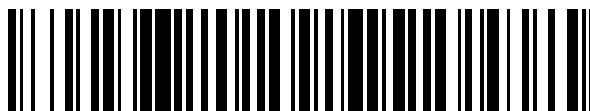


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 240**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09774297 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2310492**

54 Título: **Diferenciación de las células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

**30.06.2008 US 76908 P**

**30.06.2008 US 76900 P**

**30.06.2008 US 76915 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2015**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)**

**800/850 Ridgeview Drive**

**Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**LIU, JIAJIAN;**

**DAVIS, JANET;**

**PARMENTER, CHRISTINE y**

**BONNET, PASCAL GHISLAIN ANDRÉ**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 552 240 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

**Diferenciación de las células madre pluripotentes****ÁREA DEL INVENTO**

5 Este invento es dirigido a métodos para diferenciar a células madres pluripotentes. En particular, este invento es dirigido a métodos y composiciones para diferenciar células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo que comprenden el cultivo de las células madres pluripotentes en un medio que comprende un monto suficiente de GDF-8 para causar la diferenciación de las células madres pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

10

**ANTECEDENTES**

15 Avances en las terapias de reemplazo celular para diabetes mellitus Tipo I y una escasez de islotes transportables de Langerhans han enfocado el interés al desarrollo de fuentes de células que produzcan insulina, o células  $\beta$ , apropiadas para injertos. Un método es la generación de células  $\beta$  de células madre pluripotentes, tales como, por ejemplo, células madres embrionarias.

20 En el desarrollo embrionario vertebrado, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden a 3 capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso que se conoce como gastrulación. Tejidos tales como, por ejemplo, el tiroides, los timos, los páncreas, los intestinos, y el hígado, se desarrollarán del endodermo, por medio de una etapa intermedia. La etapa intermedia de este proceso es la formación de un endodermo definitivo. Las células endodérmicas definitivas expresan a varios marcadores, tales como, por ejemplo, HNF-3beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

25 La formación del páncreas surge de la diferenciación de endodermos definitivos a endodermos pancreáticos. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreático-duodenal, PDX1. En la ausencia del PDX1, el páncreas no puede desarrollar más allá de la formación de brotes ventrales y dorsales. Por lo tanto, la expresión de PDX1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejidos exocrinos y endocrinos. Tejidos exocrinos y endocrinos surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

30

35 Se han reportado células que portan las características de las células islotes que se han derivado de células embrionarias del ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science (Ciencia) 292:1389, 2001) reporta la diferenciación de células madres embrionarias de ratón a estructuras secretoras de insulina similares a los islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) reporta que células secretoras de insulina derivadas de las células madres embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones diabéticos inducidos por la estreptozotocina.

35

40 En un ejemplo, Hori et al. (PNAS 99: 16105, 2002) presenta que el tratamiento de las células madres embrionarias de ratón con inhibidores de Fosfoinositol 3-quinasa (LY294002) produjo células que se asemejaban a células  $\beta$ .

40

En otro ejemplo, Blyszczuk et al. (PNAS 100:998, 2003) reporta la generación de células que producen insulina a partir de células madre embrionarias de ratón que expresan constitutivamente a Pax4.

45 Micallef et al. reporta que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madres embrionarias para formar endodermos pancreáticos positivos de Pdx1. El ácido retinoico es más efectivo para inducir la expresión de Pdx1 cuando se agrega cultivos durante el día 4 de la diferenciación de células madres embrionarias durante un período que corresponde al final de la gastrulación en el embrión diabetes 54:301, 2005).

45

50 Miyazaki et al. reporta una línea de células madres embrionarias de ratón que sobre-expresan a Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 mejoró la expresión de genes de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina3, p48, Pax6, y HNF6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

50

55 Skoudy et al. reporta que la activina A (un miembro de la súper familia TGF-  $\beta$ ) mejora la expresión de los genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en las células madres embrionarias de ratón.

55

60 El efecto máximo fue observado utilizando 1 nM de activina A. También se observó que el nivel de expresión de la insulina y el ARNm de Pdx1 no fueron afectados por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento de 3nM de FGF7 resultó en un nivel incrementado de la transcripción para Pdx1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

60

65 Shiraki et ál. Estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que mejoran específicamente la diferenciación de las células madre embrionarias a células positivas de Pdx1. Ellos observaron que TGF $\beta$  produjo reproduciblemente una proporción más alta de células positivas de Pdx1 (Genes Cells (Células de Genes). 2005 Junio; 10(6): 503-16).

65

Gordon et ál. demostró la inducción de las células del endodermo brachyury [positivas]/ HNF-3beta [positivas] de las células madres embrionarias de ratón en la ausencia de sueros y en la presencia de activina junto con un inhibidor de señales Wnt (US 2006/0003446A 1).

5 Gordon et ál. (PNAS, Vol 103, página 16806, 2006) declara: "Wnt and TGF-beta/ nodal/ activin signaling simultaneously were required for the generation of the anterior primitive streak" ("Wnt y TGF-beta/nodal/ Activina que señalan simultáneamente fueron requeridas para la generación del rasgo primitiva anterior").

10 Sin embargo, el modelo de ratón del desarrollo de células madres embrionarias puede que no mimeticen exactamente el programa de desarrollo en los mamíferos de niveles más altos, tales como, un ejemplo, humanos.

15 D'Amour et ál. describe la producción de cultivos enriquecidos de endodermos más definitivos derivados de células madres embrionarias humanas en la presencia de una alta concentración de activina y bajo suero (D'Amour K A et al. 2005). Trasplantar estas células bajo las cápsulas de los riñones de ratones resultó en la diferenciación a más células maduras con las características de algunos órganos endodérmicos. Las células endodérmicas definitivas derivadas de células madre embrionarias humanas pueden ser diferenciadas aún más en células positivas de PDX1 después de agregar FGF-10 (US 2005/0266554A1).

20 D'Amour et al. (Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) --24, 1392-1401 (2006)) declara: "We have developed a differentiation process that converts human embryonic stem (hES) cells to endocrine cells capable of synthesizing the pancreatic hormones insulin, glucagon, somatostatin, pancreatic polypeptide and ghrelin. This process mimics in vivo pancreatic organogenesis by directing cells through stages resembling definitive endoderm, gut-tube endoderm, pancreatic endoderm and endocrine precursor en route to cells that express endocrine hormones" ("Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte a células madre embrionarias humanas (hES - human embryonic stem) a células endocrinas capaces de sintetizar la insulina, el glucagón, la somatostatina, el polipéptido pancreático y la grelina de las hormonas pancreáticas. Éste proceso mimetiza in vivo la organogénesis pancreática al dirigir a las células a través de etapas que se asemejan a precursores definitivos endodérmicos, del tubo intestinal endodérmico, del endodermo y de la endocrina en ruta a las células que expresan a las hormonas endocrinas".

25 En otro ejemplo, Fisk et ál. reporta un sistema para producir células islotes a partir de células madres embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la senda de diferenciación fue dividida en 3 etapas. Las células madres embrionarias humanas fueron diferenciadas primero al endodermo utilizando una combinación de n-butirato y activina A. las células fueron cultivadas entonces con antagonistas de TGFβ tales como Noggin en combinación con EGF o betacelulina para generar células positivas de PDX1. La terminación diferencial fue inducida por medio de nicotinamida.

30 En un ejemplo, Benvenistry et al. declara: "We conclude that over-expression of PDX1 enhanced expression of pancreatic enriched genes, induction of insulin expression may require additional signals that are only present in vivo" ("Concluimos que la sobreexpresión de la expresión mejorada de PDX1 de los genes enriquecidos pancreáticos, la inducción de expresión insulínica podría requerir señales adicionales que sólo están presentes in vivo") (Benvenistry et al, Stem Cells (Células Madre) 2006; 24:1923-1930).

35 La activina A es un miembro de la familia TGF-beta que exhibe un amplio rango de actividades biológicas incluyendo la regulación de la proliferación y diferenciación celular, y la promoción de supervivencia neural. El aislamiento y purificación de la activina A es a menudo complejo y puede resultar a menudo en producciones bajas. Por ejemplo, Pangas S.A. y Woodruff, T.K. Declaran: "Inhibin and activin are protein hormones with diverse physiological roles including the regulation of pituitary FSH secretion. Like other members of the transforming growth factor-β gene family, they undergo processing from larger precursor molecules as well as assembly into functional dimers. Isolation of inhibin and activin from natural sources can only produce limited quantities of bioactive protein" ("La inhibina y la activina son hormonas proteínicas con roles fisiológicos diversos incluyendo la regulación de la secreción FSH pituitaria. En una forma parecida a otros miembros de la familia genética del factor de crecimiento I3 transformante, ellas experimentan procesamientos de moléculas precursoras más grandes así como su ensamblaje a dímeros funcionales. El aislamiento de la inhibina y de activina a partir de fuentes naturales sólo puede producir cantidades limitadas de la proteína bioactiva"). (J. Endocrinol. 172 (2002) 199-210).

40 En otro ejemplo, Arai, K. Y. et al declara: "Activins are multifunctional growth factors belonging to the transforming growth factor-β superfamily. Isolation of activins from natural sources requires many steps and only produces limited quantities. Even though recombinant preparations have been used in recent studies, purification of recombinant activins still requires multiple steps" ("Las activinas son factores de crecimiento multi - funcionales de la súper familia del factor de crecimiento transformante β. El aislamiento de activinas a partir de fuentes naturales requieren muchos pasos y solamente se producen cantidades limitadas. Aunque las preparaciones recombinantes han sido utilizadas en recientes estudios, la purificación de activinas recombinantes todavía requiere varios pasos"). (Protein Expression and Purification (Expresión y Purificación Proteínica) 49 (2006) 78-82).

65

Por lo tanto, todavía queda una necesidad significativa para alternativas de activina A para facilitar la diferenciación de células madres pluripotentes.

**RESUMEN**

5 En una sección, este invento suministra un método para diferenciar células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, comprendiendo cultivos de las células madres pluripotentes en medios que comprenden un monto suficiente de GDF-8 para causar la diferenciación de las células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

10 En una sección, el medio que comprende un monto suficiente de GDF-8 también contiene por lo menos otro compuesto más. En una sección, el compuesto adicional es una anilina-piridinotriazina. En otra sección, el otro compuesto adicional es una anilina- piridinotriazina cíclica.

**DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS**

La **figura 1** muestra la diferenciación de células madre embrionarias humanas H1 a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. La diferenciación fue determinada al medir el número de células (panel A) y la intensidad SOX17 (panel B) utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (Analizador Celular IN 1000) (GE Healthcare). Las células madre embrionarias humanas fueron tratadas durante un periodo total de 4 días con un medio que contenía 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y activina A con las concentraciones indicadas (barras negras) o un medio sin Wnt3a pero con activina A a las concentraciones indicadas (barras blancas).

La **figura 2** muestra la relación de respuestas de dosis de activina A y GDF8 utilizadas para diferenciar células de la línea H1 de células madres embrionarias humanas hacia células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Las células fueron tratadas durante un periodo total de 3 días con activina A o GDF8 con las concentraciones mostradas en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a en el primer día del ensayo. La diferenciación fue determinada al medir la intensidad SOX17 utilizando una sonda de anticuerpos fluorescentes y un análisis de contenidos altos en un IN Cell Analyzer 1000 (Analizador Celular IN) de GE Healthcare.

La **figura 3** muestra la expresión de CXCR4 en células después del primer paso de diferenciación, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 12. Las células H1 fueron tratadas con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 200 nanogramos/mililitros de GDF-8 durante un periodo total de 3 días en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5 µM del compuesto 34 o 2.5 µM del compuesto 56 durante todos los 3 días. La expresión de CXCR4 fue medida utilizando una sonda de anticuerpos fluorescentes y citometría de flujo, produciendo los porcentajes de células positivas que se muestran.

La **figura 4** muestra la expresión de SOX17 en las células después de 3 días de diferenciación a endodermos más definitivos de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 12. Las células de H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 200 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5 µM del compuesto 34 o 2.5 µM del compuesto 56 durante los 3 días. La diferenciación fue determinada al medir la intensidad de SOX17 (barras negras) y el número de células resultante (barras blancas) con sondas de anticuerpos fluorescentes y un análisis de alto contenido en un analizador celular IN de GE Healthcare.

La **figura 5** muestra la expresión de las proteínas PDX1 y PDX2 en las células después del 3<sup>er</sup> paso de diferenciación, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 12. Las células H1 fueron tratadas por un periodo total de 3 días con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 200 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5 µM del compuesto 34 o 2.5 µM del compuesto 56 durante todos los 3 días seguidos por una diferenciación subsiguiente a través del 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> pasos de diferenciación. La expresión proteínica y los números celulares, tal como fueron determinados por las ondas de anticuerpos fluorescentes y el análisis de alto contenido, se muestran para cada grupo de tratamiento. Para propósitos comparativos, los valores son estandarizados en relación al tratamiento con activina A/Wnt3a.

La **figura 6** muestra la expresión de la proteína PDX1 (barras blancas) y el número de células (barras negras) en las células después del cuarto paso de diferenciación, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 12. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de tiempo de 3 días con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 200 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5 µM del compuesto 34 o 2.5 µM del compuesto 56 durante los 3 días seguido por una diferenciación subsiguiente a través de los pasos 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> y cuarto de la diferenciación. La expresión proteínica y los números celulares, tal como se determinó con sondas de anticuerpos fluorescentes y análisis de alto contenido, se muestran para cada grupo de tratamiento. Para propósitos comparativos, los valores son estandarizados en relación al tratamiento con activina A / Wnt3a.

65

5 La **figura 7** muestra la expresión proteínica para insulina y glucagón y el número celular en células diferenciadas de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 12. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días con 100 nanogramos/mililitros de Activina A o 200 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 34 o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 56 durante todos los 3 días seguido por la diferenciación subsiguiente a través del 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, cuarto y 5<sup>o</sup> pasos de diferenciación. La expresión proteínica y los números de células, tal como se determinó con las sondas de anticuerpos fluorescentes y el análisis de alto contenido se muestran para cada grupo de tratamiento. Para propósitos comparativos, los valores son normalizados en relación al tratamiento con activina A / Wnt3a.

10 La **figura 8** muestra la expresión proteínica de SOX17 y el número de células en las células madre embrionarias después de la diferenciación al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 13. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 4 días con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de un factor de crecimiento GDF en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 34 o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 56 durante los primeros 2 días del ensayo. La expresión proteínica de SOX17 (barras negras) y los números de células (barras blancas), tal como se determinó con las sondas de anticuerpos fluorescentes y los análisis de altos contenidos, se muestran para cada grupo de tratamiento. Para propósitos comparativos, los valores son estandarizados en relación al tratamiento con activina A / Wnt3A. El panel 8A muestra una serie de condiciones de control para la diferenciación en la ausencia de cualquiera de los factores de crecimiento (NINGUNO), o con el tratamiento de activina A / Wnt3a (AA / Wnt3a) o con reactivos individuales por sí solos. El panel 8B muestra una diferenciación con GDF-3, individualmente o en múltiples combinaciones con Wnt3a, el compuesto 34 o el compuesto 56. El panel 8C muestra una diferenciación con GDF-5, individualmente o en varias combinaciones con Wnt3a, el compuesto 34 o el compuesto 56. El panel 8D muestra la diferenciación con GDF-8, individualmente o en combinaciones múltiples con Wnt3a, el compuesto 34 o el compuesto 56. El panel 8E muestra la diferenciación con GDF-10, individualmente o en varias combinaciones con Wnt3a, el compuesto 34 o el compuesto 56. El panel 8F muestra la diferenciación con GDF-11, individualmente o en varias combinaciones con Wnt3a, el compuesto 34 o el compuesto 56. El panel 8 G muestra la diferenciación con GDF-15, individualmente o en varias combinaciones con Wnt3a, el compuesto 34 o el compuesto 56.

30 La **figura 9** muestra la expresión proteínica de SOX17 en células madre embrionarias humanas después de la diferenciación a un endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 14. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días con 100 nanogramos/mililitros de activina A o varios factores de crecimiento a las concentraciones mostradas en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 34 durante el primer día del ensayo. La expresión proteínica de SOX17 (barras negras) y los números de células (barras blancas), tal como se determina por medio de sondas de anticuerpos fluorescentes y análisis de alto contenido, se muestran para cada grupo de tratamiento. Para propósitos comparativos, los valores son estandarizados en relación al tratamiento con activina A / Wnt3a. El panel 9A muestra una serie de condiciones de control para la diferenciación con Wnt3a individualmente o en la ausencia de cualquier factor de crecimiento (ninguno) o con el tratamiento de activina A / Wnt3a (AA/Wnt3a). El panel 9B muestra la diferenciación con GDF-8 (proveedor PeproTech), con las concentraciones mostradas, en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a. El panel 9C muestra la diferenciación con GDF-9 (proveedor Shenendoah), con las concentraciones mostradas, en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a. El panel 9D muestra la diferenciación con TGF $\beta$ 1, con las concentraciones mostradas, en varias combinaciones con Wnt3a o el compuesto 34. El panel 9E muestra la diferenciación con BMP2, con las concentraciones mostradas, en varias combinaciones con Wnt3a o el compuesto 34. El panel 9F muestra la diferenciación con BMP3, con las concentraciones mostradas, en varias combinaciones con Wnt3a o el compuesto 34. El panel 9G muestra la diferenciación con BMPa, con las concentraciones mostradas, en varias combinaciones con Wnt3a o el compuesto 34.

50 La **figura 10** muestra la expresión proteínica de SOX17 en las células madres embrionarias humanas después de la diferenciación al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitro de activina A O 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a. La expresión proteínica de SOX17, tal como se determinó por sondas de anticuerpos fluorescentes y análisis de alto contenido, se muestra como valores de intensidad total para cada grupo de tratamiento, probando las condiciones de control para la diferenciación sin agregar factores de crecimiento (sin tratamiento), con Wnt3a individualmente, con activina A o GDF-8 individualmente, o con tratamiento de activina A / Wnt3a o con tratamiento de GDF-8 / Wnt3a, donde Wnt3a fue agregado solamente durante el primer día del ensayo o durante todos los 3 días del ensayo como se mostró.

60 La **figura 11** muestra la expresión proteínica de SOX17 en células madres embrionarias humanas después de la diferenciación a endoderms definitivos, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de activina A en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel a), compuesto 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), compuesto 34 (panel F), o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) en las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado

65

únicamente en el primer día del ensayo. La expresión proteínica para SOX17, tal como se determinó con sondas de anticuerpos fluorescentes y análisis de alto contenido, se muestra por medio de valores totales de intensidad.

5 **La figura 12** muestra la expresión proteínica de SOX17 en las células madre embrionarias humanas después de la diferenciación al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de activina A en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel A), compuesto 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), el compuesto 34 (panel F), o el BIO inhibidor de GSKe (panel G)) con las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado durante todos los 3 días del ensayo. La expresión proteínica para SOX17, tal como se determinó con sondas de anticuerpos fluorescentes y análisis de alto contenido, se muestra por medio de los valores totales de intensidad.

15 La **figura 13** muestra la expresión proteínica de SOX17 en células madres embrionarias humanas después de la diferenciación al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel A), compuestos 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), el compuesto 34 (panel F) o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) a las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado únicamente en el primer día del ensayo. La expresión proteínica para SOX17, tal como se determinó por las ondas de anticuerpos fluorescentes y el análisis de alto contenido, se muestra por los valores totales de intensidad.

25 La **figura 14** muestra la expresión proteínica de SOX17 en las células madres embrionarias humanas después de su diferenciación al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel a), compuesto 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), compuesto 34 (panel F) o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) con las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado durante 2 los 3 días del ensayo. La expresión proteínica para SOX17, tal como se determinó por sondas de anticuerpos fluorescentes y análisis de alto contenido, se mostró por medio de los valores totales de intensidad.

30 La **figura 15** muestra las producciones de números celulares después de la diferenciación de las células madres embrionarias humanas al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a. Los números de células, tal como se determinó con una sonda nuclear fluorescente y análisis de alto contenido, se muestran para cada grupo de tratamiento, las condiciones de control de pruebas para la diferenciación sin agregar factores de crecimiento (sin tratamiento), con Wnt3a individualmente, con activina A o GDF-8 individualmente, o con el tratamiento de activina A / Wnt3a o el tratamiento de GDF-8 / Wnt3a, donde Wnt3a fue agregado únicamente durante el primer día del ensayo durante todos los 3 días en el ensayo como se mostró.

35 La **figura 16** muestra las producciones de números de células después de la diferenciación de las células madres embrionarias humanas al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células de H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de activina A en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel A), compuesto 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), compuesto 34 (panel F), o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) con las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado únicamente durante el primer día del ensayo. Las producciones de números de células, tal como se determinó con una sonda nuclear fluorescente y un análisis de alto contenido, son mostradas.

40 La **figura 17** muestra producciones de números de células después de la diferenciación de células madres embrionarias humanas al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de activina A en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel a), compuesto 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), compuesto 34 (panel F), o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) con las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado durante los 3 días del ensayo. Las producciones de números de células, tal como se determinó con una sonda nuclear fluorescente y un análisis de altos contenidos, son mostradas.

45 La **figura 18** muestra las producciones en números de células después de la diferenciación de las células madres embrionarias humanas al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un periodo total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con el compuesto de prueba (compuesto 181 (panel A), compuestos 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), compuesto 34 (panel F), o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) en las concentraciones mostradas, donde el compuesto de

65

prueba fue agregado únicamente durante el primer día del ensayo. Las producciones en números de células, tal como se determinó con una sonda nuclear fluorescente y análisis de alto contenido, son mostradas.

5 **[0045] La figura 19** muestra las producciones en números de células después de la diferenciación de las células madres embrionarias humanas al endodermo definitivo, de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 15. Las células H1 fueron tratadas durante un período total de 3 días en varias exposiciones cronometradas con 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 en combinación con un compuesto de prueba (compuesto 181 (panel A), compuesto 180 (panel B), compuesto 19 (panel C), compuesto 202 (panel D), compuesto 40 (panel E), compuesto 34 (panel F), o el BIO inhibidor de GSK3 (panel G)) con las concentraciones mostradas, donde el compuesto de prueba fue agregado durante los 3 días del ensayo. Las producciones en números de células, tal como se determinó con una sonda nuclear fluorescente y un análisis de alto contenido, son mostradas.

15 La **figura 20** muestra la expresión de varios marcadores proteínicos en las células a lo largo de los múltiples pasos de diferenciación de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 16. Las células H1 fueron tratadas con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 durante un período total de 3 días en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5  $\mu\text{M}$  de varios compuestos (el compuesto 19, el compuesto 202, el compuesto 40 o el BIO inhibidor de GSK3) agregado únicamente durante el primer día. **La figura 20, en el panel A** muestra el análisis de FACS para el marcador de endodermo definitivo, CXCR4, en las células después del primer paso de diferenciación. La expresión de CXCR4 fue medida usando una sonda de anticuerpos fluorescentes y citometría de flujo, produciendo los porcentajes de células positivas tal como se muestra. **La figura 20, en el panel B** muestra un análisis de una imagen de alto contenido para la expresión proteínica estandarizada de SOX17 (barras negras) y los números de células recuperadas (barras blancas) que resultan del primer paso de diferenciación, probando a los tratamientos correspondientes mostrados. **La figura 20, en el panel C** muestra un análisis de imágenes de alto contenido para los números de células relativos recuperados de los cultivos tratados por medio del paso 5 de la diferenciación. **La figura 20, en el panel D** muestra el análisis de imágenes de alto contenido para la expresión proteínica de glucagón de cultivos tratados por medio del paso 5 de la diferenciación. **La figura 20 en el panel E** muestra el análisis de imágenes de alto contenido para la expresión proteínica de insulina de cultivos tratados a lo largo del paso 5 de la diferenciación. **La figura 20 en el panel F** muestra la tasa de la expresión de glucagón a insulina en las células de los cultivos tratados a lo largo del paso 5 de la diferenciación. Para propósitos comparativos, los valores de expresión en los paneles B, C, D, E y F son estandarizados para controlar el tratamiento con activina A y Wnt3a durante el paso 1.

35 La **figura 21** muestra la expresión de varias proteínas y marcadores de RT-PCR en células a lo largo de varios pasos de diferenciación de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 17. Las células H1 fueron tratadas con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 durante un período total de 3 días en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o varios compuestos con las siguientes concentraciones (compuesto 181, compuesto 180, compuesto 19, compuesto 202, compuesto 40, compuesto 56 o el BIO inhibidor de GSK3) agregado únicamente durante el primer día. El análisis FACS para el marcador de endodermo definitivo, CXCR4, fue mostrado en las células después del primer paso de diferenciación donde el tratamiento combinó a activina A (**panel A**) o GDF-8 (**panel B**) con Wnt3a o varios compuestos. La expresión CXCR4 fue medida utilizando una sonda de anticuerpos fluorescentes y citometría de flujo, produciendo los porcentajes de células positivas tal como se muestra. En paneles subsiguientes de la figura 21, los valores RT-PCR estandarizados para varios marcadores de diferenciación se muestran con sus tratamientos respectivos utilizando activina A o GDF-8 durante el primer paso de diferenciación tal como se muestra a continuación: los marcadores al final del paso uno de diferenciación para los tratamientos que combinan a la activina A (**panel C**) o GDF-8 (**panel D**); los marcadores al final del paso 3 de diferenciación para los tratamientos se combinan a activina A (**panel E**) o a GDF-8 (**panel F**); los marcadores al final del paso 4 de diferenciación para los tratamientos que combinan a activina A (**panel G**) o a GDF-8 (**panel H**); los marcadores al final del paso 5 de diferenciación para los tratamientos se combinan a activina A (**panel I**) o a GDF-8 (**panel J**). En la conclusión del paso 5 de diferenciación, un análisis de alto contenido fue realizado para medir los números celulares recuperados para los tratamientos correspondientes durante el primer paso de diferenciación utilizando activina A (**panel K**) o GDF-8 (**panel M**). Se utilizó un análisis de alto contenido para medir la intensidad de glucagón y de insulina en las poblaciones de células recuperadas al final del paso 5 de la diferenciación, que corresponde al tratamiento con activina A (**panel L**) o GDF-8 (**panel N**) durante el primer paso de diferenciación.

55 La **figura 22** muestra la expresión de varias proteínas y marcadores RT-PCR en las células tratadas de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 18. Las células H1 fueron tratadas con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 durante un período total de 3 días en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a durante el primer día o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 40 o 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto 202 únicamente durante el primer día. **La figura 22 en el panel A** muestra el análisis FACS para el marcador de endodermo definitivo, CXCR4, en las células después del primer paso de diferenciación. La expresión de CXCR4 fue medida usando una sonda de anticuerpos fluorescentes y citometría de flujo, produciendo los porcentajes de células positivas tal como se mostró. En la **figura 22, en el panel B**, los valores de RT-PCR estandarizados para varios marcadores de diferenciación en las células recuperadas después del cuarto paso de diferenciación se muestran correspondiendo a los tratamientos

65

respectivos utilizando activina A / Wnt3a o GDF-8 / compuesto 40 o GDF-8 / compuesto 202 durante el primer paso de diferenciación.

5 La **figura 23** muestra el nivel de péptidos C detectados en los ratones SCID beige que recibieron las células al final del paso 4 del protocolo de diferenciación tal como se describió en el ejemplo 18.

10 La **figura 24** en el panel A muestra la expresión de CXCR4, tal como se determinó por medio de FACS en las células al final del paso uno del protocolo de diferenciación descrita en el ejemplo 19. El panel B muestra la expresión de varios genes, tal como se determinó por medio de RT-PCR en las células al final del paso 4 del protocolo de diferenciación descrito en el ejemplo 19. Dos réplicas experimentales diferentes son mostradas (Rep-1 y Rep-2), cada una expuesta a protocolos de tratamientos idénticos. El panel C muestra el nivel de péptidos C detectados en los ratones SCID-beige que recibieron las células al final del paso 4 del protocolo de diferenciación de acuerdo a como fueron tratados con GDF-8 y Wnt3a durante el primer paso de la diferenciación in vitro. El panel D muestra el nivel de péptidos C detectados en los ratones SCID-beige que recibieron las células al final del paso 4 del protocolo de diferenciación de acuerdo a como fueron tratados con GDF-8 y el compuesto 28 durante el primer paso de diferenciación in vitro.

20 La **figura 25** muestra el número de células (panel A) y la expresión de CXCR4 (panel B) de las células cultivadas en esferas micro portadoras, tratadas de acuerdo a los métodos de este invento tal como se describió en el ejemplo 22. Las células fueron cultivadas en esferas de Cytodex3 sin tratamiento (sin ser diferenciados) o con tratamiento combinando 100 nanogramos/mililitros de activina A con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (AA/Wnt3a) o con varios tratamientos combinando a GDF-8 tal como se mostró: 50 nanogramos/mililitros de GDF-8 con 2.5 µM del compuesto 34 (Cmp 34 + 8); o 50 nanogramos/mililitros de GDF-8 con 2.5 µM del compuesto 34 y 50 nanogramos/mililitros de PDGF (Cmp 34 + 8 + D); o 50 nanogramos/mililitros de GDF-8 con 2.5 µM del compuesto 34 y 50 nanogramos/mililitros de PDGF y 50 nanogramos/mililitros de VEGF (Cmp 34 + 8 + D + V); o 50 nanogramos/mililitros de GDF-8 con 2.5 µM del compuesto 34 y 50 nanogramos/mililitros de PDGF y 50 nanogramos/mililitros de VEGF y 20 nanogramos/mililitros de muscimol (Cmp 34 + 8 + D + V + M).

30 La **figura 26** muestra la proliferación de células después del tratamiento de los compuestos de este invento tal como se describió en el ejemplo 23. **Desde el panel B al panel I** muestran los resultados de los ensayos para el tratamiento utilizando un compuesto en combinación con GDF-8 y midiendo las lecturas MTS OD después de uno, 2 y 3 días después de iniciar el ensayo de diferenciación.

35 La **figura 27** muestra la expresión de varias proteínas y genes de las células cultivadas en las esferas micro portadoras, tratadas de acuerdo a los métodos de este invento. El **panel A** muestra la expresión positiva porcentual de CXCR4, CD99 y CD9 tal como se determinó por medio de FACS en las células al final del paso uno del protocolo de diferenciación descrito en el ejemplo 24. El **panel B** muestra las células recuperadas de los tratamientos, tal como se mostró, diferenciadas a través del paso 3 del protocolo de diferenciación. El **panel C** muestra los valores ddCT para varios marcadores genéticos expresados en las células tratadas tal como se mostró en el paso y diferenciados a lo largo del paso 3 del protocolo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Para claridad de la presentación, y no en forma de limitación, la descripción detallada del invento es dividida en las siguientes subsecciones para describir o ilustrar ciertas características, secciones o aplicaciones de este invento.

### Definiciones

50 Las células madres son células no diferenciadas definidas por su capacidad a un nivel celular único para auto renovarse y diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores auto renovables, progenitores no renovables y células diferenciadas terminalmente. Las células madres también son caracterizadas por su habilidad para diferenciarse in vitro a células funcionales de varios linajes celulares a partir de capas germinales múltiples (Endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de varias capas germinales después de su trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, o a todos los tejidos después de su disertación de blastocistos.

60 Las células madres son clasificadas por su potencial de desarrollo como se indica a continuación: (1) totipotentes, significando que tienen la capacidad para dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios y extra embrionarios; (2) pluripotentes, que tiene la capacidad para dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios; (3) multipotetes, que tiene la capacidad para dar lugar a un subconjunto de linajes celulares pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC – hematopoietic stem cells) pueden producir progenies que incluyen a HSC (auto renovación), progenitores oligopotentes restringidos de células sanguíneas, y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes que pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células

65



madres multipotentes; y (5) unipotentes; que pueden dar lugar a un solo linaje celular (por ejemplo, células madres espermatozógenas).

5 La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada tal como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida a la diferenciación es una que ha tomado una posición más especializada (“comprometida”) dentro del linaje de una célula. El término “comprometida”, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en el sendero de diferenciación hasta un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará a diferenciarse a un tipo de célula específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo celular diferente o revertirse a un tipo celular menos diferenciado. La des-diferenciación se refiere al proceso por el cual la célula se revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza aquí, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células vino y a qué células dará lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador de linaje específico se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de células de un linaje de interés y puede ser utilizado para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida al linaje de interés.

20 “El linaje de célula  $\beta$ ” se refiere a las células con expresión genética positiva para el factor de transcripción de PDX-1 y por lo menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 beta, MAFA, PAX4, o PAX6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de la célula  $\beta$  incluyen a las células  $\beta$ .

25 “Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo”, o “células de la etapa uno” o “etapa uno”, tal como se utiliza aquí, se refiere a las células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteínas homeobox similares a mixtas, FGF4 CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen a las células precursoras de rasgos primitivos, células mesendodérmicas y células endodérmicas definitivas.

30 “Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático”, tal como se utiliza aquí, se refiere a las células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, HNF-1 beta, PTF1 alfa, HNF6, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico pancreático incluyen células endodérmicas pancreáticas, células primitivas del tubo intestinal, y células posteriores del intestino anterior.

35 “Las células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático”, o “células de la etapa 5”, o “etapa 5”, tal como se utiliza aquí, se refiere a células que expresan a por lo menos uno de los siguientes marcadores: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, o PTF-1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos de linaje endocrino pancreático incluyen células endocrinas pancreáticas, células que expresan a la hormona pancreática y células que secretan a la hormona pancreática, y células de linaje celular  $\beta$ .

40 “Endodermo definitivo” tal como se utiliza aquí, se refiere a las células que portan las características de las células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman la senda gastrointestinal y sus derivados. Las células endodérmicas definitivas expresan los siguientes marcadores: HNF-3 beta, GATA4, SOX-17, Cerberus, OTX2, gooseoid, C-Kit, CD99, o MIXL1.

45 “Endodermo extra embrionario”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una población de células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: SOX7, AFP, o SPARC.

50 “Marcadores”, tal como se utiliza aquí, son las moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos que son expresadas diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un nivel incrementado para un marcador positivo y un nivel reducido para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido marcador es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés comparadas a otras células, que la célula de interés puede ser identificada y distinguida de otras células utilizando una variedad de métodos conocidos en la industria.

55 “Célula mesendodérmica”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa por lo menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (EOMES), SOX17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17, o GATA-6.

60 “Célula endocrina pancreática” o “célula que expresa la hormona pancreática”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptidos pancreáticos.

65 “Células endodérmicas pancreática” o “células de la etapa 4” o “etapa 4”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de expresar por lo menos uno de los siguientes marcadores: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, PAX4, o NKX2.2.

“Célula que produce hormonas pancreáticas”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de producir por lo menos una de las siguientes hormonas: Insulina, glucagón, somatostatina y polipéptidos pancreáticos.

5 “Células secretora de hormonas pancreáticas”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de secretar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptidos pancreáticos.

10 “Célula posterior del intestino anterior” o “células de la etapa 3”, o “etapa 3”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula que puede secretar por lo menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, HNF1, PTF-1 alfa, HNF6, HB-9, o PROX-1.

“Célula de rasgos pre-primitivos”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa por lo menos uno de los siguientes marcadores: Nodal o FGF8.

15 “Célula primitiva del conducto intestinal” o “células de la etapa 2” o “etapa 2”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de secretar por lo menos uno de los siguientes marcadores: HNF1, HNF-4 alfa.

20 “Célula de rasgos primitivos”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa por lo menos uno de los siguientes marcadores: Brachyury, proteína de homeobox tipo mixta, o FGF4.

### **Aislamiento, expansión y cultivos de células madres pluripotentes**

#### *Caracterización de las células madres pluripotentes*

25 La pluripotencia de las células madres puede ser confirmada, por ejemplo, al inyectar células a ratones con una severa inmunodeficiencia combinada (SCID – severe combined immunodeficient), fijando los teratomas que se forman utilizando un 4 por ciento de paraformaldehído, y examinándolos entonces histológicamente para detectar evidencia de tipo de célula de las 3 capas germinales. Alternamente, la pluripotencia puede ser determinada por medio de la creación y evaluación de cuerpos embrioides para detectar la presencia de marcadores asociados con las 3 capas germinales.

30 Las líneas de células madres pluripotentes propagadas pueden ser examinadas para detectar cariotipos utilizando una técnica estándar de bandas G y comparada a cariotipos publicados de la especie primate correspondiente. Es deseable obtener células que tienen un “cariotipo normal”, lo que significa que las células son euploides, donde todos los cromosomas humanos están presentes y no se nota que estén alterados.

35

#### *Fuentes de células madres pluripotentes*

40 Los tipos de células madres pluripotentes que pueden ser utilizados incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas de tejidos formados después de la gestación. También se contempla el uso de las composiciones de esta presentación durante el establecimiento o estabilización iniciales de estas células, en cuyo caso las células fuente serían células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejidos fuente. Además, se considera adecuado a células tomadas de una población de células madres pluripotentes ya cultivadas en la ausencia de células alimentadoras.

45 En una sección, las células madres pluripotentes son preparadas tal como se describe por Takahashi et al. (Cell 131: 1-12, 2007).

#### *Cultivo de células madres pluripotentes*

50 En una sección, las células madres pluripotentes son cultivadas típicamente en una capa de células alimentadoras que dan soporte a las células madres pluripotentes en varias formas. Alternamente, las células madres pluripotentes son cultivadas en un sistema de cultivos que es esencialmente libre de células alimentadoras pero que sin embargo soporta la proliferación de las células madres pluripotentes sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madres pluripotentes en cultivos libres de alimentadoras sin una diferenciación es logrado utilizando un medio acondicionado al cultivarse previamente con otro tipo celular. Alternamente, el crecimiento de células madres pluripotentes en un cultivo libre de alimentadoras sin diferenciación es logrado utilizando un medio definido químicamente.

55 60 Las células madres pluripotentes pueden ser colocadas en platos en un sustrato de cultivos adecuado. En una sección, el sustrato de cultivos adecuado es un componente matricial extracelular, tal como, por ejemplo, aquellos derivados de la membrana basal o que puede formar parte de los acoplamientos receptor-ligando de la molécula de adherencia. En una sección, el sustrato de cultivos adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® es una preparación soluble de las células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que se convierte en gel a la temperatura del cuarto para formar una membrana basal reconstituida.

65

Otros componentes matriciales extracelulares y mezclas de componentes son adecuadas como una alternativa. Dependiendo del tipo celular que está proliferando, esto podría incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparán, y similares, individualmente o en varias combinaciones.

- 5 Las células madres pluripotentes pueden ser puestas en platos en el sustrato en una distribución adecuada y en la presencia de un medio que promueve la supervivencia, propagación y retención celular de las características deseadas. Todas estas características se benefician de una atención cuidadosa al distribuir la siembra y pueden ser determinadas fácilmente por una persona con conocimiento en la industria.
- 10 Medios de cultivos adecuados pueden ser hechos de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium), Gibco # 11965-092; el medio de Eagle modificado de Dulbecco de Eliminación (KO DMEM - Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium), Gibco # 10829-018; medio basal F12/50% DMEM de Ham; 200mM de L- glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050;  $\beta$  - mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF - basic fibroblast growth factor) recombinante humano, Gibco # 13256-029.
- 15

**Formación de células que producen hormonas pancreáticas a partir de células madres pluripotentes**

20 En una sección, este invento suministra un método para producir células que producen hormonas pancreáticas a partir de células madres pluripotentes, que comprende los siguientes pasos:

- a. Cultivar células madres pluripotentes,
- 25 b. Diferenciar a las células madres pluripotentes en marcadores que expresan células característicos del linaje endodérmico definitivo,
- c. Diferenciar a las células que expresan a los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y
- 30 d. Diferenciar las células que expresan a los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático a células que expresan marcadores característicos de linaje endocrino pancreático.

En un aspecto de este invento, la célula endocrina pancreática es una célula que produce hormonas pancreáticas. En un aspecto alterno, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  expresa a PDX1 y a por lo menos uno de los siguientes factores de transcripciones: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 beta, MAFA, PAX4, o Pax6. En un aspecto de este invento, una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

35

40 Las células madres pluripotentes adecuadas para su uso en este invento incluyen, por ejemplo, la línea de células madres embrionarias humanas H9 (código NIH: WA09), la línea de células madres embrionarias humanas H1 (código NIH: WA01), la línea de células madres embrionarias humanas H7 (código NIH: WA07), y la línea de células madres embrionarias humanas SA002 (Cellartis, Suecia). También son adecuados para su uso en este invento las células que expresan por lo menos uno de los siguientes diferentes marcadores característicos de las células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, Connexin43, Connexin45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tral-60, or Tral-81.

45

Las células madres pluripotentes pueden ser cultivadas en una capa celular alimentadora. Alternamente, las células madres pluripotentes pueden ser cultivadas en una matriz extracelular. La matriz extracelular puede ser una preparación de membrana basal solubilizada extraída de células de sarcoma de ratones (tal como lo vende BD Biosciences bajo el nombre comercial MATRIGEL™). Alternamente, la matriz extracelular puede ser un factor de crecimiento-reducido de MATRIGEL™. Alternamente, la matriz extracelular puede ser fibronectina. En la sección alterna, las células pluripotentes son cultivadas y diferenciadas en un sustrato de cultivos de tejidos cubiertos con suero humano.

50

55 La matriz extracelular puede ser diluida antes de cubrir el sustrato de cultivos de tejidos. Ejemplos de métodos adecuados para diluir a la matriz extracelular y para recubrir al sustrato de cultivos de tejidos se puede encontrar en Kleinman, H.K., et al., Biochemistry (Bioquímica) 25:312 (1986), y Hadley, M.A., et al., J.Cell.Biol. 101:1511 (1985).

60 En una sección, la matriz extracelular es MATRIGEL™. En una sección, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ a una dilución de 1:10. En una sección alterna, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ a una dilución de 1:15. En una sección alterna, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ a una dilución de 1:30. En una sección alterna, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ a una dilución de 1:60.

65

En una sección, la matriz extracelular es MATRIGEL™ reducida por un factor de crecimiento. En una sección, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ reducida por un factor de crecimiento a una dilución de 1:10. En la sección alterna, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ reducida con un factor de crecimiento a una dilución de 1:15. En la sección alterna, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ reducida con un factor de crecimiento a una dilución de 1:30. En la sección alterna, el sustrato de cultivos de tejidos es cubierto con MATRIGEL™ reducida con un factor de crecimiento a una dilución de 1:60.

Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo son seleccionados del grupo que consiste de SOX17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox tipo mixta, FGF4 CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2. Adecuada para su uso en este invento, es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de este invento, una célula que expresa a los marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo es una célula precursora de rasgo primitiva. En un aspecto alterno, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula mesendodérmica. En un aspecto alterno, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula endodérmica definitiva.

Marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son seleccionados del grupo que consiste de PDX1, HNF-1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso en este invento es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de este invento, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula endodérmica pancreática.

Los marcadores característicos de linaje endocrino pancreático son seleccionados de un grupo que consiste de NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, y PTF-1 alfa. En una sección, la célula endocrina pancreática es capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptidos pancreáticos. Adecuado para su uso en este método es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de este invento, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa a la hormona pancreática. Alternamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula que secreta a la hormona pancreática.

#### **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo**

En un aspecto de este invento, las células madre pluripotentes pueden ser diferenciadas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al cultivar células madres pluripotentes en un medio que comprende un monto suficiente de GDF-8 para causar la diferenciación de las células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

Las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas en un medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día a 7 días. Alternamente, las células madres pluripotentes puede ser cultivadas en un medio que contenga un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día a 6 días. Alternamente, las células madres pluripotentes pueden ser cultivadas en un medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día a 5 días. Alternamente, las células madres pluripotentes pueden ser cultivadas en un medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día a 4 días. Alternamente, las células madres pluripotentes puede ser cultivadas en un medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día a 3 días. Alternamente, las células madres pluripotentes pueden ser cultivadas en un medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día a 2 días. Alternamente, las células madres pluripotentes pueden ser cultivadas en un medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante alrededor de un día.

En una sección, el GDF-8 es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En la sección alterna, el GDF-8 es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el GDF-8 es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 25 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el GDF-8 es utilizado a una concentración de alrededor de 25 nanogramos/mililitros.

En una sección, el medio que comprende un monto suficiente de GDF-8 también contiene por lo menos otro factor. En una sección, el factor adicional es seleccionado de un grupo que consiste de: EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, VEGF, muscimol, PD98059, LY294002, U0124, U0126, y butirato de sodio.

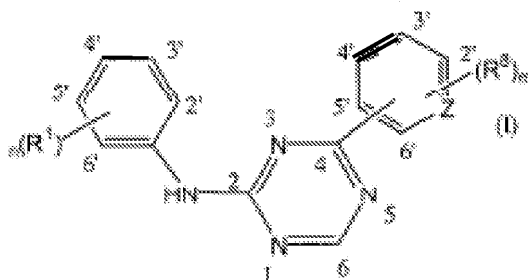
En una sección, el EGF es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el EGF es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el EGF es utilizado a una concentración de alrededor de 50 nanogramos/mililitros.

- 5 En una sección, el FGF4 es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el FGF4 es utilizado a una concentración desde alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el FGF4 es utilizado a una concentración de alrededor de 50 nanogramos/mililitros.
- 10 En una sección, el PDGF-A es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-A es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-A es utilizado a una concentración de alrededor de 50 nanogramos/mililitros.
- 15 En una sección, el PDGF-B es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-B es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-B es utilizado a una concentración de alrededor de 50 nanogramos/mililitros.
- 20 En una sección, el PDGF-C es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-C es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-C es utilizado a una concentración de 50 nanogramos/mililitros.
- 25 En una sección, el PDGF-D es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-D es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el PDGF-D es utilizado a una concentración de alrededor de 50 nanogramos/mililitros.
- 30 En una sección, el VEGF es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 500 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el VEGF es utilizado a una concentración de alrededor de 5 nanogramos/mililitros a 50 nanogramos/mililitros. En una sección alterna, el VEGF es utilizado a una concentración de alrededor de 50 nanogramos/mililitros.
- 35 En una sección, el muscimol es utilizado a una concentración de alrededor de 1 µM a 10 µM. En una sección alterna, el muscimol es utilizado a una concentración de alrededor de 1 µM a 20 µM. En una sección alterna, el muscimol es utilizado a una concentración de 20 µM.
- 40 En una sección, el PD98059 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.1 µM a 10 µM. En una sección alterna, el PD98059 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.1 µM a 1 µM. En una sección alterna, el PD98059 es utilizado a una concentración de alrededor de 1 µM.
- 45 En una sección, el LY294002 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.25 µM a 25 µM. En una sección alterna, el LY294002 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.25 µM a alrededor de 2.5 µM. En una sección alterna, el LY294002 es utilizado a una concentración de alrededor de 2.5 µM.
- 50 En una sección, el U0124 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.1 µM a 10 µM. En una sección alterna, el U0124 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.1 µM a 1 µM. En una sección alterna, el U0124 es utilizado a una concentración de alrededor de 1 µM.
- 55 En una sección, el U0126 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.1 µM a 10 µM. En una sección alterna, el U0126 es utilizado a una concentración de alrededor de 0.1 µM a 1 µM. En una sección alterna, el U0126 es utilizado a una concentración de alrededor de 1 µM.
- 60 En una sección, el butirato de sodio es utilizado a una concentración de alrededor de 0.05 µM a 5 µM. En una sección alterna, el butirato de sodio es utilizado a una concentración de alrededor de 0.05 µM a 0.5 µM. En una sección alterna el butirato de sodio es utilizado a una concentración de alrededor de 0.5 µM.
- 65 En una sección alterna, por lo menos un factor adicional es seleccionado de un grupo que consiste de: una piridinotriazina-anilina, una anilina-piridinotriazina cíclica, N - {[1- (fenilmetil) azepan-4-il] metil} -2-piridin-3-ilacetamida, 4- {[4- (4- {[2- (piridin-2-ilamino) etil] amino} -1,3,5-triazin-2-il) piridin-2-il) oxi] butan-1-ol, 3 - ({3- [4 - ({2 - [metil (piridin-2-il) amino] etil] amino} -1,3,5-triazin-2-il) piridin-2-il) amino] propan-1-ol, N-4--[2-(3-Fluorofenil)etil]-N-2-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]pirido[2,3-d]pirimidin-2,4-diamina, 1-Metil-N - [(4-piridin-3-il-2- {[3- (trifluorometil) fenil] amino} -1,3-tiazol 5 -il) metil]piperidin-4-carboxamida, 1,1 dimetiletil {2- [4 - ({5- [3- (3-hidroxi)propil] fenil] 4H-1,2,4-triazol-3-il) amino] fenil] etil} carbamato, 1,1-dimetiletilo {[3 - ({5-[5 - (3 -hidroxipropil) -2- (metiloxi) fenil] -1,3 -oxazol-2-il) amino] fenil] metil} carbamato, 1- ({5 - [6- ({4 - [(4-metil-piperazin-1-il) sulfonil] fenil} amino) pirazin-2-il] tiofen-2-il) metil} piperidin-4-ol, 1 - ({4- [6 - ({4 - [(4-metil-piperazin-1-il) sulfonil] fenil} amino) pirazin-2-il] tiofen-2-il) metil} piperidina-4- carboxamida, y 2- {[4-(1-Metiletil)fenil]aminol-N-(2-tiofen-2-iletil)-7,8-dihidropirido[4,3-d]pirimidin-6(5H)-carboxamida.

**Los compuestos de este invento**

Este invento suministra compuestos que son capaces de diferenciar a células madres pluripotentes en células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo.

En una sección, el compuesto que es capaz de diferenciar células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una anilina-piridinotriazina de la fórmula (1):



Fórmula (1).

Las formas de N- oxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y sus formas estereoquímicamente isoméricas, donde:

m representa un número entero desde el 1 al 4; n representa un número entero desde el 1 al 4; Z representa a N o a C;

R<sup>1</sup> y R<sup>8</sup> cada uno representa independientemente hidrógeno, Het<sup>14</sup>, ciano, halo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-6</sub>-, alquilo C<sub>1-6</sub>-, mono- o di (alquilo C<sub>1-4</sub>) amino-carbonil-, mono- o di (alquilo C<sub>1-4</sub>) amino-sulfonilo, alcoxi C<sub>1-6</sub>-sustituido con halo o R<sup>1</sup> representa a alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con uno o cuando sea posible 2 o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo o halo;

R<sup>2</sup> y R<sup>9</sup> cada uno representa independientemente a hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>-, alqueno C<sub>2-4</sub>-, Het<sup>3</sup>-, Het<sup>4</sup>- alquilo C<sub>1-4</sub>-, Het<sup>5</sup>-alquilcarbonil C<sub>1-4</sub>-, mono o di(alquilo C<sub>1-4</sub>)amono-alquilo C<sub>1-4</sub>-carbonilo- o fenilo sustituido opcionalmente con uno o cuando sea posible 2 o más sustituyentes seleccionados de hidrógeno, hidroxilo, amino o alquilo C<sub>1-4</sub>-;

R<sup>3</sup> y R<sup>7</sup> representan independientemente cada uno a hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>-, Het<sup>6</sup>-, Het<sup>7</sup>-alquilo C<sub>1-4</sub>-, alquilcarbonil C<sub>2-4</sub>- opcionalmente sustituido con Het<sup>8</sup>-alquilaminocarbonil C<sub>1-4</sub>- alquilsulfonil C<sub>2-4</sub>-, alquilo C<sub>1-4</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>- o fenilo sustituido opcionalmente con uno o cuando sea posible con 2 o más sustituyentes seleccionados de hidrógeno, hidroxilo, amino o alquilo C<sub>1-4</sub>-;

R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>10</sup> representan cada uno independientemente a hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituidos con hidroxilo, Het<sup>9</sup> o alquilo C<sub>1-4</sub>;

Het<sup>1</sup> y Het<sup>2</sup> representan independientemente un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolidinilo o pirazolidinilo en el que dichos Het<sup>1</sup> y Het<sup>2</sup> pueden ser sustituidos opcionalmente con amino, hidroxilo, alquilo C<sub>1-4</sub>-, hidroxilo-alcil C<sub>1-4</sub>-, fenilo, fenil-alquilo C<sub>1-4</sub>-, alquilo C<sub>1-4</sub>-oxi- alquilo C<sub>1-4</sub>- mono- o di (alquilo C<sub>1-4</sub>) amino- o-amino carbonilo;

Het<sup>3</sup> y Het<sup>6</sup> cada uno representa independientemente, un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo o piperidinilo donde dichos Het<sup>3</sup> y Het<sup>6</sup> son sustituidos opcionalmente con uno o cuando sea posible 2 o más sustituyentes seleccionados de alquilo C<sub>1-4</sub>-, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>-, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>-, alquilo C<sub>1-4</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>- o polihidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>-;

Het<sup>4</sup>, Het<sup>7</sup> y Het<sup>9</sup> representan cada uno independientemente a un heterociclo seleccionado de morfolinilo, pirrolidinilo, piperazinilo o piperidinilo en el que dichos Het<sup>4</sup>, Het<sup>7</sup> y Het<sup>9</sup> son sustituidos opcionalmente con uno o cuando sea posible 2 o más sustituyentes seleccionados de alquilo C<sub>1-4</sub>-, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>-, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>-, alquilo C<sub>1-4</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>- o polihidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>;

Het<sup>5</sup> representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo, pirrolidinilo, piperazinilo o piperidinilo donde aquel Het<sup>5</sup> es sustituido opcionalmente con uno o cuando sea posible 2 o más sustituyentes seleccionados de alquilo C<sub>1-4</sub>-, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>-, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>-, alquilo C<sub>1-4</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>- o polihidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>;

Het<sup>10</sup>, Het<sup>11</sup> y Het<sup>13</sup> representa independientemente cada uno a un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolidinilo o pirazolidinilo donde aquellos Het<sup>10</sup>, Het<sup>11</sup> y

Het<sup>13</sup> son sustituidos opcionalmente con amino, hidroxilo, alquilo C<sub>1-4</sub>, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>, fenilo, fenil- alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub>-oxi- alquilo C<sub>1-4</sub>, amino-carbonil-o mono-o di (alquil C<sub>1-4</sub>) amino-;

5 Het<sup>12</sup> representa a un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolidinilo o pirazolidinilo en el que dicho Het<sup>12</sup> es opcionalmente sustituido con amino, hidroxilo, alquilo C<sub>1-4</sub>, hidroxilo- alquilo C<sub>1-4</sub>, fenilo, fenil-alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub>-oxi-alquilo C<sub>1-4</sub>-; mono-o di (alquilo C<sub>1-4</sub>) amino-o-amino carbonilo;

10 Het<sup>14</sup> representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo; pirrolidinilo; piperazinilo; imidazolilo; pirrolilo; 2,3,4-triazapirrolilo; 1,2,3-triazolilo; pirazolilo; o piperidinilo en donde dicho Het<sup>14</sup> está opcionalmente sustituido con uno o si es posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> o polihidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>; en particular, Het<sup>14</sup> representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo; pirrolidinilo; pirrolilo; 2,3,4-triazapirrolilo; piperazinilo o piperidinilo en el que dicho Het<sup>14</sup> está opcionalmente sustituido con uno o si es posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> o polihidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>; más específicamente Het<sup>14</sup> representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo; pirrolidinilo; piperazinilo o piperidinilo en donde dicho Het<sup>14</sup> puede ser sustituido opcionalmente con uno o si es posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, hidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> o polihidroxilo-alquilo C<sub>1-4</sub>.

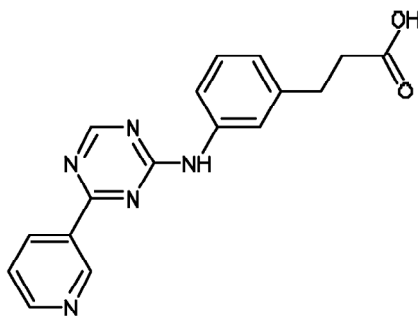
20 En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (1).

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (2).

25

30

35



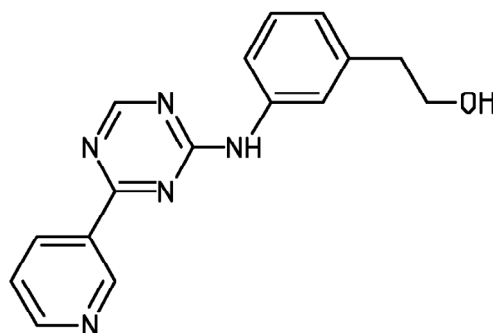
**Fórmula (2): ácido 3- {3 - [(4-piridin-3-il-1,3,5-triazin-2-il) amino] fenil} propanoico. Denominado en este documento como "el compuesto 1".**

40

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (3).

45

50



55

**Fórmula (3): 2- {3 - [(4-piridin-3-il-1,3,5-triazin-2-il) amino] fenil} etanol. Denominado aquí como "Compuesto 2".**

60

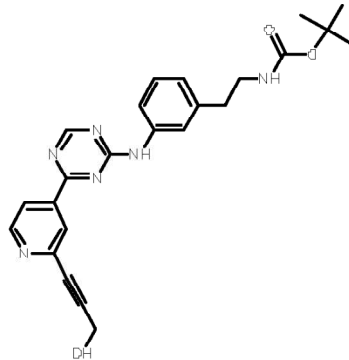
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (4).

5

10

15



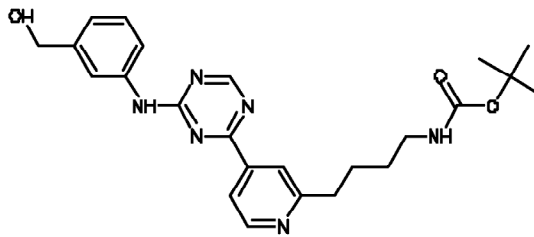
**Fórmula (4): 1,1-dimetiletil {2- [3 - [(4- [2- (3-hidroxi-prop-1-in-1-il) piridin-4-il] -1,3,5-triazin-2-il) amino] fenil] etil} carbamato. Denominado aquí como "Compuesto 3".**

20

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (5).

25

30



**Fórmula (5): 1,1-dimetiletil {4- [4- (4 - {[3- (hidroximetil) fenil] amino} -1,3,5-triazin-2-il) piridin-2-il] butil} carbamato. Denominado aquí como "Compuesto 4".**

35

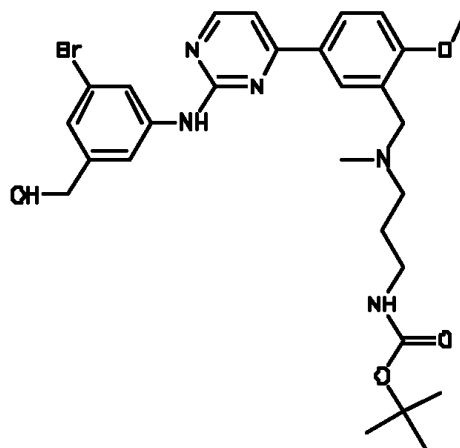
En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (6).

40

45

50

55



**Fórmula (6): 1,1-dimetiletil {3 - [[{5- (2-[[3-bromo-5-hidroxi-metil]fenil]amino)pirimidin-4-il)-2-(metiloxi)fenil]metil}(metil)amino]propil} carbamato. Denominado aquí como "Compuesto 5".**

60

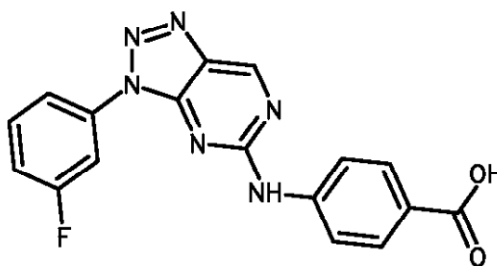
En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (7).

65



5

10

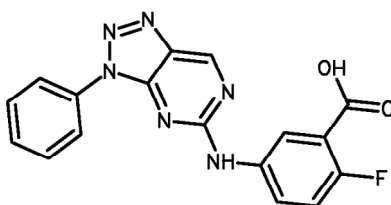


15 **Fórmula (7): ácido 4- {[3 - (3 fluorofenil) -3H [1, 2,3] triazolo [4,5-d] pirimidin-5-il] amino} benzoico. Denominado aquí como "Compuesto 6".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (8).

20

25



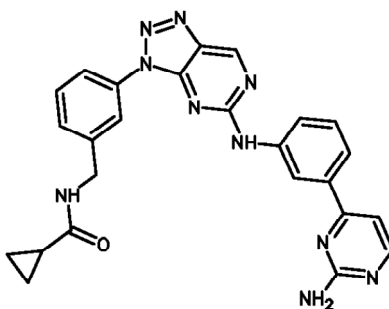
30 **Fórmula (8): ácido 2-fluoro-5 - [(3-fenil-3H- [1,2,3] triazolo [4,5-d] pirimidin-5-il] amino] benzoico. Denominado aquí como "Compuesto 7".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (9).

35

40

45



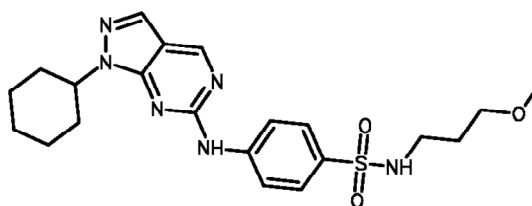
50 **Fórmula (9): N-} [3- (5-} [3- (2-aminopirimidin-4-il) fenil] amino 3H- [1, 2,3] triazolo [4,5-d] pirimidin-3 - il) fenil] metil} ciclopropanocarboxamida. Denominado aquí como "Compuesto 8".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (10).

55

60

65



**Fórmula (10): 4-[(1 -ciclohexil- 1H-pirazolo [3, 4-d] pirimidin-6-il) amino] -N- [3 - (metiloxi) propil] bencenosulfonamida. Denominado aquí como "Compuesto 9".**

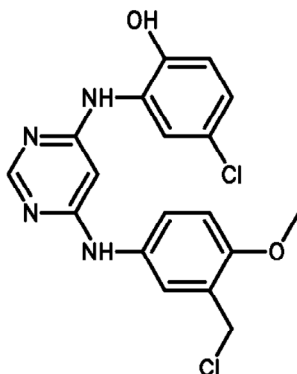
En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (11).

5

10

15

20

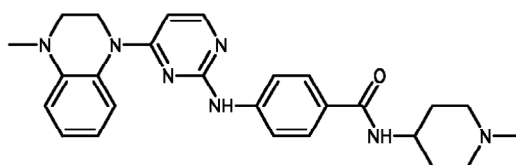


**Fórmula (11): 4-cloro-2 - {[6 - {[3 - (clorometil) -4-metoxifenil] amino} pirimidin-4-il) amino] fenol. Denominado aquí como "Compuesto 10".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (12).

25

30



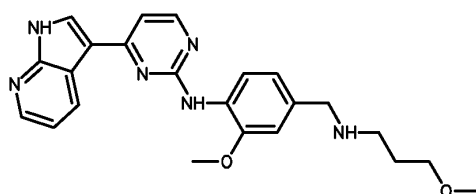
**Fórmula (12): 4 - {[4- (4-metil-3,4--dihidroquinoxalin 1 (2H) -il) pirimidin-2-il] amino} -N- (1 -methylpiperidin-4-il) benzamida. Denominado aquí como "Compuesto 11".**

35

En una sección, la anilina-piridinotriazina es un compuesto de la fórmula (13).

40

45



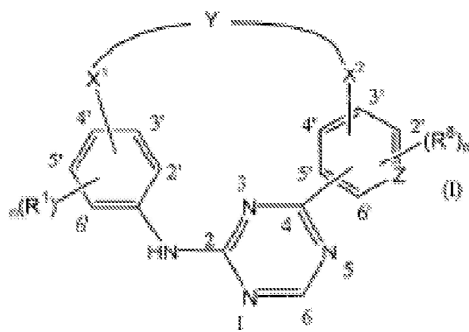
**Fórmula (13): N- (2-metoxi-4 - {[3-metoxipropilo] amino] metil} fenil) -4- (1H-pirrolo [2, 3 -b]) piridin-3 - il) pirimidin-2-amina. Denominado aquí como "Compuesto 12".**

50

En una sección, el compuesto que es capaz de diferenciar células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una anilina-piridinotriazina cíclica de la fórmula (14):

55

60



**Fórmula (14).**

65

Las formas de N- óxido, las sales de adición y sus formas estereoquímicamente isoméricas farmacéuticamente aceptables, donde:

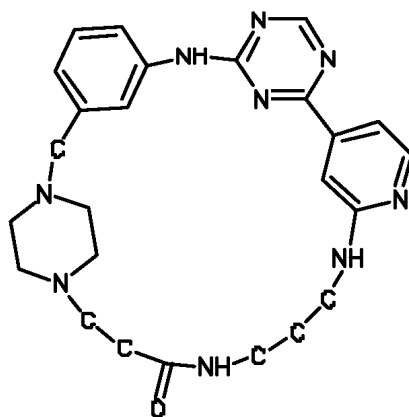
- 5 m representa un número entero desde uno a 4; n representa un número entero desde uno a 4; Z representa a N o a C;
- 10 Y representa a  $-NR^2-$  alquilo  $C_{1-6}-CO-NR^4-$ , - alquilo  $C_{1-4}-NR^9-$  alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-6}-CO-Het^{10}-$ ,  $-Het^{11}-CO-$  alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-Het^{12}-$  alquilo  $C_{1-6}$ , -  $CO-Het^{13}-$ alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-CO-NR^{10}-$  alquilo  $C_{1-6}$ , -  $Het^1-$  alquilo  $C_{1-6}-CO-NR^5-$ , o  $Het^2-CO-NR^6-$  en el que el alquilo  $C_{1-6}$ -enlazador en-  $NR^2-$  alquilo  $C_{1-6}-CO-NR^4-$ -o- $Het^1-$  alquilo  $C_{1-6}-CO-NR^5-$  está opcionalmente sustituido con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, metoxi, aminocarbonilo, halo, fenilo, indolilo, metilsulfuro, tiol, hidroxifenilo, cianofenilo, amino y hidroxycarbonilo;
- 15  $X^1$  representa un enlace directo, Alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}-$ , alquilo  $C_{1-4}-CO-$ , alqueno  $C_{2-4}$ , alqueno  $C_{2-4}$ , o alquilo  $C_{1-4}-NR^3-$ , en el que dicho alquilo  $C_{1-4}$  o alqueno  $C_{2-4}$  sustituido opcionalmente con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes halo;
- 20  $X^2$  representa un enlace directo, Alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}-$ , alquilo  $C_{1-4}-CO-$ , alqueno  $C_{2-4}$ , alqueno  $C_{2-4}$ , o alquilo  $C_{1-4}-NR^7-$ , en el que dicho alquilo  $C_{1-4}$  o alqueno  $C_{2-4}$  está opcionalmente sustituido con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes;
- 25  $R^1$  y  $R^8$  representan cada uno independientemente a hidrógeno,  $Het^{14}$ , cian, halo, hidroxilo, alcoxi  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$ , mono- o di (alquilo  $C_{1-4}$ ) amino-carbonilo, mono- o di (alquilo  $C_{1-4}$ ) amino-sulfonilo, alcoxi  $C_{1-6}$ -sustituido con halo o  $R^1$  representa a alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con uno o si es posible 2 o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo halo;
- 30  $R^2$  y  $R^9$  representan cada uno independientemente a hidrógeno, Alquilo  $C_{1-4}$ , alqueno  $C_{2-4}$ ,  $Het^3$ ,  $Het^4-$  alquilo  $C_{1-4}$ ,  $Het^5-$ alquilcarbonil  $C_{1-4}-$ , mono- o di (alquilo  $C_{1-4}$ ) amino-alquilo  $C_{1-4}$ -carbonil-o fenilo sustituido opcionalmente con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados de hidrógeno, hidroxilo, amino o alquilo  $C_{1-4}-$ ;
- 35  $R^3$  y  $R^7$  representan cada uno independientemente a hidrógeno Alquilo  $C_{1-4}$ ,  $Het^6$ ,  $Het^7-$  alquilo  $C_{1-4}$ , carbonilo  $C_{2-4}$ -opcionalmente sustituido con  $Het^8-$  alquilaminocarbonil  $C_{1-4}-$ , alquilsulfonil  $C_{2-4}-$ , alquilo  $C_{1-4}$  alquilo  $C_{1-4}-$  o fenilo sustituido opcionalmente con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados de hidrógeno, hidroxilo, amino o alquilo  $C_{1-4}-$ ;
- 40  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^{10}$  representan cada uno independientemente a hidrógeno o alquilo  $C_{1-4}$  sustituido opcionalmente con hidroxilo,  $Het^9$  o alquilo  $C_{1-4}$ ;
- 45  $Het^1$  y  $Het^2$  representan cada uno independientemente a un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolidinilo o pirazolidinilo en el que dichos  $Het^1$  y  $Het^2$  son sustituidos opcionalmente por amino, hidroxilo, alquilo  $C_{1-4}$ , hidroxilo-alquilo  $C_{1-4}-$ , fenilo, fenil-alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}-oxi-$ alquilo  $C_{1-4}$ -mono-o di (alquilo  $C_{1-4}$ ) amino-o-amino carbonilo;
- 50  $Het^3$  y  $Het^6$  representan cada uno independientemente, un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo o piperidinilo en el que dichos  $Het^3$  y  $Het^6$  son sustituidos opcionalmente por uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$ , hidroxilo- alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}$  alquilo  $C_{1-4}$  o polihidroxilo- alquilo  $C_{1-4}-$ ;
- 55  $Het^4$ ,  $Het^7$  y  $Het^9$  cada uno representa independientemente a un heterociclo seleccionado de morfolinilo, pirrolidinilo, piperazinilo o piperidinilo en el que dichos  $Het^4$ ,  $Het^7$  y  $Het^9$  están opcionalmente sustituidos con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados de alquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$ , hidroxilo- alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}$  alquilo  $C_{1-4}$  o polihidroxilo- alquilo  $C_{1-4}-$ ;
- 60  $Het^5$  representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo, pirrolidinilo, piperazinilo o piperidinilo en el que dicho  $Het^5$  es sustituido opcionalmente con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados de alquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$ , hidroxilo- alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}$  alquilo  $C_{1-4}$  o polihidroxilo- alquilo  $C_{1-4}-$ ;
- 65  $Het^{10}$ ,  $Het^{11}$  y  $Het^{13}$  representan cada uno independientemente a un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolidinilo o pirazolidinilo en donde dichos  $Het^{10}$ ,  $Het^{11}$  y  $Het^{13}$  son sustituidos opcionalmente con amino, hidroxilo, alquilo  $C_{1-4}$ , hidroxilo-alquilo  $C_{1-4}$ , fenilo, fenil-alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}-oxi-$ alquilo  $C_{1-4}$ , amino-carbonil-o mono- o di (alquilo  $C_{1-4}$ ) amino-;
- $Het^{12}$  representa a un heterociclo seleccionado de pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolidinilo o pirazolidinilo en el que dicho  $Het^{12}$  se sustituye opcionalmente con amino, hidroxilo, alquilo  $C_{1-4}$ , hidroxilo- alquilo  $C_{1-4}$ , fenilo, fenil-alquilo  $C_{1-4}$ , alquilo  $C_{1-4}-oxi-$ alquilo  $C_{1-4}-$ ; mono- o di (alquilo  $C_{1-4}$ ) amino-o-amino carbonilo;

Het<sup>14</sup> representa a un heterociclo seleccionado de morfolinilo; pirrolidinilo; piperazinilo; imidazolilo; pirrolilo; 2,3,4-triazapirrolilo; 1,2,3-triazolilo; pirazolilo; o piperidinilo en donde dicho Het<sup>14</sup> se sustituye opcionalmente con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, hidroxi- alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> o polihidroxi-alquilo C<sub>1-4</sub>; en particular, Het<sup>14</sup> representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo; pirrolidinilo; pirrolilo; 2,3,4-triazapirrolilo; piperazinilo o piperidinilo en el que dicho Het<sup>14</sup> se sustituye opcionalmente con uno o en caso de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, hidroxi-alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> o polihidroxi-C<sub>1-4</sub> alquil-; más en particular Het<sup>14</sup> representa un heterociclo seleccionado de morfolinilo; pirrolidinilo; piperazinilo o piperidinilo en el que dicho Het<sup>14</sup> se sustituye opcionalmente con uno o de ser posible dos o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, hidroxi-alquilo C<sub>1-4</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> alquilo C<sub>1-4</sub> o polihidroxi-alquil C<sub>1-4</sub>.

Los compuestos de la fórmula (7) son presentados en WO2007/003525, asignado a Janssen Pharmaceutica N.V.

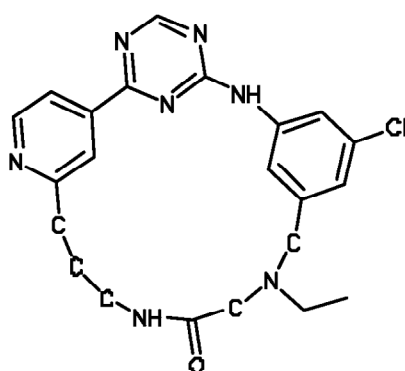
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (14).

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (15).



**Fórmula (15): 1,8,10,12,17,19,23,27,33-Nonaazapentaciclo[25.2.2.1-3,7—1-9,13—1-14,18—]tetratriacontan-3(34),4,6,9(33),10,12,14(32),15,17-nonaen-24-ona.** Esto se refiere en este documento como "Compuesto 13".

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (16).



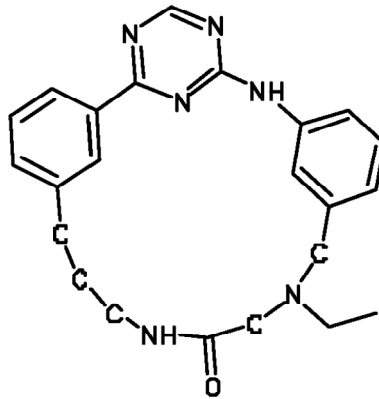
**Fórmula (16): 10-Cloro -14-etil-3,5,7,14,17,22,27-heptaazatetraciclo- [19,3 .1.1-2,6-1-8,12-] heptacosan-1 (25), 2 (27) , 3, 5, 8 (26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona.** Denominado aquí como "Compuesto 14".

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (17).

5

10

15



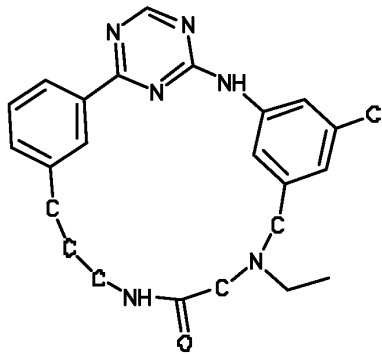
20 **Fórmula (17): 14-etil-3,5,7,14,17,27-hexaazatetraciclo [19.3.1.1-2,6-.1-8,12-] heptacosa-1 (25), 2 (27), 3,5, 8 (26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 15".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (18).

25

30

35



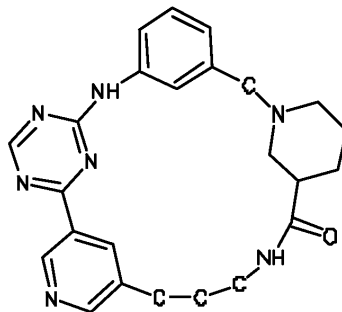
40 **Fórmula (18): 10-cloro-14--etil-3,5,7,14,17,27 hexaazatetraciclo [19.3.1.1-2,6-.1-8,12-] heptacosa 1 (25), 2 (27), 3, 5,8 (26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 16".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (19).

45

50

55



60 **Fórmula (19): 3,5,7,14,20,26,31 Heptaazapentaciclo [22,3 .1.1-2,6-.1-8,12-.1-14,18-] hentriaconta- 1 (28), 2 (31), 3, 5, 8 (30), 9,11,24,26-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 17".**

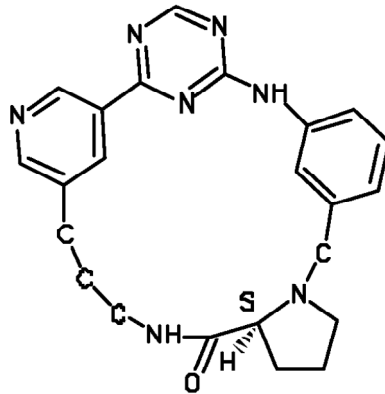
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (20).

5

10

15



20

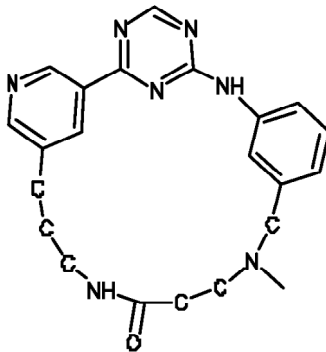
**Fórmula (20):** (18S) 3, 5, 7,14,20,26,30-Heptaazapentaciclo [22,3 .1.1-2,6-.1-8,12-.0-14,18-] triaconta-1 (28), 2 (30), 3, 5, 8 (29), 9,11,24,26-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 18".

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (21).

25

30

35



40

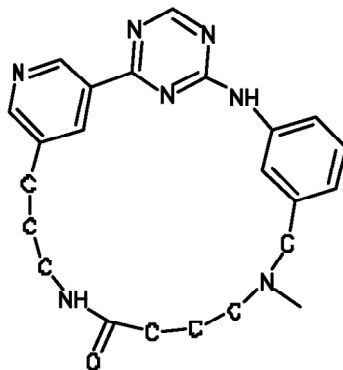
**Fórmula (21):** 14-metil-3,5,7,14,18,24,28-heptaazatetraciclo- [20.3.1 .1-2,6-.1-8,12-] octacosa-1 (26), 2 (28), 3,5,8 (27), 9,11,22,24-nonaen-17-ona. Denominado aquí como "Compuesto 19".

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (22).

45

50

55



60

**Fórmula (22):** 14-Metil-3,5,7,14,19,25,29-heptaazatetraciclo[21.3.1.1-2,6-.1-8,12-]nonacosa-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-nonaen-18-ona. Denominado aquí como "Compuesto 20".

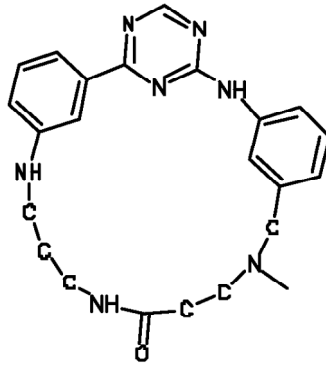
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (23).

5

10

15



**Fórmula (23):** 14-Metil-3,5,7,14,18,22,29-heptaazatetraciclo[21.3.1.1-2,6—1-8,12—]nonacosa-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-nonaen-17-ona. Denominado aquí como "Compuesto 21".

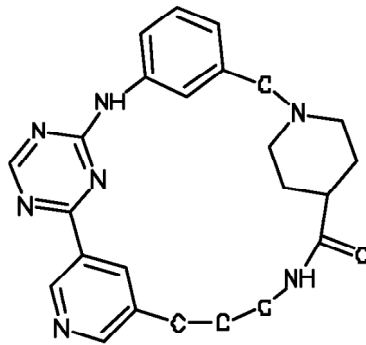
20

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (24).

25

30

35



**Fórmula (24):** 1,8,10,12,16,22,30 - Heptaazapentaciclo [22.2.2.1-3, 7-.1-9,13-.1-14,18-] hentriaconta -3 (31), 4,6, 9 (30), 10,12,14 (29), 15,17-nonaen-23-ona. Denominado aquí como "Compuesto 22".

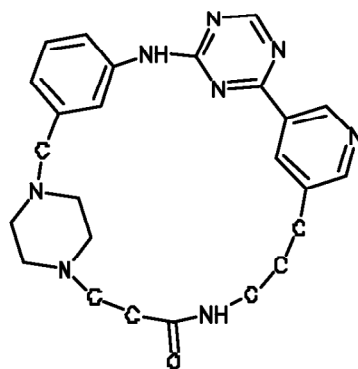
40

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (25).

45

50

55

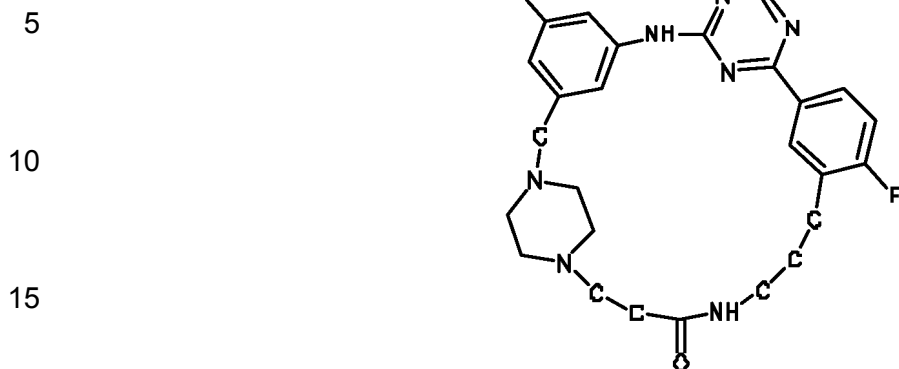


**Fórmula (25):** 1,8,10,12,16,22,26,32-Octaazapentaciclo[24.2.2.1-3,7—1-9,13—1-14,18—]tritiaconta-#(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-nonaen-23-ona. Denominado aquí como "Compuesto 23".

60

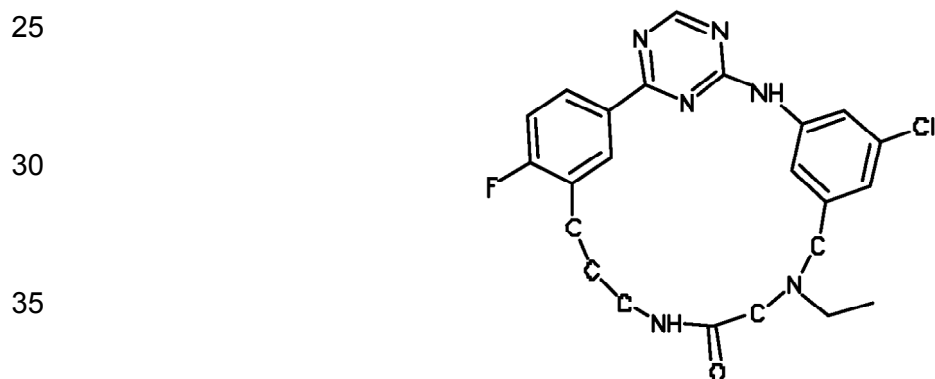
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (26).



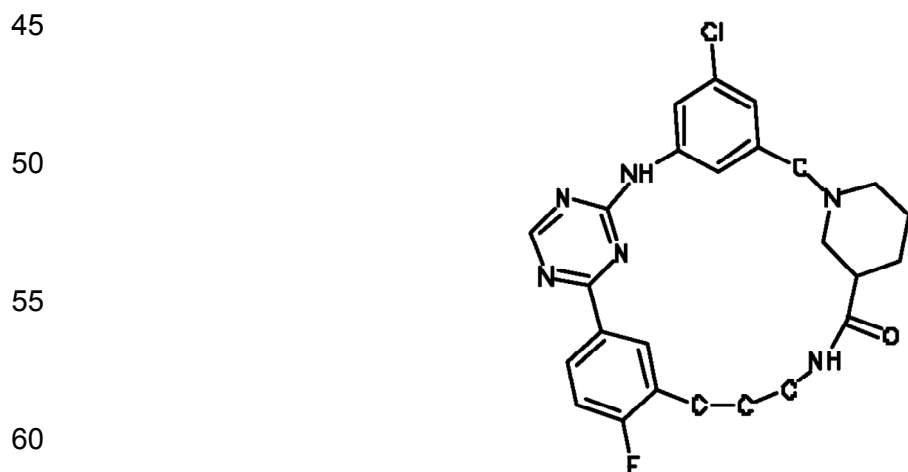
20 **Fórmula (26): 5-cloro-17-fluoro--1,8,10,12,22,26,32 heptaazapentaciclo [24.2.2.1-3, 7-.1-9,13-.1-14,18-] tritriaconta-3 (33), 4,6,9 (32), 10,12,14 (31), 15,17-nonaen-23 -ona. Denominado aquí como "Compuesto 24".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (27).



40 **Fórmula (27): 10-cloro-14-etil-22-fluoro-3,5,7,14,17,27-hexaazatetraciclo [19,3 .1.1-2,6-.1-8,12-] heptacosa-1 (25), 2 (27), 3, 5, 8 (26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 25".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (28).



65 **Fórmula (28): 10-cloro-25 - fluoro-3,5,7,14,20,31 -hexaazapentaciclo [22.3.1.1-2,6-.1-8,12-.1-14,18 -] hentriaconta -1 (28 ), 2 (31), 3,5,8 (30), 9,11,24,26-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 26".**



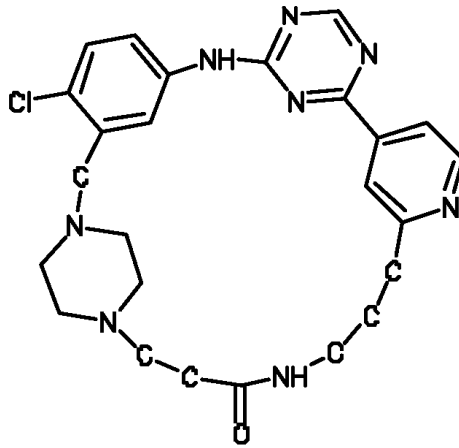
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (29).

5

10

15

20



**Fórmula (29):** 4-Cloro -1,8,10,12,17,22,26,32 -octaazapentaciclo [24.2.2.1-3,7-.1-9,13-.1-14,18-] tritriaconta -3 (33 ), 4,6,9 (32), 10,12,14 (31), 15,17-nonaen-23-ona. Denominado aquí como "Compuesto 27".

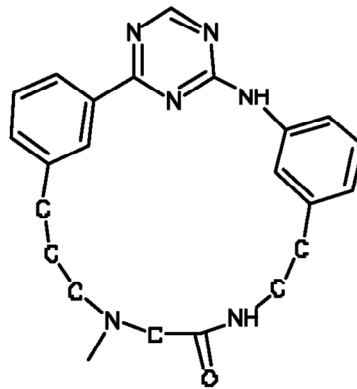
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (30).

25

30

35

40



**Fórmula (30):** 18-metil-3,5,7,15,18,28-hexaazatetraciclo [20.3.1.1-2,6-.1-8,12]octacos-1 (26), 2 (28), 3,5,8 (27 ), 9,11,22,24-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 28".

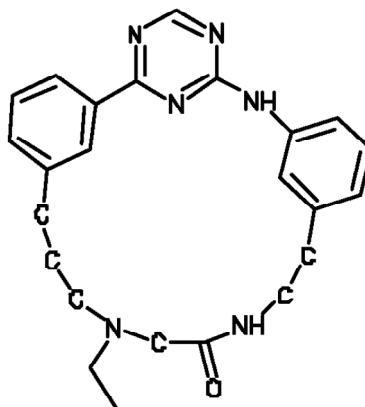
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (31).

45

50

55

60



**Fórmula (31):** 18-Ethyl-3,5,7,15,18,28-hexaazatetraciclo[20.3.1.1-2,6-.1-8,12]octacos-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 29".

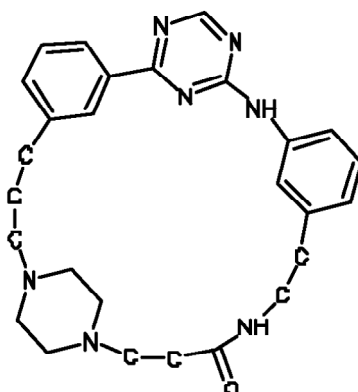
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (32).

5

10

15



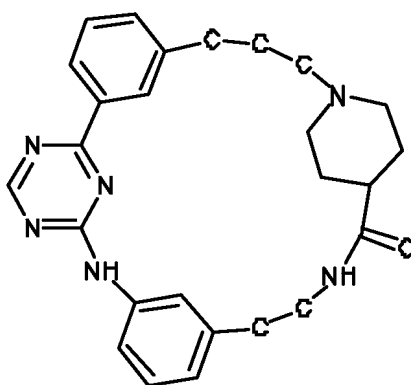
20 **Fórmula (32): 1,8,10,12,17,19,23,27,33 - Nonaazapentacyclo [25.2.2.1-3,7-1-9,13-1-14,18-] tetratriaconta - 3 (34), 4,6,9 (33), 10,12,14 (32), 15,17-nonaen-24-ona. Denominado aquí como "Compuesto 30".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (33).

25

30

35



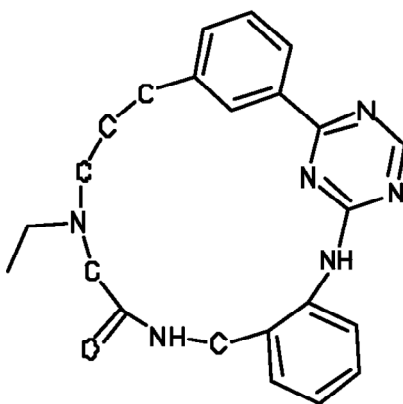
40 **Fórmula (33): 1,11,13,15,23,31 - Hexaazapentacyclo [23 0,2 0,2 0,1 a 5, 9. 1-10,14-. 1-16,20-] dotriaconta - 5 (32), 6,8,10 (31), 11,13,16 (30), 17,19-nonaen-24-ona. Denominado aquí como "Compuesto 31".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (34).

45

50

55



60

**Fórmula (34): 15-Etil - 13,14,15,16,18,19-hexahidro-1H-6,2- (azeno) -7,11- (meteno) -1,3,5,15,18 - benzopentaazacyclohenicosin-17 (12H) -ona. Denominado aquí como "Compuesto 32".**

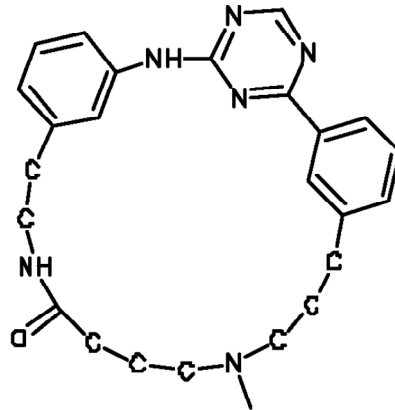
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (35).

5

10

15



20

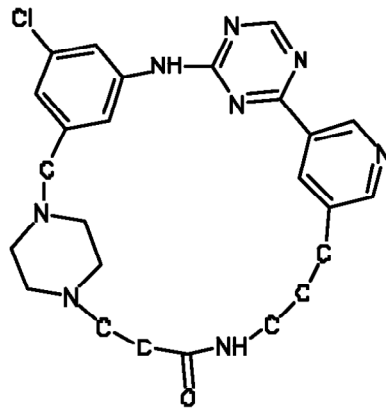
**Fórmula (35): 20-metil - 3,5,7,15,20,30-hexaazatetraciclo [22.3.1.1-2,6-.1-8,12-] triaconta - 1 (28), 2 (30), 3,5, 8 (29), 9,11,24,26-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 33".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (36).

25

30

35



40

**Fórmula (36): 5-Cloro -1,8,10,12,16,22,26,32 - octaazapentaciclo [24.2.2.1-3,7-.1-9,13-.1-14,18-] tritriaconta - 3 (33), 4,6,9 (32), 10,12,14 (31), 15,17-nonaen-23-ona. Denominado aquí como "Compuesto 34".**

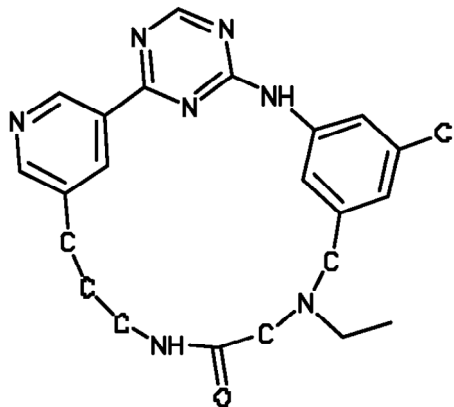
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (37).

45

50

55

60



65

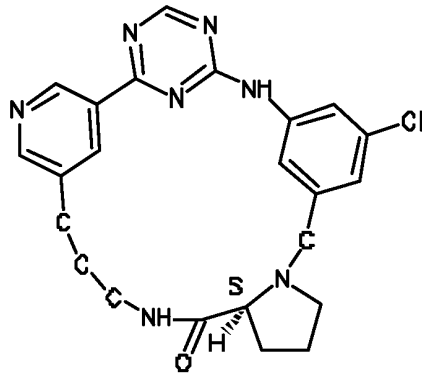
**Fórmula (37): 10-cloro-14 - etil-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo- [19,3 .1.1-2,6-.1-8,12-] heptacosa-1 (25), 2 (27), 3, 5, 8 (26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 35".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (38).

5

10

15



20

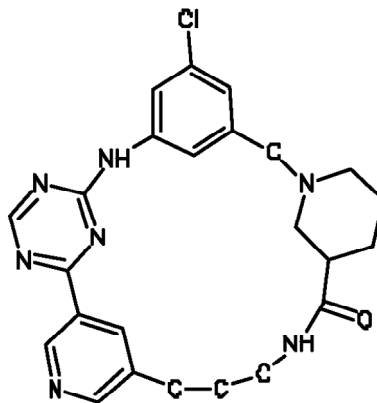
**Fórmula (38): (18S) -10-Cloro - 3, 5, 7,14,20,26,30-heptaazapentaciclo [22,3 .1.1-2,6-.1-8,12-.0-14,18-] triaconta-1 (28), 2 (30), 3, 5, 8 (29), 9,11,24,26-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 36".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (39).

25

30

35



40

**Fórmula (39): 10-Cloro - 3, 5, 7,14,20,26,31-heptaazapentaciclo [22,3 .1.1-2,6-.1-8,12-.1-14,18-] hentriaconta-1 (28), 2 (31), 3, 5, 8 (30), 9,11,24,26-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 37".**

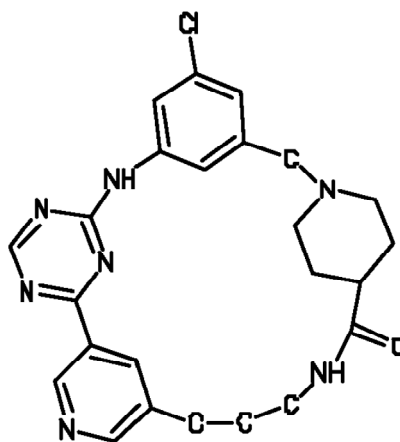
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (40).

45

50

55

60



65

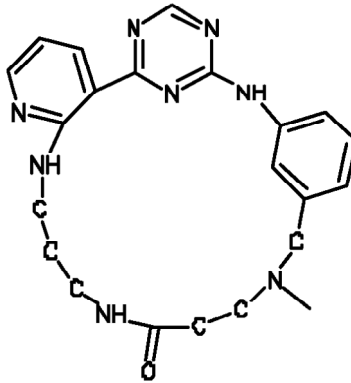
**Fórmula (40): 5-Cloro - 1,8,10,12,16,22,30- heptaazapentaciclo [22.2.2.1-3,7-.1-9,13-.1-14,18] hentriaconta - 3 (31), 4 , 6,9 (30), 10,12,14 (29), 15,17-nonaen-23-ona. Denominado aquí como "Compuesto 38".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (41).

5

10

15



20 **Fórmula (41): 9-Metil-2,3,4,5,7,8,9,10-octahidro-16H-17,21-(azeno)-11,15-(metheno)pirido[3,2-g][1,3,5,9,13,17]hexaazaciclotricosin-6(1H)-ona. Denominado aquí como "Compuesto 39".**

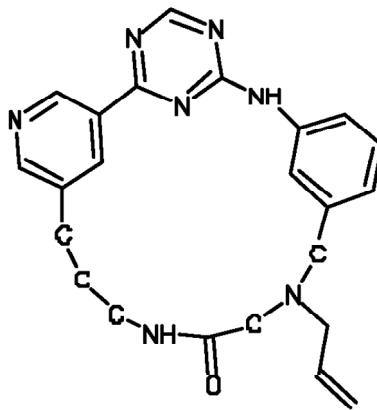
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (42).

25

30

35

40



40 **Fórmula (42): 14-Prop -2-en-1-il - 3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo- [19.3 .1.1-2,6-.1-8,12-] heptacosa - 1 (25) , 2 (27), 3, 5, 8 (26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona. Denominado aquí como "Compuesto 40".**

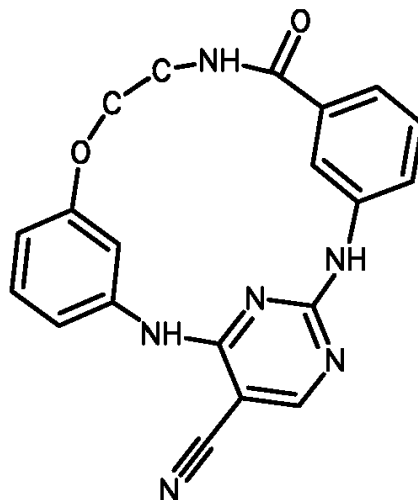
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (43).

45

50

55

60



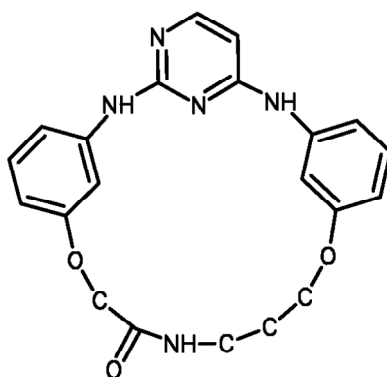
65 **1Fórmula (43): 18-oxo-14-oxa-2,4,8,17,25 -pentaazatetraciclo [17,3 .1.1-3,7-.1-9,13-] pentacosa-1 (23), 3 (25), 4 , 6,9 (24), 10,12,19,21-nonaene-6-carbonitrilo. Denominado aquí como "Compuesto 41".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (44).

5

10

15



20

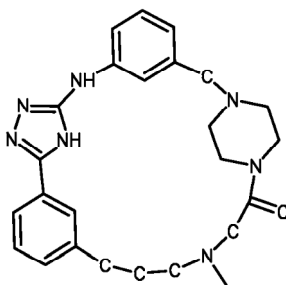
**Fórmula (44): 14,21-Dioxa-2,4,8,18,28-pentaazatetraciclo[20.3.1.1-3,7—.1-9,13—]octacosa-1(26),3(28),4,6,9(27),10,12,22,24-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 42".**

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (45).

25

30

35



**Fórmula (45): 21-Metil - 1,8,10,11,21,24,30 -heptaazapentaciclo[22.2.2.1-3,7—.1-9,12—.1-13,17—]hentriaconta-3(31),4,6,9,11,13(29),14,16-octaen-23-ona. Denominado aquí como "Compuesto 43".**

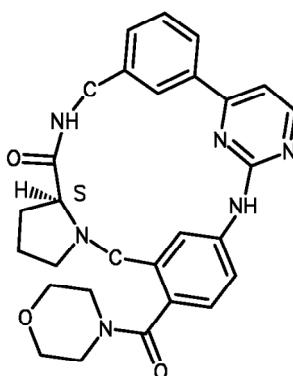
En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (46).

40

45

50

55



**Fórmula (46): (18S) -11 - (Morfolin-4-ylcarbonyl) -5,7,14,20,28 pentaazapentaciclo [20.3.1.1-2,6-1-8,12-0-14,18-] octacosa - 1 (26), 2 (28), 3,5,8 (27), 9,11, 22,24-nonaen-19-ona. Denominado aquí como "Compuesto 44".**

60

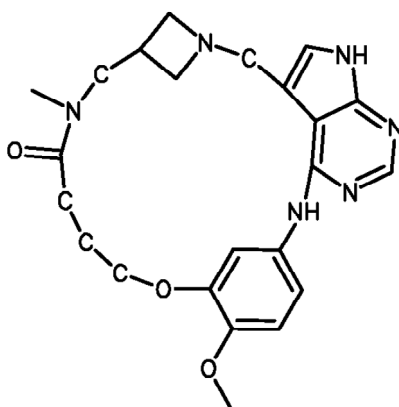
65

En una sección, la anilina-piridinotriazina cíclica es un compuesto de la fórmula (47).

5

10

15



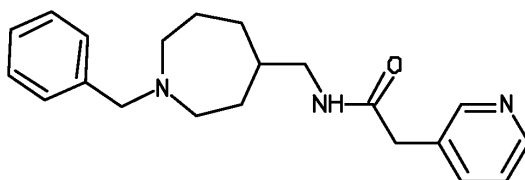
20

**Fórmula (47):** 10-metoxi-17-metil- 2,14,15,17,18,19,20,22- octahidro- 6H-19,21-metano-7,11- (meteno) -12-oxa-2,3, 5, 6,17,21-hexaazacicloicosa [1,2,3-cd] inden-16 (13H) -ona. Denominado aquí como "Compuesto 45".

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (48):

25

30



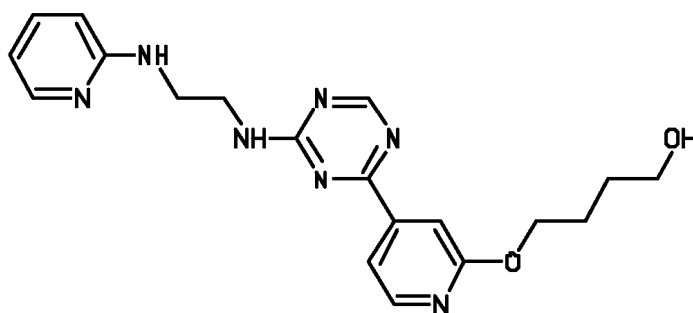
35

**Fórmula (48):** N- [1 - (fenilmetil) azepan-4-il] -2 metil]-piridin-3-ilacetamida. Referido aquí como "Compuesto 46".

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (49):

40

45



50

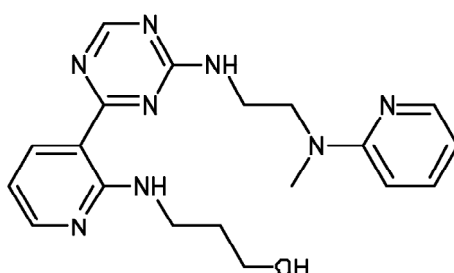
**Fórmula (49):** 4- {[4- (4- {[2 - (piridin-2-ilamino) etil] amino -1,3, 5 triazin-2-il) piridin-2-il] oxi} butan-1-ol. Referido en el presente documento como "Compuesto 47".

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (50):

55

60

65



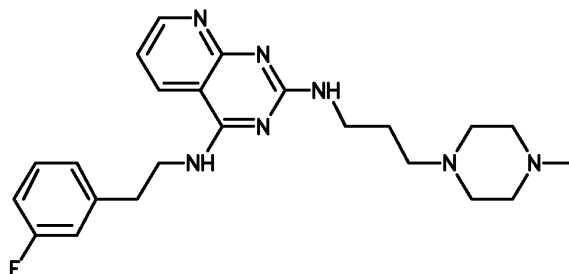
**Fórmula (50):** 3 - ({3- [4 - ({2 - [metil (piridin-2-il) amino] etil} amino) -1,3,5-triazin-2-il] piridin-2 - il} amino) propan -1-ol. Referido aquí como "Compuesto 48".

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (51):

5

10

15



**Fórmula (51):** N-4-42- (3 - fluorofenil) etil] -N-2-43- (4-metil-piperazin-1-il) propil] pirido [2,3-d] pirimidina-2,4-diamina. Referido aquí como "Compuesto 49".

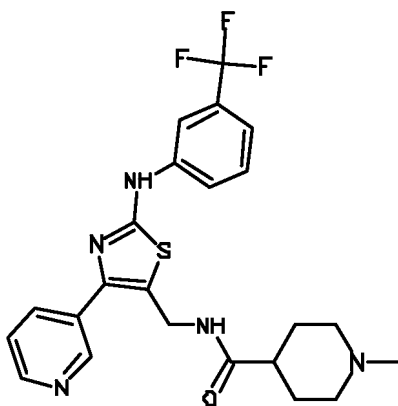
En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (52):

20

25

30

35



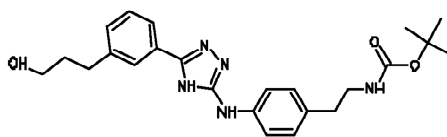
**Fórmula (52):** 1-Metil-N - [(4 - piridin-3-il-2 - {[3- (trifluorometil) fenil] amino} -1,3-tiazol-5-il) metil] piperidina-4-carboxamida. Referido aquí como "Compuesto 50".

40

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (53):

40

45



**Fórmula (53):** 1,1-dimetiletil - {2- [4 - ({5-[3- (3-hidroxiopropil) fenil] 4H-1,2,4-triazol-3-il} amino) fenil] etil] carbamate. Denominado en el presente documento como "Compuesto 51".

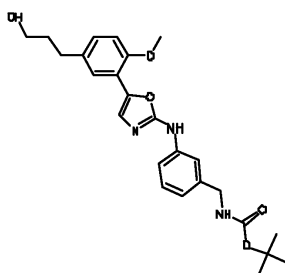
50

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (54):

50

55

60



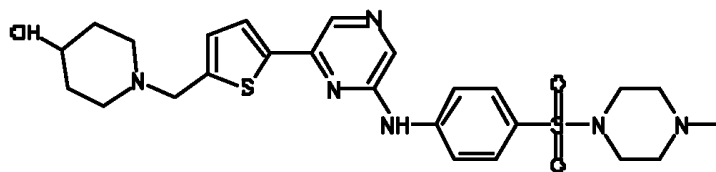
**Fórmula (54):** 1,1-dimetiletil - {[3 - ({5- [5- (3-hidroxiopropil) -2- (metiloxi) fenil]-2-oxazol -1,3 - il} amino) fenil] metil] carbamate. Referido aquí como "Compuesto 52".

65



En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (55):

5

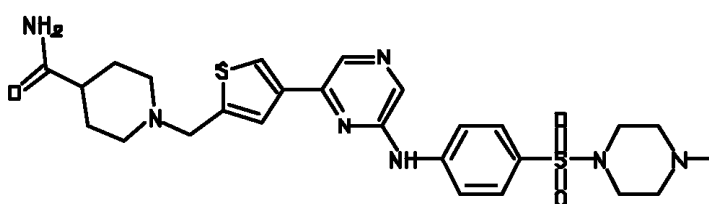


10

**Fórmula (55): 1 - ((5-[6 - ((4 - [(4 - metil-piperazin-1-il) sulfonil] fenil) amino) pirazin-2-il] tiofen-2 - il) metil) piperidin-4-ol. Referido aquí como "Compuesto 53".**

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (56):

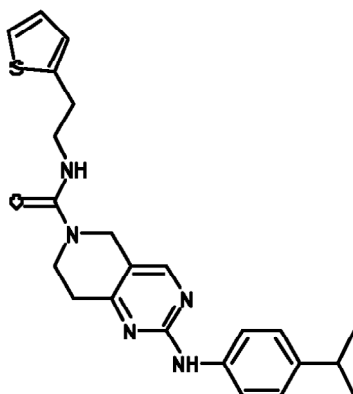
20



**Fórmula (56): 1-((4-[6-((4 - [(4 - metil-piperazin-1-il) sulfonil] fenil) amino) pirazin-2-il] tiofen-2-il) metil) piperidina-4-carboxamida. Denominado aquí como "Compuesto 54".**

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (57):

30



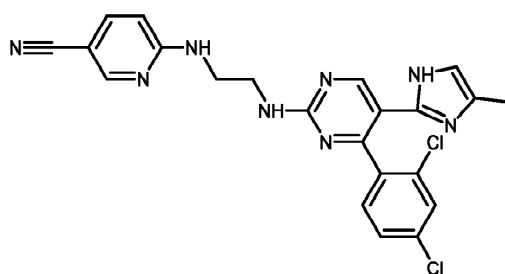
35

40

**Fórmula (57): 2- [[4- (1 - metiletil) fenil] amino] -N- (2-tiofen-2-il-etil) -7,8-dihidropirido [4,3 - d] pirimidin-6 (5H) carboxamida. Denominado aquí como "Compuesto 55".**

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (58):

50



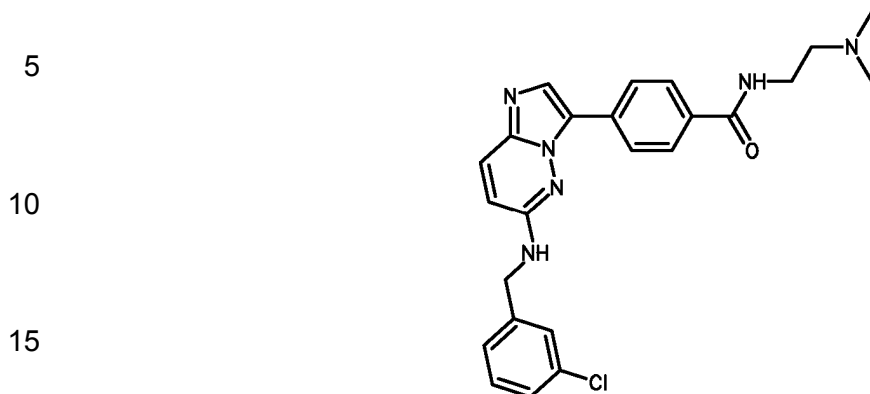
55

60

**Fórmula (58): 6 - [(2 - {[4 - (2,4-Diclorofenil) -5- (4-metil-1H-imidazol-2-il) pirimidin-2 - il] amino} etil) amino] piridina-3-carbonitrilo . Denominado en el presente documento como "Compuesto 56".**

65

En una sección, el factor adicional es un compuesto de la fórmula (59):



20 **Fórmula (59): 4- (6-} [(3 - clorofenil) metil] amino} imidazo [1,2-b] piridazin-3-y1) -N- [2- (dimetilamino) etil] benzamida. Referido aquí como "Compuesto 57".**

*Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo*

25 La formación de células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden determinarse al probar para detectar la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo específico. Las células madre pluripotentes comúnmente no expresan a aquellos marcadores. Por lo tanto, la diferenciación de células pluripotentes se detecta cuando las células empiezan expresarlas.

30 La eficiencia de la diferenciación puede determinarse al exponer a la población de células tratadas a un reactivo (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteínico expresado por las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

35 Los métodos para evaluar la expresión de marcadores proteínicos y de ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas es un procedimiento normal en la industria. Esto incluye una reacción cuantitativa en cadena reversa de polimerasa y transcriptasa (RT-PCR - reverse transcriptase polymerase chain reaction), northern blots, hibridación in situ (refiérase a, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos Actuales en Biología Molecular) (Ausubel et al., eds. 2001 suplemento)), y ensayos inmunológicos tales como análisis inmunohistoquímicos de material seccionado, Western blots, y para marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (refiérase a, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Utilizando Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio), Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

45 Por ejemplo, las características de células madres pluripotentes son bien conocidas para aquellas personas con conocimiento en la industria, y características adicionales de las células madres pluripotentes continúan siendo identificadas. Los marcadores de células madres pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FOXD3, Connexin43, Connexin45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, o Tral-81.

50 Después de tratar células madres pluripotentes con los métodos de este invento las células diferenciadas pueden ser purificadas al exponer a una población celular tratada a un reactivo (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente a un marcador proteínico, tal como CXCR4, expresado por las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

*Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático*

55 Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden diferenciarse a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático por medio de cualquier método en la industria o por medio de cualquier método propuesto en este invento.

60 Por ejemplo, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden diferenciarse en células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático de acuerdo a los métodos descritos en D'Amour et al, Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) 24, 1392 - 1401 (2006).

65 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo son diferenciadas aún más a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, al tratar a las células que expresan a los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento

de fibroblastos y un inhibidor de senderos de señalización de hedgehog KADD- ciclopamina, luego removiendo el medio que contiene al factor de crecimiento de fibroblastos y a la KAAD-ciclopamina y subsiguientemente cultivando las células en un medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD - ciclopamina. Un ejemplo de este método es presentado en Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) 24, 1392 – 1401 (2006).

En un aspecto de este invento, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo son diferenciadas aún más a células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico pancreático, al tratar a las a las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico y por lo menos un factor de crecimiento de fibroblastos durante un período de tiempo, de acuerdo los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos con el número de serie 11/736,908 asignada a LifeScan, Inc.

En un aspecto de este invento, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian aún más a células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, al tratar a las células que expresan a marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico y por lo menos un factor de crecimiento de fibroblastos durante un período de tiempo, de acuerdo a los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos que tienen número de serie 11/739,311, asignada a LifeScan, Inc.

En un aspecto de este invento, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo son diferenciadas aún más a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, al tratar a las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo a los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos que tienen número de serie 60/990,529.

Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden ser tratadas con por lo menos un factor adicional que podría mejorar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. Alternamente, por lo menos un factor adicional podría mejorar la proliferación de las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático formadas de acuerdo a los métodos de este invento. Además, el factor adicional podría mejorar la habilidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático formadas por los métodos de este invento para formar otros tipos de células, o mejorar la eficiencia de cualquiera de los otros pasos de diferenciación adicionales.

El factor adicional podría ser, por ejemplo, nicotinamida, los miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, albúmina sérica, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento AA derivado de plaquetas, y plasma rica en plaquetas, el factor de crecimiento insulínico (IGF-I y II – insulin growth factor), el factor de diferenciación de crecimiento (tal como, por ejemplo, GDF (growth differentiation factor) -5, -6, -8, -10, -11), péptido I y II similar al glucagón (GLP (glucagón like factor) I y II), GLP-1 y GLP-2 que imitan al cuerpo, exendina 4, ácido retinoico, hormona paratiroides, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercatoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF – epidermal growth factor), gastrina I y II, quelantes de cobre tales como, por ejemplo, pentamina de trietilenglicol, forskolina, Na-butirato, activina, betacelulina, ITS, noggin, factor de crecimiento de neuritas, ácido nodal, ácido valproico, tricostatina A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF – hepatocyte growth factor), esfingosina-1, VEGF, MG132 (EMD, CA), suplementos N2 y B27 (Gibco, CA), alcaloides de esteroides tales como, por ejemplo, ciclopamina (EMD, CA), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF – keratinocyte growth factor), familia de proteínas de Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada con la neogénesis- de islotes (INGAP – islet neogenesis-associated protein) , erizo indio, erizo sónico, inhibidores del proteasomas, inhibidores de los senderos de notch, inhibidores de sonic hedgehog, o sus combinaciones.

El factor adicional puede ser suplementado por un medio acondicionado obtenido de las líneas de células pancreáticas tales como, por ejemplo, PANC-1 (ATCC número: CRL-1.469), CAPAN-1 (ATCC número: HTB-79), BxPC-3 (ATCC número: CRL-1687), HPAF-II (ATCC número: CRL-1997), líneas celulares hepáticas tales como, por ejemplo, HepG2 (ATCC número: HTB-8065), y líneas de células intestinales, tales como, por ejemplo, FH 74 (ATCC No: CCL-241).

*Detección de células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático*

Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son bien conocidos a aquellas personas con conocimiento en la industria, y marcadores adicionales característicos del linaje endodérmico pancreático continúan siendo identificados. Estos marcadores pueden ser utilizados para confirmar que las células tratadas de acuerdo a este invento se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endodérmico pancreático. Los marcadores específicos del linaje endodérmico pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripciones tales como, por ejemplo, a Hlx9, PTF-1a, PDX-1, HNF-6, HNF-1beta.

La eficiencia de diferenciación puede determinarse al exponer a una población celular tratada a un reactivo (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente a un marcador proteínico expresado por las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático.

5 Los métodos para evaluar expresiones de marcadores proteínicos y de ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándar en la industria. Estos incluyen a la reacción cuantitativa en cadena de polimerasas de transcriptasas reversas (RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction) Northern blots, hibridación in situ (referirse a, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos Actuales en Biología Molecular) (Ausubel et al., eds. Suplemento de 2001)), y ensayos inmunológicos tales como el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, Western blots y marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (referirse, por ejemplo, a Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Usando Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

15 *Formación de células que expresan a marcadores del linaje endocrino pancreático*

Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse en células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de acuerdo a cualquier método conocido en la industria o de acuerdo al método presentado en este invento.

20 Por ejemplo, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse en células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de acuerdo a los métodos descritos en D'Amour et al, Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) 24, 1392 - 1401 (2006).

25 Por ejemplo, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son diferenciadas aún más a células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al cultivar las células que expresan los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene DAPT y exendina 4, entonces se remueve el medio que contiene a DAPT y a exendina 4 y subsiguientemente cultivando exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se presenta en Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) 24, 1392 - 1401 (2006).

30 Por ejemplo, las células que expresa a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aun más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al cultivar las células que expresan a marcadores característicos de linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene exendina 4, entonces removiendo el medio que contiene exendina 4 y subsiguientemente cultivando las células en un medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se presenta en D' Amour et al, Nature Biotechnology (Biotecnología Natural), 2006.

35 Por ejemplo, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aun mas a células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene a DAPT y exedina 4. Un ejemplo de este método está presentado en D' Amour et al, Nature Biotechnology (Biotecnología Natural), 2006.

40 Por ejemplo, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son diferenciadas aún más en células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al cultivar a las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene exedina 4. Un ejemplo de este método se presenta en D' Amour et al, Nature Biotechnology (Biotecnología Natural), 2006.

45 En un aspecto de este invento, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático puede diferenciarse aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar a las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhiben la senda de señalización de Notch, de acuerdo a los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos con el número de serie 11/736,908, asignada a Life Scan Inc.

50 En un aspecto de este invento, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son diferenciadas aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar a las células que expresan a los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la senda de señalización de Notch, de acuerdo a los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos con el número de serie 11/779,311, asignada a LifeScan, Inc.

55 En un aspecto de este invento, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más a células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar las células que expresan a los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático

65

con un factor que inhibe la senda de señalización de Notch, de acuerdo a los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos con el número de serie 60/953,178, asignada a LifeScan, Inc.

5 En un aspecto de este invento, las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son diferenciadas aún más en células que expresan a marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar a las células que expresan a marcadores característicos de linaje endodérmico pancreático de acuerdo a los métodos presentados en la aplicación de patente de Estados Unidos con el número de serie 60/990,529.

10 Las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden ser tratadas con por lo menos un factor adicional que podría mejorar la formación de células que expresan a marcadores característicos de linaje endocrino pancreático. Alternamente, el factor adicional podría mejorar la proliferación de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático formadas por los métodos de este invento. Además, el factor adicional podría mejorar la capacidad de las células que expresan a marcadores característicos de linaje endocrino pancreático formada por los métodos de este invento para formar otros tipos de células o mejorar la eficiencia de cualquiera de los pasos adicionales de diferenciación.

15 El factor adicional puede ser, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TGF-  $\beta$ 1, 2, y 3, albúmina sérica, miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento -AA y -BB derivado de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento insulínico (IGF-I, II – insulin growth factor)), el factor de diferenciación de crecimiento (tal como, por ejemplo, GDF -5, -6, -8, -10, -11 – growth differentiation factor), péptido I y II similares a glucagones (GLP-I y II – glucagón like factor), GLP-1 y GLP-2 mimetizadores de cuerpo, Exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroides, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF – epidermal growth factor), gastrina I y II, quelantes de cobre tales como, por ejemplo, pentamina de trietileno, forskolina, Na- butirato, activina, betacelulina, ITS, noggin, factor de crecimiento de neuritas, nodal, ácido valproico, tricostatina A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF – hepatocyte growth factor), esfingosina-1, VEGF, MG132 (EMD, CA), N2 y suplementos B27 (Gibco, CA), alcaloides de esteroides tales como, por ejemplo, ciclopamina (EMD, CA), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF – keratinocyte growth factor), familia de proteínas de Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada con la neogénesis de islotes (INGAP – islet neogenesis-associated protein), erizo indio, erizo sónico, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores de erizo sónico, o sus combinaciones.

20 El factor adicional puede ser suplementado por un medio acondicionado obtenido de líneas de células pancreáticas tales como, por ejemplo, PANC-1 (ATCC No: CRL-1469), CAPAN-1 (ATCC No: HTB-79), BxPC-3 (ATCC No: CRL-1687), HPAF-II (ATCC No: CRL-1997), líneas de células hepáticas tales como, por ejemplo, HepG2 (ATCC No: HTB-8065), y líneas celulares intestinales tales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC No: CCL-241).

*Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático*

40 Marcadores característicos de células del linaje endocrino pancreático son bien conocidos por aquellas personas con conocimiento en la industria, y marcadores adicionales característicos de linaje endocrino pancreático continúan siendo identificados. Estos marcadores pueden ser utilizados para confirmar que las células tratadas de acuerdo a este invento se han diferenciado para adquirir propiedades características del linaje endocrino pancreático. Los marcadores específicos del linaje endocrino pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, NGN3, NEURO o ISL1.

50 Los marcadores característicos de células de linaje celular  $\beta$  son bien conocidos por aquellas personas con conocimiento en la industria, y marcadores adicionales característicos del linaje celular  $\beta$  continúan siendo identificados. Estos marcadores pueden ser utilizados para confirmar que las células tratadas de acuerdo con este invento se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje celular  $\beta$ . Las características específicas de linaje celular  $\beta$  incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, PDX1, NKX2.2, NKX6.1, ISL1, PAX6, PAX4, NEUROD, HNF1 beta, HNF6, HNF3 beta, o MAFA, entre otros. Estos factores de transcripción son bien establecidos en la industria para la identificación de células endocrinas. Refiérase, por ejemplo, a Edlund (Nature Reviews Genetics (Genética Revisiones Naturales) 3: 524-632 (2002)).

55 La eficiencia de diferenciación puede determinarse al exponer a una población celular tratada a un reactivo (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteínico expresado por células que expresan a marcadores característicos de linaje endocrino pancreático. Alternamente, la eficiencia de diferenciación puede determinarse al exponer a una población celular tratada a un reactivo (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente a un marcador proteínico expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje celular  $\beta$ .

60 Los métodos para evaluar la expresión de marcadores proteínicos y de ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándar en la industria. Estos incluyen la reacción cuantitativa en cadena de polimerasas de transcriptasas en reversa (RT-PCR - reverse transcriptase polymerase chain reaction), Northern blots, hibridación in

situ (refiérase, por ejemplo, a Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos Actuales en Biología Molecular) (Ausubel et al., eds. Suplemento de 2001)), y ensayos inmunológicos tales como análisis inmunohistoquímicos de material seccionado, Western blots y marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (refiérase a, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Utilizando Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio), Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

En un aspecto de este invento, la eficiencia de diferenciación se determina al medir el porcentaje de células de insulina positivas en un cultivo celular en particular después del tratamiento. En una sección, los métodos de este invento producen alrededor de un 100 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo particular. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 90 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En otra sección, los métodos de este invento producen alrededor de un 80 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 70 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 60 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 50 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 40 % de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 30 por ciento de células positivas de insulina en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 20 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de un 10 por ciento de células de insulina positivas en un cultivo. En una sección alterna, los métodos de este invento producen alrededor de 5 por ciento de células positivas de insulina en un cultivo.

En un aspecto de este invento, la eficiencia de la diferenciación es determinada al medir la secreción de insulina estimulada por la glucosa, tal como se detecta al medir el monto de péptidos C liberados por las células. En una sección, las células producidas por los métodos de este invento producen alrededor de 1000 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento producen alrededor de 900 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento producen alrededor de 800 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento producen alrededor de 700 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 600 nanogramos de péptidos C / pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 500 nanogramos de péptidos C / pg de ADN. En la sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 400 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento producen alrededor de 500 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 500 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 400 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 300 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 200 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 100 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 90 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 80 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 70 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 60 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 50 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 40 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas con los métodos de este invento generan alrededor de 20 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 20 nanogramos de péptidos C/pg de ADN. En una sección alterna, las células producidas por los métodos de este invento generan alrededor de 10 nanogramos de péptidos C/pg de ADN.

## 55 **Terapias**

En un aspecto, de este invento se suministra un método para tratar a un paciente que padece de, o que tiene riesgo de desarrollar, diabetes de tipo uno. El método involucra el cultivo de células madre pluripotentes, diferenciando a las células madre pluripotentes in vitro a un linaje celular  $\beta$ , e implantando las células de un linaje celular  $\beta$  al paciente.

En otro aspecto, este invento suministra un método para tratar a un paciente que sufre de, o que tiene riesgo de desarrollar, diabetes de tipo II. Este método involucra el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de células cultivadas in vitro a un linaje celular  $\beta$ , y la implantación de las células de un linaje celular  $\beta$  al paciente.

Si fuese apropiado, el paciente puede ser tratado aún más con reactivos o bio - activos farmacéuticos que faciliten la supervivencia y la función de las células trasplantadas. Estos reactivos podrían incluir, por ejemplo, insulina, miembros de la familia TGF-  $\beta$ , incluyendo a TGF-  $\beta$ 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP - bone morphogenic proteins) -2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, y -13), factores de crecimiento de fibroblastos -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento insulínico (IGF (insulin growth factor)-I y -II) factor de diferenciación de crecimiento (tal como, por ejemplo, GDF (growth differentiation factor) -5, -6, -7, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF - vascular endothelial cell-derived growth factor), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, péptido-I similar al glucagón (GLP (glucagón like peptide)-I) y II, GLP-1 y -2 que mimetizan al cuerpo, Exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroides, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos presentados en la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0209901 y la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0132729.

Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse a células productoras de insulina antes de su trasplante a un recipiente. En una sección en específico, las células madre pluripotentes son completamente diferenciadas a células  $\beta$  antes de su trasplante en un recipiente. Alternamente, las células madre pluripotentes pueden ser trasplantadas a un recipiente en un estado no diferenciado o parcialmente diferenciado. Puede tomar una mayor diferenciación en el recipiente.

Las células endodérmicas definitivas o, alternamente, las células endodérmicas pancreáticas, o, alternamente, las células  $\beta$ , pueden ser implantadas como células dispersas o formadas en aglutinamientos que pueden ser infundidos en la vena portal hepática. Alternamente, las células pueden ser suministradas en soportes poliméricos degradables biocompatibles, dispositivos no degradables porosos o encapsulados para evitar una respuesta inmunológica del anfitrión. Las células pueden ser implantadas en un lugar apropiado en un recipiente. Los lugares de implantación incluyen, por ejemplo, el hígado, el páncreas natural, el espacio subcapsular renal, el omento, el peritoneo, el espacio de suberosos, el intestino, el estómago o un bolsillo subcutáneo.

Para mejorar aún más la diferenciación, supervivencia o actividad de las células implantadas, factores adicionales, tales como factores de crecimiento, antioxidante o reactiva anti inflamatorios, pueden ser administrados antes, simultáneamente o después de la administración de las células. En ciertas secciones, se utilizan factores de crecimiento para diferenciar a las células administradas in vivo. Estos factores pueden ser secretados por células endógenas y expuestos a las células administradas in situ. Las células implantadas pueden ser inducidas a diferenciarse por medio de cualquier combinación de factores administrados endógenamente y exógenamente tal como se conoce en la industria.

El monto de células utilizadas en implantes depende de varios factores incluyendo la condición del paciente y la respuesta a la terapia, y puede determinarse por una persona con conocimiento en la industria.

En un aspecto, este invento suministra un método para tratar a un paciente que padece de, o que tiene el riesgo de desarrollar diabetes. Este método involucra el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células cultivadas in vitro a un linaje celular  $\beta$ , e incorporando las células a un soporte tridimensional. Las células pueden ser mantenidas in vitro en este soporte antes de su implantación al paciente. Alternamente, el soporte que contiene las células puede implantarse directamente en el paciente sin un cultivo in vitro adicional. El soporte puede opcionalmente ser incorporado con por lo menos un reactivo farmacéutico que facilita la supervivencia y la función de las células trasplantadas.

Materiales de soporte adecuados para su uso para propósitos de este invento incluyen a plantillas, conductores, barreras y reservorios de tejidos útiles para la reparación de tejidos. En particular, los materiales sintéticos y naturales en la forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas, que han sido utilizadas in vitro e in vivo para reconstruir o regenerar tejidos biológicos, así como para entregar reactivos quimiotácticos para inducir el crecimiento de tejidos, son adecuados para su uso en la práctica de los métodos de este invento. Refiérase, por ejemplo, a los materiales presentados en la patente de Estados Unidos 5,770,417, la patente de Estados Unidos 6,022,743, la patente de Estados Unidos 5,567,612, la patente de Estados Unidos 5,759,830, la patente de Estados Unidos 6,626,950, la patente de Estados Unidos 6,534,084, la patente de Estados Unidos 6,306,424, la patente de Estados Unidos 6,365,149, la patente de Estados Unidos 6,599,323, la patente de Estados Unidos 6,656,488, la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0062753 AI, la patente de Estados Unidos 4,557,264 y la patente de Estados Unidos 6,333,029.

Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico puede ser mezclado con una solución polimérica antes de formar el soporte. Alternamente, un reactivo farmacéutico puede ser cubierto en un soporte fabricado, preferiblemente en la presencia de un portador farmacéutico. El reactivo farmacéutico puede estar presente como un líquido, como un sólido dividido finamente, o cualquier otra forma física apropiada. Alternamente, excipientes pueden ser agregados para apoyar la alteración de la tasa de liberación del reactivo farmacéutico. En una sección alterna, el soporte es incorporado con por lo menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, los compuestos presentados en la patente de Estados Unidos 6,509,369.

El soporte puede estar conformado con por lo menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto anti – apoptótico, tal como, por ejemplo, los compuestos presentados en la patente de Estados Unidos 6,793,945.

5 El soporte también puede ser incorporado con por lo menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, tal como, por ejemplo, los compuestos presentados en la patente de Estados Unidos 6,331,298.

10 El soporte también puede ser incorporado con por lo menos un compuesto farmacéutico que es capaz de mejorar la angiogénesis, tal como, por ejemplo, los compuestos presentados en la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0220393 y la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0209901.

15 El soporte también puede ser incorporado con por lo menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunosupresor, tal como, por ejemplo, los compuestos presentados en la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0171623.

20 El soporte también puede ser incorporado con por lo menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento tal como, por ejemplo, los miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo a TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP (bone morphogenic proteins) -2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, y -13), factores de crecimiento de fibroblastos -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas –AA y -BB, plasma rica en plaquetas, factor de crecimiento insulínico (IGF (insuline growth factor) –I, II), factor de diferenciación de crecimiento (tal como, por ejemplo, GDF (growth differentiation factor) -5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF - vascular endothelial cell-derived growth factor), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor inducible por la hipoxia 1- alfa, péptido similar al glucagón-1 (GLP (glucagón like peptide)-1), cuerpos que mimetizan a GLP-1 y GLP-2, y II, Exendina-4, nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona de la tiroides, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de la trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de proteínas matriciales extracelulares adherentes que se enlazan a células y a heparina tales como la fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos presentados en la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0209901 y la aplicación publicada de Estados Unidos 2004/0132729.

30 La incorporación de las células de este invento a un portador se puede lograr por medio de un simple depósito de células en el portador. Las células pueden ingresar al portador por medio de una simple difusión (J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)). Varios otros métodos han sido desarrollados para mejorar la eficiencia de la siembra celular. Por ejemplo, matraces de centrifugación han sido utilizados en la siembra de condrocitos. Aportadores de ácidos poliglicólicos (Biotechnol. Prog. 14(2): 193-202 (1998)). Otro método para sembrar células es el uso de centrifugación, que produce un estrés mínimo a las células sembradas y mejora la eficiencia de siembra. Por ejemplo, Yang et ál. desarrolló un método de siembra celular (J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379-86 (2001)), denominado Inmovilización Celular por medio de Centrifugación (CCI - Centrifugational Cell Immobilization).

40 Este invento es ilustrado en más detalle, pero sin limitarse a, en los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

45 Para claridad de la presentación, y no en forma de limitación, la descripción detallada del invento es dividida en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, secciones o aplicaciones de este invento.

### Ejemplo referencial 1

#### Cultivo de células madres embrionarias humanas

50 Las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 fueron obtenidas del WiCell Research Institute, Inc. (Madison, WI) y cultivadas de acuerdo a las instrucciones suministradas por el Instituto fuente. Las células madres embrionarias humanas también fueron sembradas en platos cubiertos con una dilución de 1:30 del factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) y cultivadas en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Las células fueron cultivadas en MATRIGEL™ donde se pasaron rutinariamente como aglutinamientos utilizando colagenasa IV (Invitrogen/GIBCO; Cat # 17104-019), Dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041), o la enzima de CI de liberase (Roche; Cat # 11814435001). En algunas ocasiones, las células fueron pasadas como células individuales utilizando ACCUTASE (Sigma; Cat # A6964).

60 Las células madre embrionarias humanas utilizadas en estos ejemplos fueron mantenidas en un estado no diferenciado pluripotente con pases en promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de colagenasa (1 o 10 miligramos/mililitros; Sigma-Aldrich) durante 10 a 30 minutos a 37 grados C después de un tratamiento suave con un estilo de una pipeta para recuperar los aglutinamiento celulares. Se permitió que los aglutinamientos hagan sedimentos por medio de la gravedad, seguido por un lavado

65



para remover la colagenasa residual. Los aglutinamientos celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 para cultivos de mantenimiento rutinarios o una tasa de 1:1 para un ensayo inmediato. Todas las líneas celulares ES humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y se evaluó rutinariamente para detectar fenotipos de cariotipos normales y la ausencia de contaminación del mycoplasma.

5

## Ejemplo referencial 2

### Ensayo biológico para la formulación de células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo

10

La activina A es un mediador importante de la diferenciación en una amplia gama de tipos celulares, incluyendo la diferenciación de las células madres embrionarias a un endodermo definitivo. Cuando las células madres embrionarias humanas son tratadas con una combinación de activina A y Wnt3a, varios genes representativos del endodermo definitivo son incentivados. Un ensayo biológico que mide esta diferenciación en las células madres embrionarias humanas fue adaptado en un formato miniatura para platos de 96 pozos para propósitos de examinación. La validación fue completada usando un tratamiento con fuentes comerciales de proteínas recombinantes de Activina A y Wnt3a y midiendo la expresión proteínica del factor de transcripción SOX17, considerado como un marcador representativo del endodermo definitivo.

15

20

*Ensayo de células vivas:* brevemente, los aglutinamientos de células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en un plástico de cultivos de tejidos cubierto por un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas usando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, luego fue lavado para remover las enzimas residuales, y se puso en platos a una tasa de 1:1 (área de la superficie) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; Perkin Elmer; Cat #6005182) cubiertos por un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™. A las células se les permitió adherirse como aglutinamientos y después recuperar el crecimiento en una fase logarítmica durante un período de uno a 3 días, alimentado diariamente con 100 microlitros por pozo de un medio acondicionado, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF – mouse embryonic fibroblast) suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB).

25

30

El ensayo fue iniciado al lavar los pozos de cada plato 2 veces en PBS (Invitrogen; Cat # 14190), seguido de una agregación de una alícuota (100 microlitros) de muestra de prueba en un medio basal DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) para cada pozo. Las condiciones de prueba fueron realizadas por triplicado, alimentando cada 2 días por medio de aspiración y reemplazo del medio de cada pozo con muestras de pruebas durante un período de ensayo total de 4 días. En el primero y 2º día del ensayo, las muestras de prueba fueron agregadas a los pozos del ensayo donde se diluyeron en DMEM:F12 con un 0.5 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03) y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN).. En el 3º y cuarto día del ensayo, las muestras de prueba agregadas a los pozos del ensayo fueron diluidas en DMEM:F12 con un 2 por ciento de FCS, sin ningún Wnt3a. Las muestras de control positivo consistieron de activina A recombinante humana (PeproTech; Cat #120-14) agregadas a una concentración de 100 nanogramos/mililitros a lo largo del ensayo con Wnt3a (20 nanogramos/mililitros) en los días uno y 2. Las muestras de control negativo omitieron el tratamiento con activina A y Wnt3a.

35

40

45

*Análisis de alto contenido:* cuando concluyeron los 4 días del cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijado con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, después se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 anti humano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) fue diluido 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. Flúor 488 Alexa conjugó un anticuerpo secundario (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat #AZ1467) el cual fue diluido a 1:200 en PBS y se le agregó a cada pozo de muestra después de haberse lavado 3 veces con PBS. Para contrarrestar al núcleo manchado, 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregaron durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se los dejó en 100 microlitros/pozo de PBS para tomar imágenes.

50

55

60

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (Analizador Celular) (GE Healthcare) utilizando la dícroica de 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados de los pozos de control positivo y de los pozos de control negativo que no fueron tratados manchados con únicamente un anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los subsiguientes procedimientos de titulación. Las medidas del número total de células y la intensidad total de SOX17 se obtuvieron de cada pozo utilizando el software de la IN Cell Developer Toolbox 1.7 (caja de herramientas de desarrollo celular IN 1.7) (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo se determinó basándose en niveles de escala grises (rango

65

de la línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y las desviaciones estándar se calcularon para cada réplica de conjunto de datos. La expresión proteínica total de SOX17 se reportó como una intensidad total o una intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala grises entre 200 y 3500. La información de intensidad total fue estandarizada al dividir las intensidades totales de cada pozo por el promedio de la intensidad total del control positivo. La información estandarizada fue calculada para los promedios y las desviaciones estándar de cada conjunto replicado.

La **figura 1** muestra la validación del ensayo de examinación, probando una curva de dilución de 2 veces una fuente comercial de activina A (PeproTech) y midiendo el número de células (**figura 1a**) y la intensidad de SOX17 (**figura 1B**). Los efectos óptimos de activina A para la inducción de la expresión de SOX17 se observaron generalmente en el rango de 100-200 nanogramos/mililitros con un EC<sub>50</sub> de 30-50 nanogramos/mililitros. Omitiendo a Wnt3a del tratamiento en los días uno y 2 del ensayo que falló en la producción de la expresión medible de SOX (**figura 1B**, barras blancas). La ausencia de activina A también falló en la producción de la expresión de SOX17 (**figura 1B**).

### Ejemplo referencial 3

#### Examinación primaria: efectos de los compuestos de este invento en la diferenciación de células madre embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo en la ausencia de Activina A

La diferenciación de células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se midió por medio de una serie de interacciones receptor-ligando que a su vez activan las quinasas receptoras conllevando a la fosforilación y translocación nuclear de sustratos corriente abajo, regulando eventualmente la expresión de genes objetivos específicos. La activación óptima de estas cascadas de señalización en algunos tipos celulares podría requerir la inhibición de sendas opositoras predeterminadas. En otros casos, las sendas redundantes involucran a miembros alternos de una familia de quinasas más grande que podría sustituir en parte a una o más moléculas de señalización. En otros casos, las sendas canónicas y no canónicas podrían divergir con estímulos iniciadores diferentes pero podrían conllevar a un resultado funcional similar.

Las examinaciones funcionales que se basan en células son un método para identificar objetivos y métodos novedosos que pueden impactar a respuestas celulares específicas. Un método muy poderoso involucra una serie de examinaciones iterativas por las cuales los hallazgos o resultados positivos de una examinación se integran a una examinación subsiguiente. Alternamente, una serie de variables diferentes son integradas en una forma combinatoria (por ejemplo, factores de crecimiento con inhibidores de quinasas) para identificar efectos novedosos en la diferenciación celular. En este caso, una biblioteca de moléculas pequeñas que comprenden amilinas-piridinotriazinas, amilinas-piridinotriazinas cíclicas y estructuras intermedias en su síntesis fueron probadas para detectar propiedades importantes durante una diferenciación endodérmica definitiva de las células madres embrionarias humanas, específicamente para detectar efectos para retener o mejorar el número celular al momento de la conclusión de un 'primer' paso de diferenciación en un suero bajo y en la ausencia del factor de crecimiento activina A.

#### Examinando el ensayo

**Siembra del ensayo celular:** brevemente, las aglutinaciones de las células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en un plástico de cultivos de tejidos cubierto por un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas usando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y raspando suavemente, y lavando para remover las enzimas residuales, y se colocaron en un plato a una dispersión uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182) cubiertos con un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ utilizando volúmenes de 100 microlitros/pozo. A las células se les dejó adherirse en aglutinamientos y después recuperar el crecimiento de fase logarítmica durante un período de uno a 3 días, alimentando diariamente con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 grados C, con 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

**Preparación de compuestos y del ensayo:** los compuestos probados fueron facilitados como cepas de 5mM en un formato de platos de 96 pozos, solubilizados en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenadas a -80 grados C. La biblioteca de compuestos fue diluida más a una concentración intermedia de 0.2 mM en 50mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), un 20 por ciento de DMSO y almacenadas a 4 grados C. Las condiciones de prueba fueron realizadas en triplicado, alimentando cada 2 días durante un período del ensayo de 4 días. Los ensayos de examinación primarios fueron iniciados al aspirar el medio del cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS (Invitrogen; Cat # 14190) para remover los factores de crecimiento residuales y el suero. En el primer día del ensayo, volúmenes de prueba de 200 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta conteniendo un medio basal de DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con un 0.5 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03) y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN) con 2.5 microM del compuesto

de prueba. En el 3<sup>er</sup> día del ensayo, volúmenes de prueba de 200 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta conteniendo un medio basal de DMEM:F12 suplementado con un 2 por ciento de FCS con 2.5 microM del compuesto de prueba, sin Wnt3a. Muestras de control positivas que contenían el mismo medio basal suplementado con FCS, sustituyendo a 100 nanogramos/mililitros de activina A humana recombinante (PeproTech; Cat #120-14) para el compuesto de prueba a lo largo del ensayo de 4 días junto con Wnt3a (20 nanogramos/mililitros) agregados únicamente en los días uno y 2. Muestras de control negativas que contenían al medio basal DMEM:F12 suplementado con FCS agregando Wnt3a en los días 1 y 2 pero omitiendo activina A.

*Análisis de alto contenido:* a la conclusión del ensayo del cultivo de 4 días, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijos con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego lavados 3 veces con PBS y permeabilizaros con 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) fue diluido a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se le agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El flúor 488 de Alexa conjugó el anticuerpo secundario (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) que fue diluido a 1:200 en PBS y se le agregó a cada pozo de la muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el núcleo manchado, se agregaron 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para tomar imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (Analizador Celular IN 1000) (GE Healthcare) utilizando la dicroica 51008bs de células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición de los pozos de control positivo y de los pozos de control negativo que fueron manchados únicamente con el anticuerpo secundario fueron optimizados. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los procedimientos subsiguientes de tinte. Las medidas para los números de células y la intensidad total de SOX17 se obtuvieron de cada pozo utilizando el software de IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo se determinó basándose en niveles de escala gris (rango de la línea base entre 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y las desviaciones estándar fueron calculadas para cada punto de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como una intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 3500. La información de la intensidad total fue estandarizada al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio para el control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados en lo referente a promedios y a desviaciones estándar para cada conjunto replicado.

La **tabla 1** muestra los resultados de la examinación primaria para los compuestos probados, mostrando sus efectos en la diferenciación de las células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en la ausencia de activina A. los resultados incluyen medidas cuantitativas del número de células y la intensidad de SOX17, donde los puntos de datos respectivos fueron promediados para los pozos triplicados y analizados para cada parámetro utilizando campos idénticos en cada pozo. La expresión del factor de transcripción SOX17 es considerada una indicación de la diferenciación endodérmica definitiva. Los resultados de examinación primarios fueron capturados de 8 platos de examinación de 96 pozos. La variabilidad de plato a plato fue reducida con la inclusión de controles positivos y negativos individuales en cada plato. Los resultados fueron estandarizados y expresados como porcentaje del control positivo. Se puso énfasis en la retención o amplificación del número de células a la conclusión del ensayo.

La **tabla 2** lista un subconjunto de 27 compuestos y sus resultados analizados a partir de la examinación primaria, donde estos hallazgos parecieron retener el número de células a un nivel equivalente o a un mejor nivel que el control positivo sin importar la ausencia de la activina A en el ensayo de examinación.

En algunos casos, la expresión de SOX17 fue inducida en la ausencia de activina A (por ejemplo, el compuesto 35 y el compuesto 22 de anilinas-piridinotriazinas cíclicas).

Los compuestos mostrados en la **tabla 2** fueron seleccionados para evaluar en mayor detalle los efectos en la diferenciación de las células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en la ausencia de activina A.

#### Ejemplo referencial 4

**Examinación secundaria: los efectos de los compuestos de este invento en la diferenciación de células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con EGF/FGF4 en la ausencia de Activina A**

Una curva de valoración para la activina A con un monto constante de Wnt3a mostró por lo menos dos efectos durante la diferenciación DE: 1) se mantuvieron los números celulares o se previno la pérdida celular; y 2) se indujo un marcador de DE, por ejemplo, una expresión de SOX17 (**ejemplo 2**). La examinación primaria del **ejemplo 3** identificó compuestos que podían mantener números celulares similares o mejorados en el ensayo en relación a la adición de activina A / Wnt3a individualmente. Un ensayo de examinación secundaria fue realizado para evaluar el efecto de combinaciones de los compuestos identificados con otros factores de crecimiento, específicamente EGF y FGF4, para la generación de endodermos más definitivos.

*Siembra de ensayos celulares:* aglutinaciones de células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en un plástico de cultivos de tejidos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas utilizando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # Cat # 17104-019) y un raspado suave, se lavó para remover las enzimas residuales y se puso en platos con una dispersión uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182) utilizando volúmenes de 100 microlitros/pozo. A las células se les permitió adherirse como aglutinamientos y después recuperar el crecimiento de la fase logaritmo durante un período de 1 a 3 días, alimentándose diariamente con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de gFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 grados C, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

*Preparación de los compuestos y de los factores de crecimiento:* las concentraciones de abastecimiento para EGF (R&D Systems; Cat # 236-EG) y FGF4 (R&D Systems; Cat #235-F4) fueron de 250 nanogramos/mililitros, cada una solubilizada en PBS con 0.1 por ciento de BSA (Sigma; Cat # A7888). Los compuestos estuvieron disponibles en abastecimientos de 5 mM en un formato de platos de 96 pozos, solubilizadas en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenados a -80 grados C. Los compuestos fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2 mM en 50mM de HEPES HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), 20 por ciento de DMSO y almacenados a 4 grados C. Todos los factores de crecimiento e inhibidores fueron preparados en pozos profundos de platos de polipropileno de 96 pozos, diluidos a abastecimientos intermedios de 5x en un medio basal DMEM:F12 al inicio del ensayo y almacenados a 4 grados C.

Un ensayo de examinación secundario fue realizado, probando en triplicado y con una alimentación realizada cada 2 días durante un ensayo de 4 días. Los ensayos fueron iniciados al aspirar el medio de cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS para remover los factores de crecimiento residuales y el suero. Los volúmenes de pruebas de 80 microlitros por pozo fueron agregados de regreso conteniendo un medio basal DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con 0.625 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03), 25 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems), y 3.125 microM del compuesto con 20 microlitros de un almacenamiento de 5x de factores de crecimiento para generar una concentración final de 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, y 2.5 microM del compuesto con 50 nanogramos/mililitros de EGF y 50 nanogramos/mililitros de FGF4 en el ensayo. Los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenidos en el mismo medio basal suplementado con 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y 100 nanogramos/mililitros de activina A. los pozos de control negativos (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con 0.5 por ciento de FCS y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, omitiendo activina A.

En el día 3, los pozos fueron aspirados y alimentados con 80 microlitros de medio basal DMEM:F12 suplementado con un 2.5 por ciento de FCS (HyClone) y 3.125 microM de compuesto con 20 microlitros de almacenamiento de 5x de factores de crecimiento por pozo para generar una concentración final de un 2 por ciento de FCS y 2.5 microM de compuesto (omitiendo Wnt3a) con 50 nanogramos/mililitros de EGF y FGF4 en el ensayo. Los pozos de control positivos (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de FCS y 100 nanogramos/mililitros de activina A, omitiendo Wnt3a. Los pozos de control negativos (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con un 2 por ciento de FCS, omitiendo activina A y Wnt3a.

*Análisis de alto contenido:* a la conclusión del cultivo de 4 días, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS, se fijaron con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavó 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas otra vez 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) se diluyó a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto, flúor 488 Alexa con jugo un anticuerpo secundario (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) que fue diluido a 1:200 en PBS y agregado a cada pozo de la muestra después de lavar 3 veces con PBS. Para contrarrestar la mancha del núcleo, 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregaron durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 10 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (Analizador Celular IN 1000) (GE Healthcare) utilizando un dicroico de 51008bs para células manchadas con Hoescht 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de

5 exposición fueron optimizados desde los pozos de control positivos y desde los pozos de control negativos no  
 10 tratados manchados con únicamente un anticuerpo secundario. Imágenes para 15 campos por pozo fueron  
 15 adquiridos para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los procedimientos de tinte  
 20 subsiguientes. Las medidas para el número total de células y la intensidad de SOX17 total fueron obtenidas de cada  
 25 pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue  
 30 determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base de 100-300) y tamaño nuclear. Los  
 35 promedios y desviaciones estándar fueron calculadas para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica  
 40 de SOX17 total fue reportada como intensidad total o intensidad integrada, definida como una fluorescencia total de  
 45 la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los  
 50 rangos de escala gris entre 200 y 3500. La intensidad total de datos fue estandarizada al dividir las intensidades  
 55 totales para cada pozo por el promedio de la intensidad total del control positivo. Los datos estandarizados fueron  
 60 calculados para los promedios y las desviaciones estándar de cada conjunto replicado.

15 **La tabla 3A** muestra los resultados para 2 factores de crecimiento, EGF y FGF 4 (50 nanogramos/mililitros cada  
 20 uno) probados en combinación con los compuestos de anilina-piridinotriazina que se muestran en la **tabla 2** en  
 25 referencia a sus efectos en la diferenciación de células madres embrionarias humanas a células que expresan  
 30 marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en la ausencia de activina A. Los resultados son  
 35 clasificados en orden descendente en relación a los mejores efectos en la expresión de SOX17. Aunque los efectos  
 40 de estos compuestos en la expresión de SOX17 fueron considerados débiles en relación al control positivo de la  
 45 activina A / Wnt3a, la respuestas para algunos de estos compuestos fueron consideradas significativas. Por ejemplo,  
 50 una selección de los compuestos parece tener propiedades únicas con respecto a los números de células de alta  
 55 retención por pozo durante el ensayo, se cree que ya sea por la prevención de apoptosis o por la modulación del  
 60 ciclo celular. Adicionalmente, estos compuestos parecen actuar en sinergia con el EGF y FGF4 para promover una  
 65 diferenciación modesta endodérmica definitiva, tal como se midió por la expresión de SOX17. Los compuestos más  
 potentes están listados en la **tabla 3B**. Otros compuestos probados en combinación con EGF y FGF4 en este  
 ensayo no fueron efectivos para inducir la expresión de SOX17 pero pudieron retener números de células en un  
 ensayo (por ejemplo, el compuesto 90:85 por ciento de número de células; 2 por ciento de expresión de SOX17).

### 30 Ejemplo referencial 5

#### 35 **Efectos de los compuestos de este invento en combinación con otros factores de diferenciación de las 40 células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje 45 endodérmico definitivo en la ausencia de Activina A**

35 Un ensayo secundario fue conducido para evaluar el efecto de los compuestos de este invento con combinaciones  
 40 de otros factores de crecimiento individuales o compuestos conocidos en la literatura para regular la diferenciación  
 45 endodérmica definitiva.

40 *Siembra celular del ensayo:* los aglutinamientos de las células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas  
 45 en un plástico de cultivos de tejidos cubierto por un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat  
 # 356231). Las células fueron pasadas usando tratamiento de collagenasa (Invitrogen; Cat # Cat # 17104-019) y un  
 raspado suave, se lavó para remover las enzimas residuales, y se puso en platos con una dispersión uniforme a una  
 tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182)  
 cubiertos con un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ usando volúmenes de 100 microlitros/pozo. Se les  
 permitió a las células adherirse en forma de aglutinamientos y entonces recuperar el crecimiento de fase logarítmica  
 durante un período de 1 a 3 días, con una alimentación diaria con un medio acondicionado MEF suplementado con 8  
 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 grados C, con un 5  
 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

50 *Preparación de compuestos y factores de crecimiento:* almacenamientos de factores de crecimiento comprados de  
 R&D Systems fueron EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-B (Cat #220-BB),  
 PDGF-C (Cat #1687-CC), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), BMP-1 (Cat  
 #1927-ZN), BMP-2 (Cat #355-BM), BMP-4 (Cat #314-BP), BMP-6 (Cat #507-BP), BMP-7 (Cat #222-AB), BMP-2/7  
 (Cat #3229-BM). Otros reactivos probados fueron comprados de la siguiente forma: BMP-7 (Sigma; Cat # B1434),  
 LY294002 (Cayman; Cat 70920), PD98059, U0126, U0124 (EMD Biosciences; Cat # 453710), muscimol (Tocris; Cat  
 # 0289), biuculline (Tocris; Cat # 0130), butirato de sodio (Sigma; Cat # B5887). Todos los factores de crecimiento  
 fueron solubilizados en PBS con un 0.1 por ciento de BSA (Sigma; Cat # A7888) y almacenado congelado a -80  
 grados C. Las moléculas pequeñas fueron solubilizados en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y  
 almacenados y congelados -80 grados C. Los compuestos estuvieron disponibles en agrupaciones de 5mM en  
 formatos de platos de 96 pozos, solubilizados en un 100 por ciento de DMSO y almacenados a -80 grados C. Los  
 compuestos de este invento fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2 mM en 50 mM de  
 HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), un 20 por ciento de DMSO y almacenado a 4 grados Celsius. Todos los  
 factores de crecimiento e inhibidores fueron preparados en un pozo profundo, en un plato de polipropileno de 96  
 pozos, diluido en agrupaciones intermedias de 5x en el medio basal de DMEM:F12 al inicio del ensayo y  
 almacenadas a 4 grados C.

Un ensayo de examinación secundario fue realizado, probando por triplicado y alimentando cada 2 días durante los 4 días del ensayo. Los ensayos fueron iniciados al aspirar medios de cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS para remover los factores de crecimiento y sueros residuales. Los volúmenes de prueba de 80 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta los cuales contenían un medio basal DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con un 0.625 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03), 25 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems), y 3.125  $\mu\text{M}$  del compuesto con 20  $\mu\text{l}$  de 5x de almacenamiento de factor de crecimiento o una molécula pequeña para generar una concentración final de 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, y 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto. Todos los factores de crecimiento remanentes fueron probados a una concentración final del ensayo de 50 nanogramos/mililitros (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PDGF-A/B, VEGF, BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-2/7). Las concentraciones finales del ensayo de las moléculas pequeñas probadas fueron las siguientes: muscimol (20 $\mu\text{M}$ ), PD98059 ( $\mu\text{M}$ ), LY294002 (2.5 $\mu\text{M}$ ), U0124 (1  $\mu\text{M}$ ), U0126 (1  $\mu\text{M}$ ), butirato de sodio (0.5mM). Los pozos del control positivo (100 $\mu\text{l}$ /pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con 0.5% de FCS, 20ng/ml de Wnt3a y 100ng/ml activina A. los pozo del control negativo (100 $\mu\text{l}$ /pozo) contenían el mismo medio basal con 0.5% de FCS y 20ng/ml de Wnt3a, omitiendo activina A.

En el día 3, los pozos fueron aspirados y alimentados con 80 microlitros del medio basal DMEM:F12 suplementado con un 2.5 por ciento de FCS (HyClone) y 3.125  $\mu\text{M}$  un compuesto de piridinotriazina anilina cíclica con 20 microlitros de 5x almacenamientos de factores de crecimiento y moléculas pequeñas por pozo para generar una concentración final de un 2 por ciento de FCS y 2.5  $\mu\text{M}$  del compuesto (omitiendo Wnt3a) tal como se denotó en el día uno para todos los factores de crecimiento remanentes o moléculas pequeñas. Los pozos del control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con 2 por ciento de FCS y 100 nanogramos/mililitros de activina A, omitiendo a Wnt3a. Los pozos de control negativo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con 2 por ciento de FCS, omitiendo a activina A y a Wnt3a.

*Análisis de alto contenido:* en el momento de la conclusión del cultivo de 4 días, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS, fijados con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizar con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) se diluyó a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. Fluor 488 Alexa conjugado con el anticuerpo secundario (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) fue diluido a 1:200 en PBS y se agregó a cada pozo de muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregaron durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para tomar imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer (Analizador de Células) 1000 (GE Healthcare) utilizando la dicroica de 51008bs de células manchadas con Hoechst 33342 y fluor 488 Alexa. Los tiempos de exposición fueron erizados desde los pozos de control positivo y desde los pozos de control negativo con unos anticuerpos secundarios. Las imágenes de los 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los subsiguientes procedimientos de coloración. Las medidas para el número total de células y la intensidad SOX17 total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN CELL Developer Toolbox una. 7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de la línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada réplica de conjunto de datos. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como una intensidad total o una intensidad integrada, definida como una fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en criterios de aceptación de rangos de escala gris entre 200 y 3500. Los datos de la intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio para el control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados para los promedios y desviaciones estándar para cada conjunto de réplicas.

**La tabla 4** muestra los resultados para la diferenciación de las células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo siguiendo el tratamiento con los compuestos de este invento en combinación con factores de crecimiento individuales y otras moléculas pequeñas. En general, los miembros de la familia BMP (BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-2/7) inhibieron o tuvieron efectos insignificantes en la expresión de SOX17. Lo mismo fue verdad para la mayoría de inhibidores enzimáticos de moléculas pequeñas probados en este ensayo (LY294002, PD98059, U0126, U0124, butirato de sodio). Sin embargo, algunos miembros de la familia PDGF (PDGF-A, -AB, -C, y -D) suministraron un incremento en la expresión de SOX17 (del 10-25 por ciento de la activina A / control de Wnt3a). Otros factores de crecimiento que mostraron incrementos similares en la expresión de SOX17 incluyeron a EGF (34 por ciento), VEGF (18 por ciento) y FGF4 (17 por ciento), aunque FGF4 no pudo soportar la retención de los números de células. El muscimol de moléculas pequeñas (el agonista receptor de GABA<sub>A</sub>) probado en combinación con el compuesto 35 también suministro un incremento moderado en la expresión de SOX17; la bicuculina antagonista de GABA<sub>A</sub> no tuvo ningún

efecto en la expresión de SOX17. EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB, PDGF-C, y PDGF-D y muscimol fueron seleccionados para una evaluación adicional durante la diferenciación del endodermo definitivo.

### Ejemplo referencial 6

#### 5 Efectos del compuesto de este invento en combinación con otros factores en la diferenciación de células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en la ausencia de Activina A

10 Un ensayo secundario fue realizado para evaluar los efectos de las combinaciones de diferentes compuestos con otros agentes individuales en la diferenciación de endodermos definitivos. Los otros reactivos seleccionados para esta examinación mostraron previamente un incremento moderado en la formación de endodermos definitivos, tal como se probó con el compuesto 17 y como se denotó en la **tabla 5**. En esta examinación, un panel más amplio de compuestos fue evaluado con estos reactivos, ya sea en una comparación en forma de una pareja o en combinaciones agrupadas.

15 *Siembra celular del ensayo:* aglutinaciones de células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en un plástico de cultivos de tejidos cubiertos por un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas utilizando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, y lavado para remover enzimas residuales, y se puso en platos a una distribución uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182 cubiertos por el factor de crecimiento reducido MATRIGEL™) utilizando volúmenes de 100 microlitros/pozo. A las células se les permitió adherirse como aglutinaciones y recuperar entonces el crecimiento de fase logarítmica durante un período de 1 a 3 días, con alimentación diaria con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 20 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada durante el transcurso del ensayo.

25 *Preparación de compuestos y de factores de crecimiento:* los almacenamientos de factores de crecimiento comprados de R&D Systems fueron EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), y VEGF (Cat #293-VE). El muscimol se compró de Tocris (Cat # 0289). Todos los factores de crecimiento fueron solubilizados en PBS con un 0.1 por ciento de BSA (Sigma; Cat # A7888) y almacenados congelados a -80 grados centígrados. El muscimol fue solubilizado en un 100 por ciento de DMSO BSA (Sigma; Cat # A7888) y almacenado y congelado a -80 grados centígrados. Los compuestos están disponibles en forma de almacenamientos de 5mM en formatos de platos de 96 pozos, solubilizados en un 100 por ciento de DMSO y almacenados a -80 grados centígrados. Los compuestos fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2 mM en 50mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), un 20 por ciento de DMSO y almacenado a 35 4 grados centígrados. Todos los factores de crecimiento e inhibidores fueron preparados en un plato de polipropileno de 96 pozos profundos, y diluido a 5x almacenamientos intermedios en un medio basal de DMEM:F12 al inicio del ensayo y almacenado a 4 grados centígrados.

40 Un ensayo de examinación secundario fue realizado, probando en triplicado y con alimentación cada 2 días durante la duración del ensayo de 4 días. Los ensayos fueron iniciados al aspirar el medio de cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS para remover factores de crecimiento y sueros residuales. Los volúmenes de prueba fueron 80 microlitros por pozo que fueron agregados de vuelta conteniendo un medio basal de DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con un 0.625 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03), 25ng/ml de Wnt3a (R&D Systems), y 3.125 µM de compuesto con 20 microlitros de 5x agrupaciones de factores de crecimiento o moléculas pequeñas para generar una concentración final de 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y 2.5 µM. Todos los factores de crecimiento remanentes fueron probados a una concentración final del ensayo de 50 nanogramos/mililitros (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF). La concentración final del ensayo de muscimol fue de 20 µM. Los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con 45 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y 100 nanogramos/mililitros de activina A. los pozos de control negativos (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con 0.5 por ciento de FCS y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, omitiendo activina A.

50 En el día 3, los pozos fueron aspirados y alimentados con 80 microlitros del medio basal DMEM:F12 suplementado con un 2.5 por ciento de FCS (HyClone) y 3.125 µM del compuesto con 20 microlitros de 5x almacenamientos de factores de crecimiento o moléculas pequeñas por pozo para generar una concentración final de un 2 por ciento de FCS y 2.5 µM del compuesto (omitendo Wnt3a) y tal como se denotó en el día uno para todos los factores de crecimiento remanentes o moléculas pequeñas. Los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de FCS y 100 nanogramos/mililitros de activina A, omitiendo Wnt3a. Los pozos de control negativo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con un 2 por ciento de FCS, omitiendo a activina A y Wnt3a.

60 *Análisis de alto contenido:* a la conclusión de los 4 días del cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 meses con PBS, fijados con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del

cuarto durante 20 minutos, luego fueron lavados 3 veces con PBS impermeabilizados con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas otra vez 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX antihumano de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) fue diluido a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y agregado a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) fue diluido a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) fue diluido a 1:200 en PBS y agregado a cada muestra después de haber lavado 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 4 microlitros/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fue agregado durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y dejados en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer (GE Healthcare) utilizando dicroico de 51008 para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados desde los pozos de control positivos y desde los pozos de control negativos no tratados manchados con únicamente un anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los procedimientos de coloración subsiguientes. Las medidas para un número celular total y la intensidad SOX17 total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación del núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y tamaño nuclear. Promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada conjunto de datos replicados. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como una intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 a 3500. La información de intensidad total fue estandarizada al dividir las intensidades totales para cada pozo para la intensidad total promedio del control positivo. La información estandarizada fue calculada para promedios y desviaciones estándar de cada grupo replicado.

La **tabla 5** muestra a los compuestos identificados previamente como coincidencias (**tabla 2**) probadas en un ensayo biológico de endodermos definitivos en varias combinaciones con factores de crecimiento y muscimol, sin activina A. Algunos compuestos tuvieron efectos mínimos o débiles en la expresión de SOX17 probando todas las combinaciones de factores de crecimiento. Sin embargo, algunos compuestos pudieron inducir expresiones de SOX17 significativas con algunas pero no todas las combinaciones de factores de crecimiento. Un compuesto en particular, el compuesto 34, tuvo respuestas de sinérgesis significativas con 22 factores de crecimiento probados e incrementos mediados en ambos números celulares así como en la expresión SOX17 en este ensayo: el compuesto 39 con 1) EGF+FGF4 = 77% de respuesta de control positiva; o 2) EGF+FGF4+PDGF-AB = 68% de respuesta de control positiva; o 3) EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF = 31% de respuesta de control positiva.

#### Ejemplo referencial 7

#### Efectos del compuesto 34 en combinación con otros factores en la diferenciación de células madre embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en la ausencia de activina A

En este ejemplo, se realizó un esfuerzo para analizar el mínimo número de factores de crecimiento requeridos en combinación con el mejor compuesto de anilina-pyridinotriazina cíclica, el compuesto 34 para generar una respuesta robusta de SOX17 en la ausencia de activina A. También en este ejemplo, un nuevo factor de crecimiento, GDF-8, fue agregado para su evaluación. El GDF-8, también conocido como miostatina, es un miembro de la familia TGF- $\beta$  y ha demostrado utilizar la activina tipo II y receptores de TGF- $\beta$  tipo I (ALK4/5) para inducir la fosforilación de SMAD 2/3.

*Siembra celular del ensayo:* aglutinamientos de células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en plásticos de cultivos de tejidos cubiertos por el factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas utilizando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, se lavaron para remover las enzimas residuales, y se pusieron en platos con una dispersión uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182) cubiertos con un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ utilizando volúmenes de 100 microlitros por pozo. A las células se les permitió adherirse en forma de aglutinaciones y entonces recuperar el crecimiento de fase logarítmica durante un período de 1 a 3 días, con una alimentación diaria con un medio acondicionado de MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

*Preparación de compuestos y de factores de crecimiento:* almacenamientos de factores de crecimiento comprados de R&D Systems fueron EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-AB (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), y GDF-8 (Cat # 788-G8). Muscimol se compró de Tocris (Cat #



0289). Todos los factores de crecimiento fueron solubilizados en PBS con un 0.1 por ciento de BSA (Sigma; Cat # A7888) y almacenados y congelados a -80 grados centígrados. El muscimol fue solubilizados en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenado congelado a -80 grados centígrados. Los compuestos de anilina-piridinotriazina cíclica estuvieron disponibles en forma de agrupaciones de 5mM en formatos de platos de 96 pozos, solubilizados en un 100 por ciento de DMSO y almacenados a -80 grados centígrados. El compuesto 34 fue diluido además a una concentración intermedia de 0.2mM en 50mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), un 20 por ciento de DMSO y almacenado a 4 grados centígrados. Todos los factores de crecimiento e inhibidores fueron preparados en un plato de polipropileno de 96 pozos profundos, diluido a 5x agrupaciones intermedias en un medio basal de DMEM:F12 al inicio del ensayo y almacenado a 4 grados centígrados.

Un ensayo de examinación secundario se realizó, probando en triplicado y con una alimentación cada 2 días durante el ensayo de 4 días. El ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivos de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS para remover factores de crecimiento y sueros residuales. Los volúmenes de prueba de 80 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta los cuales contenían un medio basal de DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con un 0.625 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03), 25ng/ml de Wnt3a (R&D Systems), y 3.125  $\mu$ M del compuesto 27 con 20 microlitros de agrupaciones de 5x de factores de crecimiento o moléculas pequeñas para generar una concentración final de 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, y 2.5  $\mu$ M del compuesto 34. Todos los factores de crecimiento y remanentes fueron probados a una concentración final del ensayo de 50 nanogramos/mililitros (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF) con la excepción de GDF-8 que fue probado a 25 nanogramos/mililitros. La concentración final del ensayo del muscimol fue de 20  $\mu$ M. Los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y 100 nanogramos/mililitros de activina A. los pozos del control negativo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con 0.5 por ciento de FCS y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, omitiendo activina A.

En el día 3, los pozos fueron aspirados y se alimentaron con 80 microlitros de medio basal de DMEM:F12 suplementado con 2.5 por ciento de FCS (HyClone) y 3.125  $\mu$ M del compuesto 34 con 20 microlitros de almacenamiento de 5x de factores de crecimiento o moléculas pequeñas por pozo para generar una concentración final de 2 por ciento de FCS y 2.5  $\mu$ M del compuesto 34 (omitendo Wnt3a) y tal como se denotó en el día uno para todos los factores de crecimiento o moléculas pequeñas remanentes. Los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de FCS y 100 nanogramos/mililitros de activina A, omitiendo Wnt3a. Los pozos de control negativos (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con un 2 por ciento de FCS, omitiendo activina A y a Wnt3a.

*Análisis de alto contenido:* a la conclusión de los 4 días de cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS, fijados con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX17 anti humanos de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) se diluyeron a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregaron a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) se diluyó a 1:200 en PBS y se agregó a cada pozo de muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado al núcleo, se agregó 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes fue realizada con IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando el dícroico de 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados de los pozos de control positivo y de los pozos de control negativo sin tratamiento manchados con solo un anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar debido a cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los procedimientos de coloración subsiguientes. Las medidas de números de células totales e intensidad total de SOX17 fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100/300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportado como intensidad total o intensidad integrada, definida como una fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 a 3500. La información de la intensidad total fue estandarizada al dividir las intensidades totales de cada pozo por el promedio de intensidad total del control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados para promedios y desviaciones estándar de cada conjunto replicado.

La **Tabla 6** muestra los resultados de este ensayo. Donde GDF-8 estuvo presente en cualquier combinación con el compuesto 34, se observó un incremento sustancial en la expresión de SOX17. Además, GDF-8 y Wnt3a con el compuesto 34 fueron suficientes para generar una expresión de SOX17 (88 por ciento del control) en un rango

similar a aquél visto con un tratamiento de 100 nanogramos/mililitros de activina A / Wnt3a. Parece que el factor de crecimiento GDF-8 sirve como un reemplazo para activina A durante la diferenciación endodérmica definitiva de las células embrionarias.

## 5 Ejemplo referencial 8

### Examinación adicional para compuestos capaces de diferenciar células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo

10 Basándose en las estructuras de compuestos para coincidencias que ya han sido identificadas, una búsqueda análoga fue realizada para encontrar compuestos adicionales relacionados para probarse en el ensayo biológico endodérmico definitivo. La búsqueda de la subestructura generó compuestos para examinación. Los parámetros de  
 15 examinación para este ensayo fueron diseñados con la combinación de factores que ya generaron resultados óptimos en ensayos previos, específicamente combinando EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, y GDF-8 con el compuesto de moléculas pequeñas.

20 *Siembra celular del ensayo:* brevemente, aglutinaciones de células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en plástico de cultivos de tejidos cubiertos por el factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas usando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, y lavado para remover enzimas residuales y se colocó en platos a una dispersión uniforme a una  
 25 tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ utilizando volúmenes de 100 microlitros / pozo. A las células se les permitió adherirse en forma de aglutinamientos y entonces recuperar el crecimiento de fase logarítmica durante un período de 1 a 3 días, con una alimentación diaria con un medio acondicionado con MEF  
 suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 grados C, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

30 *La preparación de compuestos y del ensayo:* los factores de crecimiento comprados de R&D Systems fueron EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), y GDF-8 (Cat # 788-G8). El Muscimol fue comprado de Tocris (Cat # 0289). La examinación fue realizada utilizando una biblioteca de compuestos que fueron facilitados en almacenamientos de 5mM en  
 35 formatos de platos de 96 pozos, solubilizados en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenados a -80 grados centígrados. Los compuestos fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2mM en 50 mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), un 20 por ciento de DMSO y almacenados a 4 grados centígrados. Las condiciones de prueba fueron realizadas en pozos individuales, con una alimentación cada 2 días durante un período de tiempo del ensayo de 4 días. Ensayos de examinación primaria fueron iniciados al aspirar los medios de cultivos de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS (Invitrogen; Cat # 14190) para remover los factores de crecimiento o y sueros residuales. En el primer día del ensayo, los volúmenes de prueba de 200 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta los cuales contenían un medio basal de DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032)  
 40 suplementado con un 0.5 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03) y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN) con 2.5 µM del compuesto. Todos los factores de crecimiento remanentes fueron probados a una concentración final del ensayo de 50 nanogramos/mililitros (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF) con la excepción de GDF-8 que fue probado a 25 nanogramos/mililitros. La concentración final del ensayo de muscimol fue de 20 µM. Las muestras de control positivo contenían el mismo medio basal suplementado con 0.5 por  
 45 ciento de FCS con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y 100 nanogramos/mililitros de activina A recombinante humana (PeproTech; Cat #120-14). Las Muestras de control negativo contenían el medio basal DMEM:F12 suplementado con 0.5 por ciento de FCS y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a. En el 3<sup>er</sup> día del ensayo, los volúmenes de prueba de 200 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta los cuales contenían el medio basal DMEM:F12 suplementado con un 2 por ciento de FCS con 2.5 µM del compuesto, sin Wnt3a. Todos los factores de crecimiento remanentes fueron probados en una concentración final ensayo de 50 nanogramos/mililitros (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF) con la excepción de GDF-8 probada a 25 nanogramos/mililitros. La concentración final del ensayo de muscimol fue 20 µM. las muestras de control positivo contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de FCS y 100 nanogramos/mililitros de activina A humana recombinante (PeproTech; Cat #120-14). Las muestras de control negativo contenían el medio basal DMEM:F12 suplementado con un 2 por ciento de FCS. Las muestras de control positivo contenían el mismo medio basal suplementado con FCS, sustituyendo 100 nanogramos/mililitros de activina A humana recombinante (PeproTech; Cat #120-14) por el compuesto de anilina-piridinotriazina a lo largo del ensayo de 4 días junto con Wnt3a (20 nanogramos/mililitros) en los días 1 y 2. Las muestras de control negativo contenían el medio basal DMEM:F12 suplementado con FCS, agregando Wnt3a en los días 1 y 2 pero omitiendo el tratamiento con activina A.

60 *Análisis de alto contenido:* al concluir los 4 días de cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijados con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat #

16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) se diluyó a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) fue diluido a 1:200 en PBS y se agregó a cada pozo de muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando el dícroico de 51008bs para las células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados y desde los pozos de control positivo y los pozos de control negativos no tratados manchados con solamente un anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los subsiguientes procedimientos de manchado. Las medidas para los números de células totales y la intensidad total de SOX17 fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada grupo de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como una intensidad total o intensidad integrada, definidas como una fluorescencia total de la célula multiplicado por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 3500. Los datos de intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad promedio total del control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados para los promedios y desviaciones estándar para cada conjunto replicado.

En la **tabla 7**, GDF-8 y una combinación de factores/agonistas de crecimiento (EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol) fueron probados con un nuevo conjunto de compuestos de anilina-piridinotriazina. Los resultados de 2 platos de estos ensayos en este experimento son clasificados en referencia a sus respuestas de SOX17 (como un porcentaje del tratamiento de control positivo con activina A y Wnt3a). Compuestos adicionales fueron identificados que mostraron una actividad de sinérgesis significativa con los grupos de factores/agonistas de crecimiento. Estos compuestos fueron efectivos al retener números de células en los ensayos y al producir la expresión SOX17 durante la diferenciación de células madres embrionarias humanas en la ausencia de activina A. una lista de estas coincidencias con una actividad superior al 25 por ciento del control positivo se muestra en la **tabla 8**.

Como nota, 4 coincidencias de la examinación primaria inicial (**tabla 2**) fueron duplicadas en la biblioteca análoga. 2 de estos compuestos repetidos como coincidencias con la examinación análoga (compuesto 34 y compuesto 35; mostrados en cuadros en la **tabla 8**); uno fue una coincidencia débil en la examinación análoga y un compuesto no se repitió.

**Ejemplo referencial 9**

**Efectos de los compuestos en este invento en la diferenciación de células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en la presencia de bajas concentraciones de Activina A**

Fue importante el determinar si los compuestos que fueron identificados como coincidencias en los ensayos biológicos endodérmicos definitivos que se acaban de mencionar también podrían mostrar una actividad de sinérgesis con dosis muy pequeñas de activina A. Una evaluación inicial fue realizada utilizando la lista corta de coincidencias de compuestos de anilina-piridinotriazina cíclica denotados en la **tabla 3B**.

*Siembra celular del ensayo:* aglutinamientos de células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivados en plásticos de cultivos de tejidos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231) las células fueron pasadas utilizando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, se lavó para remover enzimas residuales, y se colocaron en platos con una dispersión uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ utilizando volúmenes de 100 microlitros/pozo. A las células se les permitió adherirse en forma de aglutinamientos y entonces recuperar el crecimiento de fase logarítmica durante un período de 1 a 3 días, con alimentación diaria con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los datos fueron mantenidos a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

*Preparación de compuestos y de factores de crecimiento:* los agrupamientos de factores de crecimiento que fueron comprados de R&D Systems fueron EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), y GDF-8 (Cat #788-G8). La activina A fue comprada de PeproTech (Cat #). El Muscimol fue comprado de Tocris (Cat # 0289). Todos los factores de crecimiento fueron solubilizados en PBS con un 0.1 por ciento de BSA (Sigma; Cat # A7888) y almacenados y

- congelados a -80 grados centígrados. El muscimol fue solubilizados en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenado y congelado a -80 grados centígrados. Los compuestos estuvieron disponibles en forma de agrupaciones de 5mM en el formato de platos de 96 pozos, solubilizados en un 100 por ciento de DMSO y almacenados a -80 grados centígrados. Los compuestos fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2mM en 50mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), un 20 por ciento de DMSO y almacenados a 4 grados centígrados. Todos los factores de crecimiento e inhibidores fueron preparados en un plato de polipropileno de 96 pozos profundos, diluido 5x agrupaciones intermedias en un medio basal DMEM:F12 al inicio del ensayo y almacenados a 4 grados centígrados.
- Un ensayo de examinación secundario fue realizado, probando en triplicado y con una alimentación de cada 2 días durante los 4 días de duración del ensayo. Los ensayos fueron iniciados al aspirar el medio de cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS para remover los factores de crecimiento y sueros residuales. Los volúmenes de prueba de 80 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta conteniendo el medio basal DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con 0.625 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03), 25ng/ml de Wnt3a (R&D Systems), 12.5ng/ml de activina A y 3.125  $\mu$ M del compuesto con 20 microlitros de 5x almacenamientos de factores de crecimiento o moléculas pequeñas para generar una concentración final de 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, 10 nanogramos/mililitros de activina A y 2.5 $\mu$ M del compuesto. Todos los factores de crecimiento remanentes fueron probados a una concentración final del ensayo de 50 nanogramos/mililitros (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF), con la excepción de GDF-8 utilizado a 25 nanogramos/mililitros. La concentración final del ensayo de muscimol fue de 20 $\mu$ M. los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con 0.5 por ciento de FCS, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a y 10 nanogramos/mililitros (una dosis baja) o 100 nanogramos/mililitros (una dosis alta) de activina A. los pozos de control negativos (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con 0.5 por ciento de FCS y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a, omitiendo activina A.
- En el día 3, las células fueron aspiradas y alimentadas con 80 microlitros de medio basal de DMEM:F12 suplementado con un 2.5 por ciento de FCS (HyClone), 12.5 nanogramos/mililitros de activina A, y 3.125  $\mu$ M del compuesto con 20 microlitros de 5x agrupaciones de factores de crecimiento o moléculas pequeñas por pozos para generar una concentración final de un 2 por ciento de FCS, 10 nanogramos/mililitros de activina A y 2.5  $\mu$ M del compuesto (omitendo a Wnt3a) y como se denotó en el día uno para todos los factores de crecimiento remanentes o moléculas pequeñas. Los pozos de control positivo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de FCS y 10 nanogramos/mililitros o 100 nanogramos/mililitros de activina A, omitiendo a Wnt3a. Los pozos de control negativo (100 microlitros/pozo) contenían el mismo medio basal con un 2 por ciento de FCS omitiendo a la activina A y a Wnt3a.
- Análisis de alto contenido:* a la conclusión de los 4 días de cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS, se fijaron con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y se bloquearon con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) fue diluido a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) fue diluido a 1:200 en PBS y agregado a cada pozo de muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y dejados en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.
- La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE healthcare) utilizando dicroico de 51008bs para las células manchadas con Hoechst 33342 y con flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados desde los pozos de control positivos y desde los pozos de control negativos manchados con solamente un anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar para cualquier pérdida celular durante los ensayos biológicos y los procedimientos de manchado subsecuentes. Las medidas de los números de células totales y la intensidad total de SOX17 fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada en base a niveles de escala gris (rango de línea base 100-300 y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada punto de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 3500. Los datos de la intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad promedio total del control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados para promedios y desviaciones estándar para cada conjunto replicado.
- La **tabla 9** muestra los resultados del ensayo en varios compuestos y diferentes combinaciones de factores de crecimiento con dosis bajas de activina A. algunos compuestos mostraron respuestas robustas de sinérgesis con

varios factores de crecimiento. En otros casos, los efectos de sinérgesis no fueron modestos pero fueron significativos en relación a un control de una dosis baja de activina A. Otros compuestos no tuvieron actividades en relación al control de activina a de dosis baja.

5 **Ejemplo referencial 10**

**Efectos de los compuestos de este invento en la diferenciación de células madres embrionarias humanas simples a células que expresan marcadores del linaje endodérmico definitivo en la ausencia de activina A**

10 Los compuestos de anilina-piridinotriazina cíclica también fueron probados en un formato de examinación utilizando células dispersas a lo largo del tratamiento enzimático a células individuales y colocadas en platos en monocapas para ensayos. El ensayo también hizo cambios para eliminar el suero que pueda suministrar factores de crecimiento aún en bajas dosis. Con ese propósito, el medio basal fue cambiado y el suero fue reemplazado con BSA libre de ácidos grasos. El ensayo fue acortado de 4 días a 3 días para suministrar un lapso de tiempo más corto para medir los resultados. Finalmente, el ensayo incluyó 2 factores de crecimiento, EGF y FGF4 que previamente mostraron efectos significativos pero que no fueron óptimos en la diferenciación endodérmica definitiva en la ausencia de activina A.

20 **Ensayos de examinación**

25 *Siembra celular del ensayo:* Brevemente, aglutinamientos de células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en plásticos de cultivos de tejidos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231) los cultivos fueron tratados con Accutase (Sigma; Cat # A6964), utilizando volúmenes equivalentes de 10 mililitros por cada 10 centímetros cuadrados del área superficial durante 5 minutos a 37 grados centígrados, luego se ejecutó una re - suspensión suave, se peletizó por medio de centrifugación, y se le suspendió en un medio acondicionado de MEF para la contabilización. Para la siembra del ensayo, las células fueron puestas en platos a 50,000 células por centímetro cuadrado en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; Cat #6005182) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ utilizando volúmenes de 100 microlitros/pozo. A las células se les permitió adherirse y recuperar el crecimiento de fase logarítmicas durante un período de 3 a 5 días, con una alimentación diaria con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 grados centígrados, un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

35 *Preparación de compuestos y del ensayo:* agrupamientos de EGF y FGF4 fueron preparados en un plato de propilpropileno de 96 pozos (Corning, Inc.; Cat # 3960). El compuesto 22 fue facilitado a un agrupamiento de 5mM solubilizados en un 100 por ciento de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenado a -80 grados centígrados. Los ensayos fueron iniciados al aspirar el medio de cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS para remover los factores de crecimiento y sueros residuales. Los volúmenes de prueba de 80 microlitros por pozo fueron agregados de vuelta conteniendo un medio basal RPMI 1640 (Invitrogen; Cat # 22400-089) suplementado con un 2.5 por ciento de BSA libre de ácido graso (MP Biomedicals LLC; Cat # 152401), 10ng/ml de bFGF (PeproTech Inc; Cat # 100-18B), 25ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN) y 3.125µM del compuesto 22 con 20 microlitros de 5x agrupamientos de factores de crecimiento para generar una concentración final de un 2 por ciento de BSA libre de ácidos grasos, 8 nanogramos/mililitros de bFGF, 20ng/ml Wnt3a, y 100ng/ml de activina A recombinante humana (PeproTech; Cat #120-14). Los pozos de control negativo contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de BSA libre de ácidos grasos, 8 nanogramos/mililitros de bFGF, 20ng/ml de Wnt3a pero se omitió el tratamiento con activina A.

50 En el 2º día del ensayo, los pozos fueron nuevamente aspirados y alimentados con 80 microlitros por pozo los cuales se agregaron de vuelta conteniendo un medio basal RPMI 1640 suplementado con un 2.5 por ciento de BSA libre de ácidos grasos, 10 nanogramos/mililitros de bFGF, y 3.125 µM del compuesto 22 con 20 microlitros de agrupamientos 5x de factores de crecimiento para generar una concentración final de un 2 por ciento de BSA libre de ácidos grasos, 80 nanogramos/mililitros de bFGF y 2.5 µM del compuesto 22 en el ensayo. Los pozos de control positivo contenían el mismo medio basal suplementado con un 2 por ciento de BSA libre de ácidos grasos, 8 nanogramos/mililitros de bFGF y 100 nanogramos/mililitros de activina A humana recombinante. Las muestras de control negativo contenían el mismo medio basal suplementado con 2 por ciento de BSA libre de ácidos grasos y 8 nanogramos/mililitros de bFGF pero se omitió el tratamiento con activina A.

60 *Análisis de alto contenido:* cuando concluyeron los 4 días del cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS, se fijaron con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y se bloquearon con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; cat # AF1924) se diluyó a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. El anticuerpo secundario conjugado con fluor 488 de Alexa (IgG

anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) se diluyó a 1:200 en PBS y se agregó a cada pozo de muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 4 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregaron durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes se realizó usando un IN Cell Analyzer (GE Healthcare) utilizando el dícroico 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados desde los pozos de control positivos y desde los pozos de control negativos no tratados manchados con únicamente un anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridos para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y los procedimientos subsiguientes de manchado. Las medidas para los números de células totales y la intensidad total de SOX17 fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de la línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 se reportó como la intensidad total o la intensidad integrada, definida como la fluorescencia de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 3500. Los datos de la intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales de cada pozo por la intensidad total promedio para el control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados para los promedios y desviaciones estándar de cada conjunto replicado.

La **tabla 10** muestra los resultados de este ensayo con el compuesto 34. Las muestras de control con EGF y/o FGF4 solas sin el compuesto 34 tuvieron una expresión baja de SOX17. La adición del compuesto 34 añadió una mejora significativa a la expresión de SOX17.

#### **Ejemplo referencial 11**

##### **Una comparación de la habilidad de activina A y GDF-8 para diferenciar células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo**

Un ejemplo previo mostró que GDF-8 es capaz de reemplazar a activina A para diferenciar células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Era importante saber las potencias relativas del GDF-8/GDF-8 y activina A con respecto a su habilidad de diferenciar a las células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Un ensayo de respuesta de dosis fue realizado utilizando concentraciones equivalentes de cada factor de crecimiento para comparar los resultados durante la diferenciación de células madres embrionarias.

*Preparación de las células para el ensayo:* Cultivos en agrupaciones de células madres embrionarias humanas (línea de células madre embrionarias humanas H1) fueron mantenidos en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL en un medio acondicionado con MEF con pases en un promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de un miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen, Cat #: 17105-041) durante de 5 a 10 minutos a 37 grados centígrados seguido por un enjuague de la monocapa con un medio de cultivo acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamiento celulares. Los aglutinamiento fueron centrifugados a una velocidad baja para recaudar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamiento celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para un cultivo de mantenimiento de rutina o a una tasa de 1:1 para un ensayo inmediato. Todas las líneas de células madre embrionarias humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y se evaluaron rutinariamente en referencia a los fenotipos de caritipos y para detectar la ausencia de contaminación de mycoplasma.

Los aglutinamiento celulares utilizados en el ensayo fueron re - suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y sembrados en Packard VIEWPLATES (PerkinElmer; Cat #6005182) de 96 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 100 microlitros/pozo. El medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF fue utilizado para la plantación y expansión iniciales. Se realizó una alimentación diaria al aspirar al medio de cultivo usado de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de medio fresco. Los platos se mantuvieron a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo del ensayo.

*El ensayo:* el ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar de vuelta una porción (100 microlitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba fueron realizadas por cuadruplicado durante un período total del ensayo de 3 días, con una alimentación en el día uno y en el día 2 al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio fresco. 2 cubetas de polipropileno de 12 canales (Argos technologies, Inc, Cat #: B3135) fueron utilizadas para elaborar a los medios de prueba con diferentes concentraciones de activina A. (PeproTech; Cat #120-14) o GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8). Los canales numerados 2 hasta el 12 de cada cubeta contenían un mililitro del medio del ensayo compuesto de un medio RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) suplementado con un 2 por ciento de una Fracción V de Albúmina Bovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc; Cat #

152401) y 8 nanogramos/mililitros de bFGF (PeproTech Inc.; Cat #: 100-18B), y con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF) agregados en el día uno, se omitieron en el día 2 y 3. El canal número uno de cada cubeta contenía 1600 nanogramos/mililitros de activina A o 1600 nanogramos/mililitros de GDF-8, diluidos en el mismo medio del ensayo. Un mililitro del medio fue transferido del canal número uno al canal número 2 y se mezcló bien. Un borde de pipeta fresco fue utilizado para transferir un mililitro del medio del canal número 2 al canal número 3, seguido por una mezcla completa. El mismo procedimiento fue repetido en secuencia a través del canal número 11 para cada cubeta respectiva. El canal número 12 de cada cubeta contenía un medio sin activina A o GDF-8. Al hacer esto, una serie de diluciones de prueba de 2 veces fue creada, conteniendo activina A o GDF-8 a concentraciones que variaban desde 1.6 nanogramos/mililitros hasta 1600 nanogramos/mililitros, para la adición a los pozos del ensayo respectivos.

*Análisis de alto contenido:* cuando se concluyeron los 3 días del cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijado con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavo 3 veces con PBS y se permeabilizó con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y se bloqueó con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) se diluyó a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregó a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavarse 3 veces con PBS, el anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat #A21467) diluido a 1:200 en PBS fue agregado a cada pozo. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 5 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) usando dicroico 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas para la intensidad total de SOX17 en cada pozo fueron obtenidas utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada grupo de datos por cuadruplicado. La expresión proteínica de SOX17 fue reportada como una intensidad total o intensidad integrada, definida por una fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación para los rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de la intensidad total de SOX17 fueron calculados utilizando GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, Inc., Lo Jolla, CA). Los datos fueron estandarizados para definir los valores más pequeños y más grandes en cada conjunto de datos establecidos como 0 por ciento y 100 por ciento respectivamente. La **tabla 11** muestra a los valores estandarizados para cada uno de los grupos de datos de activina A y GDF-8. 2 curvas de respuesta de dosis de sigmoides se muestran en la **figura 2** tal como se generaron utilizando los valores estandarizados mostrados en la **tabla 11**. Los valores  $R^2$ , que indican la forma de la curva, cuando se calcula utilizando GraphPad Prism y que se determina que es 0.9944 para activina A y 0.9964 para GDF-8. Utilizando GraphPad Prism, los valores de  $EC_{50}$  para cada factor de crecimiento fueron calculados y se determinó que fueron 13.9 nanogramos/mililitros para activina A y 184.8 nanogramos/mililitros para GDF-8. Estos datos indican que GDF-8 es menos potente que activina A en relación al inducir células madres embrionarias humanas para diferenciar a células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Sin embargo, GDF-8 puede sustituir a activina A a ciertas concentraciones específicas, puede inducir una población equivalente de células endodérmicas definitivas, tal como se denota por la expresión de SOX17.

### Ejemplo referencial 12

**Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo que fueron formadas de acuerdo a los métodos de este invento son capaces de diferenciarse aún más a células que expresan marcadores característicos de linaje endocrino pancreático**

Poblaciones paralelas de células madres embrionarias humanas fueron diferenciadas a células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo utilizando GDF-8 en combinación con el compuesto 34 o el compuesto 56. Después de eso, un protocolo de diferenciación con pasos fue aplicado para células tratadas para promover la diferenciación hacia linajes endodérmicos y endocrinos pancreáticos. Un control en paralelo que consistía de células tratadas con activina A y Wnt3a se mantuvo para propósitos de comparación a lo largo del proceso de diferenciación con pasos. Muestras fueron tomadas en cada etapa de la diferenciación para determinar la apariencia de las proteínas en bio - marcadores de ARNm representativos de las varias etapas de la diferenciación.

Preparación de las células para el ensayo: cultivos de agrupaciones de células madres embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) se mantuvieron en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos por un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ en un medio acondicionado con MEF con pases que en promedio se realizaron cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una

solución de un miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 grados centígrados seguido de un enjuague de la monocapa con un medio de cultivo acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamiento celulares. Las aglutinaciones fueron centrifugadas a una velocidad baja para recolectar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamientos celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinarios en una tasa de 1:1 para un ensayo inmediato. Todas las líneas celulares ES humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y fueron evaluados rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de mycoplasma.

Los aglutinaciones celulares fueron re suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y sembrados en platos de cultivos de pared negra de 24 pozos (Arctic White; Cat # AWLS-303012) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 0.5 mililitros/pozo. Se realizó una alimentación diaria al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de medio fresco. Los platos fueron mantenidos a 37 grados C, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a lo largo de la duración del ensayo.

*Ensayo:* este ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar devuelta una porción (0.5 mililitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba para el primer paso de la diferenciación fueron realizados durante un periodo de 3 días, alimentando diariamente al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de prueba fresco. En el primer día del ensayo, 100 nanogramos/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) o 200ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) fueron agregados a los pozos de ensayos respectivos donde cada cuarto de crecimiento fue diluido en un medio de RPMI-1640 (Invitrogen; Cat # 22400) con un uno por ciento de fracción V bobina, libre de ácidos grasos (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401), 1% de probumina (Millipore; Cat # 81-068-3) y 20ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF). En el 2º día del ensayo, 100 nanogramos/mililitros de activina A o 200 nanogramos/mililitros de GDF-8 se diluyeron a un medio de RPMI-1640 suplementado con un 2 por ciento de FAF BSA sin Wnt3a. En algunas muestras de prueba donde se utilizó GDF-8, se reemplazó a Wnt3a con el compuesto 34 o el compuesto 56 a una concentración de 2.5 µM, y ya sea el compuesto 34 o el compuesto 56 fue agregado diariamente durante de los 3 días de la diferenciación endodérmica definitiva. En el momento de la conclusión del primer paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para un análisis de citometría de flujo para evaluar los niveles de CXCR4, un marcador de la formación endodérmica definitiva. Pozos adicionales fueron cultivados para un análisis RT-PCR para medir otros marcadores de diferenciación.

En la conclusión del primer paso de diferenciación, los conjuntos replicados de paredes paralelas de cada grupo de tratamiento fueron sujetos a más diferenciación por medio de pasos. Es importante el notar que después de cada paso de diferenciación, todos los pozos en los cuales se continuaba los cultivos y la diferenciación recibieron el mismo tratamiento. El protocolo para esta diferenciación coOntinua se describe a continuación.

El paso 2 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 2 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) del medio DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) que contenía un 2 por ciento de fracción V bobina de albúmina, libre de ácidos grasos (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401), 50ng/ml de FGF7 (PeproTech; Cat # 100-19), y 250nM de ciclopamina (Calbiochem; Cat # 239804).

El paso 3 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 4 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) del DMEM de alta glucosa (Invitrogen; Cat # 10569) suplementada con un uno por ciento de B27 (Invitrogen; Cat # 17504-044), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; Cat # 3344-NG), 250 nM de KAAD-ciclopamina (Calbiochem; Cat # 239804), y 2 µM de ácido trans retinoicos (RA – retinoic acids) (Sigma-Aldrich; Cat # R2625). Para la conclusión del paso 3 de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de PT-PCR para medir los marcadores de diferenciación. Otros pozos de cultivos fueron expuestos a análisis de imágenes de alto contenido para detectar los niveles de expresión proteínica de Pdx1, un factor de transcripción asociado con el endodermo pancreático y Cdx2, un factor de transcripción asociado con el endodermo intestinal.

El paso 4 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 3 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) de DMEM de alta glucosa suplementada con un uno por ciento de B27, 100 ng/ml de Noggin, 100 ng/ml de Netrina-4, 1µM de DAPT (EMD Biosciences; Cat #565770), y 1µM de inhibidor de Alk 5 (Axxora; Cat # ALX-270-445). En el momento de la conclusión del cuarto paso de diferenciación las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir marcadores de diferenciación. Otros pozos de cultivos fueron sujetos a análisis de imágenes de alto contenido para detectar niveles de expresión proteínicos de PDX1.

El paso 5 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 7 días en DMEM de alta glucosa con un uno por ciento de B27, y 1µM de inhibidor de Alk 5. El medio en cada pozo fue aspirado y reemplazado con una porción fresca (0.5 mililitros) todos los días. Cuando concluyó el 5º paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación. Otros pozos



del cultivo fueron sujetos a un análisis de toma de imágenes de alto contenido para detectar los niveles de expresión proteínica de insulina y de glucagón.

5 El paso 6 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 7 días en DMEM de alta glucosa con un 1% B27. El medio en cada pozo fue aspirado y reemplazado con una porción fresca (0.5 mililitros) cada 2 días. Cuando concluyó el 6° paso de diferenciación las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación.

10 *Análisis FACS:* las células para el análisis FACS fueron bloqueadas en una solución 1:5 de 0.5 por ciento de globulina gama humana (Sigma; Cat# G-4386) en PBS (Invitrogen; Cat # 14040-133): BSA - amortiguador de manchado FACS de BD (BD; Cat #554657) durante 15 minutos a 4 grados centígrados. Las células fueron manchadas entonces con anticuerpos para CD9 PE (BD; Cat # 555372), CD99 PE (Caltag; Cat # MHCD9904) y CXCR4 APC (R&D Systems; Cat# FAB173A) durante 30 minutos a 4 grados centígrados. Después de varios lavados en un amortiguador marchador de FACS de BD, las células fueron manchadas para viabilidad con 7-AAD (BD; Cat # 559925) y se ejecutaron en un ensayo FACS de BD. Un anticuerpo de control del isotipo IgG1K de ratón para PE y APC se utilizó para dar paso a las células positivas.

15 *Análisis RT-PCR:* las muestras de ARN fueron purificadas al enlazarse a una membrana de gel sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) en la presencia de un amortiguador de alta salinidad que contenía etanol seguido por un lavado para remover contaminantes. El ARN fue purificado aún más utilizando un equipo libre de ADN TURBO (Ambion, INC), y ARN de alta calidad fue entonces eluído en agua. La producción y la pureza fueron evaluadas por medio de lecturas A260 y A280 en un espectrómetro. Las copias de cDNA fueron hechas a partir del ARN purificado utilizando un equipo de archivo de cDNA de alta capacidad ABI (ABI, CA).

20 A menos que se indique de otra forma, todos los reactivos fueron comprados de Applied Biosystems. Reacciones PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900. TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA) reutilizado con 20 nanogramos de ARN transcrito en reversa en un volumen total de reacción de 20 µl. Cada muestra de cDNA fue ejecutada por duplicado para corregir los errores de pipetas. Los iniciadores y las ondas TAQMAN® marcadas FAM fueron utilizadas en concentraciones de 200nM. El nivel de expresión para cada gen objetivo fue estandarizado utilizando un control endógeno de deshidrogenasa humana de la gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) desarrollado previamente por Applied Biosystems. Conjuntos de iniciadores y de sondas se listan en la **tabla 12**. Después de una incubación inicial a 50 grados centígrados durante 2 minutos seguidos por 95 grados centígrados durante 10 minutos, las muestras fueron puestas en ciclos 40 veces en 2 etapas-un paso de desnaturalización a 95 grados centígrados durante 15 segundos después de un paso de reconocimiento/extensión a 60 grados centígrados durante un minuto. El análisis de los datos se ejecutó utilizando el software GENEAMP®7000 Sequence Detection System (Sistema de Detección Secuencial). Por cada conjunto de iniciador/sonda, el valor Ct fue determinado como el número del ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia alcanzaba un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. Los niveles de expresión genética relativos fueron calculados utilizando el método comparativo Ct. Brevemente, para cada muestra de cDNA, el valor Ct de control endógeno fue sustraído del gen de interés Ct para obtener el valor Ct Delta ( $\Delta$ Ct). El monto estandarizado del objetivo fue calculado como  $2^{-\Delta Ct}$ , asumiendo que la amplificación tenía una eficiencia del 100 por ciento. Los datos finales fueron expresados en relación a una muestra calibradora.

25 *Análisis de alto contenido:* cuando concluyó el cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), se fijaron con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX17 anti humanos de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) se diluyeron a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregaron a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavarse 3 veces con PBS, el anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat #A21467) se diluyó a 1:200 en PBS el cual fue agregado a cada pozo. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 5µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregó durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes. Otros anticuerpos primarios utilizados para el análisis incluyeron a CDX2 anti humano de ratón con una dilución del 1:100 (Invitrogen; Cat # 397800), Pdx1 antihumano de conejo con una dilución de 1:200 (Santa Cruz Biotechnology; Cat # SC-14664), insulina anti humana de conejo con una dilución de 1:200 (Cell Signaling; Cat # C27C9), y glucagón antihumano de ratón con una dilución de 1:1500 (Sigma-Aldrich; Cat # G2654). Los anticuerpos secundarios utilizados para el análisis incluyeron a una dilución 1:400 de flúor 647 de Alexa con IgG anti ratón de gallina (Invitrogen; Cat # A-21463), una dilución de 1:200 de flúor 488 de Alexa con IgG anti cabra de burro (Invitrogen; Cat # A11055), una dilución de 1:1000 de flúor 6:47 de Alexa con IgG anti conejo de gallina (Invitrogen; Cat # A21443), y una dilución de 1:1000 de flúor 488 de Alexa con IgG anti ratón de gallina (Invitrogen; Cat # A21200).

65

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando el dícroico de 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y Fluor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas de la intensidad total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo se determinó basándose en niveles de escala gris (rango de líneas base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y las desviaciones estándar se calcularon para cada punto de datos replicado. La expresión proteínica total fue reportada como una intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación para los rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por el promedio de intensidad total para cada control positivo.

Los resultados PCR para los marcadores representativos de diferenciación se muestran en la **tabla 13** para las células cultivadas de cada paso de diferenciación. Las muestras tratadas con GDF-8 y Wnt3a o con GDF-8 o cualquiera de los compuestos 34 o 56 mostraron, en algunas instancias, niveles parecidos o mejorados de expresión por parte de los marcadores de expresión asociados con la diferenciación endodérmica y endocrina.

La **figura 3** muestra los resultados del análisis de FACS, mostrando la expresión del marcador endodérmico definitivo, CXCR4, después del primer paso de diferenciación. El tratamiento de células madres embrionarias humanas con GDF-8 y Wnt3a produjo un porcentaje equivalente de células positivas CXCR4 en comparación al tratamiento con activina A y Wnt3a. Similarmente, el tratamiento de las células madres embrionarias humanas con GDF-8 y una molécula pequeña (compuesto 34 o compuestos 56) también generaron un porcentaje equivalente o ligeramente más alto de células positivas de CXCR4. La **figura 4** muestra el análisis de toma de imágenes de alto contenido para la expresión proteínica de SOX17 estandarizado en células madres embrionarias humanas después de 3 días de diferenciación al endodermo definitivo. Los niveles de expresión para los grupos de tratamiento que utilizaron GDF-8 y Wnt3a o GDF-8 con una molécula pequeña son similares al tratamiento con Activina A y Wnt3a.

La figura 5 muestra el análisis de toma de imágenes de alto contenido para las expresiones proteínicas Pdx1 y Cdx2 en células madre embrionarias humanas después del 3er paso de diferenciación al endodermo pancreático. Los niveles de expresión para los grupos de tratamiento que utilizan a GDF-8 con Wnt3a o GDF-8 con un compuesto de este invento muestran niveles equivalentes de PDX1 y CDX2. En algunos grupos de tratamiento los números celulares retenidos después de la diferenciación se redujeron lo cual disminuyó a su vez por lo tanto la tasa de células que expresan a PDX1. Resultados similares fueron obtenidos mostrando expresiones de PDX1 estandarizadas equivalentes en todos los grupos de tratamiento después del cuarto paso de diferenciación tal como se muestra la **figura 6**. En la **figura 7**, los niveles proteínicos estandarizados de insulina y glucagón se muestran, dejando clara una expresión equivalente entre los grupos de tratamiento de Activina A y el GDF-8.

Estos resultados colectivos demuestran que GDF-8, en combinación con Wnt3a o con el compuesto 34 o el compuestos 56, puede sustituir a la activina A durante la diferenciación endodérmica definitiva y la diferenciación subsiguiente endodérmica o endocrina pancreática.

### Ejemplo referencial 13

#### La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con otros miembros de la familia de proteínas GDF

Fue importante determinar si el tratar a células madres embrionarias humanas con otros miembros de la familia GDF podría afectar la formación de células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo. Wnt3a en combinación, ya sea con, el compuesto 34 o el compuestos 56 fueron probados en las células madres embrionarias humanas en combinación con 6 factores de crecimiento GDF diferentes [GDF-3, GDF-5, GDF-8, GDF-10, GDF-11, y GDF-15] para determinar la capacidad de los miembros de la familia de proteínas GDF para diferenciar a células madres embrionarias humanas hacia células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo. Un control paralelo de células tratadas con activina A y Wnt3a se mantuvo para propósitos de comparación.

*Preparación de las células para el ensayo:* Cultivos en agrupaciones de células madres embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) se mantuvieron en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos con un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) en un medio acondicionado con MEF con bases en un promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de 1 miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 grados centígrados seguido de un enjuague de la monocapa con el medio de cultivo acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los cultivos celulares. Las aglutinaciones fueron centrifugadas a una velocidad baja para recaudar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamientos fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinarios o a una tasa de 1:1 para ensayos inmediatos. Todas las líneas celulares ES humanas fueron mantenidas a números de pases menores que 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de micoplasma.

Los aglutinamiento celulares fueron re suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y sembrados en Packard VIEWPLATES (PerkinElmer; Cat # 6005182) de 96 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 0.1 mililitros/pozo. Se realizaron alimentaciones diarias al aspirar el medio de cultivo consumido de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de un medio fresco. Los platos se mantuvieron a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> durante el ensayo.

*Ensayo:* el ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar de vuelta porciones (100 microlitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba fueron realizadas en triplicado durante un período de ensayo total de 4 días, haciendo alimentaciones en el día uno y en el día 3 al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de prueba fresco. Varios miembros de la familia de proteínas GDF fueron obtenidos para pruebas de la siguiente manera: GDF-3 (PeproTech; Cat # 120-22); GDF-5 (DePuy Orthopaedics, Inc., una compañía de Johnson & Johnson); GDF-8 (R&D Systems; Cat # 788-G8); GDF-10 (R&D Systems; Cat # 1543-BP); GDF-11 (PeproTech; Cat # 120-11); GDF-15 (R&D Systems; Cat # 957-GD). En el primer día del ensayo, todos los pozos recibieron una porción de (80 microlitros) del medio basal DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con un 0.5 por ciento de suero bovino fetal (Hyclone; Cat # SH30070.03). Un grupo de 5 controles diferentes o muestras de prueba experimentales fueron creados para evaluar a activina A o a varios GDFs en combinación con Wnt3a o el compuesto 34 o el compuestos 56. Estas muestras de prueba fueron agregadas en porciones de 20 microlitros (concentradas a 5x) pozos de ensayos emparejados apropiadamente para producir un volumen de ensayo final de 100 microlitros en cada pozo a las condiciones de ensayo finales indicadas. En el primer conjunto de muestras de control, las siguientes condiciones fueron probadas: 1) sin aditivos (es decir, ningún factor de crecimiento suplementario o moléculas pequeñas); 2) 100 nanogramos/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) en combinación con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF); 3) 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a individualmente; 4) el compuesto 34 individualmente (2.5 µM) sin ningún factor de crecimiento o molécula pequeña; 5) el compuestos 56 individualmente (2.5 µM) sin ningún factor de crecimiento o molécula pequeña. En el 2º conjunto de muestras de prueba, las siguientes condiciones fueron probadas en combinación con 100 nanogramos/mililitros de GDF-3: 1) sin aditivos (es decir, GDF-3 por sí solo); 2) 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a; 3) 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a con el compuesto 34 (2.5 µM); 4) el compuesto 34 (2.5 µM); 5) el compuestos 56 (2.5 µM); y 6) 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a con el compuestos 56 (2.5 µM). En el 3er conjunto de muestras de prueba, cada una de las 6 condiciones fue combinada con 100 nanogramos/mililitros de GDF-5. En el cuarto conjunto de las muestras de prueba, cada una de las 6 condiciones fue combinada con 100 nanogramos/mililitros de GDF-8. En el 5º conjunto de muestras de prueba, cada una de las 6 condiciones fue combinada con 100 nanogramos/mililitros de GDF-10. En el 6º conjunto de las muestras de prueba, cada una de las 6 condiciones fue combinada con 100 nanogramos/mililitros de GDF-11. En el 7º conjunto de las muestras de prueba, cada una de las 6 condiciones fue combinada con 100 nanogramos/mililitros de GDF-15. En el 3er día del ensayo, los pozos para todas las muestras de prueba, recibieron 100 nanogramos/mililitros de Activina A o 100 nanogramos/mililitros del factor de crecimiento respectivo GDF, sin Wnt3a o el compuesto 34 o el compuestos 56, diluido en el medio DMEM:F12 suplementado con un 2 por ciento de FBS.

*Análisis de alto contenido:* cuando concluyó el cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), se fijaron con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX17 anti humanos de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) se diluyeron a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregaron a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavarse 3 veces con PBS, anticuerpos secundarios conjugados con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat #A21467) se diluyeron a 1:200 en PBS lo cual fue agregado a cada pozo. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 5 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando dicroico 51008bs para las células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas para la intensidad total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en los niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica total fue reportada como una intensidad total o una intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación para los rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de intensidad total fueron estandarizados al dividir a las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio para el control positivo.

La **figura 8** muestra el análisis de toma de imágenes de alto contenido para la expresión proteínica de SOX17 en células madres embrionarias humanas después de 4 días de diferenciación a endodermos definitivos. En cada caso, los resultados son estandarizados al tratamiento de control positivo con activina A y Wnt3a. En la **figura 8A**, solamente el tratamiento de control positivo generó una expresión significativa de SOX17; el tratamiento con únicamente Wnt3a o ya sea, el compuesto 34 o el compuesto 56 individualmente no pudo inducir la expresión de SOX17. En la **figura 8**, los paneles **B al G**, muestran los niveles estandarizados de expresión de SOX17 para cada factor de crecimiento GDF que este sustituyendo a activina A en el tratamiento respectivo. GDF-3 (**la figura 8B**) y GDF-5 (**la figura 8C**) indujeron una expresión débil de SOX17 y sólo en muestras de prueba donde uno de los compuestos de este invento estuvieron presentes. GDF10 (**la figura 8D**), GDF11 (**la figura 8E**) y GDF15 (**la figura 8G**) indujeron niveles significativos de la expresión de SOX17, más que lo que se observó con los tratamientos de GDF3 o 5 pero menos que lo observado con los tratamientos de activina A y Wnt3a. En general, la expresión de SOX17 fue insignificante cuando se combinó a GDF-10, GDF-11 o a GDF-15 con Wnt3a, pero mejor en combinación con uno de los compuestos de este invento; en particular cuando se combinó con el compuesto 34. La **figura 8D** muestra los resultados para los grupos de tratamiento que utilizaron a GDF-8 donde GDF-8 en combinación con, ya sea, el compuesto 34 o el compuesto 56 causaron una inducción robusta de SOX17, excediendo los resultados vistos con el control objetivo de activina A / Wnt3a. En algunos de estos ejemplos, la presencia del compuesto 34 o el compuestos 56 combinados con un factor de crecimiento GDF también causaron un incremento en el número de células durante la diferenciación.

Estos resultados colectivos demuestran que GDF-8 fue superior a todos los otros miembros de la familia GDF probados cuando se utilizaron en combinación con el compuesto 34 o el compuesto 56, y podría sustituir a la activina A durante diferenciaciones endodérmicas definitivas.

#### Ejemplo referencial 14

#### Formación de células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo con otros miembros de la súper familia de proteínas TGF

Fue importante el determinar si el tratar a las células madres embrionarias humanas con otros miembros de la súper familia TGF pudiese facilitar la formación de células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. El compuesto 34 y Wnt3a fueron probados en células madres embrionarias humanas en combinación con, ya sea, TGF13-1, BMP2, BMP3, o BMP4 para determinar la capacidad de los miembros de la súper familia TGF para diferenciar a las células madres embrionarias humanas hacia células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En paralelo, 2 fuentes comerciales diferentes de GDF-8 fueron probadas con Wnt3a para su habilidad para diferenciar células madres embrionarias humanas hacia células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Un control positivo utilizando activina A con Wnt3a se mantuvo para propósitos de comparación.

*Preparación de células para ensayos:* los cultivos en almacenamientos de células madres embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) fueron mantenidas en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos por un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ -(bd biosciences; cat # 356231)- en un medio acondicionado con MEF con pases en promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de 1 miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 grados centígrados seguido de un enjuague de la monocapa con el medio de cultivo acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamiento celulares. Los aglutinamiento fueron centrifugados a una velocidad baja para recaudar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamiento celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinario o a una tasa de 1:1 para ensayos inmediatos. Todas las líneas de células madres embrionarias fueron mantenidas a números de pases que no superaron los 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de mycoplasma.

Los aglutinamiento celulares fueron re - suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y sembrados en Packard VIEWPLATES (PerkinElmer; Cat # 6005182) de 96 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 0.1 mililitro/pozo. La alimentación diaria fue realizada al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de medio fresco. Los platos fueron mantenidos a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a lo largo del ensayo.

*El ensayo:* el ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar devuelta porciones (100 microlitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba fueron realizadas en triplicado durante un período total del ensayo de 3 días, con alimentaciones en el día uno y en el día 2 al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de prueba fresco. Varias proteínas de factores de crecimiento fueron obtenidas para las pruebas de la siguiente forma: BMP-2 (R&D Systems; Cat # 355-BM); BMP-3 (R&D Systems; Cat # 113-BP); BMP-4 (R&D Systems; Cat # 314-BP); TGF13-1 (R&D Systems; Cat # 240-B); GDF-8 (PeproTech; Cat # 120-00); GDF-8 (Shenandoah; Cat #100-22); y activina A (PeproTech; Cat #120-14). En el primer día del ensayo, cada pozo fue tratado con 80 microlitros de medio de crecimiento [RPML-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) con un 2.5% de Fracción V

de Albúmina Bovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA - Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free) (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401), y 10 nanogramos/mililitros de bFGF]. En algunos pozos, se agregó 25 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF) al medio de crecimiento para generar una concentración final del ensayo de 20 nanogramos/mililitros. En algunos pozos, se agregó activina A al medio de crecimiento para generar una concentración final del ensayo de 100 nanogramos/mililitros. En algunos pozos, 3.125µM del compuesto 34 se agregaron al medio de crecimiento para generar una concentración final del ensayo de 2.5µM. un ajuste de la dosis de factores de crecimiento adicionales (concentrado a 5x, diluido a RPMI-1640) se agregó a los pozos de prueba respectivos para generar un volumen final del ensayo de 100 microlitros en cada pozo para todas las condiciones de tratamiento. En el 2° día del ensayo, se omitieron del ensayo a Wnt3a y al compuesto 34. Todos los pozos recibieron 80 microlitros de medio de crecimiento [RPMI-1640 que contenía 2.5% de FAF BSA, y 10 nanogramos/mililitros de bFGF] y 20 microlitros de la dilución del factor de crecimiento respectivo (concentrado a 5x, diluido en RPMI-1640). Controles comparativos para este ensayo incluyeron: 1) No se agregaron factores de crecimiento; 2) únicamente Wnt3a; y 3) activina A y Wnt3a. Cada fuente comercial de GDF-8 fue probada en combinación con Wnt3a. Cada uno de los factores de crecimiento BMP, así como TGF β-1, fueron probados en combinación con Wnt3a, con el compuesto 34, y con Wnt3a en combinación con el compuesto 34.

*Análisis de alto contenido:* cuando concluyó el cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), se fijaron con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron un con un 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y se bloquearon con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) se diluyeron a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregaron a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavarse 3 veces con PBS, los anticuerpos secundarios conjugados con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat #A21467) diluidos a 1:200 en PBS fueron agregados a cada pozo. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 5 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

La toma de imágenes se realizó utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) que usa un dicroico de 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas para la intensidad total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo se determinó basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada punto de datos replicado. La expresión proteínica total fue reportada como intensidad total o intensidad integrada, definidas como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en criterios aceptables para los rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio para cada control positivo.

La **figura 9** muestra un análisis de toma de imágenes de alto contenido para la expresión proteínica de SOX17 en células madre embrionarias humanas después de 3 días de diferenciación hacia el endodermo definitivo. En cada caso, los resultados son estandarizados para el tratamiento de control positivo para activina A con Wnt3a. Los resultados en la **figura 9A**, muestran que el tratamiento con sólo el medio de crecimiento, o Wnt3a individualmente no pudieron inducir la expresión de SOX17; solamente la adición de activina A causó una expresión robusta de SOX17. En la **figura 9**, en los **paneles B y C**, los resultados de cada una de las fuentes comerciales de GDF-8 fueron mostradas, donde se podía apreciar las diferencias en potencia entre los 2 proveedores. Aunque menos potente que la activina A, existió una inducción significativa de la expresión de SOX17 en las células tratadas con GDF-8 en combinación con Wnt3a. En la **figura 9**, en los **paneles D, E, F y G**, los resultados mostrados para la diferenciación endodérmica definitiva utilizando BMP2, BMP3, BMP4, y TGF β-1, incorporando un ajuste de dosis para cada factor de crecimiento en combinación con Wnt3a, o el compuesto 34, o ambos Wnt3a con el compuesto 34. Aunque algunos tratamientos tuvieron un efecto significativo en los números de células a la conclusión del ensayo (por ejemplo, BMP2 y BMP4), la inducción de la expresión SOX17 que resulta de cualquiera de estos factores de crecimiento y combinaciones de tratamiento fue débil o insignificante en comparación con el tratamiento de Wnt3a individual.

#### Ejemplo referencial 15

**Estudios que varían en las dosis para la formación de células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con una selección de los compuestos de este invento**

Fue importante el conocer las concentraciones óptimas de funcionamiento para el compuesto 181, el compuesto 180, el compuesto 19, el compuesto 202, el compuesto 40 y el compuesto 34 que mediaban la formación de las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En conjunto, las comparaciones

hombro a hombro fueron realizadas para ajustes de cada compuesto en combinación con la activina A y GDF-8 en el ensayo endodérmico definitivo. Finalmente, la duración de la exposición para cada compuesto fue probada en ensayos, también en combinación con activina A o GDF-8, agregando los compuestos solamente en el primer día del ensayo o a lo largo de los 3 días de la formación endodérmica definitiva.

5 *Preparación de las células para el ensayo:* los cultivos en agrupaciones de células madres embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) fueron mantenidas en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231)- en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de 8ng/ml bFGF (PeproTech Inc.; Cat # 100-18B) con pases en un promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de un miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante de 5 a 7 minutos a 37 grados centígrados seguido de un enjuague de la monocapa con el medio de cultivos acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamientos celulares. Los aglutinamiento fueron centrifugados a una velocidad baja para recaudar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamiento celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinario o a una tasa de 1:1 para ensayos inmediatos. Todas las líneas de células madres embrionarias humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de mycoplasma.

20 Los aglutinamiento celulares fueron re - suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y sembrados en Packard VIEWPLATES (PerkinElmer; Cat # 6005182) de 96 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 0.1 mililitro/pozo. La alimentación diaria fue realizada al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de medio fresco. Los platos fueron mantenidos a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a lo largo de la duración del ensayo.

25 **[0373]** *El ensayo:* el ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar porciones de (100 microlitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba fueron realizadas por cuadruplicado durante un período total del ensayo de 4 días, con alimentación diaria al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de prueba fresco. Cada pozo fue tratado con 80 microlitros del medio de crecimiento [RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) que contenía un 2.5% de la Fracción V de Albúmina Bovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA - Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free) (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401), 10 nanogramos/mililitros de bFGF, y factores de crecimiento adicionales (concentrado a 1.25x)] y 20 microlitros del compuesto de prueba (concentrado a 5x diluido en RPMI-1640) para producir un volumen de ensayo final de 100 microlitros en cada pozo. Los compuestos de prueba en este ensayo incluyeron 6 de los compuestos de este invento: el compuesto 181, el compuesto 180, el compuesto 19, el compuesto 202, el compuesto 40 y el compuesto 34, y un inhibidor de GSK3i BIO comercial (EMD Chemicals, Inc.; Cat # 361550). En el primer día del ensayo, los pozos fueron tratados con varias condiciones de control o experimentales. Las condiciones de control, con concentraciones finales del ensayo tal como fueron indicadas, fueron las siguientes: 1) únicamente el medio de crecimiento; 2) 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a únicamente (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF); 3) 100 nanogramos/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14); 4) 100 nanogramos/mlitros de activina A y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a; 5) 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8); 6) 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a. Los compuestos de prueba fueron diluidos 2 veces en series para generar un rango de concentración desde 78 nM a 10 µM en el ensayo final. Muestras de prueba experimentales combinaron cada serie individual de dilución de compuestos con 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8, ambos conjuntos de tratamiento en la ausencia de Wnt3a. En el 2º y 3º día del ensayo, algunos pozos continuaron siendo tratados con 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a o el compuesto de prueba diluido en combinación, ya sea, con activina A o GDF-8. En otros pozos, el tratamiento de activina A o GDF-8 continuó en el 2º y el 3º día del ensayo, pero el Wnt3a o el compuesto de prueba diluido fueron removidos.

50 *Análisis de alto contenido:* cuando concluyó el cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijado con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y se bloquearon con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX anti humanos de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) se diluyeron a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregaron a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavarse 3 veces con PBS, el anticuerpo secundario (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat #A21467) conjugado con flúor 488 de Alexa diluido a 1:200 en PBS fue agregado a cada pozo. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 5 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregaron durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes.

65 La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) que usa el dicroico 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas para la intensidad total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer

5 Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo se determinó basándose en niveles de escala gris (rango de la línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y las desviaciones estándar fueron calculados para cada punto de datos replicado. La expresión proteínica total fue reportada como intensidad total o intensidad integrada, definidas como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de la intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio del control positivo.

10 *Resultados:* los resultados del análisis de alto contenido se muestran para la expresión de SOX17 en las **figuras 10-14** y los números celulares resultantes a la conclusión del ensayo en las **figuras 15-19**. La **figura 10** muestra los resultados para la expresión de SOX17 que resulta de los tratamientos de control utilizando activina A o GDF-8, ya sean solas o en combinación con Wnt3a. Los tratamientos de activina A resultaron en una expresión significativamente más alta de SOX17 que lo que se observó con el tratamiento de GDF-8. Asimismo, tal como se dio en la **figura 15**, el tratamiento de activina A resultó en un número más alto de células a la conclusión del ensayo que lo que se observó con el tratamiento de GDF-8 sin importar si Wnt3a estuvo presente durante uno o los 3 días durante el ensayo. El agregar cualquiera de los compuestos 181, 180, 19, 202, 40 o 34 con tratamientos de activina A no mejoró la expresión de SOX17 (**figuras 11-12**) o incremento los números celulares (**figuras 17-18**), sin importar si es que el compuesto estuvo presente durante un día al inicio del ensayo o los 3 días a lo largo de la duración del ensayo. Sin embargo, el tratamiento con el compuesto 181, el compuesto 180, el compuesto 19, el compuesto 202, el compuesto 40 o el compuesto 34 en combinación con GDF-8 mejoró significativamente la expresión de SOX17 (**figuras 13-14**) y también mejoró los números de células al final del ensayo (**figuras 18-19**). Cuando el compuesto 181, el compuesto 180, el compuesto 19, el compuesto 202, el compuesto 40 o el compuesto 34 y GDF-8 fueron utilizados en combinación, las mejoras a la expresión de SOX17 y a los números celulares, en muchos casos, fueron equivalentes a los resultados observados con el tratamiento de activina A. Una diferenciación mejorada en combinación con GDF-8 fue aparente en un efecto de ajuste de dosis para muchos de los compuestos, aunque a veces se observó toxicidad a las concentraciones más altas. En la mayoría de casos, efectos beneficiosos óptimos del tratamiento o con el compuesto y GDF-8 fueron aparentes con solamente un día de exposición al compuesto al inicio del ensayo. En algunos casos, la presencia del compuesto a lo largo de la duración del ensayo no tuvo efectos negativos o tuvieron un efecto ligeramente beneficioso. De estos resultados colectivos, se determinó un rango de concentración de funcionamiento óptimo para cada compuesto en combinación con el tratamiento de GDF-8. Los resultados fueron específicos de acuerdo a compuesto, generalmente en el rango de 1-10  $\mu\text{M}$  tal como se probó en este ensayo.

### 35 **Ejemplo referencial 16**

**Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo que fueron formadas sin apearse a los métodos de este invento pueden diferenciarse aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático**

40 Moléculas pequeñas adicionales fueron probadas en combinación con GDF-8 para una diferenciación endodérmica definitiva. Estas incluyeron un inhibidor comercial de GSK3 así como compuestos de este invento. Un protocolo de diferenciación mediante pasos fue aplicado a las células tratadas con GDF-8 en combinación con varias moléculas pequeñas. La eficacia de la diferenciación se determinó por la expresión genética de los bio - marcadores representativos del linaje endodérmico o endocrino pancreático. Una muestra de control paralela de células tratadas con activina A o Wnt3a fue mantenida para propósitos de comparación a lo largo del proceso de diferenciación por pasos.

50 *Preparación de las células para el ensayo:* cultivos en agrupamientos de células madre embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) se mantuvieron en un estado no diferenciado pluripotente en platos acondicionados con MEF con pases en un promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de 1 miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen, Cat #: 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 grados centígrados seguido de un enjuague de la monocapa con un medio de cultivos acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamientos celulares. Los aglutinamientos fueron centrifugados a una velocidad baja para recuperar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamientos celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinarios o a una tasa de 1:1 para ensayos inmediatos. Todas las líneas de células madres embrionarias humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de micoplasma.

60 Los aglutinamientos celulares fueron re - suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y colocados en platos de cultivos de paredes negras de 24 pozos (Arctic White; Cat # AWLS-303012) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL en volúmenes de 0.5 mililitros/pozo. Se realizó una alimentación diaria al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazándolo con un volumen igual de medio fresco. Los platos se mantuvieron a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de  $\text{CO}_2$  a lo largo de la duración del ensayo.

5 *El ensayo:* El ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar devuelta una porción (0.5 mililitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba para el primer paso de diferenciación se realizaron durante un período de 3 días, con alimentación diaria al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de pruebas fresco. El primer día del ensayo, 100 nanogramos/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) o 100 nanogramos/ml de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) se agregaron a los usos respectivos del ensayo donde cada factor de crecimiento fue diluido en un medio RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) con un 2 por ciento de Fracción V de Albúmina Bovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA - % Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free) (Proliant Inc. Cat #: SKU 68700), y 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF). En el 2°

10 día del ensayo, 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 se diluyeron al medio RPMI-1640 suplementado con un 2 por ciento de FAF BSA sin Wnt3a. En algunas muestras de prueba donde se utilizaba GDF-8, Wnt3a fue reemplazado por un compuesto de moléculas pequeñas, agregado únicamente en el primer día de la diferenciación endodérmica definitiva. Estas moléculas pequeñas incluyeron el compuesto 19 (2.5µM en el ensayo), el compuesto 202 (2.5µM en el ensayo), el compuesto 40 (2.5µM en el ensayo), o un BIO inhibidor de GSK3 disponible comercialmente (0.5µM en el ensayo) (EMD Chemicals, Inc.; Cat # 361550). A la

15 conclusión del primer paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para hacer un análisis de citometría de flujo para evaluar los niveles de CXCR4, un marcador de formaciones de endodermos definitivos. Pozos adicionales fueron cultivados para un análisis de RT-PCR para medir otros marcadores de diferenciación.

20 A la conclusión del primer paso de la diferenciación endodérmica definitiva, los conjuntos replicados de los pozos paralelos de cada grupo de tratamiento fueron sujetos a una mayor diferenciación en forma de pasos. Es importante el tomar en cuenta que después del primer paso de diferenciación, todos los pozos que fueron sujetos a cultivos y diferenciaciones subsiguientes recibieron el mismo tratamiento. El protocolo para esta continuación en diferenciación se describe más adelante.

25 El paso 2 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 2 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros del medio DMEM:F12) (Invitrogen; Cat # 11330-032) que contenía un 2 por ciento de FAF BSA, 50 nanogramos/mililitros de FGF7 (PeproTech; Cat # 100-19), y 250 nM de ciclopamina – KAAD (Calbiochem; Cat # 239804).

30 El paso 3 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 7 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) de DMEM de alta glucosa (Invitrogen; Cat # 10569) suplementado con un 0.1 por ciento de Albumax (Invitrogen; Cat #: 11020-021), 0.5x de insulina-transferrina-Selenio (IT S -X (Insulin-Transferrin-Selenio); Invitrogen; Cat # 51500056), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; Cat # 3344-NG), 250 nM de KAAD-ciclopamina, y 2µM de ácido holo-trans-retinoico (RA – retinoic acid) (Sigma-Aldrich; Cat # R2625). En la conclusión del 3<sup>er</sup> paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para un análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación. Otros pozos del cultivo fueron sujetos a un análisis de toma de imágenes de alto contenido para detectar los niveles de expresión proteínica de Pdx1 y Cdx2.

35 El paso 4 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 3 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) de DMEM de alta glucosa suplementado con 0.1 por ciento de Albumax, 0.5x de insulina-transferrina-selenio, 100 nanogramos/mililitros de Noggin y 1µM de inhibidor de Alk 5 (Axxora; Cat # ALX-270-445). Cuando concluyó el cuarto paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación. Otros pozos del cultivo fueron sujetos a análisis de toma de imágenes de alto contenido para detectar niveles de expresión proteínica de Pdx1.

40 El paso 5 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 7 días en DMEM de alta glucosa con 0.1 por ciento de Albumax, 0.5x de insulina-transferrina-selenio, y 1µM de inhibidor de Alk 5. El medio en cada pozo fue aspirado y reemplazado por una porción fresca (0.5 mililitros) diariamente. Cuando concluyó el 5° paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir marcadores de diferenciación. Otros pozos del cultivo fueron sujetos a un análisis de toma de imágenes de alto contenido para detectar los niveles de expresión proteínica de insulina y de glucagón.

45 *Análisis de FACS:* las células para el análisis de FACS fueron bloqueadas en una solución 1:5 de 0.5 por ciento de gama humana - globulina (Sigma; Cat# G-4386) en PBS (Invitrogen; Cat # 14040-133): amortiguador de manchado para FACS de BD – BSA (BD; Cat #554657) durante 15 minutos a 4 grados centígrados. Las células fueron manchadas entonces con anticuerpos para CD9 PE (BD; Cat # 555372), CD99 PE (Caltag; Cat # MHCD9904) y CXCR4 APC (R&D Systems; Cat# FAB173A) durante 30 minutos a 4 grados centígrados. Después de varios lavados en un amortiguador de manchado de FACS de BD, las células fueron manchadas para viabilidad con 7-AAD (BD; Cat # 559925) y se ejecutó en una agrupación de FACS de BD. Un anticuerpo de control de isotipo IgG1K de ratón para PE y APC fue utilizado para medir las células positivas porcentuales.

50

55

60



*Análisis de RT-PCR:* muestras de ARN fueron purificadas al enlazarse a una membrana de gel de sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) en la presencia de un amortiguador de alta salinidad que contenía etanol seguido de lavados para remover los contaminantes. El ARN fue purificado aún más utilizando el equipo libre de ADN turbo (Ambion, INC), y el ARN de alta calidad fue eluido en agua. La producción y la pureza fueron evaluadas por medio de lecturas A260 y A280 en un espectrómetro. Las copias de cDNA fueron hechas de ARN purificado utilizando un equipo de archivo de cDNA de alta capacidad ABI (ABI, CA).

A menos que se indique de otra forma, todos los reactivos fueron comprados de Applied Biosystems, las reacciones PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando el sistema de detección secuencial 7900 de ABI PRISM®. Se utilizó TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA) con 20 nanogramos de ARN transcrito en reversa en volumen de reacción total de 20 microlitros. Cada muestra de cDNA fue ejecutada por duplicado para corregir errores de pipetas. Los inicializadores y las ondas de TAQMAN® etiquetadas como FAM fueron utilizadas a concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión para cada gen objetivo fue estandarizado utilizando un control endógeno de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) desarrollado previamente por Applied Biosystems. Los conjuntos de iniciadores y de sondas se listan en la **tabla 12**. Después de una incubación inicial de 5 grados C durante 2 min seguido por 95 grados centígrados durante 10 minutos, las muestras fueron expuestas a ciclos 40 veces en 12 etapas. Un paso de desnaturalización a 95 grados centígrados durante 15 segundos seguido por un paso de recocido/extensión a 60 grados centígrados durante un min. El análisis de datos fue ejecutado usando el software del Sistema de Detección Secuencial 7000 de GENEAMP® (GENEAMP®7000 Sequence Detection System software). Para cada conjunto de inicializadores/sondas, un valor Ct fue determinado como el número de ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia alcanzó un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. Los niveles de expresión genética relativos fueron calculados usando el método comparativo Ct. Brevemente, para cada muestra de cDNA, el valor endógeno de Ct fue sustraído del Ct del gen de interés para detectar el valor delta de Ct ( $\Delta Ct$ ). El monto normalizado del objetivo fue calculado como  $2^{-\Delta Ct}$ , asumiendo una amplificación con un 100 por ciento de eficiencia. Los datos finales fueron expresados en relación a una muestra calibradora.

*Análisis de alto contenido:* en la conclusión de cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijados con un 4 por ciento de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.5 por ciento de Tritón X-100 100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. El anticuerpo primario (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) fue diluido a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y agregado a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavarse 3 veces con PBS, los anticuerpos secundarios conjugados con flúor 488 de Alexa (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat # A21467) diluidos a 1:200 en PBS fueron agregados a cada pozo. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 5 microgramos/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y dejados en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes. Otros anticuerpos primarios utilizados para el análisis incluyeron insulina anti humana de conejo a una dilución de 1:200 (Cell Signaling; Cat # C27C9), y glucagón antihumano de ratón a una dilución de 1:1500 (Sigma-Aldrich; Cat # G2654). Los anticuerpos secundarios utilizados para el análisis incluyeron IgG anti conejo de gallina con flúor 647 de Alexa a una dilución de 1:1000 (Invitrogen; Cat # A21443), e IgG anti ratón de gallina (Invitrogen; Cat # A21200) con flúor 488 de Alexa a una dilución de 1:1000.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) que usa dicroico 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas para la intensidad total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y las desviaciones estándar fueron calculados para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica total fue reportada como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación para los rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio para el control positivo.

Los resultados de PCR para marcadores de diferenciación representativos se muestran en la **tabla 14** para las células cultivadas de cada paso de diferenciación. Las muestras tratadas con GDF-8 y Wnt3a o con GDF-8 y una molécula pequeña mostraron niveles de expresión similares de marcadores asociados con la diferenciación endodérmica y endocrina.

El panel A de la **figura 20** muestra los análisis FACS para el marcador endodérmico definitivo, CXCR4, después del primer paso de diferenciación. El tratamiento de las células madres embrionarias humanas con GDF-8 y Wnt3a generaron un porcentaje similar de células positivas de CXCR4 en comparación al tratamiento con activina A y Wnt3a. El tratamiento de las células madres embrionarias humanas con GDF-8 y un compuesto de este invento

(compuesto 19, compuesto 202, compuesto 40 o el BIO inhibidor IX de GSK3) también generaron un porcentaje equivalente o ligeramente superior a la células positivas de CXCR4. El **panel B de la figura 20** muestra el análisis de toma de imágenes de alto contenido para la expresión proteínica SOX17 estandarizada en células madres embrionarias humanas después de 3 días de diferenciación a endodermos definitivos. En algunos casos, el tratamiento con GDF-8 resultó en un número celular más bajo a la conclusión del primer paso de diferenciación. Sin embargo, el tratamiento con GDF-8 en combinación con Wnt3a o con los inhibidores de moléculas pequeñas indujeron claramente la expresión de SOX17, un marcador del endodermo definitivo. En una instancia, el tratamiento con GDF-8 y el compuesto 40 generaron números celulares en los cultivos y una expresión de SOX17 equivalente al tratamiento con activina A y Wnt3a.

El **panel C de la figura 20** muestra el análisis de toma de imágenes de alto contenido para los números celulares recuperados de los cultivos tratados a lo largo del paso 5 de diferenciación. Tal como se observó anteriormente al final del paso 1, algunos tratamientos causaron una baja en la recuperación celular en relación al tratamiento con activina A y Wnt3a. Éste bajo el número de células fue visto específicamente con los grupos de tratamientos que utilizaban a GDF-8 con el BIO inhibidor de GSK3 y también los que utilizaban a GDF-8 con el compuesto 19. Grupos de tratamiento de GDF-8 adicionales tuvieron recuperaciones celulares similares a los tratamientos con activina A y Wnt3a. En la **figura 20 en los paneles D-F**, los niveles proteínicos estandarizados de insulina y de glucagón son mostrados, junto con sus tasas respectivas para cada grupo de tratamiento. Niveles similares de insulina y de glucagón pudieron ser obtenidos con cada uno de los tratamientos de GDF-8 en relación al tratamiento con activina A y Wnt3a, demostrando que GDF-8, en combinación con Wnt3a o una molécula pequeña, puede sustituir a activina A durante la diferenciación endodérmica definitiva y las diferenciaciones subsiguientes endodérmica y endocrina pancreáticas.

#### Ejemplo referencial 17

**Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo que fueron formadas utilizando a GDF-8 y a un compuesto de este invento son capaces de diferenciarse aún más a células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático**

Moléculas pequeñas adicionales fueron probadas en combinación con GDF-8 y activina A para su diferenciación endodérmica definitiva. Estas incluyeron un inhibidor comercial de GSK3 así como los compuestos de este invento. Un protocolo de diferenciación por pasos fue aplicado a las células tratadas con GDF-8 en combinación con varias moléculas pequeñas. La eficacia de la diferenciación fue determinada por la expresión genética de bio - marcadores representativos de los linajes endodérmico y endocrino pancreáticos. Una muestra de control paralela de células tratadas con activina A y Wnt3a fue mantenida para propósitos de comparación a lo largo del proceso de diferenciación por medio de pasos.

*Preparación de células para el ensayo:* cultivos en agrupaciones de células madres embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) fueron mantenidas en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos por un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) en un medio acondicionado, MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF (PeproTech Inc.; Cat # 100-18B) con pases en promedio de 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de un miligramo/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 grados centígrados seguido de un enjuague de la monocapa con un medio de cultivo acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamiento celulares. Los aglutinamiento fueron centrifugados a una velocidad baja para recolectar un pellet celular y remover la dispasa residual. Los aglutinamiento celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinario o a una tasa de 1:1 para ensayos inmediatos. Todas las líneas de células ES humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y fueron evaluadas rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de mycoplasma.

Los aglutinamiento celulares fueron re - suspendidos uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 nanogramos/mililitros de bFGF y puestas en platos de cultivos de paredes negras de 24 pozos (Arctic White; Cat # AWLS-303012) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 0.5 mililitros/pozo. Se realizó una alimentación diaria al aspirar el medio de cultivo gastado en cada pozo y reemplazándolo con un volumen igual de medio fresco. Los platos fueron mantenidos a 37 grados centígrados, con un 5 por ciento de CO<sub>2</sub> durante el ensayo.

*Ensayo:* el ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar de vuelta una porción (0.5 mililitros) del medio de prueba. Las condiciones de prueba para el primer paso de diferenciación fueron realizadas durante un período de 3 días, con una alimentación diaria al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de prueba fresco. En el primer día del ensayo, 100 nanogramos/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) o 100 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) fueron agregados a los pozos del ensayo respectivos donde cada factor de crecimiento fue diluido en un medio de RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) con un 2 por ciento de Fracción V de Albúmina Bovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA - Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free) (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401). En algunas muestras, 20 nanogramos/mililitros de Wnt3a (R&D Systems;

- 5 Cat # 1324-WN/CF) también fueron incluidos. En el 2° día del ensayo, 100 nanogramos/mililitros de activina A o 100 nanogramos/mililitros de GDF-8 fueron diluidos en un medio de RPMI-1640 suplementado con un 2 por ciento de FAF BSA, omitiendo Wnt3a de todas las muestras. En algunas muestras de prueba que utilizaban GDF-8, el Wnt3a fue reemplazado con una concentración específica de un compuesto de moléculas pequeñas, agregado únicamente en el primer día de la diferenciación endodérmica definitiva. Estas moléculas pequeñas incluyeron: el compuesto 181 (1.25  $\mu\text{M}$  en el ensayo), el compuesto 180 (2.5  $\mu\text{M}$  en el ensayo), el compuesto 19 (10  $\mu\text{M}$  en el ensayo), el compuesto 202 (2.5  $\mu\text{M}$  en el ensayo), el compuesto 40 (5  $\mu\text{M}$  en el ensayo), el compuesto 34 (2.5  $\mu\text{M}$  en el ensayo), el compuesto 206 (2.5  $\mu\text{M}$  en el ensayo), y un BIO inhibidor IX de GSK3 (10  $\mu\text{M}$  en el ensayo), (EMD Chemicals, Inc.; Cat # 361550). Cuando el primer paso de diferenciación concluyó, las células de algunos pozos fueron cultivadas para un análisis de citometría de flujo para evaluar los niveles de CXCR4, un marcador de formaciones de endodermos definitivos. Pozos adicionales fueron cultivados para un análisis de RT-PCR para medir otros marcadores de diferenciación.
- 10 Cuando concluyó el primer paso de la diferenciación endodérmica definitiva, conjuntos replicados de pozos paralelos de cada grupo de tratamiento fueron sujetos a más diferenciaciones en forma de pasos. Es importante el mantener en mente que después del primer paso de diferenciación, todos los pozos que fueron sujetos a cultivos y diferenciaciones subsiguientes recibieron el mismo tratamiento. El protocolo para esta diferenciación continuada se describe más adelante.
- 15 El paso 2 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 2 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) de DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) que contenía un 2 por ciento de FAF BSA, 50 nanogramos/mililitros de FGF7 (PeproTech; Cat # 100-19), y 250nM de ciclopamina-KAAD (Calbiochem; Cat # 239804).
- 20 El paso 3 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 4 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) de DMEM de alta glucosa (Invitrogen; Cat # 10569) suplementado con un 0.1 por ciento de Albumax (Invitrogen; Cat #: 11020-021), 0.5x de insulina-transferrina-selenio (IT S -X ;Invitrogen; Cat # 51500056), 50 nanogramos/mililitros de FGF7, 100 nanogramos/mililitros de Noggin (R&D Systems; Cat # 3344-NG), 250 nM de KAAD-ciclopamina, y 2 $\mu\text{M}$  de ácido holo-trans-retinoico (RA -retinoic acid) (Sigma-Aldrich; Cat # R2625). Cuando concluyó el 3<sup>er</sup> paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación.
- 25 El paso 4 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 3 días. Las células fueron alimentadas diariamente al aspirar el medio de cada pozo y reemplazarlo con una porción fresca (0.5 mililitros) de DMEM de alta glucosa suplementado con un 0.1 por ciento de Albumax, 0.5x de insulina-transferrina-selenio, 100 nanogramos/mililitros de Noggin y 1  $\mu\text{M}$  de inhibidor de Alk 5 (Axxora; Cat # ALX-270-445). Cuando haya concluido el cuarto paso de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación.
- 30 El paso 5 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 7 días en DMEM de alta glucosa con un 0.1 por ciento de Albumax, 0.5x de insulina-transferrina-selenio, y 1 $\mu\text{M}$  de inhibidor de Alk 5. El medio en cada pozo fue aspirado y reemplazado con una porción fresca (0.5 mililitros) todos los días. Cuando concluyó el paso 5 de diferenciación, las células de algunos pozos fueron cultivadas para su análisis por medio de RT-PCR para medir los marcadores de diferenciación. Otros pozos del cultivo fueron sujetos a un análisis de toma de imágenes de alto contenido para detectar niveles de expresión proteínica de insulina y de glucagón.
- 35 *Análisis de FACS:* las células para el análisis de FACS fueron bloqueadas en una solución 1:5 de 0.5 por ciento de gama humana - globulina (Sigma; Cat# G-4386) en PBS (Invitrogen; Cat # 14040-133); amortiguador de manchado de FACS de BD – BSA (BD; Cat #554657) durante 15 minutos a 4 grados centígrados. Las células fueron manchadas entonces con anticuerpos para CD9 PE (BD; Cat # 555372), CD99 PE (Cat; Cat # MHCD9904) y CXCR4 APC (R&D Systems; Cat# FAB173A) durante 30 minutos a 4 grados centígrados. Después de varios lavados en un amortiguador de manchado de FACS de BD, las células fueron halladas por viabilidad con 7-AAD (BD; Cat # 559925) y se ejecutó una matriz de FACS de BD. Un anticuerpo de control de isotipo IgG1K de ratón se utilizó para PE y APC para medir el porcentaje de células positivas.
- 40 *Análisis de RT-PCR:* las muestras de ARN fueron purificadas al enlazarse a una membrana de gel de sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) en la presencia de un amortiguador de alta salinidad que contiene etanol seguido por lavados para remover a contaminantes. El ARN fue purificado aún más utilizando un equipo libre de ADN turbo (Ambion, INC), y el ARN de alta calidad fue eluido en agua. La producción y la pureza fueron evaluadas por medio de lecturas A260 y A280 en un espectrofotómetro. Las copias de cDNA fueron hechas de ARN purificado usando un equipo de archivo de cDNA de alta capacidad de ABI (ABI, CA).
- 45
- 50
- 55
- 60

A menos que se indique de otra forma, todos los reactivos fueron comprados de Applied Biosystems. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando el Sistema de Detección Secuencial 7900 PRISM® de ABI (PRISM® 7900 Sequence Detection System). Se utilizó a TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA) con 20 nanogramos de ARN transcrito en reversa en un volumen de reacción total de 20 microlitros. Cada muestra de cDNA fue ejecutada por duplicado para corregir cualquier error de pipetas. Inicializadores y sondas TAQMAN® etiquetadas FAM fueron utilizadas con concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión para cada gen objetivo fue estandarizado utilizando un control endógeno de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate) desarrollado previamente por Applied Biosystems. Los conjuntos de inicializadores y de sondas se listan en la **tabla 12**. Después de una incubación inicial a 50 grados C durante 2 minutos seguido por 95 grados C durante 10 minutos, las muestras fueron puestas en ciclos 40 veces en 2 etapas, un paso de desnaturalización a 95 grados C durante 15 segundos seguido por un paso de recocido/extensión a 60 grados centígrados durante un minuto. El análisis de datos fue ejecutado usando el software GENEAMP®7000 Sequence Detection System (Sistema de Detección Secuencial). Para cada conjunto de inicializadores/sondas, un valor de Ct fue determinado como el número de ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia alcanzó un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. Los niveles de expresión genética relativos fueron calculados utilizando el método comparativo de Ct. Brevemente, para cada muestra de cDNA, el valor de Ct de control endógeno fue sustraído del Ct del gen de interés para dar el valor de Delta Ct ( $\Delta$ Ct). El monto estandarizado del objetivo se calculó como  $2^{-\Delta C}$  asumiendo que la amplificación tenía un 100 por ciento de eficiencia. Los datos finales fueron expresados en relación a la muestra calibradora.

*Análisis de alto contenido:* cuando concluyó el cultivo, los platos del ensayo fueron lavados una vez con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijados con un 4 por ciento del paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 min, luego se lavaron 3 veces con PBS ice permeabilizar con 0.5 por ciento de trip con X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas otra vez 3 veces con PBS y se bloquearon con un 4 por ciento de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Anticuerpos primarios (SOX17 anti humanos de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) fueron diluidos a 1:100 en un 4 por ciento de suero de gallina y se agregaron a cada pozo durante 2 horas a la temperatura del cuarto. Después de lavar 3 veces con PBS, los anticuerpos secundarios (IgG anti cabra de gallina; Invitrogen; Cat # A21467) conjugados con flúor 488 de Alexa se diluyeron a 1:200 en PBS y se agregaron a cada pozo para contrarrestar el manchado del núcleo, 5 microgramos/mililitro de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) se agregaron durante 15 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 microlitros/pozo de PBS para la toma de imágenes. Otros anticuerpos primarios utilizados para análisis incluyeron CDX2 antihumano de ratón a una dilución de 1:100 (Invitrogen; Cat # 397800), Pdx1 antihumano de cabra a una dilución de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology; Cat # SC-14664), insulina anti humana de conejo a una dilución de 1:200 (Cell Signaling; Cat # C27C9), y glucagón antihumano de ratón a una dilución de 1:1500 (Sigma-Aldrich; Cat # G2654). Los anticuerpos secundarios utilizados para análisis incluyeron a flúor 647 de Alexa con IgG anti ratón de gallina (Invitrogen; Cat # A-21463) a una dilución de 1:400, flúor 488 de Alexa con IgG anti cabra de burro (Invitrogen; Cat # A11055) a una dilución de 1:200, flúor 447 de Alexa con IgG anti conejo de gallina (Invitrogen; Cat # A21443) a una dilución de 1:1000, y flúor 488 de Alexa con IgG anti ratón de gallina (Invitrogen; Cat # A21200) a una dilución de 1:1000.

La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) que usa el dicroico 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Las imágenes fueron adquiridas de 25 campos por pozo. Las medidas para la intensidad total fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para los núcleos fue determinada basándose en los niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y tamaño nuclear los promedios y desviaciones estándar fueron detectadas para cada punto de datos replicado. La expresión proteínica total fue representada como intensidad total o intensidad integrada, definidas como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación para rangos de escala gris entre 200 y 4500. Los datos de intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio para el control positivo.

*Resultados:* los resultados para los marcadores de diferenciación representativos se muestran en la **figura 21** y en la **tabla 15** para las células cultivadas de cada paso de diferenciación. En la **figura 21A y B**, los resultados de citometría de flujo para CXCR4 se muestran para varios tratamientos durante el primer paso de la diferenciación endodérmica definitiva. La **figura 21A** muestra los efectos en la expresión de CXCR4 a partir del tratamiento con varios compuestos en combinación con activina A. La **figura 21B** muestra los efectos en CXCR4 a partir de tratamiento con varios compuestos en combinación con GDF-8. Los compuestos de este invento en combinación con activina A no mejoraron la expresión de CXCR4. Sin embargo, todos los compuestos de este invento probados en este ejemplo mejoraron la expresión de CXCR4 en combinación con GDF-8.

En las **figuras 21C y 21D**, valores de RT-PCR estandarizados de varios marcadores de diferenciación al final del paso uno de diferenciación se muestran para los tratamientos aplicados durante el paso uno del protocolo, usando compuestos seleccionados de este invento en combinación con activina A (**figura 21C**) o en combinación con GDF-8

(figura 21D). Valores de RT-PCR estandarizados similares fueron evaluados cuando concluyó el paso 3 del protocolo de diferenciación (figuras 21E y 21F) y al final del paso 4 del protocolo de diferenciación (figuras 21G y 21H) y al final del paso 5 del protocolo de diferenciación (figuras 21I y 21J). Los tratamientos durante el paso uno de diferenciación, que combinaron un compuesto de este invento con GDF-8, tuvieron una expresión mejorada de varios marcadores endodérmicos y pancreáticos en relación al tratamiento con sólo GDF-8 (figuras 21F, 21 H y 21 J). Los tratamientos que combinaron a compuestos de este invento con activina A tuvieron una mejora mínima o no existió mejora en la expresión de marcadores en relación al tratamiento con sólo activina A o activina A con Wnt3a (figuras 21E, 21G y 21I). La tabla 15 resume los valores CT comparativos para marcadores genéticos adicionales al final de cada paso de diferenciación, comparando los tratamientos durante el paso uno que combinaron a activina A o a GDF-8 con o sin un compuesto de este invento. Cuando concluyó el paso 5 de diferenciación, un análisis de alto contenido fue realizado para medir los números de células (figura 21K y 21M) y la expresión proteínica de insulina y glucagón (figuras 21L y 21N). El tratamiento con GDF-8 durante el primer paso de diferenciación, solo o en combinación compuesto de este invento, resultó en una expresión de insulina y de glucagón cuando concluyó el paso 5 de diferenciación, demostrando que GDF-8 fue capaz de sustituir a activina A durante la iniciación de la formación endodérmica definitiva y subsiguientemente conllevó a células hormonales pancreáticas. Colectivamente, estos datos muestran que la adición de cualquiera de las moléculas pequeñas respectivas tuvo efectos mínimos en marcadores de diferenciación para tratamientos en combinación con activina A. sin embargo, la adición del tratamiento de una molécula pequeña en combinación con GDF-8 tuvo efectos significativamente mejorados en la diferenciación endodérmica definitiva inmediata cuando concluyó el paso uno de diferenciación y también en los marcadores de diferenciación en los siguientes pasos en la conclusión de los pasos 3, 4 y 5. Se observó una variabilidad dentro del panel de moléculas pequeñas, que pudo haber sido atribuido a la concentración del compuesto utilizado en el ensayo y/o el mecanismo de acción.

#### Ejemplo referencial 18

**Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo que fueron formadas utilizando a GDF-8 y a un compuesto de este invento son capaces de liberar péptidos C después de ser transplantados a un roedor**

Fue importante el determinar si es que las células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático generadas in vitro por medio del tratamiento con GDF-8 y una molécula pequeña pueden producir células endocrinas funcionales in vivo. Un estudio de trasplante in vivo fue realizado para comparar las células diferenciadas por medio del tratamiento con activina A y Wnt3a vs. el tratamiento con GDF-8 y compuestos de moléculas pequeñas.

*Preparación de las células:* aglutinamientos de células madres embrionarias manas H1 fueron cultivadas en plásticos de cultivos de tejidos cubiertos por un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231) con pases de un promedio de cada 4 días. El medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF fue utilizado para una siembra y expansión inicial. Todas las líneas de células ES humanas fueron mantenidas a números de pases menores a 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de contaminación de micoplasma.

Los pases celulares son realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de 1 mg/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 °C seguido de un enjuagado de la monocapa celular con un medio acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamiento celulares. Los aglutinamiento celulares fueron centrifugados a una velocidad baja en un medio acondicionado con MEF para remover la dispasa residual y después se le suspendieron uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF (PeproTech Inc.; Cat # 100-18B) para su siembra en platos de 6 pozos (Nunc; Cat# 140685) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL (BD Biosciences; Cat # 356231) a una tasa de 1:3 utilizando volúmenes de 2.5 mililitros/pozo. Se ejecutó una alimentación diaria al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazándolo con un volumen igual de medio fresco. Los platos fueron mantenidos a 37° C, con un 5% de CO<sub>2</sub> a lo largo de la duración del cultivo.

*Diferenciación celular:* el proceso de diferenciación fue iniciado 3 días después de que las células fueron sembradas en platos de 6 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™. Un protocolo de 4 pasos fue utilizado para la diferenciación in vitro de células madres embrionarias humanas H1 a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. El paso uno fue realizado durante 3 días para generar células endodérmicas definitivas. En el primer día del paso uno, la diferenciación fue iniciada al aspirar el medio de cultivo gastado y añadir un volumen igual de medio basal de RPMI-1640 (Invitrogen; Cat # 22400) con un 2% de Fracción V de Albúmina Aovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA - Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free) (Proliant Biologicals; Cat # SKU 68700) y 8ng/ml de bFGF. En un grupo de tratamiento, las células fueron expuestas a 100 ng/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) con 20 ng/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF). En un 2° grupo de tratamientos, las células fueron expuestas a 100 ng/mililitros de GDF-8 (R&D

Systems; Cat # 788-G8) con 2.5  $\mu$ M del compuesto 40. En un 3<sup>er</sup> grupo de tratamientos, las células fueron expuestas a 100 ng/mililitros de GDF-8 (R&D Systems; Cat # 788-G8) con 2.5  $\mu$ M del compuesto 202. En el 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> día del paso uno de diferenciación, las células de todos los grupos de tratamientos fueron alimentadas con RPMI-1640 que contenían un 2% de FAF BSA, 8ng/ml de bFGF y ya sea, 100 ng/mililitros de activina A (grupo de tratamientos 1) o 100 ng/ml de GDF-8 (grupo de tratamientos 2 y 3), sin la adición de Wnt3a o un compuesto de este invento. Al final del 3<sup>er</sup> día de cultivo, un pozo de cada grupo de tratamientos fue recolectado para un análisis de FACS.

El paso 2 del protocolo de diferenciación fue realizado durante 3 días. Las células para todos los grupos de tratamientos fueron alimentadas diariamente con DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementada con un 2% de FAF BSA y 50 ng/ml de FGF7 (PeproTech; Cat # 100-19).

El paso 3 del protocolo de diferenciación fue realizado durante 4 días. Las células para todos los grupos de tratamientos fueron alimentadas diariamente con DMEM de alta glucosa (Invitrogen; Cat #10569) suplementado con un 1% de B27 (Invitrogen; Cat #: 17504-044), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; Cat # 3344-NG), 250 nM de KAAD-ciclopamina (Calbiochem; Cat # 239804), y 2 $\mu$ M de ácido holo-trans-retinoico (RA – retinoic acid) (Sigma-Aldrich; Cat # R2625).

El paso 4 del protocolo de diferenciación fue realizado durante 3 días. Las células de todos los grupos de tratamientos fueron alimentadas diariamente durante los primeros 2 días con DMEM de alta glucosa suplementada con un 1% de B27, 100 ng/ml de Noggin, y 1 $\mu$ M de inhibidor de ALK5 (Axxora; Cat # ALX-270-445). En el 3<sup>er</sup> día, las células fueron levantadas del sustrato al utilizar una punta de 20  $\mu$ l (Rainin; Cat # RT-L10F) y un raspado celular (Corning; Cat # 3008), luego se transfirieron a un tubo de 50 ml. Se les permitió sedimentarse a las células por medio de la gravedad, y el material flotante fue aspirado sin perturbar al pellet celular. Las células fueron re-suspendidas en un DMEM de alta glucosa suplementado con un 1% de B27, 100 ng/ml de Noggin y un inhibidor de ALK5, y luego se cultivaron durante la noche en micro platos ultra de baja adherencia de Costar (Costar Ultra Low Attachment Microplates) (Corning Inc., Cat # 3471). El siguiente día, las células en cultivo de suspensión fueron recaudados y contados. Porciones de 10x 10<sup>6</sup> células/ratón fueron utilizadas para trasplantes. Porciones de 0.5x 10<sup>6</sup> células fueron recaudadas para un análisis RT-PCR.

El **panel A de la figura 22** muestra los resultados de citometrías de flujo para las células endodérmicas definitivas generadas al final del paso uno para cada uno de los grupos de tratamientos respectivos. El tratamiento con activina A y Wnt3a o el tratamiento con GDF-8-compuesto de este invento resultó en células que expresaron niveles similares de CXCR4 (mayores a un 85%) al final del paso uno, sugiriendo que una población de endodermos definitivos equivalente de células fueron derivadas de cada grupo de tratamiento.

Los resultados para los análisis de RT-PCR para células de cada grupo de tratamiento cuando concluyó el paso 4 del protocolo de diferenciación se muestran en el **panel B de la figura 22**. Las células diferenciadas a endodermos pancreáticos (PE - pancreatic endoderm) usando Activina A y Wnt3a o utilizando GDF-8 y el compuesto 40 o usando GDF-8 y el compuesto 202 expresaron niveles equivalentes de marcadores de PE: CDX2, MAFA, NGN3, NKX6.1, PDX1 y Ptf1 alfa. Estos resultados sugieren que el protocolo de diferenciación que utilizaba GDF-8 y una molécula pequeña fue igualmente efectivo para crear una población precursora de endodermos pancreáticos de células.

Trasplantes de células madres embrionarias humanas tratadas de acuerdo a los métodos de este invento a ratones: ratones scid-beige machos de 6 a 5 semanas de edad (C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdc<sup>scid</sup>-Lyst<sup>bg</sup> N7) fueron comprados de Taconic Farms. Los ratones fueron albergados en jaulas micro aislantes con acceso libre a comida y agua esterilizadas. En la preparación para la cirugía, los ratones fueron identificados por medio de etiquetas en las orejas, su masa corporal fue medida, y su glucosa en la sangre fue determinada utilizando un glucómetro manejado manualmente (LifeScan; One Touch). En el día de la cirugía, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano y oxígeno, y el lugar quirúrgico fue afeitado con maquinillas para cortar el pelo animal. Se les administró dosis a los ratones de 0.1 miligramos. Kilogramos de Buprenex subcutáneamente antes de la operación. El lugar quirúrgico fue preparado con lavados sucesivos con un 70% de alcohol isopropílico, un 10% de yoduro de povidona y un 70% de alcohol isopropílico, y se realizó una incisión lateral izquierda a través de la piel y las capas musculares. El riñón izquierdo fue externalizado y se lo mantuvo húmedo con un 0.9 por ciento de cloruro de sodio. Un catéter I.V. de 24G x 3/4" fue utilizado para penetrar la cápsula del riñón, y la aguja fue removida. El catéter fue avanzado bajo la cápsula del riñón al polo distal del riñón. Durante la preparación pre-operativa del ratón, las células para trasplante fueron centrifugadas en un tubo de micro centrifugación de 1.5 ml y la mayor parte del material flotante fue removido, dejando suficiente medio para recaudar un pellet celular. Las células fueron recaudadas en un filo de pipeta de desplazamiento positivo Rainin Pos-D, y la pipeta fue invertida para permitir a las células a sentarse por medio de la gravedad. El medio que estaba en exceso fue dispensado dejando una preparación celular empacada para su trasplante. Para el trasplante, el filo de pipeta pos-D fue colocado firmemente en el centro de distribución del catéter, y las células fueron dispensadas desde la pipeta a lo largo del catéter bajo la cápsula del riñón para su entrega al polo distal del riñón. El lumen del catéter fue enjuagado con un volumen pequeño de medio de cultivos para entregar cualquier célula remanente, y el catéter fue retirado. La cápsula del riñón fue sellada con un cauterio de baja temperatura, y el riñón fue regresado a su posición anatómica original. El músculo fue cerrado con suturas continuas utilizando 5-0 suturas VICRYL, y la piel fue cerrada con clips de heridas. El ratón fue removido de la

anestesia y se le permitió recuperarse completamente. Los ratones fueron administrados dosis de 1.0 miligramos. Kilogramos de Metacam subcutáneamente después de la operación.

5 Después del trasplante, los ratones fueron pesados una vez a la semana y la glucosa sanguínea fue medida 2 veces ala semana. A varios intervalos después del trasplante, a los ratones se les administró 3 g/kilogramos de glucosa IP y se les sacó sangre 60 minutos después de la inyección de glucosa por medio del seno retro orbital a tubos de micro centrifugación que contenían montos pequeños de heparina. La sangre fue centrifugada, y el plasma fue colocado en un 2° tubo de micro centrifugación, congelado con hielo seco, para su almacenamiento a -80 °C hasta que el ensayo de péptidos C humanos haya sido realizado. Los niveles de péptidos C humanos fueron  
10 determinados utilizando ELISA de péptidos C Ultrasensible de Diagnóstico de Mercodia / ALPCO (Mercodia/ALPCO Diagnostics Ultrasensitive C-peptide ELISA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los resultados ELISA de los péptidos C humanos se muestra en la **figura 23** para los ratones a los que se les trasplantó células de cada uno de los grupos de tratamientos respectivos. Ningún péptido C humano circulante fue detectado a las 4 semanas a partir del trasplante en ningún ratón que haya recibido las células de cualquiera de los grupos de tratamiento. A 8 semanas después del trasplante, péptidos C detectables fueron encontrados en 1 o 2 ratones que recibieron células tratadas con activina A y Wnt3a; uno de los 3 ratones que recibió células tratadas con GDF-8 y el compuesto 40; y 2 de los 3 ratones que recibieron células tratadas con GDF-8 y el compuesto 202. Estos resultados sugieren que una población equivalente de células precursoras endocrinas podría derivarse de protocolo de diferenciación con GDF-8 y una molécula pequeña y que las células maduraron aún más in vivo a una célula secretora de insulina que responde a la glucosa.

#### Ejemplo referencial 19

25 **Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo que fueron formadas utilizando a GDF-8 son capaces de liberar péptidos C después del trasplante a roedores**

Era importante el de mostrar que las células diferenciadas con GDF-8 en la ausencia de activina A podrían ser diferenciadas aún más a una población celular endocrina capaz de secretar péptidos C humanos en un modelo de trasplante de roedor in vivo.

35 *Preparación de las células:* aglutinamientos de células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en plásticos de cultivos de tejidos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (Invitrogen; Cat # 356231) con pases que en promedio se hacían cada 4 días. El medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF fue utilizado para una siembra y expansión inicial. Todas las líneas de células ES humanas fueron mantenidas a números de pases menores que 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar cariotipos normales y la ausencia de la contaminación de mycoplasma.

Los números de células fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de 1 mg/mililitro de dispasa (Invitrogen; Cat # 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 °C seguido de un enjuague de la monocapa celular con un medio acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperarlos aglutinamientos celulares. Los aglutinamiento celulares fueron centrifugados a una velocidad baja en un medio acondicionado con MEF para remover la dispasa residual y entonces re - suspender uniformemente en el medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF (PeproTech Inc.; Cat # 100-18B) para la siembra en platos de 6 pozos (Nunc; Cat# 140685) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) a una tasa de 1 : 3 utilizando volúmenes de 2.5 mililitros/pozo. Se realizó una limitación diaria al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de medio fresco. Los platos fueron mantenidos a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> a lo largo del cultivo.

50 *Diferenciación celular:* el proceso de diferenciación fue iniciado 3 días después de que las células fueron sembradas en platos de 6 pozos. El protocolo de 4 pasos utilizado para la diferenciación in vitro de células madres embrionarias humanas H1 A células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. El paso uno fue realizado durante 3 días para generar células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En el primer día del paso uno, la diferenciación fue iniciada al aspirar el medio de cultivo gastado y agregar un volumen igual de medio basal de RPMI-1640 (Invitrogen; Cat # 22400) con un 2% de Fracción V de Albúmina Bovina, libre de ácidos grasos (FAF BSA - Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free) (Proliant Biologicals; Cat # SKU 68700) y 8ng/ml de bFGF. En un grupo de tratamiento, conjuntos duplicados de células fueron tratados con 100 ng/mililitros de GDF-8 (R&D Systems; Cat # 788-G8) y 20ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF). En el 2° grupo de tratamientos, los conjuntos duplicados de células fueron tratados con 100 ng/mililitros de GDF-8 y 2.5 μM del compuesto 40. En el 2° y 3<sup>er</sup> día del paso uno de diferenciación, las células en todos los grupos de tratamiento fueron alimentadas con RPMI-1640 que contenía un 2% de FAF BSA, 8 ng/mililitros de bFGF y 100 ng/mililitros de GDF-8 pero sin agregarse Wnt3a o el compuesto 40. Cuando terminó el día 3 del cultivo, un pozo de cada grupo de tratamiento fue recaudado para un análisis de FACS.

El paso 2 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 3 días. Las células para todos los grupos de tratamientos fueron alimentadas diariamente con DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con un 2% de FAF BSA y 50 ng/ml de FGF7 (PeproTech; Cat # 100-19).

5 El paso 3 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 4 días. Las células para todos los grupos de tratamiento fueron alimentadas diariamente con DMEM de alta glucosa (Invitrogen; Cat # 10569) suplementado con 1% de B27 (Invitrogen; Cat #: 17504-044), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; Cat # 3344-NG), 250 nM de KAAD-ciclopamina (Calbiochem; Cat # 239804), y 2µM de ácido holo-trans-retinoico (RA – retinoic acid) (Sigma-Aldrich; Cat # R2625).

10 El paso 4 del protocolo de diferenciación fue ejecutado durante 3 días. Las células para todos los grupos de tratamiento fueron alimentadas diariamente con DMEM de alta glucosa suplementado con 1% de B27, 100 ng/ml de Noggin y 1µM de un inhibidor de ALK5 (Axxora; Cat # ALX-270-445), y 100 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems; Cat # 788-G8) durante los primeros 2 días. En el 3<sup>er</sup> día del paso 4, las células fueron cultivadas de los platos de 6 pozos utilizando una punta de 20 ml (Rainin; Cat # RT-L10F) y un raspador celular (Corning; Cat # 3008) y transferidas a un tubo de 50 ml. A las células se les permitió sedimentarse por medio de la gravedad, y el material flotante fue aspirado sin perturbar al pellet celular. Las células fueron re - suspendidas en un DMEM de alta glucosa suplementado con 1% de B27, 100 ng/ml de Noggin, y 1µM de inhibidor de ALK5, y luego se cultivaron durante la noche en micro platos ultra de baja adherencia de Costar de 6 pozos (Corning Inc., Cat # 3471). El siguiente día, las células en el cultivo de suspensión fueron recuadadas y contadas. Porciones de  $10 \times 10^6$  de células/ratón fueron utilizadas para trasplantes. Porciones de  $0.5 \times 10^6$  células fueron recuadadas para un análisis RT-PCR.

25 La **figura 24 A** muestra los resultados de las citometrías de flujo para células endodérmicas definitivas generadas al final del paso uno para cada uno de los grupos de tratamiento respectivos. Los resultados para tratamiento con GDF-8 y Wnt3a o tratamiento con GDF-8 y el compuesto 40 expresaron niveles similares de CXCR4 al final del paso uno, sugiriendo que una población endodérmica definitiva equivalente y robusta de células resultó de cada grupo de tratamiento.

30 Conjuntos de tratamiento duplicados tuvieron una fuerte concurrencia. Resultados previos a los trasplantes para el análisis RT-PCR cuando concluyó el paso 4 del protocolo de diferenciación se muestran en la figura 24B. Las células diferenciadas a endodermos pancreáticos (PE - pancreatic endoderm) utilizando GDF-8 y Wnt3 o GDF-8 y el compuesto 40 expresaron niveles equivalentes de marcadores característicos de linaje endodermo pancreático, tales como CDX2, MafA, Ngn3, NKX6.1, Pdx-1 y Ptf1A. Estos resultados demostraron que el protocolo de diferenciación que utilizó a GDF-8 y a Wnt3a o a GDF-8 y a un compuesto del invento fueron efectivos en crear una población precursora de endodermos pancreáticos de células. El protocolo de diferenciación fue realizado en 2 conjuntos de tratamientos independientes pero idénticos. Los resultados de los conjuntos de tratamiento duplicados tuvieron un alto nivel de concurrencia tal como se demostró por medio del análisis RT-PCR.

40 *Transplante de células madres embrionarias humanas a ratones:* ratones scid-beige machos de 5 a 6 semanas de edad (C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdc<sup>scid</sup>-Lyst<sup>bg</sup> N7) fueron comprados de Taconic Farms. Los ratones fueron albergados en jaulas micro aislantes con acceso libre a comida y agua esterilizada. En preparación para la cirugía, los ratones fueron identificados con etiquetas en sus orejas, su masa corporal fue medida, y su glucosa sanguínea fue determinada utilizando un glucómetro portátil (LifeScan; One Touch). En el día de la cirugía, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano y oxígeno, y el lugar quirúrgico fue afeitado con maquinillas para corte de pelos para animales. A los ratones se les administró una dosis de 0.1 miligramos. Kilogramos de Buprenex subcutáneamente antes de la operación. El lugar quirúrgico fue preparado con lavados sucesivos de un 70% de alcohol isopropílico, 10% de yoduro de povidona y 70% de alcohol isopropílico, y se hizo una incisión lateral izquierda a través de la piel y las capas musculares. El riñón izquierdo fue externalizado y se mantuvo húmedo con 0.9 por ciento de cloruro de sodio. Un catéter I.V. de A 24G x 3/4" fue utilizado para penetrar la cápsula de riñón, y la aguja fue removida. El catéter fue avanzado entonces bajo la cápsula del riñón al polo distal del riñón. Durante la preparación pre - operativa de los ratones, las células a ser trasplantadas fueron centrifugadas en un tubo de micro centrifugación de 1.5 mililitros, y la mayor parte del material flotante fue removida, dejando suficiente medio para recaudar el pellet celular. Las células fueron recuadadas en una punta de pipeta de desplazamiento positivo de Rainin Pos-D, y la pipeta fue invertida para permitir a las células asentarse por medio de la gravedad. El medio de exceso fue dispensado dejando una preparación de células empacada para su trasplante. Para el trasplante, la punta de pipeta Pos-D fue colocada firmemente en la central de distribución del catéter, y las células fueron dispensadas de la pipeta a través del catéter bajo la cápsula del riñón para su entrega al polo distal del riñón. El lumen del catéter fue enjuagado con un volumen pequeño de medio de cultivo para entregar cualquier célula remanente, y el catéter fue retirado. La cápsula de riñón fue sellada con un cauterio de baja temperatura, y el riñón fue regresado a su posición anatómica original. El músculo fue cerrado con suturas continuas utilizando 5-0 vicryl, y la piel fue cerrada con clips de heridas. El ratón fue removido de la anestesia y se le permitió recuperarse completamente. Se administró a los ratones una dosis de 1.0 miligramos.kg de Metacam después de la operación.

65 Después del trasplante, los ratones fueron pesados una vez a la semana y la glucosa sanguínea fue medida 2 veces a la semana. En varios intervalos después de los trasplantes, se les administró a los ratones dosis de 3



g/kilogramos de glucosa IP, y se le sacó sangre 60 minutos después de la inyección de glucosa por medio del seno retro orbital a tubos de micro centrifugación que contenían un monto pequeño de heparina. La sangre fue centrifugada, y el plasma fue colocado en un 2° tubo de micro centrifugación, congelado en hielo seco, para almacenarse a -80 °C hasta que se realice el ensayo de péptidos C humanos. Los niveles de péptidos C humanos fueron determinados usando ELISA ultrasensible de diagnóstico de péptidos C de Mercodia/ALPCO de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados de ELISA para péptidos C humanos se muestra en la **figura 29C y D** para ratones a los que se les trasplantaron células de cada uno de los grupos de tratamiento respectivos. Niveles similares de péptidos C humanos fueron detectables a 8 semanas después del trasplante para cada categoría de tratamiento, indicando que una población de células precursoras endocrinas equivalentes podrían ser derivadas del protocolo de diferenciación utilizando GDF-8 y Wnt3a o GDF-8 y un compuesto del invento.

### Ejemplo referencial 20

#### 15 **Evaluación del potencial de los inhibidores de CDK, GSK3, y TRK para diferenciar células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos de linaje de endodermos definitivos**

Un subconjunto de 14 moléculas pequeñas propietarias, conocidas por tener especificidad para los senderos de señalización CDK, GSK3, y/o TRK fueron evaluados para detectar su potencial para diferenciar a células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje de endodérmicos definitivos.

25 *Siembra celular en el ensayo:* brevemente, aglutinamientos de células madres embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en un plástico de cultivo de tejidos cubierto por un factor de crecimiento reducido de Matrigel™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas usando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, se lavaron para remover enzimas residuales, y se colocaron en platos con una dispersión uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat # 6005182) cubiertos con factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) usando volúmenes de 100 µl/pozo. A las células se les permitió adherirse y después recuperar el crecimiento de fase logarítmica durante un período de tiempo de un ensayo de 1 a 3 días, alimentándose diariamente con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

35 *Preparación de los compuestos y del ensayo:* la examinación fue realizada utilizando los compuestos descritos en la **tabla 16**. Adicionalmente, el compuesto 34 fue incluido como control positivo, tal como se demostró en ejemplos previos. Los compuestos fueron facilitados en forma de agrupaciones de 5mM en formato de plato de 96 pozos, solubilizados en un 100% de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenados a -80 °C. Los compuestos de biblioteca fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2 mM en 50 mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), 20% de DMSO y almacenadas a 4 °C. Las condiciones de prueba fueron realizadas por triplicado, con una alimentación cada 2 días durante un período de tiempo del ensayo de 4 días. El ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo seguido de 3 lavados en PBS (Invitrogen; Cat # 14190) para remover los factores de crecimiento residuales. En el primer día del ensayo, volúmenes de prueba de 200 µl por pozo fueron agregados a cada pozo utilizando un medio basal de DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con 0.5 de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03) y 100 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8), 2.5µM del compuesto. En conjunto paralelo de muestras de prueba fueron tratadas en una forma idéntica pero omitiendo el GDF-8 del medio. En el 3<sup>er</sup> día del ensayo, los volúmenes de prueba de 100 µl por pozo fueron agregados a cada pozo utilizando el medio basal de DMEM:F12 suplementado con un 2% de FCS con 100 ng/mililitros de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8). El GDF-8 fue omitido de las muestras de prueba que no fueron tratadas con GDF-8 en el primer día del ensayo. Muestras de control positivas contenían el mismo medio basal suplementado con FCS y 100 ng/mililitros de activina A humana recombinante (PeproTech; Cat #120-14) durante los 4 días del ensayo junto con la adición de Wnt3a (20 ng/mililitros) en los días 1 y 2. Las muestras de control negativas contenían un medio basal de DMEM:F12 suplementada con FCS.

55 *Análisis de alto contenido:* cuando concluyeron los 4 días del cultivo, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijados con 4% de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.5 por ciento de Tritón X-10 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4% de suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX17 anti humanos de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) fueron diluidos a 1:100 en un 4% de suero de gallina y fueron agregados a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. flúor 488 de Alexa conjugado con los anticuerpos secundarios (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) fueron diluidos a 1:200 en PBS y agregados a cada pozo de muestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el manchado del núcleo, 4 µg/mililitros de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 10 minutos a temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 µl/pozo de PBS para la toma de imágenes.

5 La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) que usaba el díctico 51008bs para células manchadas Hoechst 33342 y flúor 488 Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados desde los pozos de control positivo y desde los pozos de control negativo que no fueron tratados manchados con  
 10 solamente anticuerpos secundarios. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar por cualquier pérdida celular durante el bio - ensayo y durante los procedimientos subsiguientes de manchado. Las medidas para el número de células totales y la intensidad total de SOX17 fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). La segmentación para el núcleo fue determinada basándose en niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculadas para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como intensidad total o intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 3500. Los datos promedios de osos triplicados fueron recaudados. El porcentaje de pozos tratados en relación al control positivo fue calculado.

15 Los resultados de esta examinación se muestran en la **tabla 17**. Ninguna de las moléculas pequeñas indujeron una expresión significativa de SOX17 en la ausencia de GDF-8 durante el proceso de 4 días de diferenciación. El compuesto 34 sirvió como control experimental e indujo una expresión significativa de SOX17 en la presencia de GDF-8, equivalente a los niveles observados con el control positivo utilizando activina A y Wnt34. Los compuestos remanentes de este invento probados en este ejemplo mostraron un rango de actividades con inducciones débiles o moderadas de la expresión de SOX17. Como nota, una actividad de diferenciación en este subconjunto de compuestos fue observada en asociación con la selectividad para las 3 sendas de señalización enzimática, dificultando el determinar compulsivamente un mecanismo claro de acción.

## 25 Ejemplo referencial 21

### **Examinación para detectar análogos de los compuestos de este invento que son capaces de mediar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo**

30 Basándose en estructuras para los compuestos de este invento, una búsqueda de análogos fue realizada y 118 análogos fueron encontrados. La examinación inicial detérmino que algunos de estos análogos fueron capaces de inducir diferenciaciones endodérmicas definitivas en la ausencia de activina A en combinación con otros factores de crecimiento. Fue importante determinar si estos análogos también podían inducir una diferenciación endodérmica definitiva en combinación exclusiva con GDF-8.

35 *Siembra celular del ensayo:* brevemente, aglutinaciones de células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en plástico de cultivos de tejidos cubiertos por un factor de crecimiento reducido de Matrigel™ (Invitrogen; Cat # 356231). Las células fueron pasadas usando un tratamiento de colagenasa (Invitrogen; Cat # 17104-019) y un raspado suave, y lavado para remover a las enzimas residuales, y se colocaron en platos con una dispersión uniforme a una tasa de 1:1 (área superficial) en platos negros de 96 pozos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; Cat #6005182) cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) usando volúmenes de 100 µl/pozo. A las células se les permitió adherirse y entonces recuperar el crecimiento de fase logarítmica durante un período de tiempo de 1 a 3 días, con alimentación diaria con un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF (R&D Systems; Cat # 233-FB). Los platos fueron mantenidos a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada durante el ensayo.

40 *Preparación de los compuestos y del ensayo:* se realizó un examinación utilizando una biblioteca de los compuestos análogos. Los compuestos de esta biblioteca fueron facilitados en forma de agrupaciones de 5mM en un formato del platos de 96 pozos, solubilizados en un 100% de DMSO (Sigma; Cat # D2650) y almacenados a -80 °C. Los compuestos de la biblioteca fueron diluidos aún más a una concentración intermedia de 0.2 mM de HEPES (Invitrogen; Cat # 15630-080), 20% de DMSO y almacenados a 4 °C. Las condiciones de prueba fueron realizadas por triplicado, con una alimentación cada 2 días durante el período del ensayo de 4 días. Los ensayos fueron iniciados al aspirar el medio de cultivo de cada pozo seguido por 3 lavados en PBS (Invitrogen; Cat # 14190) para remover los factores de crecimiento residuales. En el primer día del ensayo, volúmenes de prueba de 200 µl por pozo fueron agregados a cada pozo utilizando el medio basal DMEM:F12 (Invitrogen; Cat # 11330-032) suplementado con 0.5 por ciento de FCS (HyClone; Cat # SH30070.03) y 200 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) con 2.5 microM del compuesto. En el 3<sup>er</sup> día del ensayo, volúmenes de prueba de 100 µl por pozo fueron agregados a cada pozo utilizando el medio basal de DMEM:F12 suplementado con un 2% de FCS con 200 ng/mililitros de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8). Muestras de control positivo contenían el mismo medio basal suplementado con FCS y 100 ng/mililitros de activina A humana recombinante (PeproTech; Cat #120-14) a lo largo de la duración de los 4 días de ensayo con Wnt3a (20 ng/mililitros en los días 1 y 2). Las muestras de control negativo contenían al medio basal DMEM:F12 suplementado con FCS, agregando Wnt3a en los días 1 y 2 pero omitiendo el tratamiento con activina A.

5 *Análisis de alto contenido:* cuando concluye el cultivo de 4 días, los platos del ensayo fueron lavados 2 veces con PBS (Invitrogen; Cat # 14190), fijados con 4% de paraformaldehído (Alexis Biochemical; Cat # ALX-350-011) a la temperatura del cuarto durante 20 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.5 por ciento de Tritón X-100 (Sigma; Cat # T8760-2) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Las células fueron lavadas nuevamente 3 veces con PBS y bloqueadas con un 4% suero de gallina (Invitrogen; Cat # 16110082) en PBS durante 30 minutos a la temperatura del cuarto. Los anticuerpos primarios (SOX17 antihumano de cabra; R&D Systems; Cat # AF1924) fueron diluidos a 1:100 en un 4% de suero de gallina y agregados a cada pozo durante una hora a la temperatura del cuarto. Flúor 488 de Alexa conjugado con los anticuerpos secundarios (IgG anti cabra de gallina; Molecular Probes; Cat # AZ1467) fue diluida a 1:200 en PBS y agregada a cada pozo demuestra después de lavarse 3 veces con PBS. Para contrarrestar el machado del núcleo, 4 µg/mililitro de Hoechst 33342 (Invitrogen; Cat # H3570) fueron agregados durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Los platos fueron lavados una vez con PBS y se dejaron en 100 µl/pozo de PBS para la toma de imágenes.

15 La toma de imágenes fue realizada utilizando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) que usa el dicroico 51008bs para células manchadas con Hoechst 33342 y flúor 488 de Alexa. Los tiempos de exposición fueron optimizados desde los usos de control positivo y desde los pozos de control negativo no tratados manchados únicamente con el anticuerpo secundario. Las imágenes de 15 campos por pozo fueron adquiridas para compensar por cualquier pérdida celular durante el ensayo biológico y subsiguientes procedimientos de manchado. Las medidas para el número de células totales y la intensidad total de SOX17 fueron obtenidas de cada pozo utilizando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare) la segmentación para el núcleo fue determinada basándose en los niveles de escala gris (rango de línea base 100-300) y el tamaño nuclear. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados para cada conjunto de datos replicado. La expresión proteínica total de SOX17 fue reportada como la intensidad total o la intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicado por el área de la célula. El fondo fue eliminado basándose en los criterios de aceptación de los rangos de escala gris entre 200 y 3500. Los datos de la intensidad total fueron estandarizados al dividir las intensidades totales para cada pozo por la intensidad total promedio del control positivo. Los datos estandarizados fueron calculados para los promedios y las desviaciones estándar para cada conjunto replicado.

30 Los resultados de la examinación se muestran en la **tabla 18** de 4 platos del ensayo en este experimento individual. Los compuestos son clasificados con respecto a su expresión de SOX17 como un porcentaje del tratamiento de control positivo con activina A y Wnt3a. Este ensayo identificó una lista de 12 nuevas coincidencias análogas tal como se muestra en la **tabla 19**.

35 **Ejemplo referencial 22**

**Células madres embrionarias humanas en micro portadores pueden ser diferenciadas a células que expresan a marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo a los métodos de este invento**

40 Para propósitos de diferenciación y de producción de grandes números de células endocrinas bajo condiciones escalables, fue importante el mostrar que las células madres embrionarias humanas podían ser cultivadas y diferenciadas a endodermos definitivos en esferas micro portadoras utilizando los métodos de este invento.

45 *Preparación de las células para ensayos y para diferenciación:* las células H1 p49C3 fueron cultivadas rutinariamente en esferas Cytodex3 (GE Healthcare Life Sciences, NJ) en un matraz giratorio de 125 ml; de acuerdo a los métodos descritos en la aplicación de patente de Estados Unidos número 61/116,447. Después de 7 días, las células y las esferas fueron transferidas a un plato de 6 pozos (Vendor; Cat # XXX) a una tasa de 30 cm<sup>2</sup> de área de superficie de las esferas por pozo, y el plato fue colocado en una plataforma oscilante. Las células en las esferas en el pozo de tratamiento de control positivo (designado AA/Wnt3a) se diferenciaron con la adición de 100 ng/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) y 20 ng/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF) durante 2 días seguidos por 100 ng/mililitros de activina A y 8 ng/mililitros de bFGF (PeproTech Inc.; Cat #: 100-18B) durante un día en RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401) utilizando volúmenes de 2 ml/pozo. El compuesto 34, a una concentración final de 2.5 µM fue agregado a un pozo tratamiento de control negativo (designado CMP individual) en RPMI-1640 con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (2 ml/pozo) durante 3 días en la ausencia de cualquier tratamiento de factor de crecimiento. Un 3<sup>er</sup> pozo de tratamiento (designado como CMP+8) recibió al compuesto 34 a 2.5 µM con 50 ng/mililitros de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) en RPMI-1640 con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (2 ml/pozo) durante 3 días. Un cuarto pozo de tratamiento (designado CMP+ 8+D) recibió al compuesto 34 a 2.5 µM con 50 ng/mililitros de GDF-8 y 50 ng/mililitros de PDGF-D en RPMI-1640 con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (2 ml/pozo) durante 3 días. Un 5<sup>o</sup> pozo de tratamiento (designado como CMP+ 8+D+V) recibió al compuesto 34 a: 5 µM con 50 ng/mililitros de GDF-8, 50ng/ml de PDGF-D, y 50ng/ml de VEGF en RPMI-1640 con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (2 ml/pozo) durante 3 días. Un 6<sup>o</sup> pozo de tratamiento (designado como CMP+ 8+D+V+M) recibió el compuesto 34 a 2.5 µM con 50 ng/mililitros de GDF-8, 50ng/ml de PDGF-D, 50ng/ml de VEGF, y 20ng/ml de Muscimol en RPMI-1640 con un 2% BSA libre de ácidos grasos (2 ml/pozo) durante 3 días. Todos los medios y los tratamientos fueron intercambiados diariamente.

5 Cuando concluyó el tratamiento y el cultivo, las células fueron cultivadas de las esferas, de acuerdo a los métodos descritos en la aplicación de patente de Estados Unidos número 61/116,447. Las células cultivadas fueron contadas y analizadas por medio de citometría de flujo, de acuerdo a los métodos descritos anteriormente.

10 Los resultados se muestran en la **figura 25**. Tal como se muestra en el **panel A**, números similares de células fueron recuperados para todos los grupos de tratamiento que están experimentando la diferenciación. Tal como se muestra en el panel B, las células tratadas con el compuesto 34 individualmente no se diferenciaron a células positivas de CXCR4. El tratamiento de control positivo, agregando activina A y Wnt3a durante la diferenciación, indujeron la expresión de CXCR4 en el 68% de la población celular resultante. El compuesto 34 agregado con varias combinaciones de factores de crecimiento indujeron la expresión de CXCR4 en el 50% de las células, en promedio. Se notó, que niveles equivalentes de la expresión CXCR4 se observaron durante el tratamiento con el compuesto 34 en combinación con un solo factor de crecimiento, GDF-8, o en combinación con varios factores de crecimiento que incluyeron a GDF-8. Esta prueba que el compuesto 34 en combinación con por lo menos GDF-8 puede sustituir a activina A y a Wnt3a para promover la diferenciación endodérmica definitiva. Este ejemplo también muestra que el procedimiento de tratamiento es efectivo para las células cultivadas y diferenciadas en esferas micro portadoras.

### Ejemplo referencial 23

#### 20 Los compuestos de este invento en conjunto con GDF-8 mejoran la proliferación celular

25 Un ejemplo previo demostró que GDF-8 es capaz de reemplazar a activina A para diferenciar células madres embrionarias humanas a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Fue importante el conocer las potencias relativas de GDF-8 y de activina A con relación a la formación endodérmica definitiva. Un ensayo de respuesta de dosis fue realizado utilizando concentraciones equivalentes de cada factor de crecimiento para comparar los resultados durante la diferenciación de células madres embrionarias humanas.

30 Los compuestos de este invento utilizados en combinación con GDF-8 durante la diferenciación endodérmica definitiva fueron evaluados para medir su habilidad para inducir la proliferación celular. Los resultados fueron comparados al tratamiento con sólo activina A o con GDF-8.

35 *Preparación de células para el ensayo:* cultivos en agrupaciones de células madres embrionarias humanas (línea de células madres embrionarias humanas H1) fueron mantenidas en un estado no diferenciado pluripotente en platos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ (BD Biosciences; Cat # 356231) en un medio acondicionado con MEF con pases de un promedio de cada 4 días. Los pases fueron realizados al exponer a los cultivos celulares a una solución de 1 mg/mililitro de dispasa (Invitrogen, Cat #: 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37 °C seguido de un enjuague de la monocapa con un medio de cultivo acondicionado con MEF y un raspado suave para recuperar los aglutinamiento celulares. Los aglutinamientos fueron centrifugados a una velocidad baja para recolectar un pellet celular y remover a la dispasa residual. Los aglutinamiento celulares fueron divididos a una tasa de 1:3 o 1:4 para cultivos de mantenimiento rutinario o a una tasa de 1:1 para ensayos inmediatos. Todas las líneas de células madres embrionarias humanas fueron mantenidas a números de bases menores a 50 y se evaluaron rutinariamente para detectar fenotipos de cariotipos normales y la ausencia de contaminación de mycoplasma.

45 Los aglutinamientos celulares utilizados en el ensayo fueron re - suspendidas uniformemente en un medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF y sembrados en Packard VIEWPLATES (PerkinElmer; Cat # 6005182) de 96 pozos cubiertos con un factor de crecimiento reducido de MATRIGEL™ en volúmenes de 100 µl/pozo. El medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/mililitros de bFGF fue utilizado para una siembra y expansión iniciales. Se realizó una alimentación diaria al aspirar el medio de cultivo gastado de cada pozo y reemplazarlo con un volumen igual de medio fresco. Un conjunto de fondos de pozos en cada plato del ensayo no fue sembrado con células pero fue tratado a lo largo del ensayo con condiciones de medios basales. Los platos fueron mantenidos a 37 °C, con un 5% de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

50 *Ensayo:* el ensayo fue iniciado al aspirar el medio de cultivo de cada pozo y agregar de vuelta una porción final (100 µl) del medio de prueba. Las condiciones de prueba fueron realizadas por triplicado durante un período de ensayo total de 3 días, con una alimentación diaria al aspirar y reemplazar el medio de cada pozo con un medio de prueba fresco. Ensayos idénticos fueron establecidos simultáneamente en paralelo para la evaluación al final de 24, 48 y 72 horas.

60 En el primer día del ensayo, todos los pozos que contenían las células recibieron una porción (80 µl) del medio RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) suplementado con un 2.5 por ciento de Fracción V de Albúmina Bovina, Libre de Ácidos Grasos (FAF BSA - Albumin Bovine Fraction V, Fatty Acid Free; un 2% en el ensayo final) (Proliant Inc. Cat #: SKU 68700). Varias muestras de control y de prueba fueron creadas a una concentración de 5x a ser agregadas a pozos apropiados (20 µl por pozo). Las condiciones de control incluyeron lo siguiente, con concentraciones finales de factores de crecimiento tal como se indican a continuación: 1) medio basal con un 2% de FAF BSA; 2) 100 ng/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14) con 8ng/ml de bFGF (PeproTech; Cat # 100-

18B); 3) 100ng/ml de activin A con 8ng/ml de bFGF y 20ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF); 4) 100ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) con 8ng/ml de bFGF; 5) GDF-8 con 8ng/ml de bFGF y 20ng/ml de Wnt3a. Las células en un conjunto adicional de pozos de control fueron tratadas con un medio acondicionado con MEF a lo largo del ensayo. En algunas muestras de control que utilizaban GDF-8, el Wnt3a fue reemplazado con un compuesto de este invento. Para muestras de prueba experimentales, 8 diferentes compuestos fueron diluidos 2 veces en series para crear 3 concentraciones de dosis diferentes y entonces se combinaron con 100 ng/mililitros de GDF-8 y 8 ng/mililitros de bFGF. Estas moléculas pequeñas incluyeron al compuesto 181, el compuesto 180, el compuesto 19, el compuesto 202, el compuesto 40, el compuesto 34, el compuesto 56 y un BIO inhibidor de GSK3 (EMD Chemicals, Inc.; Cat # 361550). En el 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> día del ensayo, todos los pozos para muestras de control y experimentales fueron aspirados y alimentados nuevamente usando condiciones de tratamiento idénticas excepto que el WNT3a fue removido de algunos pozos de control.

*Ensayo MTS:* en el momento que concluyeron 24, 48 o 72 horas del cultivo, un conjunto de platos de ensayo fueron sujetos a un ensayo de MTS (Promega; Cat# G3581), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 20 µl de MTS fueron agregados a cada pozo, y los platos del ensayo fueron incubados a 37° centígrados, con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas antes de tomar las lecturas OD490. Medidas estadísticas fueron calculadas menos los fondos (es decir, los pozos de tratamientos y las células) para determinar los valores de las medias de cada conjunto por triplicado en adición a un error estándar de la media.

El ensayo MTS es una medida de la actividad metabólica celular en la reducción enzimática de un compuesto de tetrazolio a un producto de formazano. En un solo momento en el tiempo, el ensayo MTS puede ser utilizado como un indicador comparativo de la viabilidad celular. Los ensayos de MTS evaluados en paralelo en momentos secuenciales del tiempo pueden agregar información adicional en relación a incrementos de actividad metabólica celular que a cambio pueden ser correlacionados con la proliferación celular para cada condición de tratamiento. El **panel a de la figura de 6** muestra las lecturas OD490 para todos los tratamientos de control durante los 3 días del período del ensayo. Las células tratadas con un medio acondicionado mostraron pequeños cambios en OD490 durante 3 días, indicando que los números de células en este grupo de tratamiento se mantuvieron estáticos. En contraste, las células cultivadas en medios basales sin factores de crecimiento (sin tratamiento), mostraron un declive uniforme en OD490 correlacionado con una pérdida en el número de células a lo largo del tiempo. Los tratamientos de activina A durante el proceso de diferenciación, sin y con Wnt3a, mostraron incrementos crecientes en OD490, indicando una expansión significativa a lo largo del tiempo. El tratamiento de GDF-8 en la ausencia de Wnt3a resultó en un declive de OD490 en relación a los tratamientos de activina A; esto fue notable en el primer día y se sostuvo a lo largo de los 3 días del cultivo. La adición de Wnt3a al grupo de tratamiento de GDF-8 resultó en una recuperación e incremento de OD490 para el 3<sup>er</sup> día del cultivo.

[El **panel B de la figura 26 hasta el panel I de la figura 26** muestran los resultados del ensayo MTS para el tratamiento con un inhibidor de moléculas pequeñas en combinación con GDF-8. Las lecturas OD490 de los tratamientos con un compuesto de este invento y GDF-8 fueron equivalentes a o exhibieron los resultados del tratamiento con activina A. en todos los casos, una concentración óptima de cada molécula pequeña combinada con GDF-8 resultó en lecturas mejoradas de OD490 durante los 3 días del ensayo en relación al tratamiento o con sólo GDF-8. Esto sugiere que los compuestos de este invento son importantes para inducir la proliferación y expansión de una población celular durante la diferenciación endodérmica definitiva.

#### **Ejemplo referencial 24**

#### **Las células madres embrionarias humanas cultivadas en micro portadores pueden diferenciarse a células progenitoras endocrinas de acuerdo a los métodos de este invento**

Para propósitos de diferenciación y de producción de grandes números de células endocrinas bajo condiciones industriales, fue importante el demostrar que las células madres embrionarias humanas podían ser cultivadas y diferenciadas a células progenitoras endocrinas en esferas micro portadoras utilizando un protocolo sin activina A.

*Preparación de las células para el ensayo y la diferenciación:* las células H1 p45 fueron cultivadas en esferas Cytodex3 (GE Healthcare; Cat # 17-0485-01) en un plato ultra de baja adherencia de 6 pozos (Costar; Cat #3471) colocados en una plataforma oscilante con una rotación cada 10 segundos (Vari Mix, Thermo Scientific, Cat#M79735). El medio acondicionado con MEF fue cambiado diariamente durante 6 días. Entonces el medio fue cambiado a los siguientes tratamientos para iniciar la diferenciación de endodermos. Las células en esferas en el pozo de tratamiento de control positivo (designado como AA+Wnt) fueron diferenciadas con la adición de 100 ng/mililitros de activina A (PeproTech; Cat #120-14), 8ng/ml de bFGF (PeproTech Inc.; Cat #: 100-18B), y 20 ng/mililitros de Wnt3a (R&D Systems; Cat # 1324-WN/CF) durante un día seguido de 100 ng/mililitros de activin A y 8ng/ml de bFGF (PeproTech Inc.; Cat #: 100-18B) durante 2 días en RPMI-1640 (Invitrogen; Cat #: 22400) con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (Proliant Biomedicals, Inc; SKU # 68700) utilizando volúmenes de 2 ml por pozo. Un 2<sup>o</sup> pozo de tratamiento (designado como GDF-8+MCX) recibió el compuesto 202 a 2.5µM con 200 ng/mililitros de GDF-8 (R&D Systems, Cat # 788-G8) y 8ng/ml de bFGF durante un día seguido por 2 días con 200 ng/mililitros de GDF-8 y 8ng/ml de bFGF en RPMI-1640, 2% de medio con BSA libre de ácidos grasos (2 ml/pozo). Un 3<sup>er</sup> pozo de

tratamiento (designado como GDF-8+Wnt) recibió 200 ng/mililitros de GDF-8 con 20 ng/mililitros de Wnt3a y 8ng/ml de bFGF durante un día seguido por 2 días con 200 ng/mililitros de GDF-8 y 8ng/ml de bFGF en RPMI-1640 con un medio con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (2 ml/2). Todos los medios y tratamientos fueron cambiados diariamente.

5 Cuando concluyó el tratamiento y el cultivo, las células fueron cultivadas y contadas para determinar la recuperación celular y ejecutar el análisis de citometría de flujo. Altos niveles de CXCR4 y CD99 fueron vistos después de los 3 regímenes de tratamiento (**figura 27 A**) el número de células varió en que muestras (**figura 27B**) un número más bajo de células fue observado en muestras tratadas con FDF-8 y en el endodermo definitivo y en la 4ª etapa que en los otros grupos de tratamiento. Esto sugiere que los compuestos del invento podrían incrementar la proliferación de las células durante la diferenciación.

10 Al final de la etapa 3 los genes endodérmicos PDX1, HNF4 alfa, y CDX2 son expresados en las células (**figura 27C, D**). El tratamiento de las células con GDF-8 y un compuesto de este invento durante la etapa uno de diferenciación resultó en una mejor expresión de Pdx1 que el tratamiento de diferenciación de control. Al final de la etapa 4, los genes endodérmicos fueron regulados aún más (**figura 27E, F**). Estos resultados concluyen en que el GDF-8 con el compuesto 202 pueden reemplazar a activina a y a Wnt3a para una diferenciación endodérmica definitiva resultando en una formación de endodermos pancreáticos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1						
Plato #	# de Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17		
		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5	plato 5	no Activina A (con Wnt3a)	7159	67.42	8.12E+06	2.51
10	plato 5	Activina A / Wnt3a	10619	100	3.23E+08	100
	plato 5	Compuesto 58	4848	45.66	-1.60E+06	-0.49
	plato 5	Compuesto 59	20	0.19	-4.62E+06	-1.43
15	plato 5	Compuesto 60	3348	31.52	-2.33E+05	-0.07
	plato 5	Compuesto 61	2931	27.6	-3.05E+06	-0.94
	plato 5	Compuesto 62	7171	67.53	-2.04E+06	-0.63
20	plato 5	Compuesto 3	14211	133.82	-2.34E+06	-0.73
	plato 6	no Activina A (con Wnt3a)	3264	32.97	2.52E+06	0.8
	plato 6	Activina A / Wnt3a	9902	100	3.14E+08	100
25	plato 6	Compuesto 63	1917	19.36	4.75E+05	0.15
	plato 6	Compuesto 26	5434	54.88	-6.33E+05	-0.2
	plato 6	Compuesto 27	6288	63.5	-1.13E+06	-0.36
	plato 6	Compuesto 28	4121	41.62	-1.89E+06	-0.6
30	plato 6	Compuesto 29	5164	52.15	-1.66E+06	-0.53
	plato 6	Compuesto 30	4726	47.73	-1.23E+06	-0.39
	plato 7	no Activina A (con Wnt3a)	9545	47.57	-4.87E+06	-0.99
35	plato 7	Activina A / Wnt3a	20064	100	4.92E+08	100
	plato 7	Compuesto 31	7230	36.03	-3.45E+06	-0.7
	plato 7	Compuesto 32	14655	73.04	-3.03E+06	-0.62
40	plato 7	Compuesto 33	13891	69.23	-8.11E+06	-1.65
	plato 7	Compuesto 34	11674	58.18	-2.24E+06	-0.46
	plato 7	Compuesto 35	15379	76.65	-7.30E+06	-1.48
	plato 7	Compuesto 36	8356	41.65	-4.57E+06	-0.93
45	plato 8	no Activina A (con Wnt3a)	6868	36.97	-2.31E+06	-0.52
	plato 8	Activina A / Wnt3a	18575	100	4.47E+08	100
	plato 8	Compuesto 37	9048	48.71	-3.51E+06	-0.79
50	plato 8	Compuesto 38	11361	61.16	-4.31E+06	-0.96
	plato 8	Compuesto 39	7054	37.98	-3.83E+06	-0.86
	plato 8	Compuesto 40	8104	43.63	-4.59E+06	-1.03
55	plato 1	no Activina A (con Wnt3a)	2972	27.98	1.64E+07	19.74
	plato 1	Activina A / Wnt3a	3126	29.44	8.33E+07	100
	plato 1	Compuesto 64	2201	20.72	1.71E+07	20.52
	plato 1	Compuesto 65	3030	28.53	2.83E+07	33.95
60	plato 1	Compuesto 66	1990	18.74	2.36E+07	28.3
	plato 1	Compuesto 67	2074	19.53	2.63E+07	31.55
	plato 1	Compuesto 68	1432	13.48	1.03E+07	12.39
65	plato 1	Compuesto 69	2593	24.42	2.62E+07	31.43

Tabla 1						
Plato #	# de Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17		
		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5						
10	plato 1	Compuesto 70	2236	21.05	2.59E+07	31.11
	plato 1	Compuesto 71	2996	28.22	3.07E+07	36.92
	plato 1	Compuesto 72	2179	20.52	1.21E+07	14.5
15	plato 1	Compuesto 73	2817	26.53	2.93E+07	35.25
	plato 1	Compuesto 74	2853	26.86	2.25E+07	27.01
	plato 1	Compuesto 75	1689	15.91	1.42E+07	17.05
20	plato 1	Compuesto 76	2324	21.89	1.48E+07	17.81
	plato 1	Compuesto 77	2306	21.71	2.04E+07	24.55
	plato 1	Compuesto 78	3298	31.06	2.58E+07	31
	plato 1	Compuesto 79	2855	26.88	2.79E+07	33.47
25	plato 1	Compuesto 80	3603	33.93	3.22E+07	38.62
	plato 1	Compuesto 81	2263	21.31	1.07E+07	12.91
	plato 1	Compuesto 82	1210	11.39	1.36E+07	16.33
30	plato 1	Compuesto 83	1805	17	1.82E+07	21.87
	plato 1	Compuesto 84	2024	19.06	2.48E+07	29.8
	plato 1	Compuesto 85	2840	26.74	3.45E+07	41.44
	plato 1	Compuesto 86	1447	13.63	8.43E+06	10.13
35	plato 1	Compuesto 87	5336	50.25	4.20E+07	50.38
	plato 2	no Activina A (con Wnt3a)	4033	35.5	2.14E+07	21.7
	plato 2	Activina A / Wnt3a	4292	37.78	9.86E+07	100
40	plato 2	Compuesto 88	3416	30.06	4.17E+07	42.28
	plato 2	Compuesto 89	4751	41.82	2.11E+07	21.4
	plato 2	Compuesto 90	4542	39.98	3.03E+07	30.7
45	plato 2	Compuesto 91	1401	12.33	1.29E+06	1.31
	plato 2	Compuesto 92	4210	37.06	2.95E+07	29.9
	plato 2	Compuesto 93	4157	36.59	2.29E+07	23.26
	plato 2	Compuesto 94	4046	35.61	2.85E+07	28.91
50	plato 2	Compuesto 95	8368	73.66	4.02E+07	40.72
	plato 2	Compuesto 96	3695	32.53	2.92E+07	29.57
	plato 2	Compuesto 97	3437	30.26	2.41E+07	24.44
55	plato 2	Compuesto 98	4178	36.77	3.75E+07	38.07
	plato 2	Compuesto 99	3739	32.91	2.10E+07	21.29
	plato 2	Compuesto 100	2275	20.02	1.27E+07	12.86
60	plato 2	Compuesto 101	3496	30.77	2.98E+07	30.17
	plato 2	Compuesto 102	4874	42.9	2.10E+07	21.32
	plato 2	Compuesto 103	4228	37.22	2.69E+07	27.32
	plato 2	Compuesto 104	6115	53.82	4.93E+07	49.99
65	plato 2	Compuesto 105	6484	57.07	5.03E+07	50.95



Tabla 1					
Plato #	# de Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17	
		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
plato 2	Compuesto 106	4211	37.06	3.94E+07	40
plato 2	Compuesto 107	2853	25.11	1.78E+07	18.04
plato 2	Compuesto 108	3779	33.27	2.39E+07	24.26
plato 2	Compuesto 108	2869	25.26	2.04E+07	20.71
plato 2	Compuesto 110	4398	38.71	2.53E+07	25.65
plato 3	no Activina A (con Wnt3a)	2589	91.17	1.17E+07	5.89
plato 3	Activina A / Wnt3a	6933	244.13	1.98E+08	100
plato 3	Compuesto 111	6816	240.04	5.33E+07	26.9
plato 3	Compuesto 112	5357	188.66	3.52E+07	17.74
plato 3	Compuesto 113	6002	211.37	8.55E+07	43.11
plato 3	Compuesto 114	3308	116.49	3.85E+07	19.44
plato 3	Compuesto 115	5007	176.31	3.96E+07	19.95
plato 3	Compuesto 116	3802	133.89	3.12E+07	15.75
plato 3	Compuesto 117	6521	229.64	4.16E+07	20.97
plato 3	Compuesto 118	6128	215.81	5.53E+07	27.91
plato 3	Compuesto 119	4184	147.35	3.41E+07	17.21
plato 3	Compuesto 120	2489	87.66	2.87E+07	14.49
plato 3	Compuesto 121	4985	175.54	3.94E+07	19.87
plato 3	Compuesto 25	4151	146.17	4.03E+07	20.32
plato 3	Compuesto 122	6407	225.61	4.15E+07	20.95
plato 3	Compuesto 123	4465	157.24	5.35E+07	26.99
plato 3	Compuesto 124	4417	155.53	4.67E+07	23.55
plato 3	Compuesto 125	6367	224.23	5.73E+07	28.93
plato 3	Compuesto 126	6157	216.82	7.47E+07	37.7
plato 3	Compuesto 127	5593	196.97	5.61E+07	28.28
plato 3	Compuesto 128	4160	146.5	4.91E+07	24.77
plato 3	Compuesto 129	3778	133.03	3.54E+07	17.88
plato 3	Compuesto 130	4357	153.43	4.15E+07	20.92
plato 3	Compuesto 131	6135	216.05	4.28E+07	21.61
plato 3	Compuesto 132	4421	155.69	4.58E+07	23.12
plato 3	Compuesto 133	7069	248.94	6.52E+07	32.88
plato 4	no Activina A (con Wnt3a)	3274	86.62	1.25E+07	12.79
plato 4	Activina A / Wnt3a	4158	110.03	9.79E+07	100
plato 4	Compuesto 134	5277	139.62	3.43E+07	35.04
plato 4	Compuesto 64	5657	149.67	3.38E+07	34.48
plato 4	Compuesto 135	2790	73.83	1.63E+07	16.63
plato 4	Compuesto 34	4774	126.33	4.35E+07	44.47
plato 4	Compuesto 136	4881	129.16	3.20E+07	32.73

Tabla 1						
Plato #	# de Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17		
		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5						
10	plato 4	Compuesto 137	1740	46.05	9.16E+06	9.35
	plato 4	Compuesto 30	6367	168.46	4.22E+07	43.13
	plato 4	Compuesto 37	5377	142.27	2.85E+07	29.14
15	plato 4	Compuesto 138	7722	204.32	3.07E+07	31.37
	plato 4	Compuesto 139	3574	94.56	1.30E+07	13.32
	plato 4	Compuesto 140	3893	103	1.12E+07	11.46
	plato 4	Compuesto 39	6114	161.77	3.45E+07	35.22
20	plato 4	Compuesto 141	4310	114.04	1.61E+07	16.48
	plato 4	Compuesto 142	5091	134.71	3.74E+07	38.22
	plato 4	Compuesto 35	6601	174.65	8.50E+07	86.77
25	plato 4	Compuesto 143	3582	94.79	2.17E+07	22.14
	plato 4	Compuesto 144	6787	179.57	5.45E+07	55.69
	plato 4	Compuesto 145	3752	99.29	2.23E+07	22.81
30	plato 4	Compuesto 146	2554	67.59	1.83E+07	18.71
	plato 4	Compuesto 112	3289	87.03	1.48E+07	15.11
	plato 4	Compuesto 113	3819	101.06	2.34E+07	23.93
	plato 4	Compuesto 114	1259	33.32	1.34E+07	13.67
35	plato 4	Compuesto 22	5517	145.98	7.09E+07	72.39
	plato 4	Compuesto 150	5104	135.04	3.34E+07	34.11
40	plato 5	no Activina A (con Wnt3a)	7159	116.7	8.12E+06	2.51
	plato 5	Activina A / Wnt3a	10619	173.09	3.23E+08	100
	plato 5	Compuesto 151	2785	45.39	-1.03E+06	-0.32
	plato 5	Compuesto 152	4693	76.5	-3.08E+06	-0.95
45	plato 5	Compuesto 153	9718	158.4	-1.20E+06	-0.37
	plato 5	Compuesto 154	3479	56.7	-1.97E+06	-0.61
	plato 5	Compuesto 155	9343	152.28	-3.45E+06	-1.07
	plato 5	Compuesto 156	3813	62.16	-2.58E+05	-0.08
50	plato 6	no Activina A (con Wnt3a)	3264	68.37	2.52E+06	0.8
	plato 6	Activina A / Wnt3a	9902	207.4	3.14E+08	100
	plato 6	Compuesto 157	2480	51.94	-1.22E+06	-0.39
55	plato 6	Compuesto 158	5271	110.41	-1.30E+06	-0.41
	plato 6	Compuesto 159	6478	135.68	-1.84E+06	-0.59
	plato 6	Compuesto 160	4212	88.21	1.30E+05	0.04
60	plato 6	Compuesto 161	2439	51.09	-9.20E+05	-0.29
	plato 6	Compuesto 162	1260	26.39	-1.35E+06	-0.43
	plato 7	no Activina A (con Wnt3a)	9545	156.12	-4.87E+06	-0.99
	plato 7	Activina A / Wnt3a	20064	328.17	4.92E+08	100
65	plato 7	Compuesto 163	16557	270.81	-7.31E+06	-1.49

Tabla 1						
Plato #	# de Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17		
		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5						
10	plato 7	Compuesto 164	16472	269.42	-7.37E+06	-1.5
	plato 7	Compuesto 165	3015	49.32	-7.34E+06	-1.49
	plato 7	Compuesto 166	13845	226.45	-7.98E+06	-1.62
15	plato 7	Compuesto 167	10325	168.87	-7.35E+06	-1.49
	plato 7	Compuesto 168	14139	231.26	-6.49E+06	-1.32
	plato 7	Compuesto 169	4468	73.08	-6.38E+06	-1.3
20	plato 8	no Activina A (con Wnt3a)	6868	179.83	-2.31E+06	-0.52
	plato 8	Activina A / Wnt3a	18575	486.35	4.47E+08	100
	plato 8	Compuesto 170	13140	344.04	-4.13E+06	-0.93
	plato 8	Compuesto 171	10894	285.22	-2.61E+06	-0.58
25	plato 8	Compuesto 172	3416	89.44	-4.72E+06	-1.06
	plato 8	Compuesto 173	8815	230.81	-4.25E+06	-0.95
	plato 8	Compuesto 174	11760	307.91	-3.33E+06	-0.75
	plato 8	Compuesto 175	5	0.13	-4.91E+06	-1.1
30	plato 8	Compuesto 176	10139	265.47	-4.73E+06	-1.06
	plato 8	Compuesto 177	9994	261.68	-2.95E+06	-0.66
	plato 8	Compuesto 178	8998	235.58	-3.74E+06	-0.84
35	plato 5	no Activina A (con Wnt3a)	7159	67.42	8.12E+06	2.51
	plato 5	Activina A / Wnt3a	10619	100	3.23E+08	100
	plato 5	Compuesto 21	4719	44.44	-1.96E+06	-0.61
40	plato 5	Compuesto 22	2036	19.18	-1.79E+06	-0.55
	plato 5	Compuesto 23	2563	24.13	-1.56E+06	-0.48
	plato 5	Compuesto 24	4470	42.09	-7.05E+05	-0.22
45	plato 5	Compuesto 24	6085	57.3	-3.08E+06	-0.95
	plato 5	Compuesto 26	7276	68.52	-2.38E+06	-0.74
	plato 5	Compuesto 27	4588	43.2	-5.63E+05	-0.17
	plato 5	Compuesto 28	2682	25.26	-1.37E+06	-0.43
50	plato 5	Compuesto 29	5778	54.41	-1.94E+06	-0.6
	plato 5	Compuesto 30	620	5.84	-5.05E+06	-1.56
	plato 5	Compuesto 31	3419	32.19	-1.42E+06	-0.44
55	plato 6	no Activina A (con Wnt3a)	3264	69.07	2.52E+06	0.8
	plato 6	Activina A / Wnt3a	9902	209.51	3.14E+08	100
	plato 6	Compuesto 32	2142	45.32	-1.33E+06	-0.42
	plato 6	Compuesto 33	5564	117.73	-8.63E+05	-0.27
60	plato 6	Compuesto 34	5927	125.41	-2.01E+06	-0.64
	plato 6	Compuesto 35	10068	213.01	-2.15E+06	-0.68
	plato 6	Compuesto 36	5170	109.39	-1.22E+06	-0.39
65	plato 6	Compuesto 37	3098	65.55	1.91E+06	0.61

Tabla 1						
Plato #	# de Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17		
		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5	plato 6	Compuesto 38	1537	32.52	4.48E+04	0.01
10	plato 6	Compuesto 39	3650	77.23	-2.01E+06	-0.64
	plato 6	Compuesto 40	5817	123.07	4.91E+05	0.16
	plato 6	Compuesto 64	4359	92.23	-1.07E+05	-0.03
15	plato 6	Compuesto 30	4035	85.38	2.09E+06	0.66
	plato 6	Compuesto 65	3279	69.37	-5.63E+05	-0.18
	plato 6	Compuesto 67	2698	57.08	-1.95E+06	-0.62
20	plato 7	no Activina A (con Wnt3a)	9545	321.22	-4.87E+06	-0.99
	plato 6	Compuesto 38	1537	32.52	4.48E+04	0.01
	plato 7	Activina A / Wnt3a	20064	675.2	4.92E+08	100
25	plato 7	Compuesto 68	10894	366.62	-5.15E+06	-1.05
	plato 7	Compuesto 69	9734	327.58	-3.97E+06	-0.81
	plato 7	Compuesto 70	16736	563.21	-6.51E+06	-1.32
	plato 7	Compuesto 71	17999	605.71	-7.38E+06	-1.5
30	plato 7	Compuesto 72	7309	245.96	-6.47E+06	-1.32
	plato 7	Compuesto 73	8888	299.1	-3.03E+06	-0.62
	plato 7	Compuesto 74	11496	386.85	-2.67E+06	-0.54
35	plato 7	Compuesto 75	9739	327.74	-7.75E+06	-1.57
	plato 7	Compuesto 76	14439	485.89	-4.19E+06	-0.85
	plato 7	Compuesto 77	12331	414.95	-6.03E+06	-1.22
40	plato 7	Compuesto 78	9702	326.49	-6.57E+06	-1.33
	plato 7	Compuesto 79	8535	287.22	-6.92E+06	-1.41
	plato 8	no Activina A (con Wnt3a)	6868	295.49	-2.31E+06	-0.52
	plato 8	Activina A / Wnt3a	18575	799.17	4.47E+08	100
45	plato 8	Compuesto 80	13939	599.68	-4.23E+06	-0.95
	plato 8	Compuesto 81	10466	450.29	-4.91E+06	-1.1
	plato 8	Compuesto 82	10323	444.14	-4.90E+06	-1.1
50	plato 8	Compuesto 83	14619	628.95	1.48E+06	0.33
	plato 8	Compuesto 84	14105	606.84	-4.44E+06	-0.99
	plato 8	Compuesto 85	12172	523.66	-3.48E+06	-0.78
55	plato 8	Compuesto 86	7218	310.54	-4.22E+06	-0.94
	plato 8	Compuesto 87	5383	231.58	-4.07E+06	-0.91
	plato 8	Compuesto 88	10419	448.27	-4.27E+06	-0.96
	plato 8	Compuesto 89	11780	506.83	-3.94E+06	-0.88
60	plato 8	Compuesto 90	7002	301.25	-1.54E+06	-0.35
	plato 8	Compuesto 91	6224	267.78	-4.53E+06	-1.01

65

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45

Tabla 2		
Compuesto #	Número de Células	Intensidad de Sox17
	% del control positivo	% del control positivo
Compuesto 17	133.8	-0.7
Compuesto 95	195	40.7
Compuesto 138	185.7	31.4
Compuesto 87	170.7	50.4
Compuesto 144	163.2	55.7
Compuesto 35	158.7	86.8
Compuesto 30	153.1	43.1
Compuesto 105	151	51
Compuesto 39	147	35.2
Compuesto 104	142.5	50
Compuesto 29	136	34.5
Compuesto 22	132.7	72.4
Compuesto 37	129.3	29.1
Compuesto 134	126.9	35
Compuesto 150	122.7	34.1
Compuesto 142	122.4	38.2
Compuesto 136	117.4	32.7
Compuesto 80	115.2	38.6
Compuesto 34	114.8	44.5
Compuesto 102	113.5	21.3
Compuesto 89	110.7	21.4
Compuesto 105	105.8	30.7
Compuesto 78	105.5	31
Compuesto 141	103.6	16.5
Compuesto 110	102.5	25.7
Compuesto 133	102	32.9

50  
55  
60  
65

Tabla 3						
Compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de Sox17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
ninguno	no Activina A, con Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
ninguno	Activina A / Wnt3a		18728	100	1.86E+08	100
Compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	21445	114.51	3.43E+07	18.48
ninguno	no Activina A, con Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
ninguno	Activina A / Wnt3a		18728	100	1.86E+08	100
Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	18336	97.91	3.72E+07	20.05

<b>Tabla 3</b>						
<b>Compuesto #</b>	<b>Tratamientos</b>		<b>Número de Células</b>		<b>Expresión de Sox17</b>	
			<b>Número de Células Total Promedio</b>	<b>% del control positivo</b>	<b>Intensidad Total Promedio</b>	<b>% del control positivo</b>
Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	18891	100.87	3.26E+07	17.55
Compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	20221	107.97	2.83E+07	15.27
Compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17095	91.28	2.82E+07	15.19
Compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	15605	83.32	2.67E+07	14.37
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	23823	127.2	2.54E+07	13.69
Compuesto 80	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	19864	106.07	2.33E+07	12.54
Compuesto 141	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17719	94.61	2.24E+07	12.04
Compuesto 30	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	18063	96.45	2.18E+07	11.73
Compuesto 150	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	16833	89.88	2.16E+07	11.63
Compuesto 144	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17100	91.31	2.04E+07	11.01
Compuesto 104	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17863	95.38	1.89E+07	10.19
Compuesto 142	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	18955	101.21	1.84E+07	9.9
Compuesto 110	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17534	93.62	1.76E+07	9.45
Compuesto 78	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17703	94.52	1.71E+07	9.23
Compuesto 133	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	16521	88.22	1.67E+07	8.97
Compuesto 87	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	16495	88.07	1.55E+07	8.33
Compuesto 95	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	16900	90.24	1.43E+07	7.72
Compuesto 136	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	19167	102.34	7.91E+06	4.26
Compuesto 105	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	15217	81.25	7.45E+06	4.01
Compuesto 134	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	17208	91.88	7.40E+06	3.99
Compuesto 138	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	16695	89.14	6.65E+06	3.58
Compuesto 89	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	14652	78.24	3.89E+06	2.1
Compuesto 90	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	15903	84.92	3.53E+06	1.9
Compuesto 102	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	12943	69.11	2.85E+05	0.15
ninguno	no Activina A, con Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
ninguno	Activina A / Wnt3a		18728	100	1.86E+08	100
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	18294	97.68	1.99E+07	10.7

<b>Tabla 3B</b>		
<b>compuesto #</b>	<b>Número de Células % del control positivo</b>	<b>Intensidad de SOX17 % del control positivo</b>
compuesto 22	97.91	20.05
compuesto 34	100.87	17.55
compuesto 29	107.97	15.27
compuesto 39	91.28	15.19
compuesto 37	83.32	14.37
compuesto 35	127.2	13.69

Tabla 4						
compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
ninguno	no Activina A (con Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
ninguno	Activina A / Wnt3a		10459	100	1.60E+08	100
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF	6942	73.43	1.27E+06	0.74
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF+FGF4	5738	60.69	3.14E+06	1.83
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	4453	47.1	9.30E+05	0.54
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	10391	109.91	8.92E+06	5.2
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	5728	60.59	2.14E+06	1.24
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	13198	139.59	1.29E+07	7.54
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	10480	110.85	8.97E+06	5.23
compuesto 17	no Activina A (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	13649	144.37	1.45E+07	8.43
ninguno	no Activina A (con Wnt3a)		3117	34.86	-1.41E+06	-0.72
ninguno	Activina A / Wnt3a		8942	100	1.95E+08	100
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF	19334	216.23	6.62E+07	33.86
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	PDGF-AB	16662	186.34	4.95E+07	25.33
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	PDGF-A	16885	188.84	4.48E+07	22.94
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	VEGF	18263	204.25	3.51E+07	17.98
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	FGF4	4410	49.32	3.33E+07	17.04
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	Muscimol	18867	211.00	2.61E+07	13.35
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	PDGF-C	16642	186.12	1.85E+07	9.46
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	PDGF-D	17618	197.03	1.84E+07	9.41
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	PDGF-B	14168	158.46	1.52E+07	7.76
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	PD98059	18877	211.11	1.30E+07	6.64
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	BMP1	18849	210.81	1.29E+07	6.59
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	LY294002	18374	205.49	1.03E+07	5.28
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	BMP4	16748	187.31	8.97E+06	4.59
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	BMP2	16218	181.38	8.89E+06	4.55
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	BMP7	20111	224.91	8.05E+06	4.12
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	U0124	16539	184.97	7.54E+06	3.86
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	BMP6	17838	199.5	7.32E+06	3.75
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	BMP217	12042	134.67	7.08E+06	3.62
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	bicuculina	19312	215.98	1.95E+06	1
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	U0126	19961	223.24	-5.75E+05	-0.29
Compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	Butirato	14238	159.24	-1,85E+06	-0.94
ninguno	no Activina A (con Wnt3a)		6049	45.2	-1.31E+07	-5.2

Tabla 4						
compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
ninguno		Activina A/Wnt3a	7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
Compuesto 20		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	10459	100	1.60E+08	100
Compuesto 17		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6942	73.43	1.27E+06	0.74
Compuesto 16		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5738	60.69	3.14E+06	1.83
Compuesto 13		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4453	47.1	9.30E+05	0.54
Compuesto 19		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7799	58.2	6.82E+07	27.2
Compuesto 92		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5886	44	5.63E+07	22.5
Compuesto 93		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5463	40.8	4,38E+07	17.5
Compuesto 94		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5100	38.1	4.18E+07	16.7
Compuesto 95		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4510	33.7	3.32E+07	13.3
Compuesto 97		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4561	34.1	2,15E+07	8.6
Compuesto 98		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3176	23.7	9.86E+06	3.9
Compuesto 99		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	1209	9	-1,56E+07	-6.2
ninguno		no Activina A (con Wnt3a)	15494	98	-1,25E+07	-4.4
ninguno		Activina A/Wnt3a	15807	100	2,86E+08	100
Compuesto 18		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	8742	55.3	1.01E+08	35.4
Compuesto 14		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	8464	53.5	8.33E+07	29.1
Compuesto 15		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7234	45.8	7.95E+07	27.8
Compuesto 100		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6805	43	5.88E+07	20.6



Tabla 4						
compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
Compuesto 101		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5668	35.9	5.34E+07	18.7
Compuesto 102		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6195	39.2	5.29E+07	18.5
Compuesto 103		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7545	47.7	5.13E+07	18
Compuesto 104		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4757	30.1	4.58E+07	16
Compuesto 105		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6285	39.8	4.29E+07	15
Compuesto 106		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5622	35.6	2.86E+07	10
Compuesto 107		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3951	25	1.72E+07	6
Compuesto 108		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3226	20,4	1.58E+07	5.5
Compuesto 109		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3473	22,0	1.46E+07	5.1
Compuesto 110		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3703	23.4	1.32E+07	4.6
Compuesto 111		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2918	18.5	1.22E+07	4.3
Compuesto 112		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2975	18.8	1.04E+07	3.6
Compuesto 113		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2910	18.4	9.18E+06	12
Compuesto 114		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2734	17.3	6.13E+06	2.1
Compuesto 115		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2169	13.7	3.77E+06	1.3
Compuesto 116		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3107	19.7	3.52E+06	1.2
Compuesto 117		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3343	21.1	5.35E+05	0.2
Compuesto 118		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3034	19.2	2.37E+05	0.1

**Tabla 4**

compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
Compuesto 119		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2263	14.3	-1.66E+06	-0.6
Compuesto 120		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	1771	11.2	-5.57E+06	-2
Compuesto 121		EGF, FGF, PDGF-A, 1TEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	1136	7.2	-1.79E+07	-6.3
Compuesto 121		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2021	12.8	-2.09E+07	-7.3

**Tabla 5**

compuesto #	Tratamiento		Número de Células		Expresión de Sox17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total	% del control positivo
ninguno	no Activina A con Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
ninguno	Activina A / Wnt3a		10459	100	1.60E+08	100
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF	6942	73.43	1.27E+06	0.74
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	5738	60.69	3.14E+06	1.83
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	4453	47.1	9.30E+05	0.54
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	10391	109.91	8.92E+06	5.2
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	5728	60.59	2.14E+06	1.24
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	13198	139.59	1.29E+07	7.54
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	10480	110.85	8.97E+06	5.23
compuesto 17	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	13649	144.37	1.45E+07	8.43
ninguno	no Activina A con Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
ninguno	Activina A / Wnt3a		10459	100	1.60E+08	100
compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF	23887	228.4	-1.01E+07	-6.32
compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	21268	203.36	1.36E+06	0.85
compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	17611	168.39	1.28E+07	8.03
compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	17949	171.62	1.54E+06	0.96
compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	23242	22123	1.23E+07	7.72
compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	16068	153.63	3.92E+07	24.57

Tabla 5							
compuesto #	Tratamiento		Número de Células		Expresión de Sox17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total	% del control positivo	
5	compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	16132	154.25	9.11E+07	57.04
10	compuesto 35	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	15457	147.8	6.89E+07	43.15
	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF	1971	18.84	-1.44E+07	-9
15	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	7436	71.1	-4.35E+06	-2.72
	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	6535	62.48	-7.52E+06	-4.71
20	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	1376	13.15	-1.42E+07	-8.91
	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	8880	84.91	-8.53E+06	-5.34
	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	8146	77.89	-4.82E+06	-3.02
25	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	8858	84.7	-7.15E+06	-4.48
	compuesto 29	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	10071	96.3	2.95E+06	1.85
30	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF	7966	76.17	-1.19E+07	-7.42
	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	6932	66.28	-4.62E+06	-2.89
	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	7473	71.46	-2.61E+06	-1.63
35	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	7914	75.67	-1.91E+06	-1.2
	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	12956	123.88	-1.25E+07	-7.82
40	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	6731	64.36	-1.10E+07	-6.89
	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	8778	83.93	1.39E+07	0.09
	compuesto 37	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	5821	55.66	-1.22E+09	-7.64
45	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF	13062	124.89	2.78E+07	17.39
	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	13133	125.58	1.23E+08	76.85
50	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	12532	119.83	1.09E+08	68.41
	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	15811	151.18	6.90E+06	4.32
	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	11801	112.84	4.04E+06	2.53
55	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	15262	145.93	1.15E+07	7.18
	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	12901	123.36	5.01E+07	31.35
60	compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	12208	116.72	5.56E+07	34.83
	ninguno	no Activina A (con Wnt3a)		10224	108.14	7.36E+05	0.43
	ninguno	Activina A / Wnt3a		9455	100	1.72E+08	100

Tabla 5							
compuesto #	Tratamiento		Número de Células		Expresión de Sox17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total	% del control positivo	
5	compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF	11615	122.85	1.49E+05	0.09
10	compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	10456	110.59	5.11E+06	2.98
	compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	9972	105.47	1.62E+06	0.94
15	Compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	10540	111.48	2.22E+06	1.29
	Compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	17050	180.34	4.84E+06	182
20	Compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	8856	93.67	7.01E+05	0.41
	Compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	7973	84.33	5.30E+06	3.09
	Compuesto 39	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	9103	96.28	7.32E+05	0.43
25	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF	14105	149.19	1.75E+06	1.02
	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4	12971	137.19	1.04E+07	6.05
30	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	16580	175.36	8.60E+06	5.01
	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	14676	155.23	5.61E+06	3.27
	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	20372	215.48	4.99E+06	2.91
35	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	12277	129.85	4.90E+06	2.86
	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	12522	132.44	7.88E+06	4.59
40	Compuesto 22	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	11610	122.8	1.33E+07	7.77

Tabla 6							
Compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
45	ninguno	no Activina A (con Wnt3a)		477	6.64	7.40E+04	0.09
50	ninguno	Activina A / Wnt3a		7185	100	8.00E+07	100
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	ninguno	4611	64.18	1.40E+07	17.21
55	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF	6145	85.53	1.50E+07	19.18
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	FGF4	5323	74.09	2.70E+07	33.75
60	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	PDGF-D	5017	69.84	1.50E+07	18.76
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	PDGF-A	4175	58.11	1.10E+07	13.43

65

Tabla 6							
Compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	VEGF	4713	65.6	1.00E+07	12.49
10	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	GDF8	6354	88.44	7.10E+07	88.59
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	Muscimol	7286	101.41	3.10E+07	38.38
15	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	PDGF-D+VEGF	5030	70.01	1.20E+07	14.58
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	VEGF+Muscimol	776	10.81	1.30E+06	1.56
20	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	PDGF-D+Muscimol	3490	48.57	6.50E+06	8.02
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	GDF8+PDGF-D	6889	95.88	5.80E+07	72.59
25	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	PDGF-D+Muscimol+VEGF	2133	29.68	2.70E+06	3.32
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	GDF8+PDGF-D+VEGF	5585	77.74	6.60E+07	81.75
30	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	GDF8+VEGF+Muscimol	6083	84.67	5.60E+07	69.62
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	GDF8+PDGF-D+VEGF+Muscimol	9455	131.6	9.60E+07	119.24
35	Compuesto 34	no AA, no Wnt3a	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8	4757	66.21	3.90E+07	48.77
	Compuesto 34	no AA (con Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8	6028	83.9	7.00E+07	87.44

Tabla 7							
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
40	1	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
45	1	Activina A / Wnt3a	ninguno	13392	100	2.50E+08	100
50	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 18	13037	97.3	1.63E+08	65.2
55	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 14	9344	69.8	1.23E+08	49
	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 15	8448	63.1	8.64E+07	34.5
60	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 16	5498	41.1	6.56E+07	26.2
65	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 64	5063	37.8	5.88E+07	23.5

Tabla 7						
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 65	4788	35.8	4.57E+07	18.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 66	8129	60.7	3.53E+07	14.1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 67	6791	50.7	3.18E+07	12.7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 68	3456	25.8	2.30E+07	9.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 69	3995	29.8	1.69E+07	6.8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 70	474	3.5	-1.80E+07	-7.2
2	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	15494	98	-1.25E+07	-4.4
2	Activina A / Wnt3a	ninguno	15807	100	2.86E+08	100
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 19	8425	53.3	1.19E+08	41.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 13	9123	57.7	1.13E+08	39.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 71	6048	38.3	5.51E+07	19.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 72	6060	38.3	5.46E+07	19.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 73	5545	35.1	3.99E+07	14
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 74	10898	68.9	3.91E+07	13.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 75	4117	26	3.01E+07	10.5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 76	3825	241	2.74E+07	9.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 77	5928	37.5	2.44E+07	8.5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 78	3303	20.9	2.03E+07	7.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 79	4767	30.2	1.85E+07	6.5

Tabla 7							
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5							
10	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 80	2194	13.9	1.22E+07	4.3
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 81	2920	18.5	9.16E+05	0.3
15	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 82	1819	11.5	-1.05E+07	-3.7
20	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 83	2153	13.6	-1.19E+07	-4.2
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 84	58	0.4	-2.94E+07	-10.3
25	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 85	57	0.4	-3.03E+07	-10.6
	1	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
30	1	Activina A / Wnt3a	ninguno	13392	100	2.50E+08	100
	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
35	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 17	7988	59.6	1.13E+08	45
	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 16	8303	62	9.20E+07	36.7
40	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
45	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 19	7799	58.2	6.82E+07	27.2
	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 92	5886	44	5.63E+07	22.5
50	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 93	5463	40.8	4.38E+07	17.5
	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 94	5100	38.1	4.18E+07	16.7
55	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 95	4510	33.7	3.32E+07	13.3
60	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 96	4570	34.1	3.09E+07	12.3
	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 97	4561	34.1	2.15E+07	8.6

Tabla 7							
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5							
10	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 98	3176	23.7	9.86E+06	3.9
15	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 99	1209	9	-1.56E+07	-6.2
20	2	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	15494	98	-1.25E+07	-4.4
25	2	Activina A / Wnt3a	ninguno	15807	100	2.86E+08	100
30	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
35	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
40	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
45	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 100	6805	43	5.88E+07	20.6
50	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 101	5668	35.9	5.34E+07	18.7
55	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 102	6195	39.2	5.29E+07	18.5
60	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 103	7545	47.7	5.13E+07	18
65	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 104	4757	30.1	4.58E+07	16
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 105	6285	39.8	4.29E+07	15
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 106	5622	35.6	2.86E+07	10
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 107	3951	25	1.72E+07	6
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 108	3226	20.4	1.58E+07	5.5
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 109	3473	22	1.46E+07	5.1
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 110	3703	23.4	1.32E+07	4.6
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 100	6805	43	5.88E+07	20.6



Tabla 7						
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 111	2918	18.5	1.22E+07	4.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 112	2975	18.8	1.04E+07	3.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 113	2910	18.4	9.18E+06	3.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 114	2734	17.3	6.13E+06	2.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 115	2169	13.7	3.77E+06	1.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 116	3107	19.7	3.52E+06	1.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 117	3343	21.1	5.35E+05	0.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 118	3034	19.2	2.37E+07	0.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 119	2263	143	-1.66E+46	-0.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 120	1771	11.2	-5.57E+06	-2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 121	1136	7.2	-1.79E+07	-6.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 122	2021	12.8	-2.09E+07	-7.3
1	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
1	Activina A/Wnt3a	ninguno	13392	100	2.50E+48	100
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 19	15878	118.6	2.67E+08	106.5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 23	12165	90.8	2.15E+08	86
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 13	11491	85.8	1.61E+08	64.3

Tabla 7							
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17		
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5							
10	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 30	11396	85.1	1.34E+10	53.4
15	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
20	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
25	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 26	7415	55.4	8.30E+09	33.1
30	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 17	6994	52.2	7.76E+07	31
35	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
40	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 179	3573	26.7	2.43E+07	9.7
45	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 180	922	6.9	-2.20E+07	-8.8
50	1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 181	8	0.1	-2.68E+07	-10.7
55	2	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	15494	98	-1.25E+07	-4.4
60	2	Activina A/Wnt3a	ninguno	15807	100	2.86E+08	100
65	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 14	9008	57	2.62E+08	91.6
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 38	9650	61	2.46E+08	86.2
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 34	8907	56.3	9.99E+07	35
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 20	7346	46.5	8.90E+07	31.2

**Tabla 7**

5	Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17	
				Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
10	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 28	7591	48	8.77E+07	30.7
15	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
20	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
25	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 182	7631	48.3	6.74E+07	23.6
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 183	6777	42.9	5.93E+07	20.8
30	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 184	5475	34.6	5.44E+07	19
35	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 185	4093	25.9	4.92E+07	17.2
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 186	5274	33.4	4.63E+07	16.2
40	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 187	5342	33.8	2.00E+47	14.1
45	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 188	5533	35	3.98E+07	13.9
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 189	5928	37.5	3.96E+07	13.9
50	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 190	4822	30.5	3.90E+07	13.7
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 191	4249	26.9	3.81E+07	13.3
55	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 192	5616	35.5	3.54E+07	12.4
	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 193	4158	26.3	3.23E+07	11.3
60	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 194	3470	22	2.96E+07	10.4
65	2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 195	3800	24	2.95E+07	10.3

**Tabla 7**

Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 196	4619	29.2	2.78E+07	9.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 197	4011	25.4	2.45E+07	8.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 198	4367	27.6	1.92E+07	6.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 199	3162	20	1.20E+07	4.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 200	2087	13.2	4.43E+06	1.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 201	1568	9.9	-6.17E+06	-12
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 202	5213	33	-1.41E+07	-4.9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 203	7	0	-3.04E+07	-10.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 204	11	0.1	-3.18E+07	-11.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Compuesto 205	10	0.1	-3.20E+07	-11.2

**Tabla 8**

Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17	
	Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
Compuesto 18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
Compuesto 15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
Compuesto 19	15878	118.6	2.67E+08	106.5
Compuesto 24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
Compuesto 14	9008	57	2.62E+08	91.6
Compuesto 38	9650	61	2.46E+08	86.2
Compuesto 23	12165	90.8	2.15E+08	86
Compuesto 21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
Compuesto 13	11491	85.8	1.61E+08	64.3
Compuesto 35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
Compuesto 30	11396	85.1	1.34E+08	53.4
Compuesto 16	9064	57.3	1.48E+08	51.8

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Compuesto #	Número de Células		Expresión de SOX17	
	Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
Compuesto 36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
Compuesto 32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
Compuesto 34	8907	56.3	9.99E+07	35
Compuesto 26	7415	55.4	8.30E+07	33.1
Compuesto 20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
Compuesto 17	6994	52.2	7.76E+07	31
Compuesto 27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
Compuesto 28	7591	48	8.77E+07	30.7
Compuesto 40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
Compuesto 33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
Compuesto 25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
Compuesto 31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
Compuesto 20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
Compuesto 17	7988	59.6	1.13E+08	45
Compuesto 16	8303	62	9.20E+07	36.7
Compuesto 18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
Compuesto 14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
Compuesto 13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
Compuesto 15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
Compuesto 19	7799	58.2	6.82E+07	27.2

40  
45  
50  
55  
60  
65

Plato #	Tratamientos		Factores de Crecimiento	Número de Células		Expresión de SOX17	
	Activina A	Compuesto #		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
1	ninguno	ninguno	ninguno	9164	149.46	-5.91E+06	-5.17
1	10 ng/ml de AA	ninguno	ninguno	6132	100	1.52E+06	1.33
1	100 ng/ml AA	ninguno	ninguno	9658	157.51	1.14E+08	100
1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8+Wnt3a	8556	139.53	8.78E+07	76.82
1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	7657	124.87	4.70E+07	41.09
1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol+Wnt3a	8100	132.1	4.42E+07	38.65
1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	7975	130.06	3.43E+07	30.03
1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	EGF+FGF4+Wnt3a	9800	159.83	4.59E+07	40.13
1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	FGF4+Wnt3a	6490	105.84	4.28E+07	37.43

Tabla 9								
Plato #	Tratamientos		Factores de Crecimiento	Número de Células		Expresión de SOX17		
	Activina A	Compuesto #		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo	
5	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	EGF+Wnt3a	5001	81.55	2.80E+07	24.45
10	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 22	Wnt3a	4543	74.09	3.05E+07	26.65
15	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8+Wnt3a	2522	41.14	-4.86E+06	-4.25
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	3479	56.74	-3.96E+06	-3.46
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol+Wnt3a	3820	62.29	-1.67E+06	-1.46
20	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	3263	53.21	-4.56E+06	-3.99
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	EGF+FGF4+Wnt3a	2704	44.1	-4.17E+06	-3.65
25	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	FGF4+Wnt3a	284	4.64	-7.54E+06	-6.59
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	EGF+Wnt3a	155	2.53	-7.82E+06	-6.84
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 35	Wnt3a	173	2.83	-7.61E+06	-6.66
30	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8+Wnt3a	2737	44.63	2.41E+07	21.1
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	2283	37.23	5.59E+06	4.88
35	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol+Wnt3a	4676	76.26	2.41E+07	21.11
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	3964	64.65	2.27E+07	19.89
40	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	EGF+FGF4+Wnt3a	1736	28.31	1.98E+06	1.73
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	FGF4+Wnt3a	2139	34.89	6.98E+06	6.1
	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	EGF+Wnt3a	365	5.96	-4.86E+06	-4.25
45	1	10 ng/ml de AA	Compuesto 29	Wnt3a	2090	34.09	4.89E+06	4.28
	2	ninguno	ninguno	ninguno	9325	121.89	-3.35E+06	-3.01
50	2	10 ng/ml de AA	ninguno	ninguno	5177	67.67	3.89E+06	3.49
	2	100 ng/ml AA	ninguno	ninguno	7650	100	1.11E+08	100
55	2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8+Wnt3a	18362	240.02	3.45E+08	309.74
	2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	15574	203.58	2.59E+08	232.7
60	2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol+Wnt3a	17890	233.85	2.88E+08	258.3
	2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	17875	233.65	2.68E+08	241.07
65	2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	EGF+FGF4+Wnt3a	14158	185.07	2.40E+08	215.35

**Tabla 9**

Plato #	Tratamientos		Factores de Crecimiento	Número de Células		Expresión de SOX17	
	Activina A	Compuesto #		Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	FGF4+Wnt3a	13323	174.15	2.19E+08	196.86
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	EGF+Wnt3a	14527	189.89	2.28E+08	204.84
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 34	Wnt3a	3589	46.91	7.02E+07	63.08
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8+Wnt3a	5738	75	2.14E+07	19.24
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	2531	33.08	2.82E+06	2.53
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol+Wnt3a	2879	37.64	3.61E+06	3.24
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	2989	39.07	-1.78E+04	-0.02
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	EGF+FGF4+Wnt3a	734	9.59	-3.93E+06	-3.53
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	FGF4+Wnt3a	521	6.81	-4.46E+06	-4.01
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	EGF+Wnt3a	211	2.75	-4.54E+06	-4.08
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 39	Wnt3a	518	6.78	-2.37E+06	-2.13
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+Muscimol+GDF8+Wnt3a	5711	74.65	1.21E+07	10.82
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	4767	62.31	-5.16E+05	-0.46
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol+Wnt3a	4540	59.34	9.23E+05	0.83
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	4223	55.2	-6.15E+05	-0.55
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	EGF+FGF4+Wnt3a	3501	45.77	5.60E+05	0.5
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	FGF4+Wnt3a	3930	51.37	-1.88E+06	-1.69
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	EGF+Wnt3a	1431	18.7	-2.75E+06	-147
2	10 ng/ml de AA	Compuesto 37	Wnt3a	791	10.34	-2.99E+06	-2.68

**Tabla 10**

Compuesto #	Tratamientos		Número de Células		Expresión de SOX17	
			Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
ninguno	No Activina A (con Wnt3a)		4273	33.7	4.75E+07	17.49
ninguno	Activina A (con Wnt3a)		12676	100	2.72E+08	100
Compuesto 34	No AA (sin Wnt3a)	FGF(50ng/ml) EGF(50ng/ml)	13317	105.06	2.01E+08	74.08
Compuesto 34	No AA (sin Wnt3a)	FGF(50ng/ml) EGF(100ng/ml)	14189	111.93	2.01E+08	73.9

Tabla 10							
Compuesto #	Tratamientos			Número de Células		Expresión de SOX17	
				Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
Compuesto 34	No AA (sin Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(50ng/ml)	12616	99.52	1.80E+08	66.21
Compuesto 34	No AA (sin Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(100ng/ml)	8269	65.23	1.13E+08	41.73
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	ninguno	ninguno	11711	92.38	1.65E+08	60.68
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	ninguno	EGF(25ng/ml)	16052	126.63	2.14E+08	78.82
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	ninguno	EGF(50ng/ml)	13593	107.23	1.94E+08	71.52
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	ninguno	EGF(100ng/ml)	13170	103.9	1.93E+08	71.04
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	ninguno	18433	145.41	2.49E+08	91.72
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	EGF(25ng/ml)	18841	148.63	2.60E+08	95.72
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	EGF(50ng/ml)	16232	128.05	2.30E+08	84.79
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	EGF(100ng/ml)	9309	73.44	1.39E+08	51
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	ninguno	12757	100.64	1.66E+08	61.1
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(25ng/ml)	17720	139.79	2.31E+08	85.01
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(50ng/ml)	16331	128.83	2.26E+08	83.11
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(100ng/ml)	16336	128.87	2.32E+08	85.24
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	ninguno	19853	156.61	2.59E+08	95.45
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(25ng/ml)	19880	156.83	2.59E+08	95.47
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(50ng/ml)	18166	143.3	2.35E+08	86.3
Compuesto 34	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(100ng/ml)	11241	88.68	1.55E+08	57.1
ninguno	No AA (con Wnt3a)	ninguno	EGF(50ng/ml)	5558	43.85	5.01E+07	18.44
ninguno	No AA (con Wnt3a)	ninguno	EGF(100ng/ml)	6818	53.79	6.42E+07	23.62
ninguno	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	ninguno	8494	67.01	6.62E+07	24.35
ninguno	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(50ng/ml)	10138	79.98	7.30E+07	26.87
ninguno	No AA (con Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(100ng/ml)	10219	80.62	7.75E+07	28.51
ninguno	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	ninguno	9944	78.45	6.68E+07	24.59
ninguno	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(50ng/ml)	11046	87.14	8.17E+07	30.07
ninguno	No AA (con Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(100ng/ml)	7695	60.71	6.87E+07	25.28



**TABLA 11**

	Intensidad de SOX17 Estandarizado Activin A		GDF8	
ng/ml	Promedio	DE	Promedio	DE
1600	100	9.2	100	9
800	100	6.6	84.9	6.3
400	100	3.3	72.2	7.5
200	100	1.9	51.3	5.3
100	90.7	8.7	32.7	5.1
50	85.2	4.7	17.6	4.8
25	73.1	2.8	5.1	3.6
12.5	50.9	6.2	0.9	0.8
6.25	18.4	4.8	0.7	1.4
3.13	3	1.9	0.1	0.2
1.56	0.1	0	0	0.2
0	0	0.2	0.3	0.3

**TABLA 12**

Nombre del Marcador	Número de Catálogo
AFP	Hs00173490_ml
CD99	Hs00365982_ml
CD9	Hs00233521ml
CDH1	Hs00170423_ml
CDH2	Hs00169953_ml
CDX2	Hs00230919ml
CER1	Hs00193796_ml
CXCR4	Hs00237052_ml
FGF17	Hs00182599ml
FGF4	Hs00173564_ml
FOXA2	Hs00232764_ml
GAPDH	Hs99999905_ml
GATA4	Hs00171403_ml
GATA6	Hs00232018ml
GSC	Hs00418279ml
HLXB9	Hs00232128ml
KIT	Hs00174029_ml
MIXL1	Hs00430824_gl
NieOG	Hs02387400_gl
OTX2	Hs00222238_ml
POU5F1	Hs00742896_sl
SOX17	Hs00751752_sl
SOX7	Hs00846731_sl

TABLA 12

Nombre del Marcador	Número de Catálogo
T	Hs00610080_ml
ALB	Hs00609411_ml
AMY2A	Hs00420710_gl
ARX	Hs00292465_ml
CDX2	Hs00230919_ml
GAPDH	Hs99999905_ml
GCG	Hs00174967_ml
HNF4A	Hs00230853_ml
INS	Hs00355773_ml
ISL1	Hs00158126_ml
MAFA	Hs01651425_sl
MAFB	Hs00534343_sl
NEUROD1	Hs00159598_ml
NEUROG3	Hs00360700_gl
NKX2-2	Hs00159616_ml
NKX2-5	Hs00231763_ml
NKX6-1	Hs00232355_ml
PAX4	Hs00173014_ml
PAX6	Hs00240871_ml
PDX1	Hs00236830_ml
PECAM1	Hs00169777_ml
POU3F4	Hs00264887_sl
PTFIA	Hs00603586_gl
SST	Hs00356144_ml
ZICI	Hs00602749_ml

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



# ES 2 552 240 T3

TABLA 14

Paso Diferenciación 1

Valores CT

Treatment	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	HLXB9	KIT	MIXL1	NAVCG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T
AA/Wnt3a	20	35.6	24.1	24.2	26	20.9	40	17.5	22.7	19.6	35.8	24.7	23.8	22.1	21.6	23.4	23.2	28.1	24.5	22	32.6	23.2	33	36.8
GDF8/Wnt3a	20.1	34	23.8	24.5	24.6	21.6	40	19.5	23.3	21	34.8	25.1	24.5	23.3	23.3	17.6	25.5	28.3	24.9	23	31	23.7	33.3	34.2
GDF8/GSK3 inh B/O	19	34.4	23.7	24.1	24.3	21.3	36	18.7	23	20.1	33.5	24.2	24.2	22.4	21.8	23.4	24.2	28.4	23.7	21.8	30.8	23	33.7	33.1
GDF8/Compuesto 19	19.8	34.8	23.8	24	24.6	20.7	37.7	18.8	22.3	20	34.4	24.2	23.6	22.5	21.9	23.1	24.3	28	24.3	21.8	31.3	22.3	33	32.9
GDF8/Compuesto 202	19.8	40	24.5	23.5	25.9	20.8	40	18.8	22.2	20.3	36.5	24.4	23.4	22.3	22.3	24	24.8	27.3	26	21.9	33.3	22.7	32.6	32.1
GDF8/Compuesto 40	19.8	36.1	24.3	22.9	26.2	21.6	33.3	18.8	22.5	20.3	38.1	25.3	23.4	23	23	25	25.7	27.8	26	22.3	32.8	23.2	27.2	29.3

Paso Diferenciación 3

Valores CT

Treatment	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO D1	NEURO G3	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA/Wnt3a	17.9	25.4	29.5	28.4	23.3	34.1	21.8	29.2	29.4	34	27	25.8	25.2	27.3	34.1	28.3	27.8	35.2	22.7	28.3	28.6	30.8	32.2	37.4
GDF8/Wnt3a	18.5	26.5	30.4	29.4	23.9	34.2	22.6	29	29	34.4	27.1	27.2	26.4	27.9	37.8	29	29.2	31.4	23.3	32.2	30.1	30.7	31	30.1
GDF8/GSK3 inh B/O	18.5	25.2	30.3	28.4	23.6	32.8	22.6	28.8	29.3	34.7	27.6	26.8	26.2	27.6	35	28.8	28.7	32.9	23.2	32.2	29.5	30.6	31.3	31.1
GDF8/Compuesto 19	18.4	26.1	30.2	29.1	24	33.1	22.5	28.5	30	34.4	27.3	26.6	25.9	27.5	37.6	27.8	28.3	33.8	22.9	31.7	29.7	30	32.4	33.4
GDF8/Compuesto 202	18.7	26.7	31.1	29.6	24	34.9	22.7	30.3	31.6	34.2	27.8	27.2	27	28	40	30	29	36.2	23.7	30.9	30.2	32.4	32.4	34.6
GDF8/Compuesto 40	18.6	25.8	30.5	29.6	23.8	37.6	22.5	30	31.1	34.5	27.9	27.2	26.2	27.8	37.2	29.5	29	37.1	23.2	31.5	30.2	31.5	32.4	35.5

Paso Diferenciación 4

Valores CT

Treatment	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO D1	NEURO G3	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA/Wnt3a	18.9	21.3	28.8	24.6	23.4	21.7	21.9	21.6	25.2	32.4	24.9	23.7	23.8	24.2	33.9	25.6	25.6	27	23	29.2	27	28.1	25.3	32.6
GDF8/Wnt3a	18.3	21.3	28.5	25.3	23.1	22.6	21.9	21.9	25.7	33.1	24.9	24.3	24.2	24.7	35.4	25.8	26.2	27.3	23.2	31.2	27	28.7	24.7	24.6
GDF8/GSK3 inh B/O	19	21.1	28.7	25.3	23.3	22.3	21.9	22	25.7	32.5	25.4	24	24	24.7	35.4	26.1	26	27.7	23.2	30.7	27.4	28.5	25.6	31.5
GDF8/Compuesto 19	18.9	21.7	28.9	25.2	23.5	22.4	22.2	22	25.6	34	25.4	24.1	23.9	24.6	35.9	25.7	25.7	27.8	23.1	31.4	27.1	28.6	25.5	31.4
GDF8/Compuesto 202	19	20.9	29.2	25.1	23.6	22.4	22.1	22	25.5	33.3	25.5	23.9	24.1	24.5	35.7	26	25.8	27.6	23.4	30.2	27.5	28.8	26.1	35.7
GDF8/Compuesto 40	19.2	21.1	29.4	25.5	23.7	22.8	22.3	22.3	26	33.5	25.8	24.2	24.2	24.6	37.3	25.9	25.9	28.4	23.1	30.4	27.6	28.4	26.3	34.4

Paso Diferenciación 5

Valores CT

Treatment	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO D1	NEURO G3	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA/Wnt3a	19.1	19.5	28.6	23.1	23.9	16.2	21.9	16.9	23.4	33.7	23.3	21.7	27.4	24	33.1	25	26.4	24.7	22.6	27.1	28.4	27.5	22	34.1
GDF8/Wnt3a	18.4	19.9	28.4	23.8	23.8	17.2	22.3	17.4	24	32.6	23.9	22.6	28.6	24.2	33.1	25.8	27.2	25.6	23.6	29.2	28.9	29.1	22.7	25.6
GDF8/GSK3 inh B/O	19.1	19.2	29.1	24	24.2	17.2	22.4	17.6	24	33.5	23.8	22.9	28.4	24.4	40	25.1	27.3	25.6	23.8	28.2	28.1	28.7	23	26.3
GDF8/Compuesto 19	19	20	28.8	23.4	24.2	17	22.6	17.1	23.8	33.2	23.8	22.8	28.6	24.1	34.6	25	26.8	25.6	23.4	29.8	28.2	28.2	22.9	28.8
GDF8/Compuesto 202	19.2	20	29	23	23.9	16.7	22.2	16.8	23.2	32.7	23.8	22.3	28.2	23.2	40	26	27.2	25.8	23.4	29.9	29.1	28.4	22.6	33.8
GDF8/Compuesto 40	19.6	19.5	29	23.7	24.2	16.9	22.2	17.1	23.9	33.2	23.9	22.5	28.1	23.5	34.8	25	27.3	26.4	23.4	29.9	29.2	27.5	22.3	34.8

ES 2 552 240 T3

Paso 1		Valores RT-PCR CT																						
Tratamiento	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	HXB9	KIF	MIXL1	NANOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T
AA	19.4	32.8	25.2	24.0	26.1	21.8	36.0	18.3	20.4	20.7	34.0	25.1	25.0	22.9	22.4	24.8	22.7	28.9	24.1	22.5	32.2	21.6	32.3	36.1
AA+Wnt3a	18.2	40.0	23.5	22.0	24.1	20.9	40.0	17.1	22.0	18.7	33.4	22.9	25.1	21.8	22.8	23.3	22.9	27.7	22.7	19.9	31.0	21.2	31.2	34.1
AA+Compuesto 181	20.1	40.0	24.5	23.3	26.0	20.7	35.9	18.2	22.0	20.1	35.1	25.6	24.7	22.9	20.8	25.5	19.7	27.8	24.8	22.3	32.8	22.2	33.0	33.8
AA+Compuesto 180	18.4	34.2	23.6	21.6	25.9	21.4	35.2	17.2	22.0	18.9	34.0	24.0	25.1	22.6	22.5	24.8	22.6	27.9	23.7	20.3	32.1	21.4	32.0	32.7
AA+Compuesto 19	20.1	35.4	24.4	24.9	26.3	20.8	40.0	17.9	17.7	20.5	32.8	25.6	25.1	22.7	21.3	26.0	22.6	29.5	24.1	22.9	32.1	22.3	33.0	29.6
AA+Compuesto 202	20.3	40.0	25.1	23.7	25.9	21.4	40.0	18.3	22.0	20.4	36.0	25.7	24.5	23.0	21.8	25.2	23.9	27.7	24.5	22.5	32.7	22.6	32.1	33.5
AA+Compuesto 40	19.9	40.0	24.6	23.6	25.8	20.4	40.0	17.7	22.7	20.2	35.1	25.5	24.6	22.5	20.9	25.5	22.9	28.0	23.8	22.0	33.6	22.3	32.5	32.8
AA-GSK3 inhib B0	20.2	35.0	25.4	23.7	27.2	21.9	35.5	18.5	22.2	20.9	36.0	25.8	25.0	23.2	22.2	25.2	23.7	28.5	24.9	22.8	34.3	23.4	32.7	33.5
AA+Compuesto 206	19.8	40.0	24.9	23.7	25.5	21.1	40.0	18.3	19.6	20.7	36.2	24.4	24.8	22.7	22.6	24.1	23.7	27.6	23.9	22.0	33.2	25.3	32.4	34.6
GDF8	21.6	40.0	25.5	25.9	25.2	22.3	40.0	20.1	24.6	22.1	34.9	25.9	27.5	24.8	24.2	25.3	25.4	30.6	25.0	24.3	29.5	25.2	29.8	32.9
GDF8-Wnt3a	21.2	40.0	25.0	25.8	25.1	22.6	40.0	19.7	23.6	22.0	34.8	25.7	27.3	24.4	23.8	25.0	25.1	30.5	24.8	24.4	31.1	25.0	34.5	32.6
GDF8+Compuesto 181	20.7	40.0	25.1	23.6	25.5	22.4	40.0	20.0	23.0	21.5	36.3	25.2	25.4	23.9	23.6	24.3	26.3	28.1	25.4	23.3	31.8	23.7	32.8	31.9
GDF8+Compuesto 180	20.9	40.0	25.6	24.0	26.0	22.1	34.7	19.9	22.7	21.1	36.6	25.0	25.2	23.9	23.6	24.2	25.8	28.3	26.3	23.0	33.2	24.2	32.8	32.3
GDF8+Compuesto 19	19.6	40.0	23.9	23.7	24.6	20.7	40.0	18.0	21.8	20.4	33.2	24.2	25.0	22.8	22.1	24.0	22.6	28.5	23.1	22.7	30.3	22.6	32.1	29.3
GDF8+Compuesto 202	18.5	30.6	22.1	20.2	22.8	19.7	35.8	18.5	22.4	19.9	34.3	23.6	22.7	22.5	23.5	23.1	23.9	27.7	25.1	21.5	30.0	22.3	32.0	32.5
GDF8+Compuesto 40	19.7	40.0	23.0	22.6	24.7	20.5	33.8	18.2	22.4	20.5	33.4	24.9	24.2	22.6	23.4	23.4	25.4	28.5	24.0	22.2	31.6	23.7	31.2	32.7
GDF8-GSK3 inhib B0	19.6	30.1	23.1	21.8	24.3	20.0	33.4	17.7	23.3	20.1	34.8	24.7	24.5	22.4	22.7	24.1	25.0	29.3	24.8	21.8	31.7	23.3	33.7	34.6
GDF8+Compuesto 206	19.7	40.0	22.7	22.5	23.2	21.0	29.9	18.4	23.0	20.3	34.5	25.3	24.9	22.9	23.6	23.8	25.7	29.7	24.7	22.2	30.7	24.4	32.8	33.8
Paso 3		Valores RT-PCR CT																						
Tratamiento	GAPDH	ACB	AMF2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD	NEUROG3	NKX2-2	NKX2-3	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PYY1A	SST	ZIC1
AA	18.5	26.9	30.6	32.0	22.9	34.1	22.4	34.8	29.3	36.4	27.4	30.1	28.0	29.3	34.6	32.2	31.4	40.0	23.3	31.0	30.5	34.6	33.2	34.8
AA+Wnt3a	18.4	27.3	30.2	33.0	23.0	34.7	22.4	40.0	28.8	33.9	27.7	30.4	28.1	29.0	40.0	34.9	31.9	38.1	23.8	30.9	30.7	40.0	32.8	40.0
AA+Compuesto 181	18.6	26.0	30.1	34.2	22.3	40.0	22.3	40.0	30.4	34.6	28.5	31.4	29.0	30.3	33.9	35.8	33.3	40.0	25.0	30.0	30.8	36.0	34.6	34.8
AA+Compuesto 180	18.8	25.5	30.0	33.3	22.5	35.1	22.5	40.0	29.4	34.3	28.6	32.6	30.3	31.1	32.5	35.3	35.3	36.2	26.3	28.9	31.3	40.0	34.7	34.4
AA+Compuesto 19	34.1	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	37.4	40.0	40.0	40.0	34.9	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
AA+Compuesto 202	18.5	26.2	30.7	33.0	22.5	34.8	22.6	35.1	29.8	35.1	28.2	30.0	28.5	29.5	33.6	33.9	32.0	36.6	24.1	29.7	31.9	40.0	34.2	40.0
AA+Compuesto 40	18.5	25.8	30.1	34.9	22.2	40.0	22.3	40.0	29.7	34.1	28.1	30.8	29.1	30.3	33.6	34.4	32.9	40.0	24.8	30.3	31.3	35.6	35.3	35.4
AA-GSK3 inhib B0	18.5	24.9	30.1	34.6	22.0	40.0	21.5	40.0	30.2	34.9	27.8	34.0	31.0	31.8	32.6	40.0	34.9	40.0	26.1	31.0	32.4	40.0	35.2	34.9
AA+Compuesto 206	18.3	27.0	30.3	33.7	22.7	35.7	22.5	40.0	28.4	34.4	27.8	30.7	28.6	29.8	32.8	35.0	31.5	30.4	23.9	29.7	31.2	35.0	31.9	40.0
GDF8	18.0	28.7	30.4	35.3	23.8	40.0	23.6	40.0	28.5	33.6	27.2	30.3	28.7	30.3	34.4	35.0	32.4	24.8	25.5	30.0	30.8	34.2	29.5	26.1
GDF8-Wnt3a	17.4	27.0	29.5	33.8	23.1	35.1	22.4	40.0	26.3	30.5	26.1	30.1	27.5	29.1	40.0	32.9	31.5	25.8	23.1	32.2	29.8	34.0	27.7	28.2
GDF8+Compuesto 181	18.8	27.8	30.2	31.3	23.4	40.0	22.7	34.5	28.8	35.5	27.3	28.9	27.0	28.0	35.4	32.5	30.5	35.4	23.5	29.4	30.5	33.9	32.4	34.5
GDF8+Compuesto 180	18.8	27.3	30.6	32.4	22.8	34.9	22.7	40.0	29.5	33.9	27.7	30.0	27.5	29.0	35.4	32.6	31.2	40.0	23.7	31.6	30.8	34.6	34.4	40.0
GDF8+Compuesto 19	18.3	24.9	29.7	33.4	22.0	40.0	22.2	40.0	29.7	34.5	28.4	33.3	31.5	32.2	34.4	35.2	34.4	35.0	25.0	29.4	31.6	40.0	34.1	33.5
GDF8+Compuesto 202	18.7	27.8	30.4	32.8	23.8	40.0	22.9	34.6	28.5	34.2	27.6	29.6	27.1	28.4	35.7	30.5	30.4	31.8	23.0	30.1	30.2	31.6	30.9	34.0
GDF8+Compuesto 40	18.4	27.7	30.1	32.5	23.0	35.1	22.4	40.0	29.1	34.3	27.5	30.0	27.3	28.8	35.3	32.9	31.5	40.0	23.2	29.2	30.5	36.3	33.7	40.0
GDF8-GSK3 inhib B0	18.4	24.9	30.3	31.5	22.2	34.7	21.7	34.5	28.9	35.3	27.6	29.2	26.8	27.9	34.6	33.9	30.6	35.1	24.0	30.4	30.0	34.8	33.6	40.0
GDF8+Compuesto 206	18.2	27.6	30.2	33.5	23.8	40.0	22.9	40.0	27.9	35.1	27.1	29.9	27.7	29.3	40.0	32.3	31.3	27.4	23.3	32.7	30.8	33.0	29.2	30.3

ES 2 552 240 T3

Paso 4		Valores RT-PCR CT																							
Tratamiento	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG1	NEK2-2	NEK2-5	NEK6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PFICAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1	
5	AA	19.0	22.4	28.6	23.9	23.7	22.8	22.1	23.6	24.1	30.6	23.5	23.7	23.3	24.0	31.9	27.4	25.7	27.1	23.7	29.8	26.5	29.6	24.3	32.5
	AA-Wnt3a	19.5	23.5	29.3	24.6	24.1	25.1	22.7	25.2	25.1	31.1	24.4	24.4	24.1	24.5	31.8	27.5	26.1	27.9	24.1	30.4	27.2	31.1	25.9	32.4
	AA+Compuesto 181	18.0	21.0	27.7	24.0	22.1	24.5	21.0	24.6	24.5	31.6	24.0	24.2	24.6	30.9	28.1	26.3	28.0	24.0	27.9	27.5	31.0	25.5	31.2	
	AA+Compuesto 180	19.4	21.0	27.3	26.3	21.6	25.4	20.6	26.7	26.1	34.7	24.6	25.5	25.8	25.0	29.4	28.9	27.7	28.9	24.0	26.7	28.5	32.6	27.1	31.2
10	AA+Compuesto 19	(muestra ARN insuficiente)																							
	AA+Compuesto 202	19.2	20.7	29.1	24.0	23.3	21.8	21.9	22.7	24.4	31.1	23.9	24.0	24.1	24.4	32.1	27.4	26.3	26.9	24.3	29.6	27.7	29.5	24.0	35.1
	AA+Compuesto 40	19.2	20.8	29.4	24.7	22.9	22.2	21.8	23.5	25.3	31.5	24.7	24.7	25.3	25.0	32.2	28.7	27.1	28.2	25.1	30.3	28.5	31.2	25.6	32.7
15	AA+GSK3 inhib B/D	19.0	19.1	29.2	26.7	22.7	25.2	21.1	26.3	26.5	33.0	25.4	26.3	27.7	26.2	31.5	32.9	29.4	30.0	26.5	29.6	30.5	33.7	27.2	32.4
	AA+Compuesto 206	18.8	20.9	28.4	23.3	22.9	21.2	21.7	22.8	24.0	30.4	23.5	23.3	23.3	23.8	31.9	27.2	25.5	26.3	23.6	29.7	26.6	29.3	23.6	32.9
	GDF8	18.0	25.5	29.1	29.8	24.6	31.3	23.8	30.9	27.6	32.8	24.1	29.2	28.7	29.0	32.3	31.2	31.1	27.9	26.5	29.4	29.4	40.0	26.0	22.8
	GDF8-Wnt3a	19.0	24.3	29.0	25.4	24.4	27.7	23.0	25.5	25.4	32.7	25.1	25.4	24.0	25.0	33.3	28.0	26.7	28.8	23.8	33.4	27.7	30.5	24.1	29.0
20	GDF8+Compuesto 181	18.0	22.8	28.1	23.5	23.1	24.6	21.4	22.7	23.8	30.6	23.0	22.9	21.8	23.2	32.1	25.7	24.2	27.0	22.3	27.6	25.4	26.6	24.2	31.6
	GDF8+Compuesto 180	19.5	24.0	29.3	24.4	23.9	25.7	22.5	24.5	24.7	31.4	24.4	24.3	23.7	24.4	33.5	27.7	26.0	28.3	23.8	30.6	26.9	30.7	26.3	33.4
	GDF8+Compuesto 19	19.1	22.6	28.7	25.5	22.9	26.7	22.1	27.2	25.8	32.6	25.5	26.2	26.4	25.6	34.0	30.2	28.2	30.0	25.1	30.2	29.2	32.6	27.9	31.1
	GDF8+Compuesto 202	19.0	22.0	28.9	23.7	24.5	21.8	22.3	21.7	24.3	30.3	23.5	22.9	22.2	23.4	33.4	25.9	24.8	26.5	23.0	29.5	26.1	27.9	22.4	34.1
	GDF8+Compuesto 40	19.0	21.4	29.0	23.4	23.6	21.0	22.0	21.5	23.8	30.2	23.3	23.2	22.7	23.7	33.2	26.6	24.8	26.1	23.4	29.3	26.4	28.4	22.7	32.6
25	GDF8+GSK3 inhib B/D	19.1	19.4	29.1	24.3	23.0	21.5	21.4	21.8	24.6	31.0	24.0	23.8	23.8	24.2	33.3	27.9	26.1	27.0	24.2	30.0	27.8	29.5	23.4	32.7
	GDF8+Compuesto 206	18.9	21.6	28.9	24.4	24.0	22.6	22.3	22.7	24.9	30.9	24.2	23.7	23.0	24.0	35.3	26.3	25.5	27.2	23.5	31.4	26.9	27.7	24.0	28.9
Paso 5		Valores RT-PCR CT																							
Tratamiento	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG1	NEK2-2	NEK2-5	NEK6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PFICAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1	
30	AA	18.3	20.2	27.6	22.0	23.4	14.1	21.3	14.9	22.4	31.8	22.2	22.8	28.1	23.7	34.1	25.5	27.3	24.0	23.2	30.1	28.8	27.3	19.6	34.4
	AA-Wnt3a	18.0	20.0	27.7	21.9	23.1	14.0	20.9	14.6	22.3	31.6	22.0	21.6	28.0	23.4	34.8	26.1	27.3	23.7	23.3	29.6	28.8	27.5	19.4	32.5
35	AA+Compuesto 181	18.0	18.8	27.6	22.0	22.9	14.3	20.9	14.5	22.1	31.4	22.2	21.5	28.9	23.3	32.2	26.1	26.8	24.0	23.1	27.5	28.8	28.0	18.8	31.2
	AA+Compuesto 180	18.0	18.8	27.6	22.4	22.9	14.9	21.0	14.7	22.4	31.9	22.6	21.7	29.5	23.8	30.2	26.5	27.2	24.3	23.2	26.7	29.0	28.7	18.7	30.3
	AA+Compuesto 19	17.9	23.6	28.6	28.2	25.4	27.0	24.2	26.9	26.2	32.0	24.4	27.2	31.2	28.0	30.1	25.8	35.1	28.6	29.4	31.5	28.2	32.4	23.1	24.0
	AA+Compuesto 202	18.6	19.2	28.0	22.6	23.4	14.9	21.3	15.0	22.7	31.8	22.6	21.9	28.6	23.7	29.9	25.8	26.9	24.7	23.6	27.7	29.2	27.9	19.4	32.8
40	AA+Compuesto 40	18.3	18.9	27.9	22.3	23.0	14.6	21.1	14.7	22.5	31.5	22.4	21.6	29.0	23.5	32.9	26.1	27.1	24.4	23.2	28.1	29.2	28.1	19.1	31.9
	AA+GSK3 inhib B/D	18.3	17.1	28.0	23.0	22.6	15.1	20.5	15.1	22.8	31.8	22.8	22.1	29.5	24.2	33.8	27.5	27.4	24.9	23.8	28.3	29.9	29.7	19.5	32.0
	AA+Compuesto 206	18.2	19.5	27.9	22.2	23.4	14.4	21.3	14.8	22.5	31.1	22.4	21.7	28.0	23.6	35.8	25.9	27.1	24.1	23.3	29.0	28.7	27.5	19.7	32.7
	GDF8	17.4	20.5	28.2	25.2	24.4	18.1	22.9	17.7	24.3	31.8	23.3	24.2	30.1	25.9	31.4	26.6	29.4	26.6	25.6	29.7	27.8	29.5	21.1	22.5
45	GDF8-Wnt3a	17.8	20.6	28.2	24.8	24.3	17.7	22.9	17.5	24.2	31.9	23.5	24.0	30.2	25.6	31.9	27.0	29.3	26.5	25.6	29.8	28.1	30.7	21.5	22.8
	GDF8+Compuesto 181	18.0	19.1	27.6	22.4	23.4	14.5	21.2	14.8	22.5	31.5	22.6	21.7	27.4	23.4	33.8	25.0	26.8	24.4	23.0	27.5	28.8	27.3	19.5	31.9
	GDF8+Compuesto 180	18.0	18.0	27.3	22.2	22.9	14.2	20.9	14.4	22.2	31.4	22.1	21.2	27.9	23.2	40.0	25.1	26.1	23.8	22.9	29.6	28.7	27.3	18.8	31.5
	GDF8+Compuesto 19	18.3	18.5	27.8	23.4	23.0	16.2	21.2	15.6	23.2	32.2	23.2	22.6	31.2	24.3	33.9	28.6	27.3	25.2	24.2	29.0	30.1	31.0	20.5	31.9
50	GDF8+Compuesto 202	18.7	19.6	28.3	23.1	24.0	15.7	21.9	15.8	23.5	32.8	23.3	22.3	27.8	23.8	31.3	24.8	27.1	25.2	23.2	29.0	29.5	27.1	20.8	30.9
	GDF8+Compuesto 40	18.1	18.7	27.9	22.3	23.0	14.8	21.1	14.8	22.6	31.5	22.5	21.5	27.3	23.2	33.2	25.0	26.6	24.1	22.9	27.3	28.9	27.4	20.4	32.0
	GDF8+GSK3 inhib B/D	18.4	17.1	27.6	23.2	22.8	15.2	20.6	15.5	23.1	32.6	22.6	22.1	28.2	24.2	35.0	26.7	27.3	24.8	24.0	28.1	30.1	28.5	19.3	32.4
	GDF8+Compuesto 206	18.0	20.0	27.9	23.4	24.0	16.0	22.1	16.0	23.6	32.1	22.9	22.8	28.5	24.4	30.5	25.9	27.5	25.4	24.0	29.7	28.3	28.0	20.8	23.9
55																									
60																									
65																									

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

<b>TABLA 16</b>	
<b>Compuesto #</b>	<b>Selectividad Primaria</b>
Compuesto 6	Selectivo para GSK
Compuesto 7	Selectivo para GSK
Compuesto 8	Selectivo para GSK
Compuesto 9	Selectivo para CDK
Compuesto 57	Selectivo para Trk
Compuesto 41	Selectivo para GSK
Compuesto 42	Selectivo para CDK
Compuesto 10	Selectivo para CDK
Compuesto 34	Control Positivo
Compuesto 11	Selectivo para CDK
Compuesto 43	Selectivo para Trk
Compuesto 44	Selectivo para GSK
Compuesto 12	Selectivo para CDK
Compuesto 45	Selectivo para Trk

<b>TABLA 17</b>							
<b>Plato</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Compuesto #</b>	<b>Selectividad del Compuesto</b>	<b>Número de Células</b>		<b>Expresión de SOX17</b>	
				<b>Número de Células Total Promedio</b>	<b>% del control positivo</b>	<b>Intensidad Total Promedio</b>	<b>% del control positivo</b>
1	no Activina A	ninguno	n/a	9809	67.8	-4.00E+05	-0.2
1	Activina A/Wnt3a	ninguno	n/a	14476	100	2.30E+08	100
1	No GDF8	Compuesto 11	Selectivo para CDK	565	3.9	-1.10E+06	-0.5
1	No GDF8	Compuesto 44	Selectivo para GSK	14	0.1	-1.10E+06	-0.5
1	No GDF8	Compuesto 43	Selectivo para Trk	8610	59.5	-2.10E+05	-0.1
1	No GDF8	Compuesto 42	Selectivo para CDK	8700	60.1	-2.40E+05	-0.1
1	No GDF8	Compuesto 57	Selectivo para Trk	1222	8.4	-7.10E+05	-0.3
1	No GDF8	Compuesto 10	Selectivo para CDK	7011	48.4	-6.60E+05	-0.3
1	No GDF8	Compuesto 41	Selectivo para GSK	9995	69	5.90E+04	0
1	No GDF8	Compuesto 7	Selectivo para CDK	3	0	-1.40E+06	-0.6
1	No GDF8	Compuesto 45	Selectivo para Trk	8857	61.2	-4.50E+05	-0.2
1	No GDF8	Compuesto 6	Selectivo para GSK	14827	102.4	-1.80E+05	-0.1
1	No GDF8	Compuesto 9	Selectivo para CDK	7156	49.4	-4.20E+04	0
1	No GDF8	Compuesto 12	Selectivo para GSK	13124	90.7	-2.30E+05	-0.1
1	No GDF8	Compuesto 8	Selectivo para GSK	13235	91.4	3.80E+05	0.2
1	GDF8	Compuesto 34	Control Positivo	13926	96.2	2.60E+08	111.8
1	GDF8	Compuesto 45	Selectivo para Trk	9540	65.9	1.10E+08	47.9

Plato	Tratamiento	Compuesto #	Selectividad del Compuesto	Número de Células		Expresión de SOX17	
				Número de Células Total Promedio	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	% del control positivo
1	GDF8	Compuesto 7	Selectivo para GSK	5296	36.6	7.00E+07	30.4
1	GDF8	Compuesto 10	Selectivo para CDK	4627	32	6.60E+07	28.6
1	GDF8	Compuesto 6	Selectivo para GSK	5118	35.4	5.80E+07	25.2
1	GDF8	Compuesto 43	Selectivo para Trk	6682	46.2	5.40E+07	23.4
1	GDF8	Compuesto 42	Selectivo para CDK	5686	39.3	4.90E+07	21.2
1	GDF8	Compuesto 8	Selectivo para GSK	5018	34.7	4.70E+07	20.4
1	GDF8	Compuesto 9	Selectivo para CDK	4816	33.3	4.50E+07	19.4
1	GDF8	Compuesto 41	Selectivo para GSK	4455	30.8	3.40E+07	14.8
1	GDF8	n/a	n/a	2856	19.7	2.20E+07	9.4
1	GDF8	Compuesto 57	Selectivo para Trk	2110	14.6	1.10E+07	4.8
1	GDF8	Compuesto 11	Selectivo para CDK	210	1.4	-4.90E+05	-0.2
1	GDF8	Compuesto 44	Selectivo para GSK	226	1.6	-9.50E+05	-0.4
1	GDF8	Compuesto 12	Selectivo para CDK	31	0.2	-1.30E+06	-0.6

Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células				Expresión Sox17			
			Número de Células Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo
1	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	15489	0	0	103.2	3.75E+07	0.00E+00	0	10.9
1	Activina A/Wnt3a	ninguno	15007	1991	13.27	100	3.45E+08	7.16E+07	20.75	100
1	GDF8	Compuesto 206	20568	1683	8.18	137.1	5.19E+08	4.41E+07	8.51	1503
1	GDF8	Compuesto 207	19224	1091	5.68	128.1	2.54E+08	5.69E+07	22.41	73.6
1	GDF8	Compuesto 19	12569	1524	12.13	83.8	2.40E+08	6.34E+07	26.44	69.5
1	GDF8	Compuesto 23	8758	474	5.41	58.4	1.16E+08	9.07E+06	7.8	33.7
1	GDF8	Compuesto 170	6460	2305	35.68	43	9.44E+07	6.98E+07	73.93	27.4
1	GDF8	Compuesto 208	4848	1225	25.27	32.3	2.26E+07	2.15E+07	94.96	23.6
1	GDF8	Compuesto 209	4831	1243	25.74	32.2	3.97E+07	1.61E+07	40.56	11.5
1	GDF8	Compuesto 32	4338	1520	35.04	28.9	3.63E+07	3.27E+07	90.14	10.5
1	GDF8	Compuesto 30	4679	435	9.29	31.2	3.47E+07	1.04E+07	30.03	10.1



Tabla 18											
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células				Expresión Sox17				
			Número de Células Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	
5											
10	1	GDF8	Compuesto 223	3704	1077	29.08	24.7	3.45E+07	2.74E+07	79.43	10
	1	GDF8	Compuesto 2	4538	632	13.93	30.2	2.95E+07	2.81E+06	9.5	8.6
15	1	GDF8	Compuesto 210	2645	817	30.88	17.6	2.90E+07	2.45E+07	84.73	8.4
	1	GDF8	Compuesto 24	5012	1263	25.21	33.4	2.64E+07	1.66E+07	62.95	7.7
20	1	GDF8	Compuesto 211	5165	796	15.41	34.4	2.61E+07	5.02E+06	19.23	7.6
	1	GDF8	Compuesto 212	5476	1445	26.39	36.5	2.54E+07	1.18E+07	46.53	7.4
25	1	GDF8	Compuesto 224	5188	761	14.67	34.6	2.46E+07	8.26E+06	33.56	7.1
	1	GDF8	Compuesto 225	4431	1149	25.92	29.5	2.45E+07	2.65E+07	108.19	7.1
30	1	GDF8	Compuesto 13	3123	1508	48.27	20.8	2.44E+07	2.30E+07	94.13	7.1
	1	GDF8	Compuesto 213	1261	1028	81.49	8.4	2.07E+07	1.97E+07	95.03	6
35	1	GDF8	Compuesto 52	4932	386	7.82	32.9	1.99E+07	6.90E+06	34.67	5.8
	1	GDF8	Compuesto 214	3345	335	10.01	22.3	1.93E+07	1.39E+07	72.18	5.6
40	1	GDF8	Compuesto 51	4289	940	21.91	28.6	1.70E+07	1.10E+07	64.86	4.9
	1	GDF8	Compuesto 26	4896	545	11.14	32.6	1.65E+07	5.93E+06	36.02	4.8
45	1	GDF8	Compuesto 226	3617	577	15.94	24.1	1.59E+07	4.96E+06	31.21	4.6
	1	GDF8	Compuesto 215	4326	165	3.81	28.8	1.45E+07	2.69E+06	18.53	4.2
50	1	GDF8	Compuesto 31	3619	1011	27.92	24.1	1.36E+07	4.63E+06	34.15	3.9
	1	GDF8	Compuesto 216	3364	629	18.7	22.4	8.75E+06	2.30E+06	26.32	2.5
55	1	GDF8	Compuesto 217	2859	544	19.03	19.1	8.75E+06	1.94E+06	22.16	2.5
	1	GDF8	Compuesto 218	1327	118	8.92	8.8	6.44E+06	9.70E+05	15.05	1.9
60	1	GDF8	Compuesto 219	368	168	45.67	2.5	1.79E+06	1.29E+06	72.17	0.5
	2	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	15778	0	0	103.2	2.24E+07	0.00E+00	0	6.7
65	2	Activina A/Wnt3a	ninguno	15290	1119	7.32	100	3.37E+08	2.84E+07	8.44	100
	2	GDF8	Compuesto 202	20177	987	4.89	132	4.85E+08	1.94E+07	4	144
	2	GDF8	Compuesto 227	2911	4619	158.69	19	3.89E+07	6.69E+07	172	11.5
	2	GDF8	Compuesto 15	4383	1775	40.49	28.7	3.57E+07	3.57E+07	100.03	10.6
	2	GDF8	Compuesto 228	4043	1253	30.98	26.4	3.10E+07	2.53E+07	81.62	9.2

Tabla 18											
Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células				Expresión Sox17				
			Número de Células Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	
5	2	GDF8	Compuesto 229	3451	892	25.85	22.6	1.80E+07	1.46E+07	81.07	5.4
10	2	GDF8	Compuesto 4	3163	805	25.44	20.7	1.58E+07	3.54E+06	2232	4.7
15	2	GDF8	Compuesto 220	2791	1453	52.05	18.3	1.40E+07	9.00E+06	64.28	4.2
20	2	GDF8	Compuesto 5	3137	1172	37.34	20.5	1.30E+07	7.52E+06	57.85	3.9
25	2	GDF8	Compuesto 230	2624	248	9.46	17.2	1.24E+07	1.55E+07	124.73	3.7
30	2	GDF8	Compuesto 231	4773	2651	55.55	31.2	1.22E+07	6.51E+06	53.37	3.6
35	2	GDF8	Compuesto 232	3273	1290	39.41	21.4	1.18E+07	1.51E+07	127.98	3.5
40	2	GDF8	Compuesto 221	1950	361	18.52	12.8	1.18E+07	1.54E+07	131.11	3.5
45	2	GDF8	Compuesto 233	3041	180	5.93	19.9	1.12E+07	1.09E+07	97.44	3.3
50	2	GDF8	Compuesto 147	3434	1199	34.91	22.5	1.12E+07	9.80E+06	87.75	3.3
55	2	GDF8	Compuesto 234	2835	623	21.98	18.5	9.47E+06	5.67E+06	59.84	2.8
60	2	GDF8	Compuesto 235	3391	2269	66.91	212	9.10E+06	6.51E+06	71.52	2.7
65	2	GDF8	Compuesto 236	2868	561	19.57	18.8	6.73E+06	6.32E+06	93.82	2
	2	GDF8	Compuesto 33	2362	511	21.66	15.4	6.60E+06	2.45E+06	37.2	2
	2	GDF8	Compuesto 1	3213	166	5.16	21	6.48E+06	3.09E+06	47.67	1.9
	2	GDF8	Compuesto 53	2783	441	15.86	18.2	6.36E+06	2.89E+06	45.36	1.9
	2	GDF8	Compuesto 237	2973	292	9.83	19.4	6.02E+06	3.00E+06	49.79	1.8
	2	GDF8	Compuesto 238	2739	485	17.7	17.9	5.97E+06	6.10E+06	102.07	1.8
	2	GDF8	Compuesto 239	3156	667	21.15	20.6	5.60E+06	2.42E+06	43.24	1.7
	2	GDF8	Compuesto 240	3002	287	9.55	19.6	4.68E+06	3.13E+06	66.8	1.4
	2	GDF8	Compuesto 200	2308	209	9.04	15.1	4.39E+06	1.88E+06	42.83	1.3
	2	GDF8	Compuesto 222	1776	719	40.47	11.6	3.33E+06	2.52E+06	75.78	1
	2	GDF8	Compuesto 241	2949	446	15.14	19.3	3.29E+06	1.55E+06	47.03	1
	2	GDF8	Compuesto 242	385	184	47.83	2.5	1.08E+06	8.85E+05	81.61	0.3
	2	GDF8	Compuesto 243	249	55	22.21	1.6	2.53E+05	3.07E+05	121.25	0.1
	2	GDF8	Compuesto 204	250	21	8.38	1.6	1.36E+05	2.27E+04	16.66	0
	3	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	15796	0	0	99.6	2.82E+07	0.00E+00	0	8

Tabla 18											
5	Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células			Expresión Sox17				
				Número de Células Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo
10	3	Activina A/Wnt3a	ninguno	15867	785	4.95	100	3.54E+08	2.40E+07	6.77	100
	3	GDF8	Compuesto 34	6974	3723	53.38	44	2.07E+08	9.51E+07	45.85	58.6
	3	GDF8	Compuesto 185	10892	1552	14.24	68.6	1.53E+08	4.08E+07	26.72	43.1
15	3	GDF8	Compuesto 35	7746	1873	24.17	48.8	1.35E+08	4.86E+07	36.08	38
	3	GDF8	Compuesto 22	6727	1927	28.64	42.4	1.06E+08	5.04E+07	47.73	29.8
20	3	GDF8	Compuesto 34	4889	1152	23.57	30.8	4.31E+07	2.11E+07	48.95	12.2
	3	GDF8	Compuesto 184	4173	1758	42.14	26.3	3.94E+07	2.24E+07	56.78	11.1
	3	GDF8	Compuesto 223	4234	1604	37.88	26.7	3.55E+07	2.51E+07	70.56	10
25	3	GDF8	Compuesto 37	4187	338	8.06	26.4	3.11E+07	1.56E+07	50.18	8.8
	3	GDF8	Compuesto 244	4479	1229	27.43	28.2	2.73E+07	1.52E+07	55.71	7.7
30	3	GDF8	Compuesto 245	4725	99	2.09	29.8	2.59E+07	1.03E+07	39.9	7.3
	3	GDF8	Compuesto 246	3820	1091	28.57	24.1	2.30E+07	2.69E+07	117.08	6.5
	3	GDF8	Compuesto 247	3730	966	25.9	23.5	2.14E+07	1.04E+07	48.63	6.1
35	3	GDF8	Compuesto 248	3875	445	11.48	24.4	2.13E+07	9.45E+06	44.45	6
	3	GDF8	Compuesto 25	3879	658	16.95	24.4	1.76E+07	1.21E+07	69.04	5
40	3	GDF8	Compuesto 195	3703	405	10.94	23.3	1.61E+07	3.27E+06	20.34	4.5
	3	GDF8	Compuesto 227	2904	397	13.68	18.3	1.43E+07	1.35E+07	94.25	4
45	3	Activina A/Wnt3a	ninguno	15867	785	4.95	100	3.54E+08	2.40E+07	6.77	100
	3	GDF8	Compuesto 183	3306	969	29.32	20.8	1.35E+07	1.14E+07	84.25	3.8
	3	GDF8	Compuesto 187	2768	1426	51.51	17.4	1.35E+07	9.02E+06	66.67	3.8
50	3	GDF8	Compuesto 201	3213	1114	34.66	203	1.35E+07	1.69E+07	125.02	3.8
	3	GDF8	Compuesto 197	3268	211	6.46	20.6	1.30E+07	5.25E+06	40.51	3.7
55	3	GDF8	Compuesto 249	3840	348	9.06	24.2	1.29E+07	6.79E+06	52.72	3.6
	3	GDF8	Compuesto 141	2404	213	8.86	15.1	1.12E+07	4.95E+06	44.3	3.2
	3	GDF8	Compuesto 194	3177	354	11.14	20	9.75E+06	2.11E+06	21.63	18
60	3	GDF8	Compuesto 250	3683	420	11.4	23.2	9.14E+06	4.78E+06	5232	2.6
	3	GDF8	Compuesto 251	3021	668	22.1	19	8.41E+06	4.59E+06	54.6	14

65

Tabla 18											
5	Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células			Expresión Sox17				
				Número de Células Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo
10	3	GDF8	Compuesto 20	2793	205	7.35	17.6	6.77E+06	1.86E+06	27.45	1.9
	3	GDF8	Compuesto 252	2580	135	5.24	16.3	6.20E+08	2.31E+05	3.72	1.8
	3	GDF8	Compuesto 253	2485	820	32.98	15.7	5.83E+06	1.47E+06	25.2	1.6
15	3	GDF8	Compuesto 202	2095	518	24.71	13.2	5.75E+06	2.62E+06	45.66	1.6
	3	GDF8	Compuesto 21	371	294	79.19	2.3	2.36E+06	3.07E+06	129.78	0.7
20	4	no Activina A (con Wnt3a)	ninguno	16629	0	0	119.3	2.42E+07	0.00E+00	0	7.8
	4	Activina A/Wnt3a	ninguno	13945	1535	11.01	100	3.09E+08	4.77E+07	15.46	100
25	4	GDF8	Compuesto 34	7416	6482	87.41	53.2	2.10E+08	1.82E+08	86.7	68
	4	GDF8	Compuesto 240	11283	2023	17.93	80.9	1.61E+08	4.41E+07	27.34	52.2
	4	GDF8	Compuesto 28	5236	1787	34.12	37.5	4.03E+07	3.08E+07	76.36	13.1
30	4	GDF8	Compuesto 198	3985	2674	67.1	28.6	3.89E+07	5.55E+07	142.91	12.6
	4	GDF8	Compuesto 196	4861	1501	30.87	34.9	3.03E+07	1.98E+07	65.37	9.8
35	4	GDF8	Compuesto 18	1921	1759	91.56	13.8	2.94E+07	3.65E+07	123.9	9.5
	4	GDF8	Compuesto 186	3486	425	12.19	25	2.34E+07	1.42E+07	60.78	7.6
40	4	GDF8	Compuesto 254	3960	1521	38.42	28.4	2.31E+07	2.27E+07	98.1	7.5
	4	GDF8	Compuesto 168	3460	324	9.36	20	2.28E+07	7.13E+06	31.23	7.4
	4	GDF8	Compuesto 190	3402	1318	38.74	24.4	1.87E+07	1.58E+07	84.61	6.1
45	4	GDF8	Compuesto 255	4006	1625	40.57	28.7	1.52E+07	1.05E+07	68.91	4.9
	4	GDF8	Compuesto 50	2666	743	27.86	19.1	1.48E+07	8.30E+06	56.15	4.8
50	4	GDF8	Compuesto 27	3721	721	19.37	26.7	1.19E+07	9.69E+06	81.29	3.9
	4	GDF8	Compuesto 256	2922	1275	43.64	21	9.41E+06	8.65E+06	92.01	3
	4	GDF8	Compuesto 257	3182	705	22.14	218	8.06E+06	4.49E+06	55.75	2.6
55	4	GDF8	Compuesto 258	2731	472	17.29	19.6	7.89E+06	7.24E+06	91.7	2.6
	4	GDF8	Compuesto 189	2350	1625	69.16	16.9	7.72E+06	5.36E+06	69.41	2.5
60	4	GDF8	Compuesto 259	2195	955	43.49	15.7	6.92E+06	2.58E+06	37.29	2.2
	4	GDF8	Compuesto 260	2468	741	30.04	17.7	6.64E+06	3.33E+06	50.18	2.2
	4	GDF8	Compuesto 261	2965	456	15.38	21.3	6.23E+06	2.10E+06	33.61	2

65

**Tabla 18**

Plato	Tratamiento	Compuesto #	Número de Células				Expresión Sox17			
			Número de Células Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo	Intensidad Total Promedio	DE	CV%	% del control positivo
4	GDF8	Compuesto 192	2377	572	24.08	17	6.17E+06	2.76E+06	44.65	2
4	GDF8	Compuesto 262	2894	399	13.78	20.8	5.75E+06	3.00E+06	52.2	1.9
4	GDF8	Compuesto 188	3005	759	25.26	21.6	5.02E+06	3.97E+06	79.06	1.6
4	GDF8	Compuesto 263	2129	230	10.79	15.3	4.77E+06	1.14E+06	23.93	1.5
4	GDF8	Compuesto 264	2630	342	13	18.9	4.28E+06	2.17E+06	50.73	1.4
4	GDF8	Compuesto 265	2636	1372	52.04	18.9	4.27E+06	1.15E+06	26.86	1.4
4	GDF8	Compuesto 14	274	14	5.02	2	1.56E+05	9.51E+04	60.91	0.1
4	GDF8	Compuesto 205	241	3	1.2	1.7	1.36E+05	6.83E+04	50.42	0
4	GDF8	Compuesto 266	271	7	2.67	1.9	1.18E+05	3.34E+04	28.43	0
4	GDF8	Compuesto 203	253	4	1.49	1.8	1.09E+05	3.49E+04	32.09	0

**TABLA 19**

Compuesto #	Expresión SOX17
Compuesto 181	150.3
Compuesto 202	144
Compuesto 180	73.6
Compuesto 19	69.5
Compuesto 34	68
Compuesto 40	52.2
Compuesto 185	43.1
Compuesto 185	38
Compuesto 35	33.7
Compuesto 23	29.8
Compuesto 22	27.4
Compuesto 17	23.6

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diferenciar células madres pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, que comprende el tratar a las células madres pluripotentes con un medio que no contiene activina A, y que contiene GDF-8, durante un periodo de tiempo suficiente para que las células madres pluripotentes se diferencien a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, donde el método no involucra el uso de embriones humanos para propósitos industriales o comerciales.
- 10 2. El método de la reivindicación uno, donde el medio que no contiene activina A también contiene por lo menos otro compuesto seleccionado de un grupo que consiste de: EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, VEGF, muscimol, PD98059, LY294002, U0124, U0126, y butirato de sodio.
- 15 3. El método la reivindicación uno, donde el medio que no contiene activina A también contiene por lo menos otro compuesto seleccionado de un grupo que consiste de: una anilina de piridinotriazina, una anilina-piridinotriazina cíclica, N - {[1- (fenilmetil) azepan- 4-il] metil} -2-piridin-3-ilacetamida, 4- {[4- (4- {[2- (piridin- 2-ilamino) etil] amino} - 1,3,5-triazin-2-il) piridin-2-il) oxi] butan-1-ol, 3 - {[3- [4- ({2- [metil (piridin-2-il) amino] etil] amino) -1,3, 5 triazin-2-il] piridin-2-il) amino] propan-1-ol, N-4-- [2- (3 fluorofenil) etil] -N-2-- [3- (4 metilpiperazin-1-il) propil] pirido [2,3-d] pirimidina-2,4-diamina, 1-metil-N [(4-piridin -3-il-2- {[3- (trifluorometil) fenil] amino} -1,3-tiazol-5-il) metil] piperidina-4-carboxamida, 1,1-dimetiletilo {2- [4- ({ 5- [3- (3-hidroxiopropil) fenil] 4H-1,2,4-triazol-3 -il) amino] fenil] carbamato de etilo, 1,1-dimetiletilo {[3- ({5- [5- (3-hidroxiopropil) -2- (metiloxi) fenil] -1,3-oxazol-2-il) amino] fenil] metil} carbamato, 1- ({5- [6- ({4- [(4-Metilpiperazin-1 - il) sulfonil] fenil] amino) pirazin-2-il] tiofen-2-il) metil] piperidin-4-ol, 1- ({4- [6- ({4 - [(4-Metilpiperazin- 1 - il) sulfonil] fenil] amino) pirazin-2-il] tiofen-2-il) metil] piperidina-4-carboxamida, y 2- {[4- (1 metiletil) fenil] aminol-N- (2-tiofen- 2-il-etil) -7,8-dihidropirido [4,3 - d] pirimidin-6 (5H) carboxamida.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, donde el compuesto es seleccionado de un grupo que consiste de: una anilina-piridinotriazina y una anilina- piridinotriazina cíclica.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde GDF-8 es utilizado a una concentración de 5 ng/mililitros a 500 ng/mililitros.
- 30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el GDF-8 es utilizado a una concentración de 5 ng/mililitros a 25 ng/mililitro.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el GDF-8 es utilizado a una concentración de 25 ng/mililitro.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde el EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D y/o VEGF es utilizado a una concentración de 5 ng/mililitro a 500 ng/mililitro.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde el EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D y/o VEGF es utilizada a una concentración de 5 ng/mililitros a 50 ng/mililitros.
- 50 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde el EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D y/o VEGF es utilizado a una concentración de 50 ng/mililitro.
- 55 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde el muscimol es utilizado a una concentración de 1  $\mu$ M a 200  $\mu$ M, tal como una concentración de 20  $\mu$ M.
- 60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, donde PD98059, U0124 y/o U0126 son utilizados a una concentración de 0.1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, tal como a la concentración de 1  $\mu$ M.
- 65 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, donde LY294002 es utilizado a una concentración de 0.25  $\mu$ M a 25  $\mu$ M, tal como una concentración de 2.5  $\mu$ M.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, donde el butirato de sodio es utilizado a una concentración de 0.05  $\mu$ M a 5  $\mu$ M, tal como una concentración de 0.5  $\mu$ M.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células madres pluripotentes son cultivadas en el medio que contiene un monto suficiente de GDF-8 durante entre 1 a 7 días, tal como 1 día.

Figura 1A

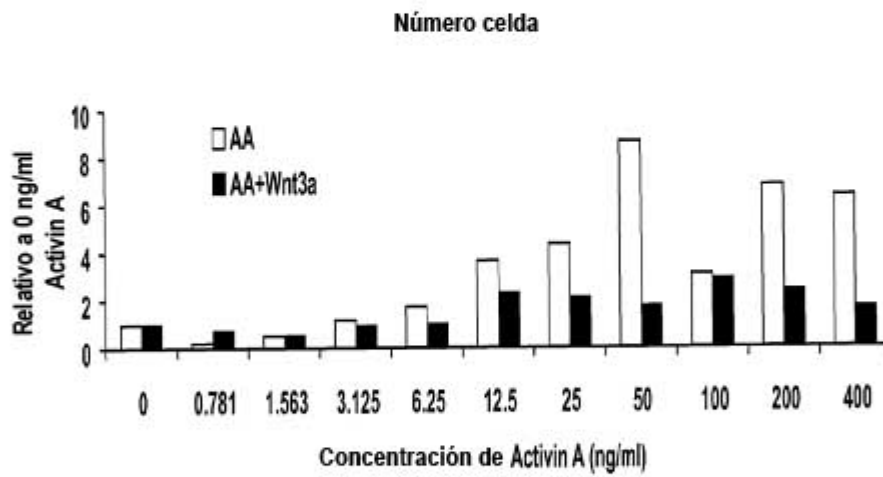


Figura 1B

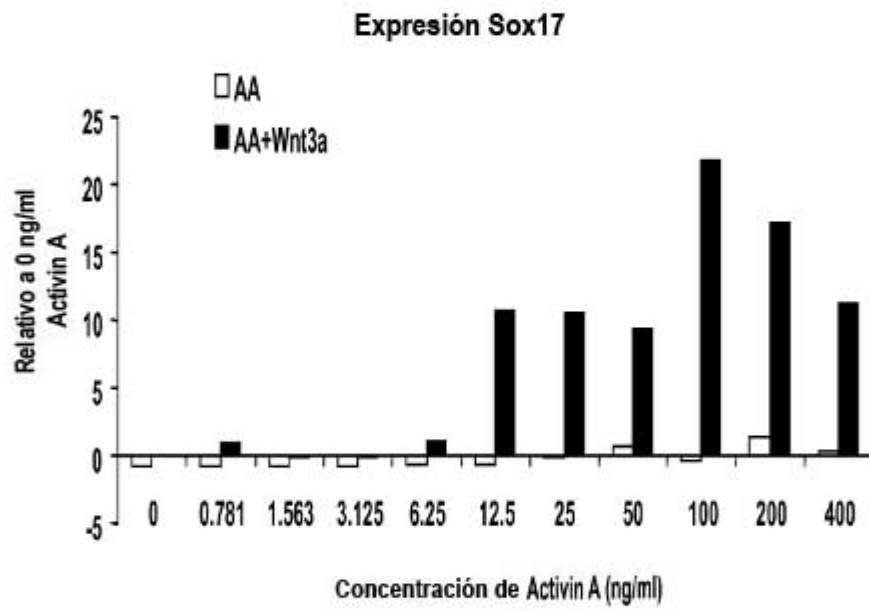




Figura 2

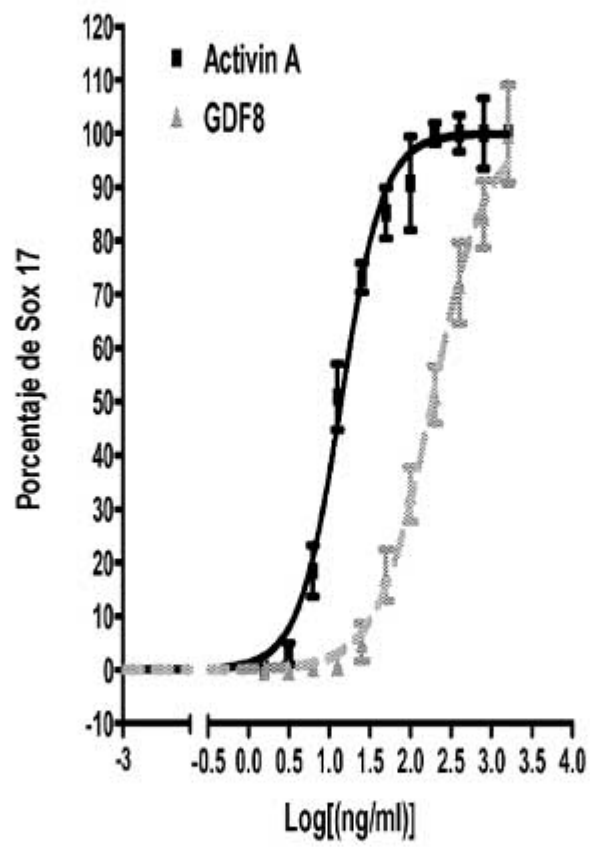
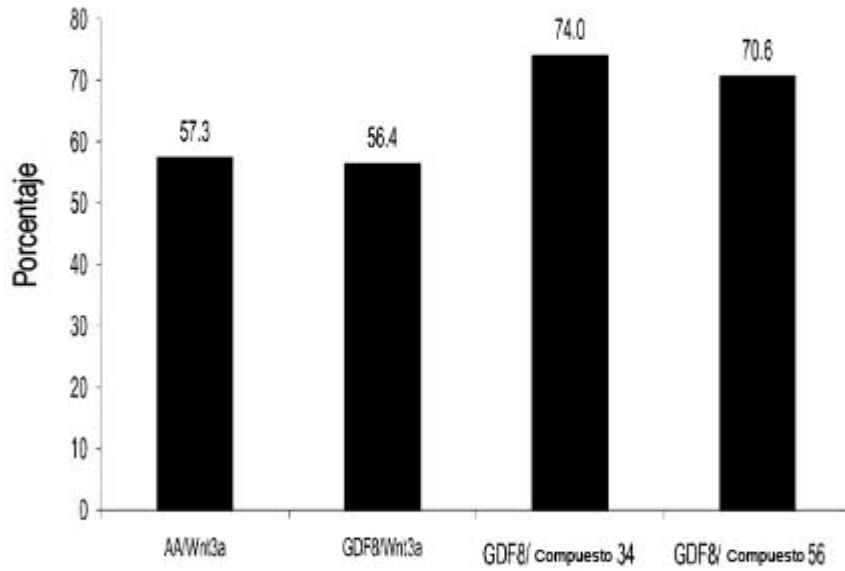


Figura 3



**Figura 4**

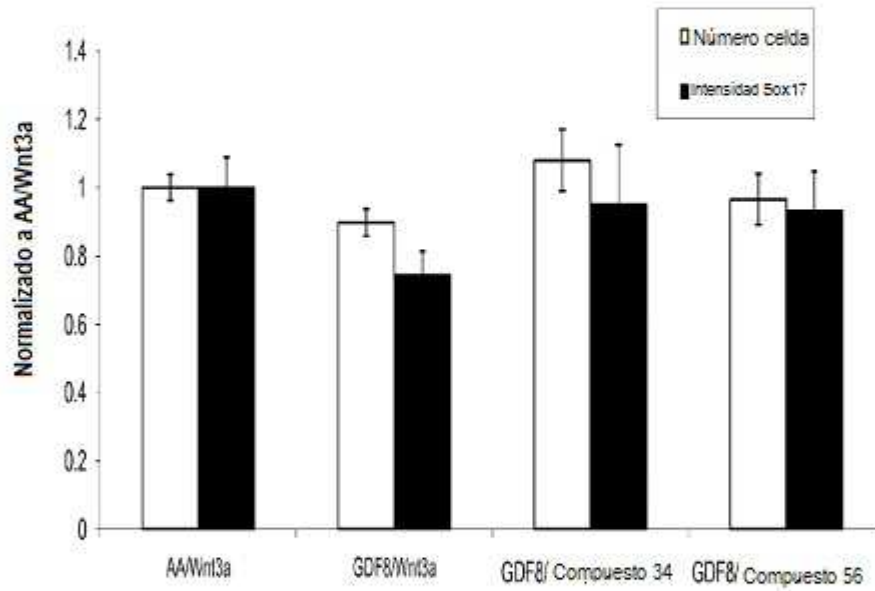


Figura 5

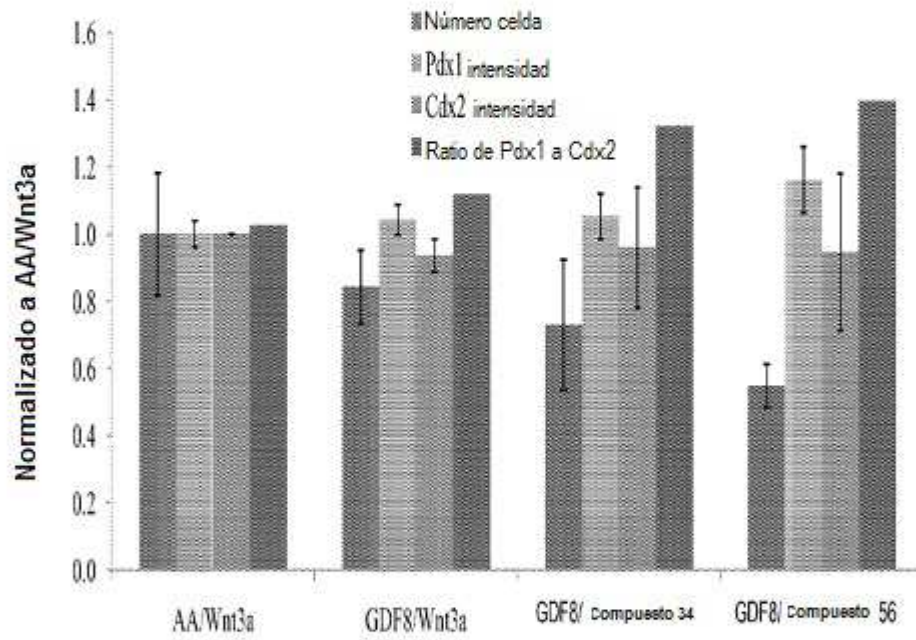
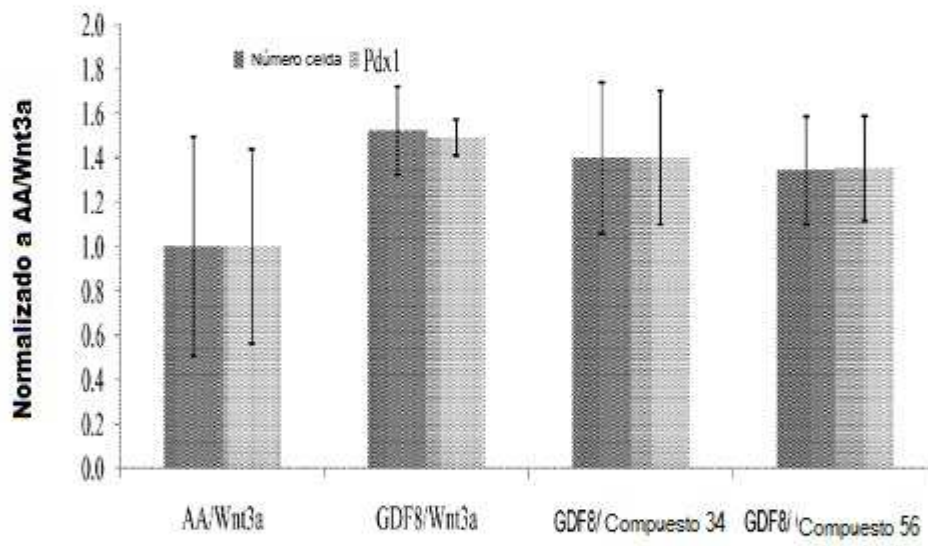


Figura 6



**Figura 7**

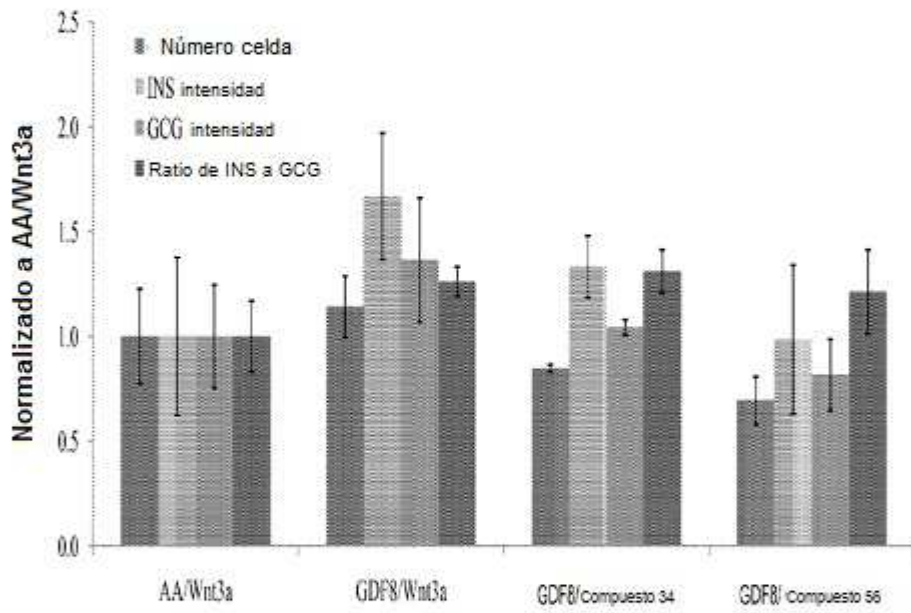


Figura 8A

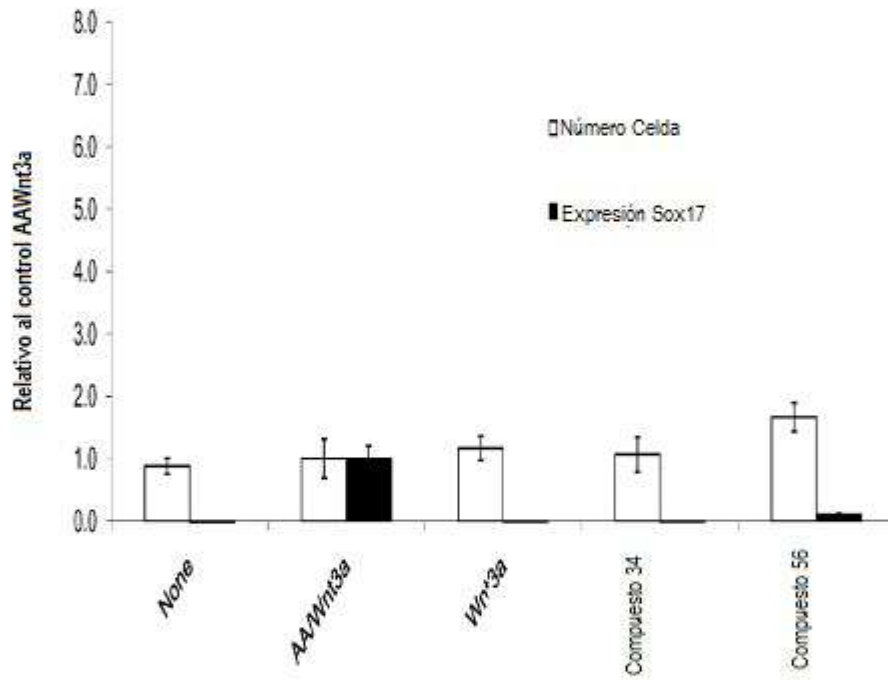
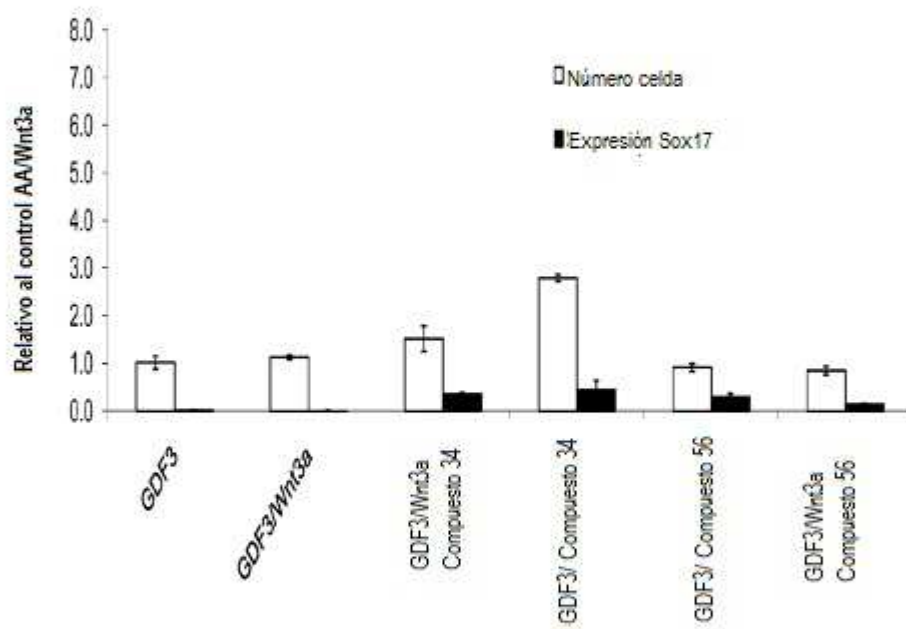


Figura 8B





**Figura 8C**

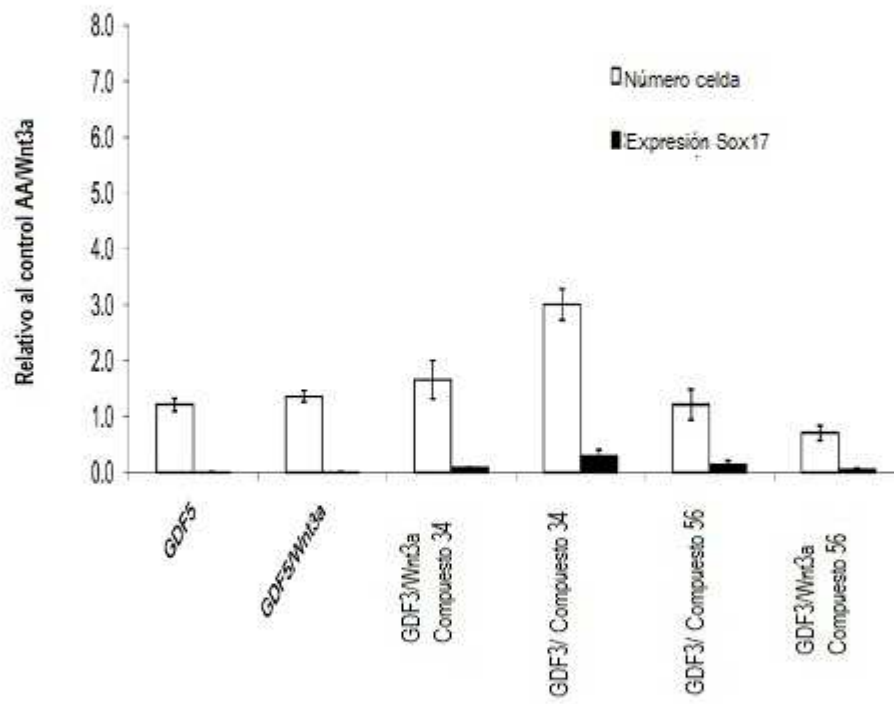
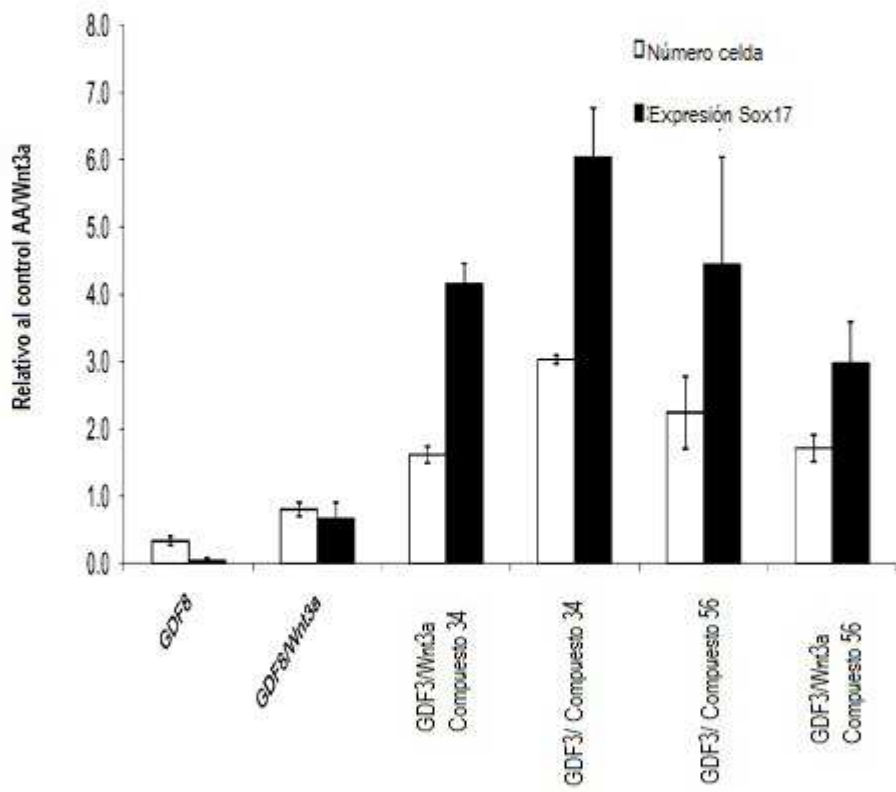
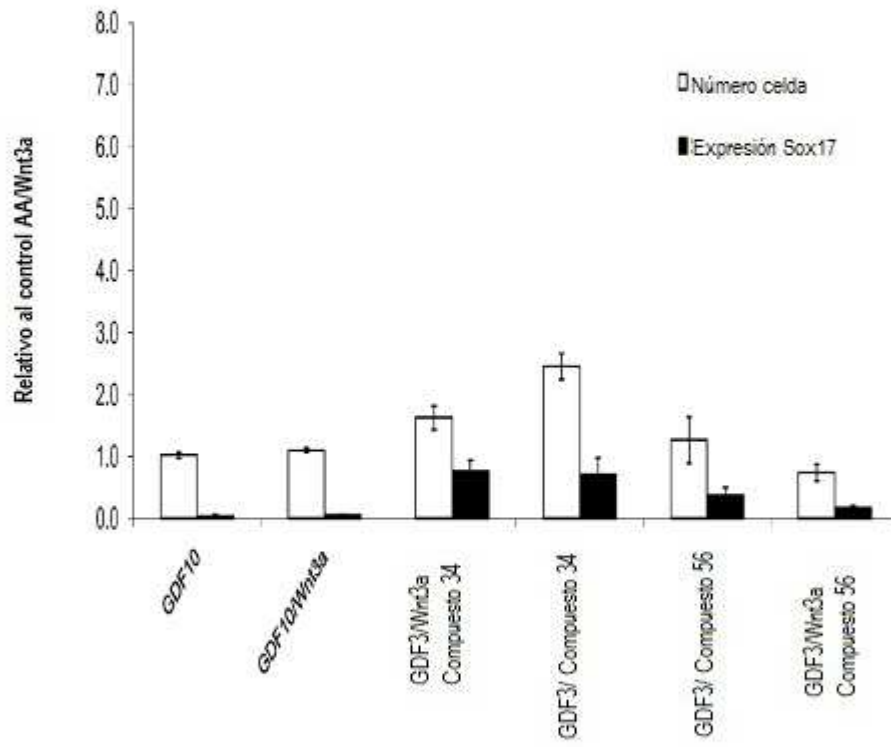


Figura 8D

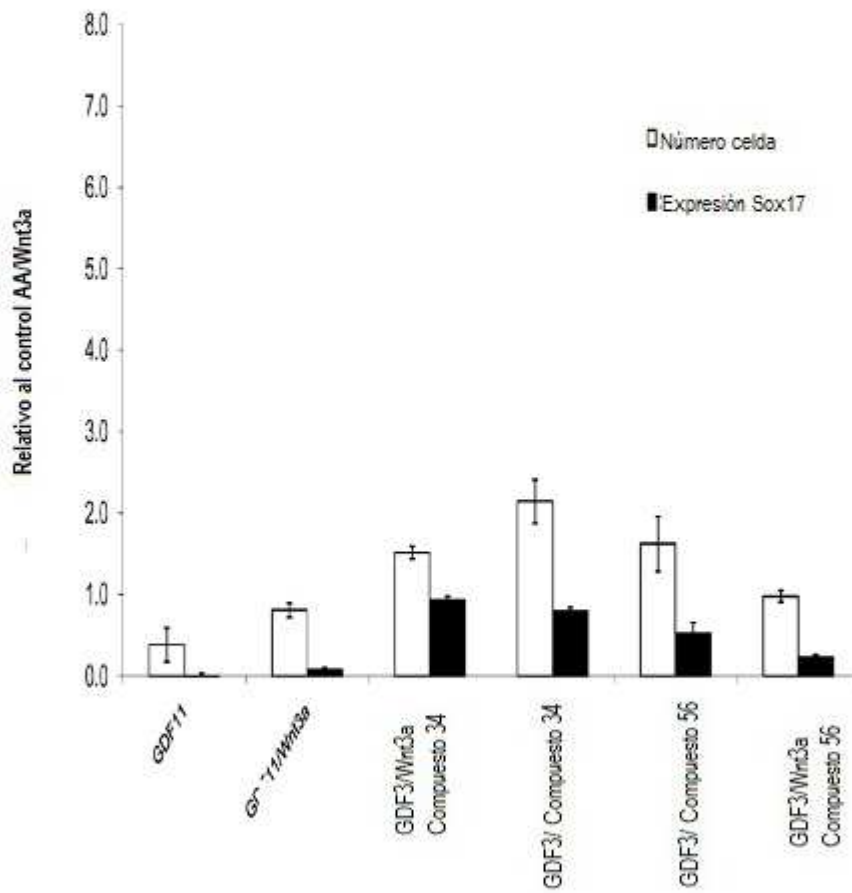


**Figura SE**



CEN5227WOPCT: DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES  
Janet Davis et al

Figura 8F



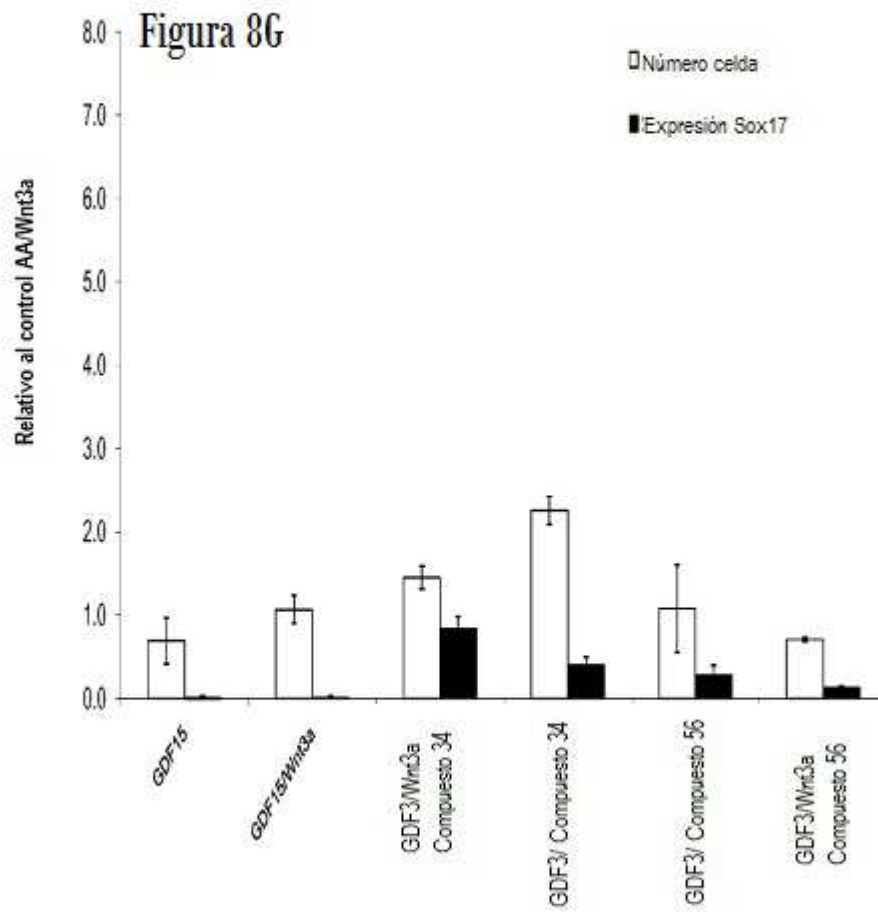
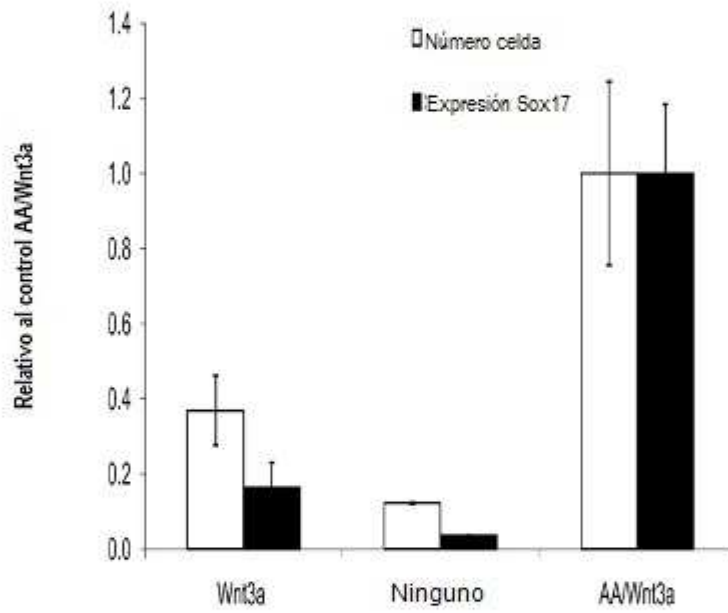
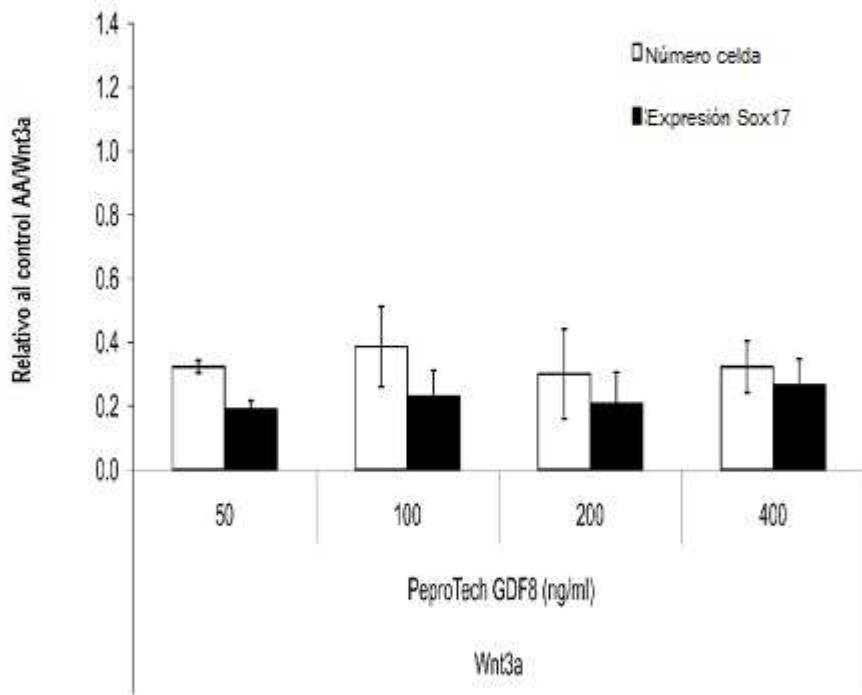


Figura 9A



**Figura 9B**



**Figura 9C**

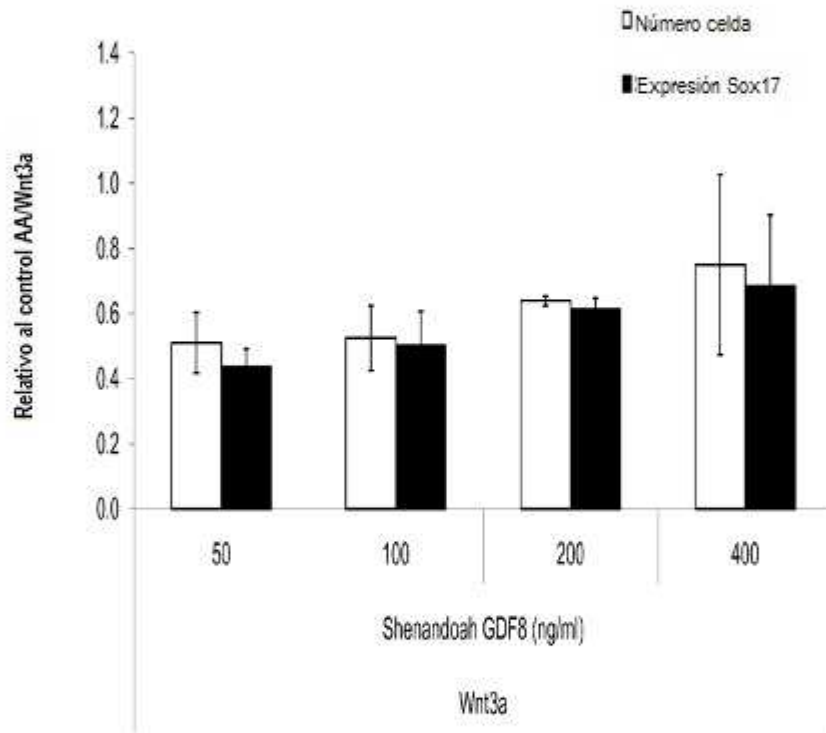




Figura 9D

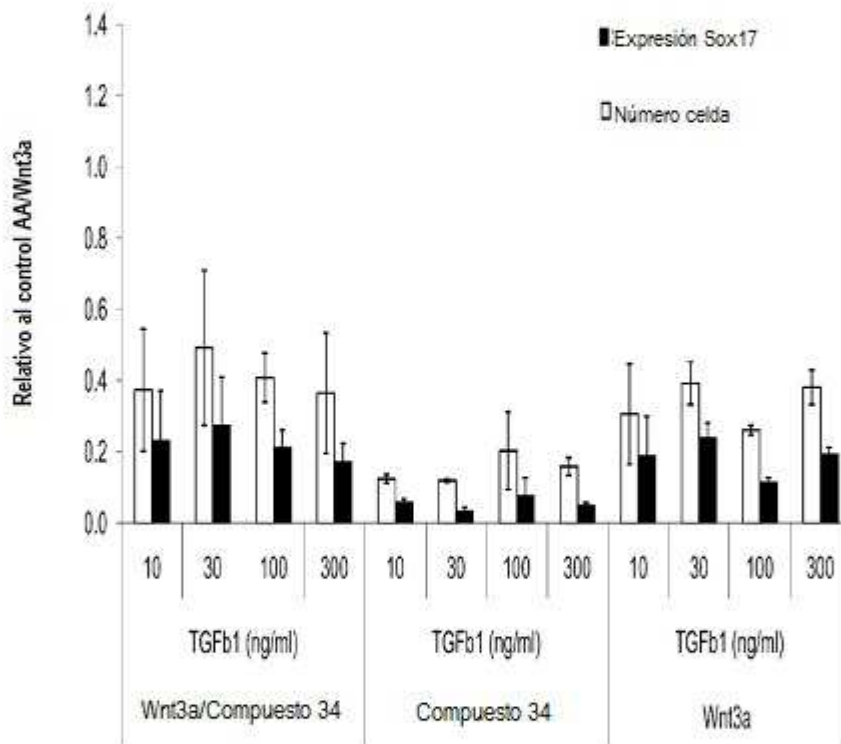


Figura 9E

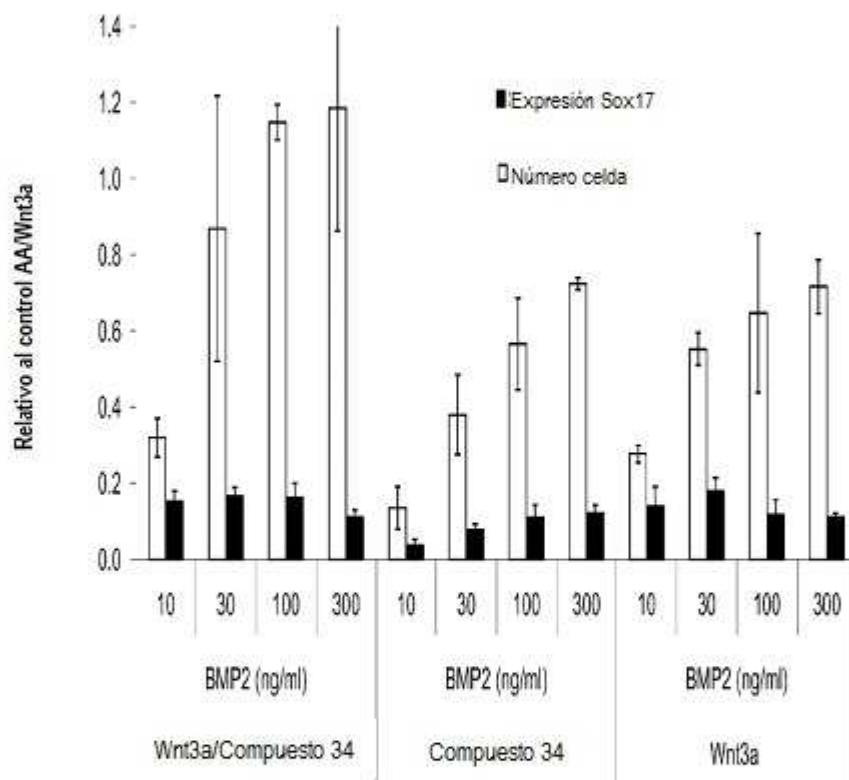


Figura 9F

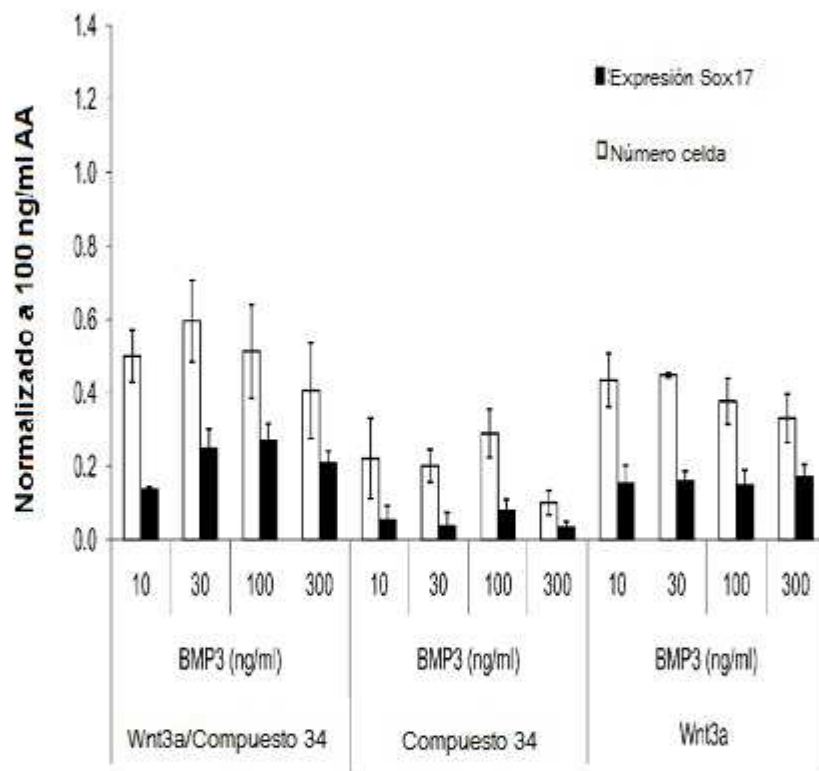


Figura 9G

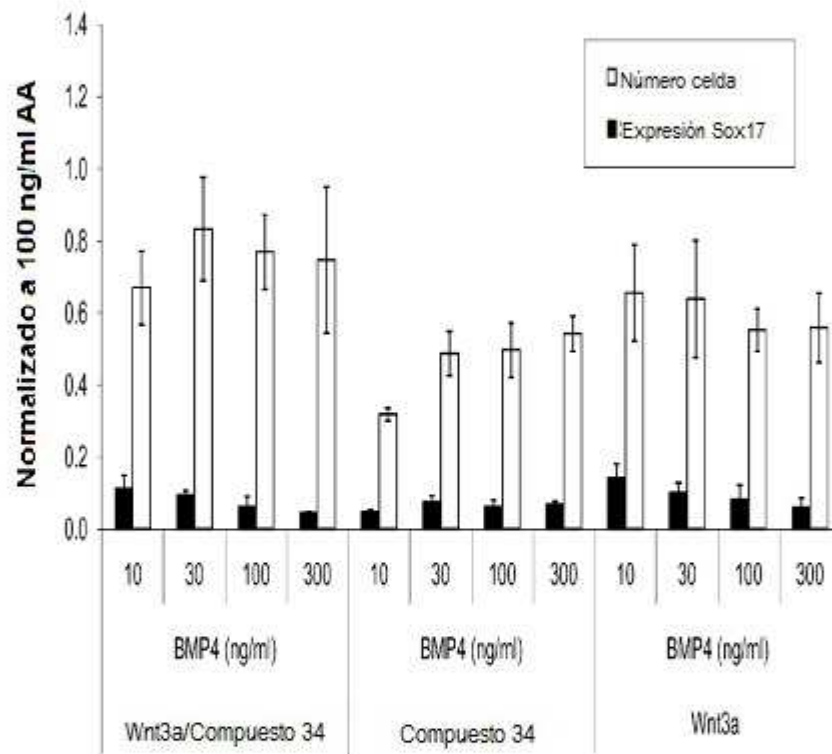


Figura 10

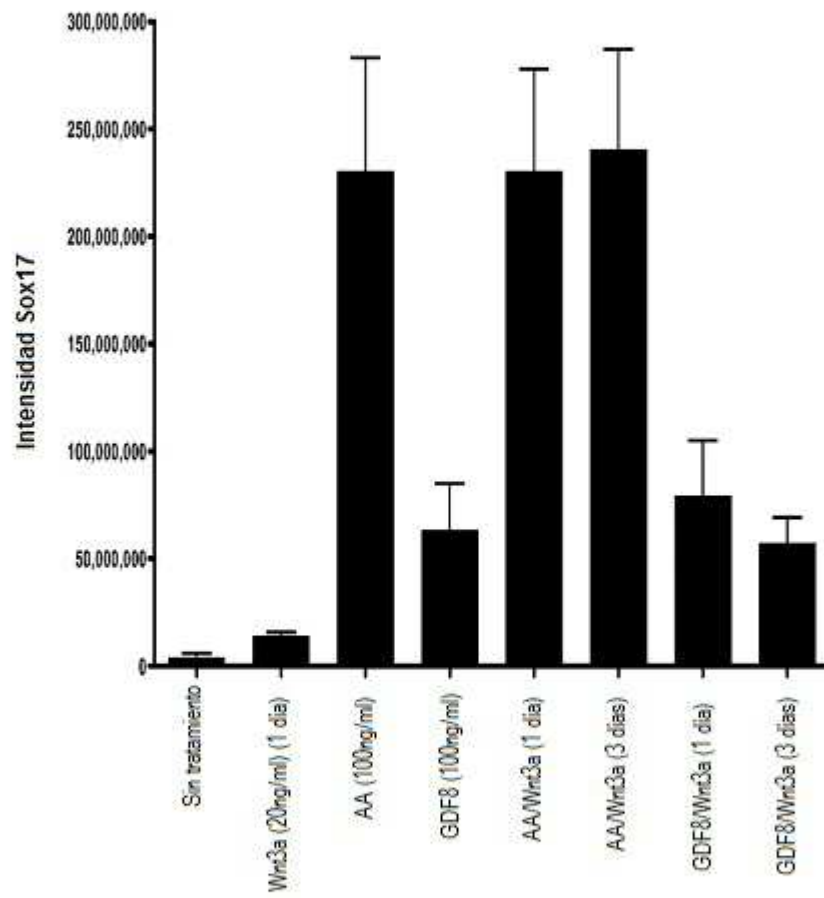


Figura 11A

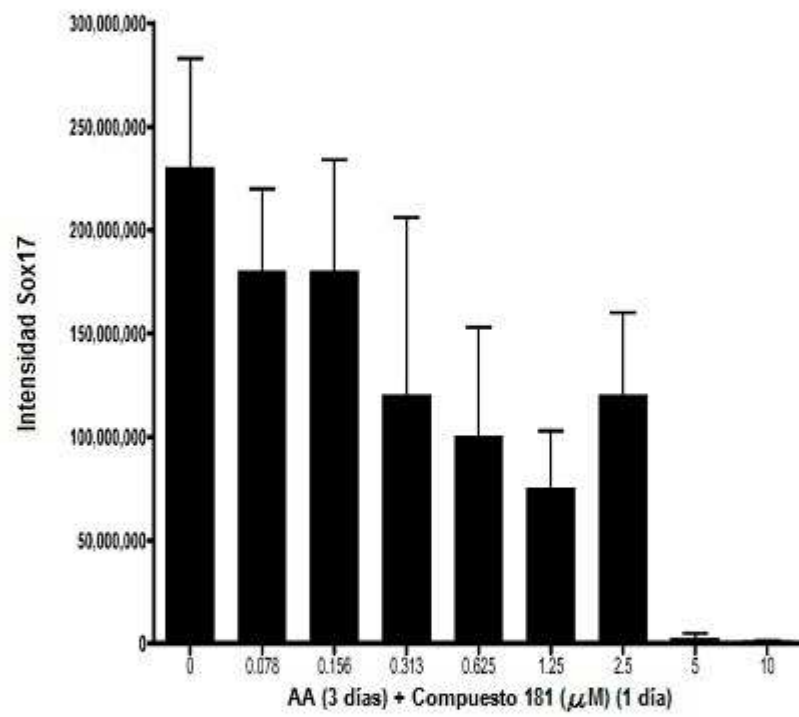


Figura 11B

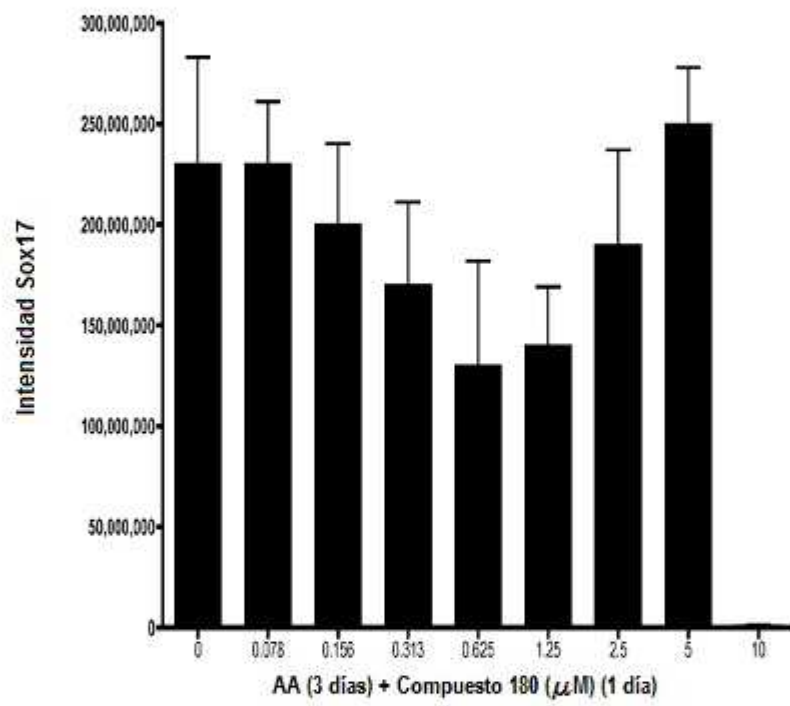


Figura 11C

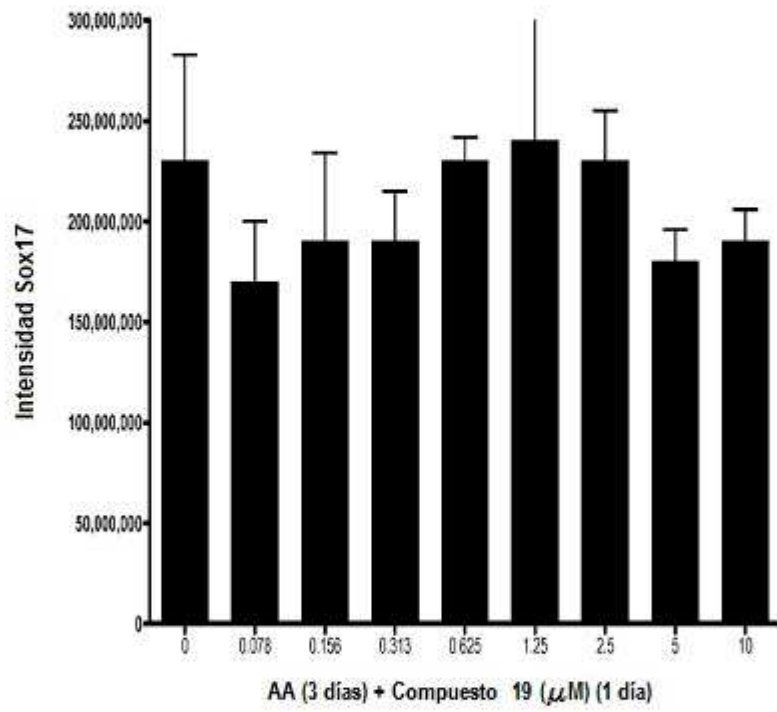




Figura 11D

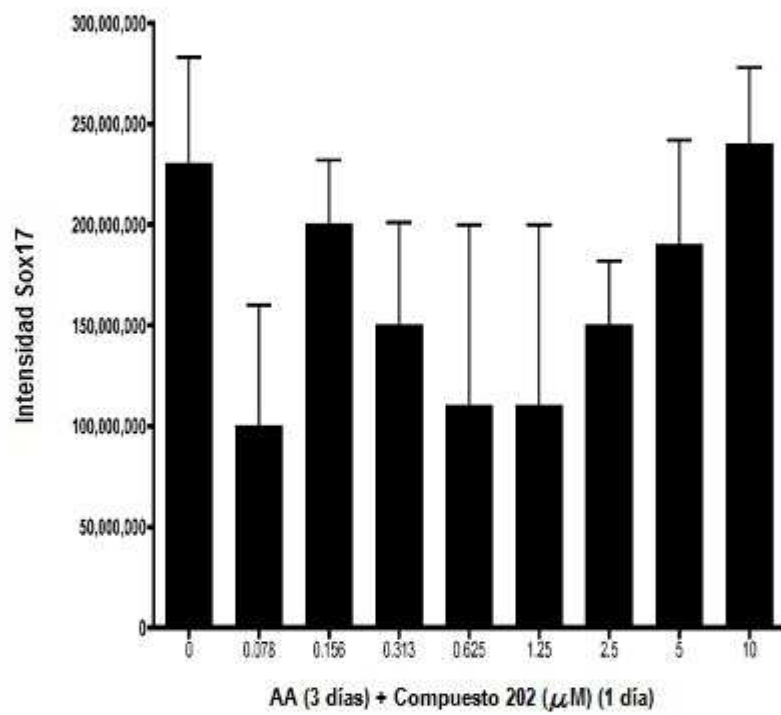


Figura 11E

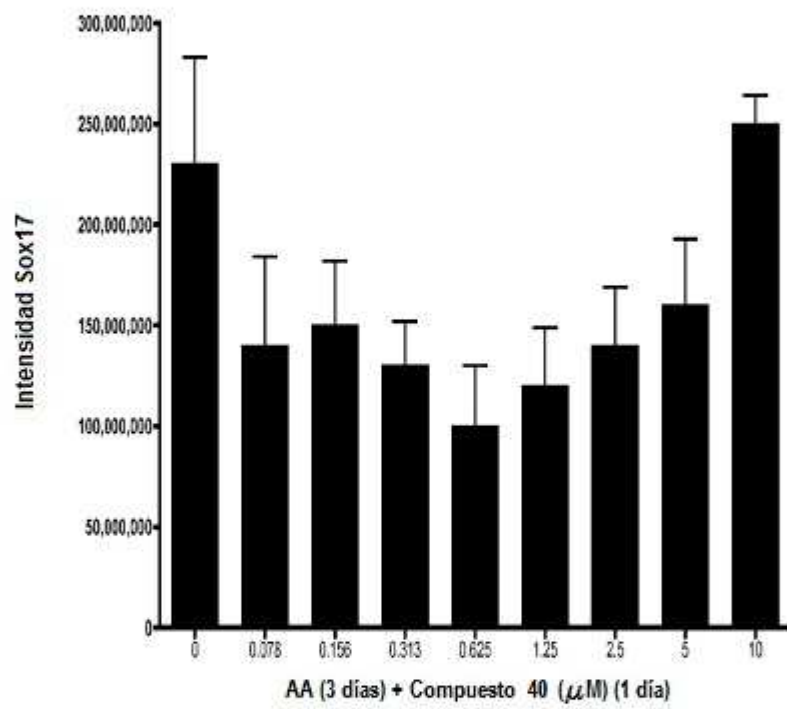


Figura 11F

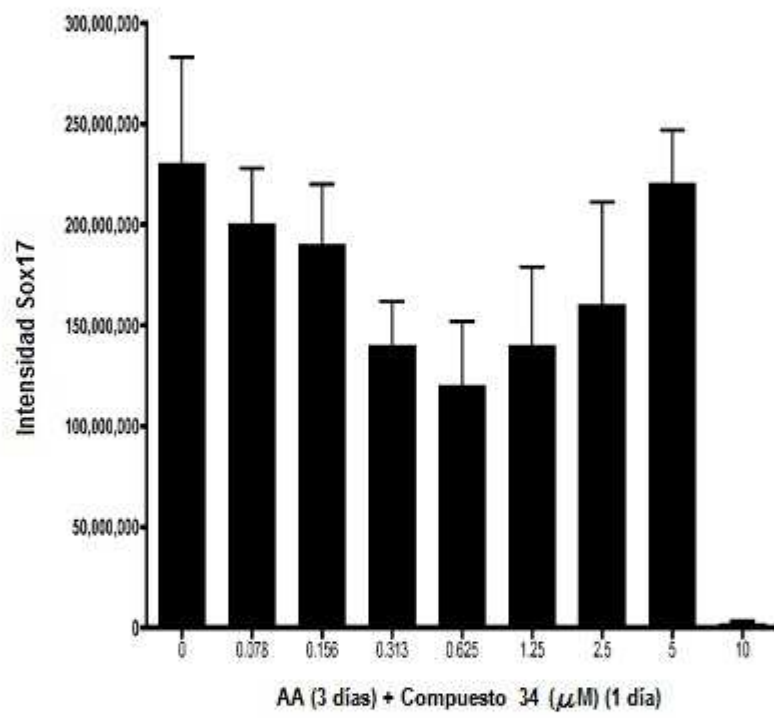


Figura 11G

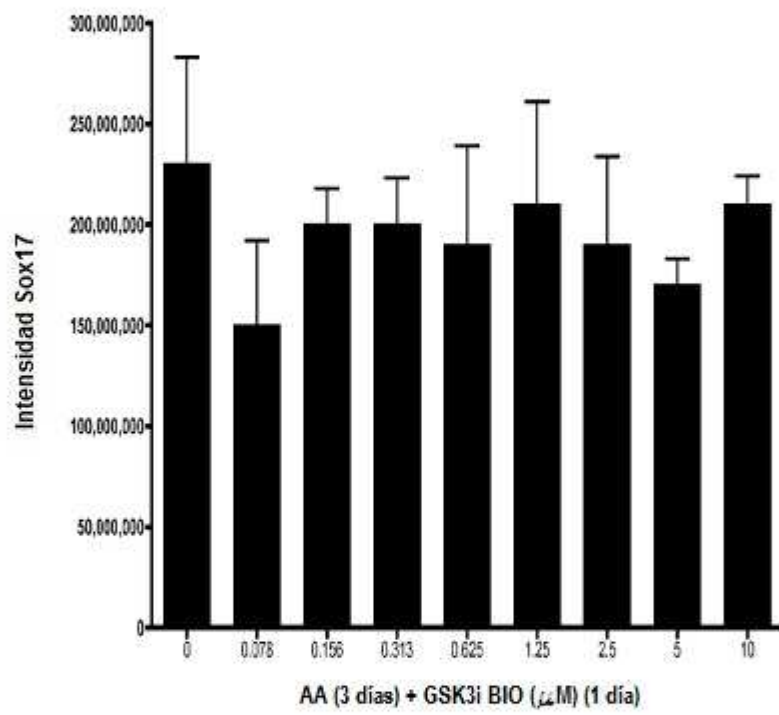


Figura 12A

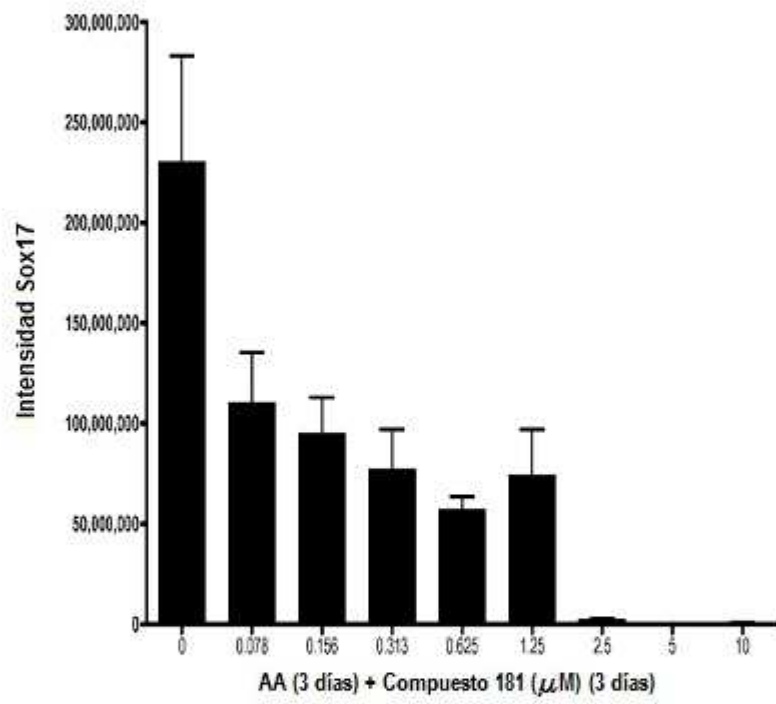


Figura 12B

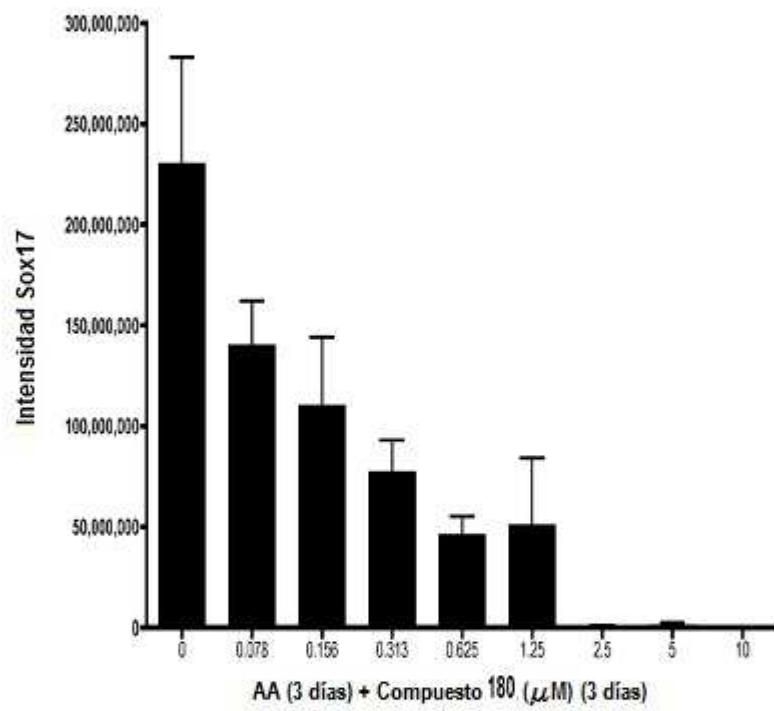


Figura 12C

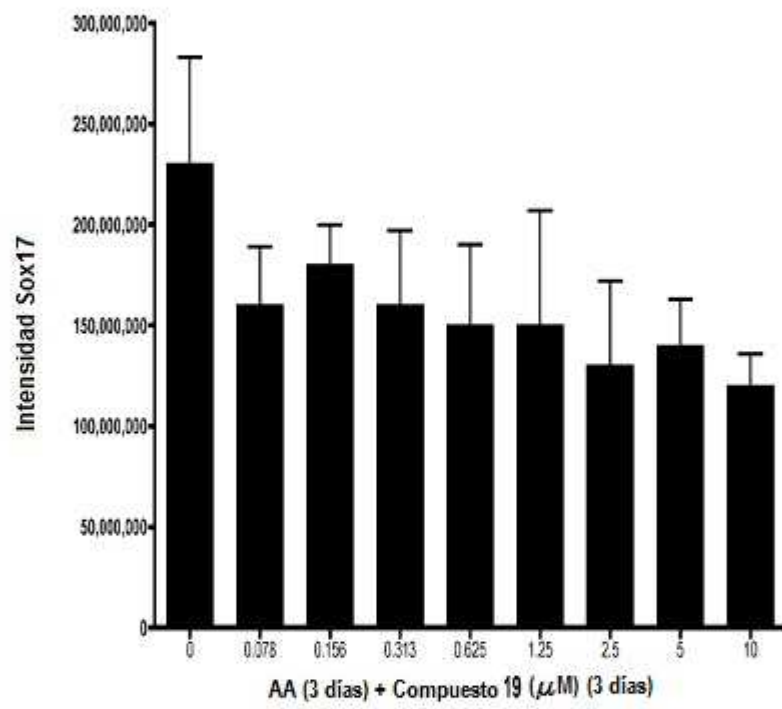


Figura 12D

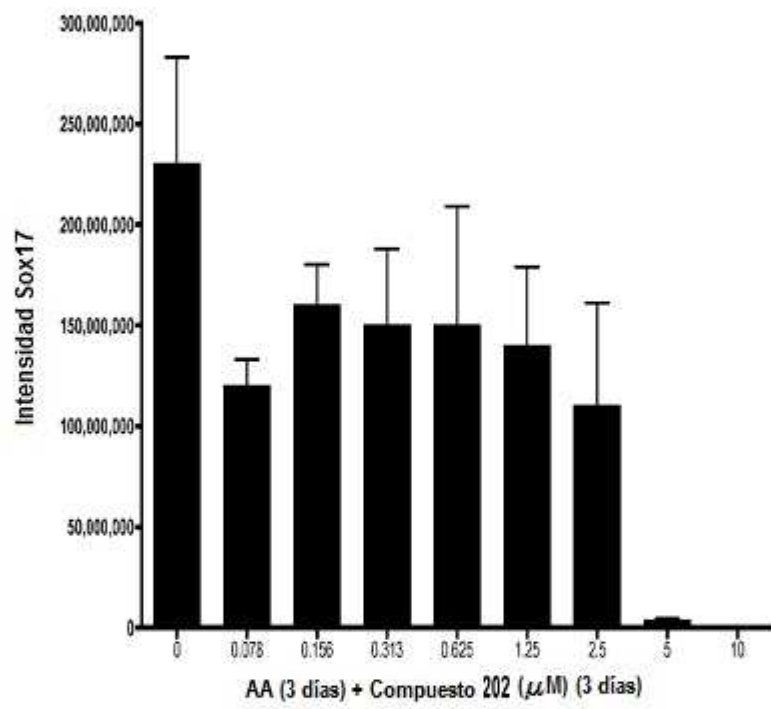




Figura 12E

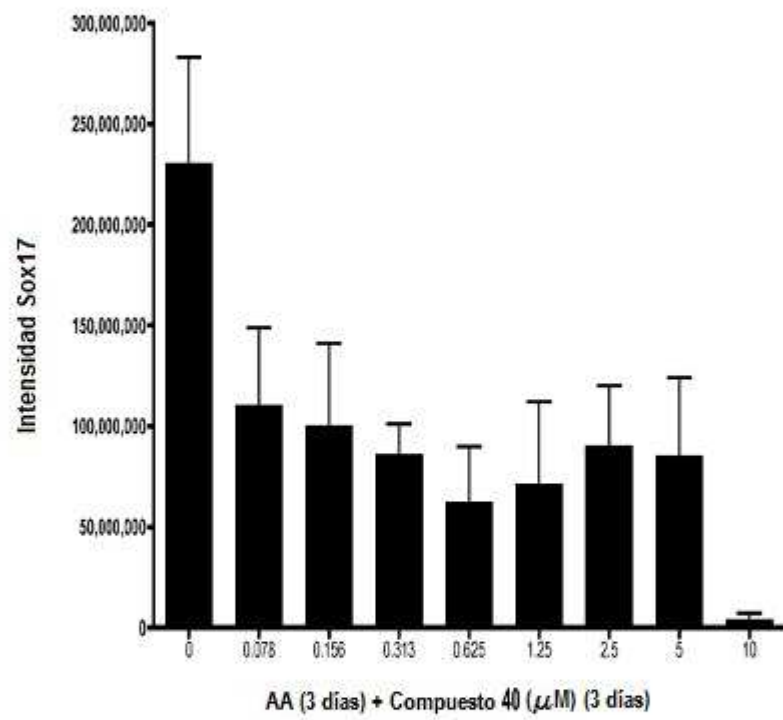


Figura 12F

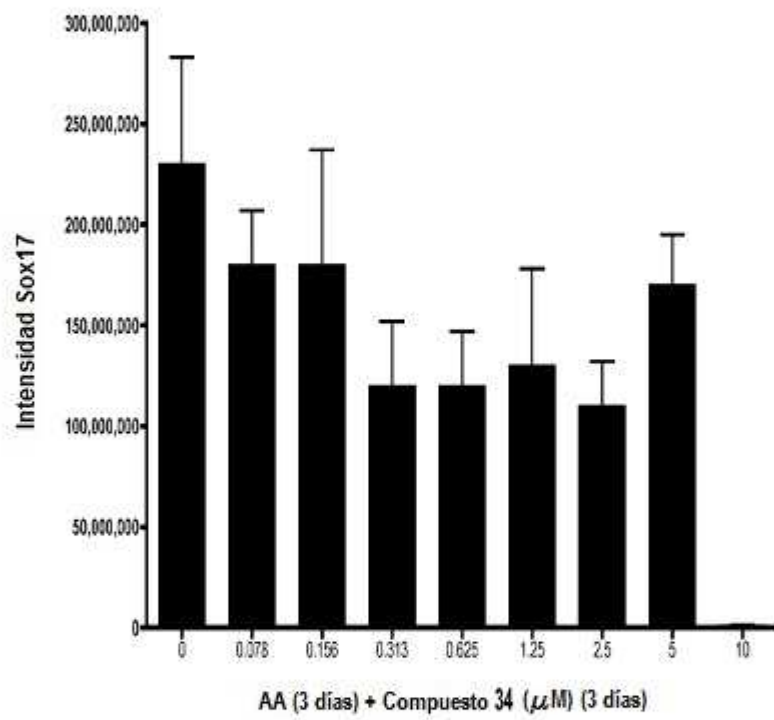


Figura 12G

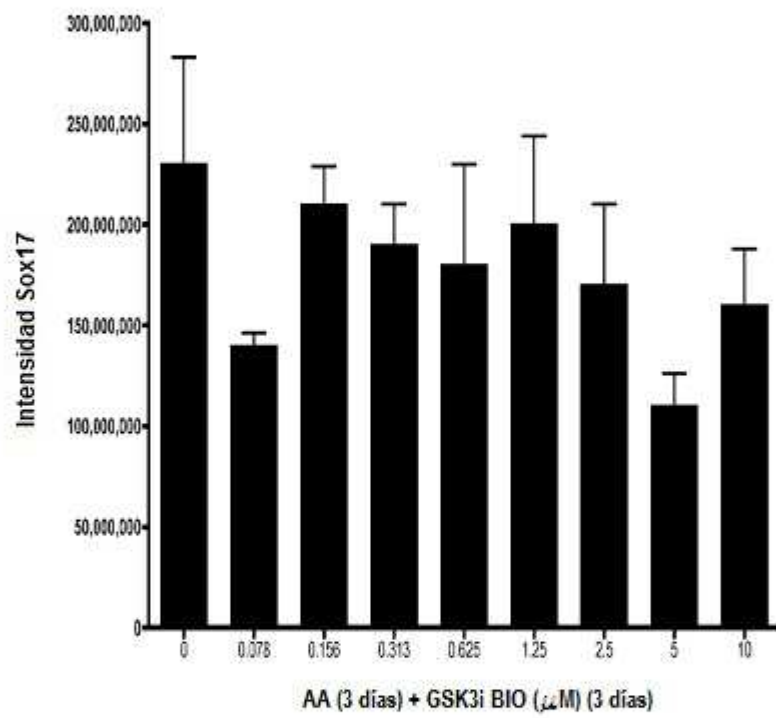


Figura 13A

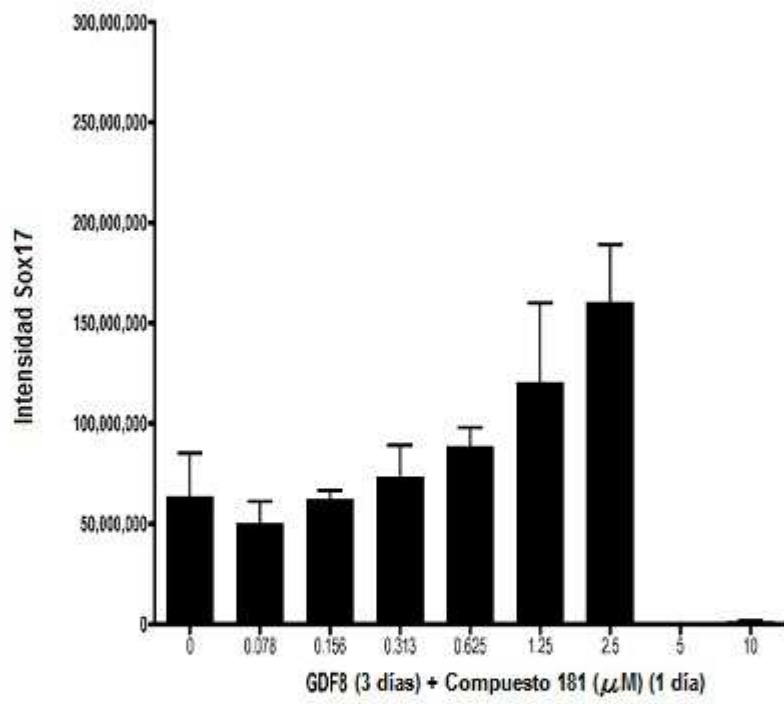


Figura 13B

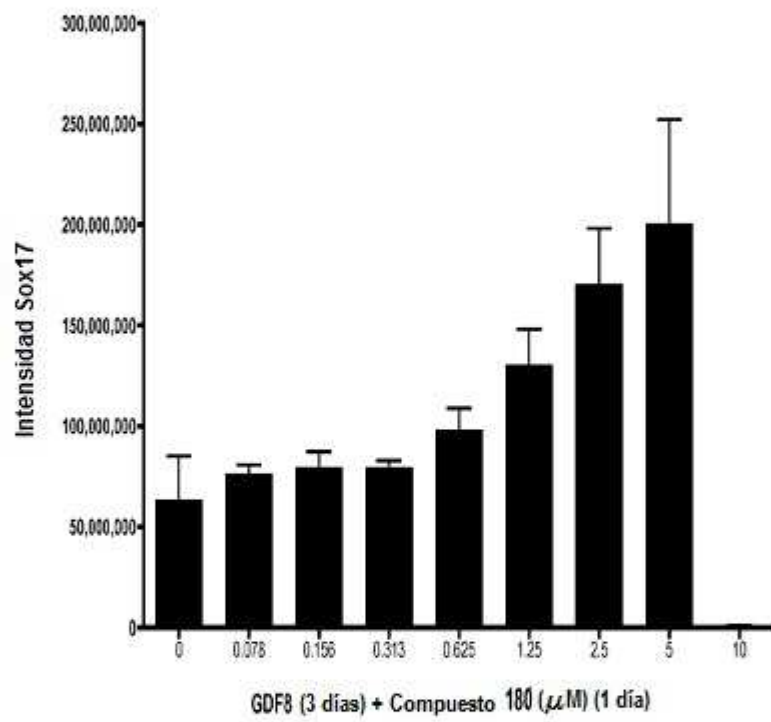


Figura 13C

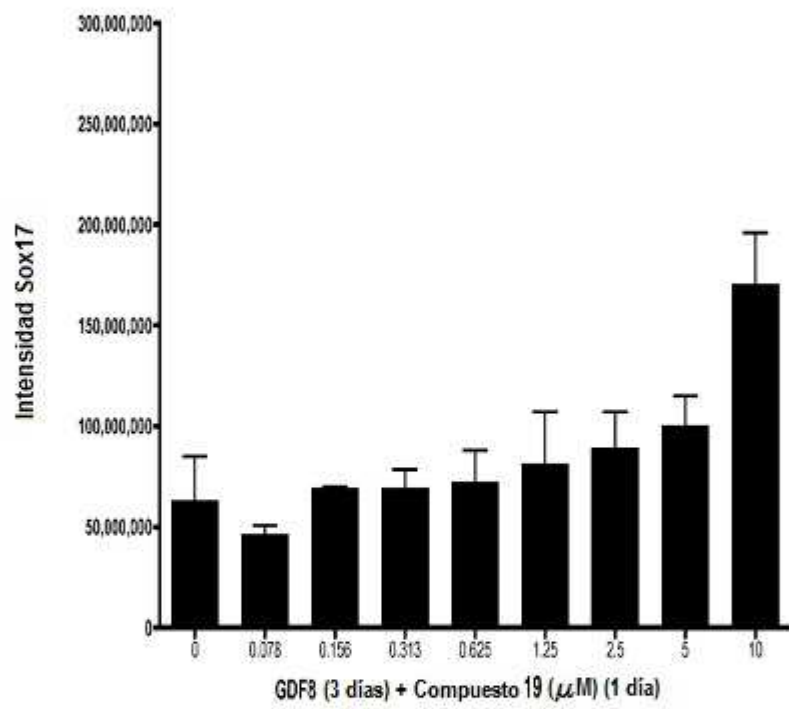


Figura 13D

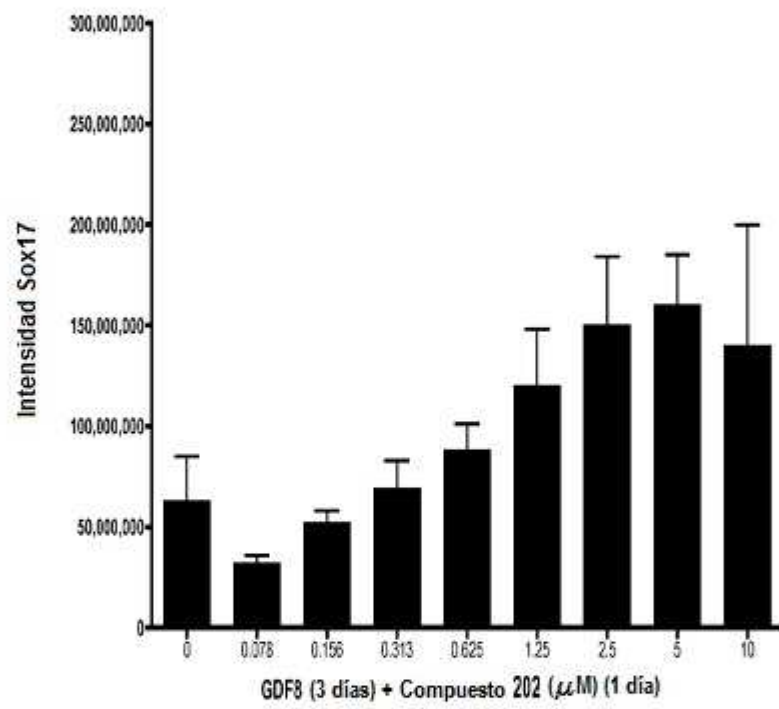


Figura 13E

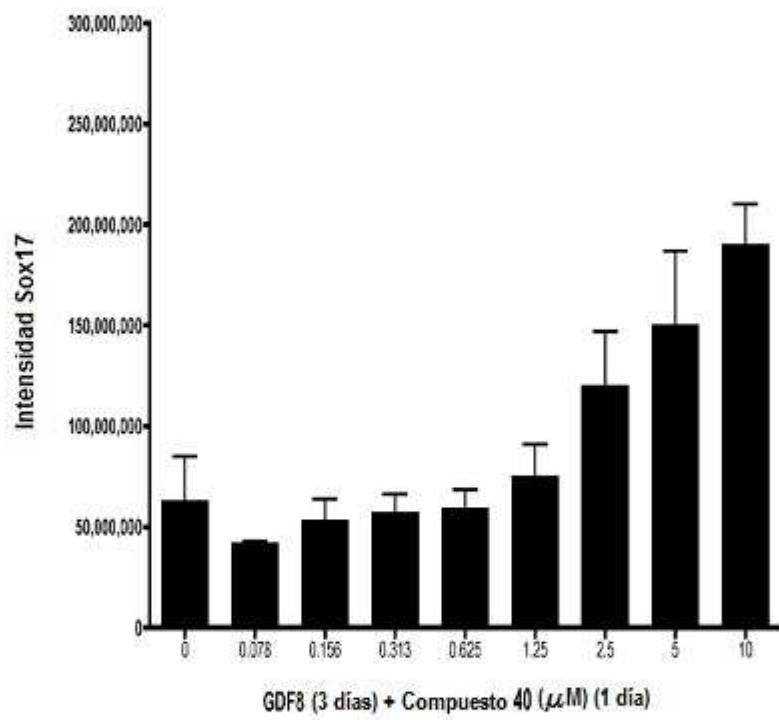




Figura 13F

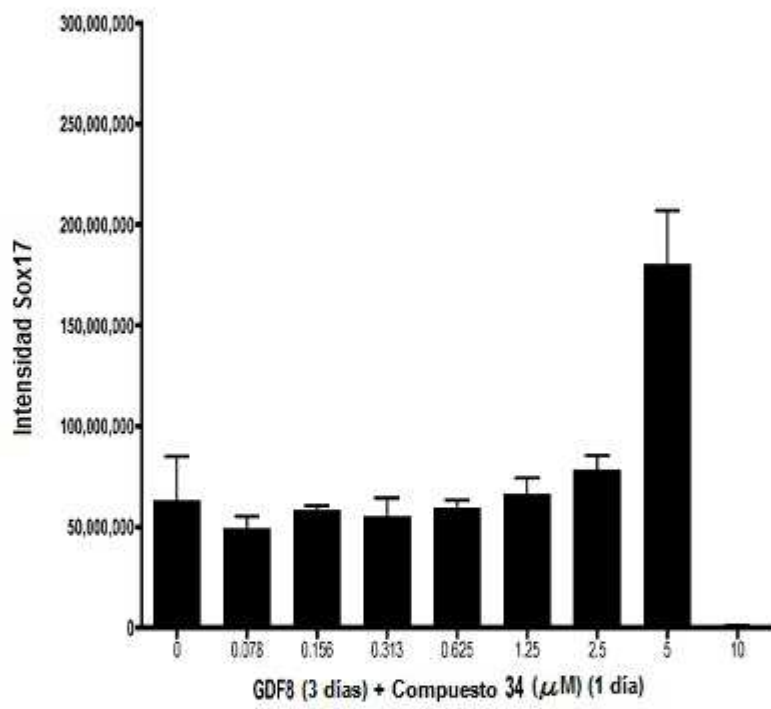


Figura 13G

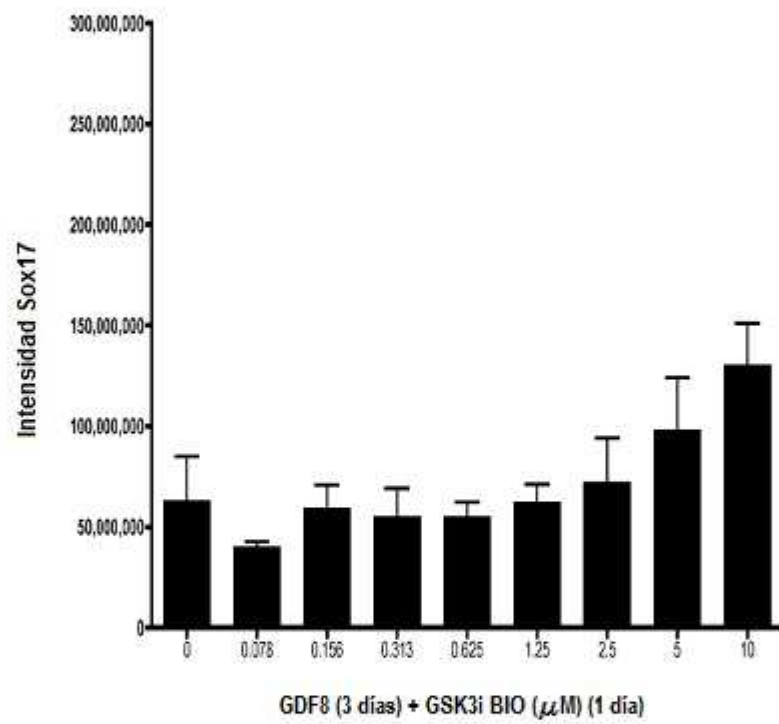


Figura 14A

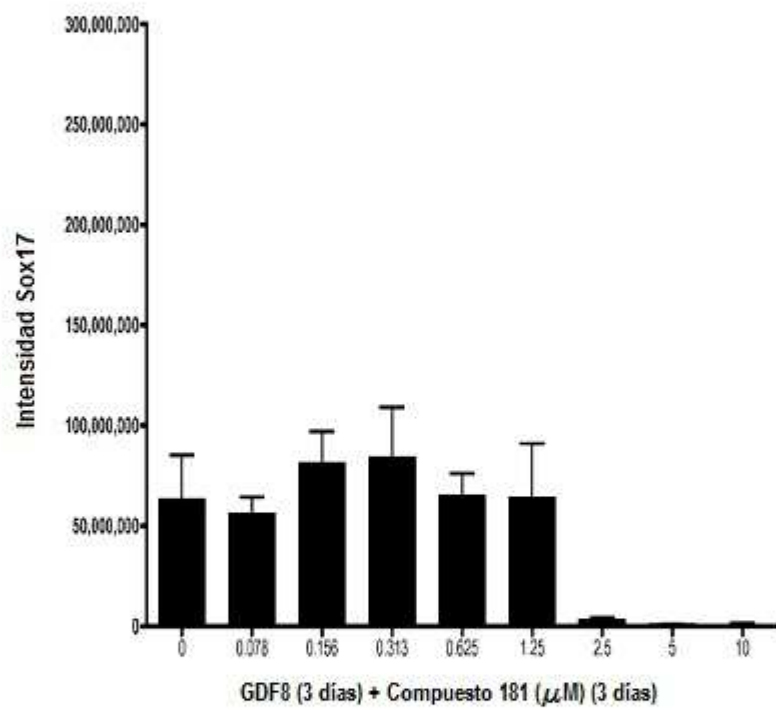


Figura 14B

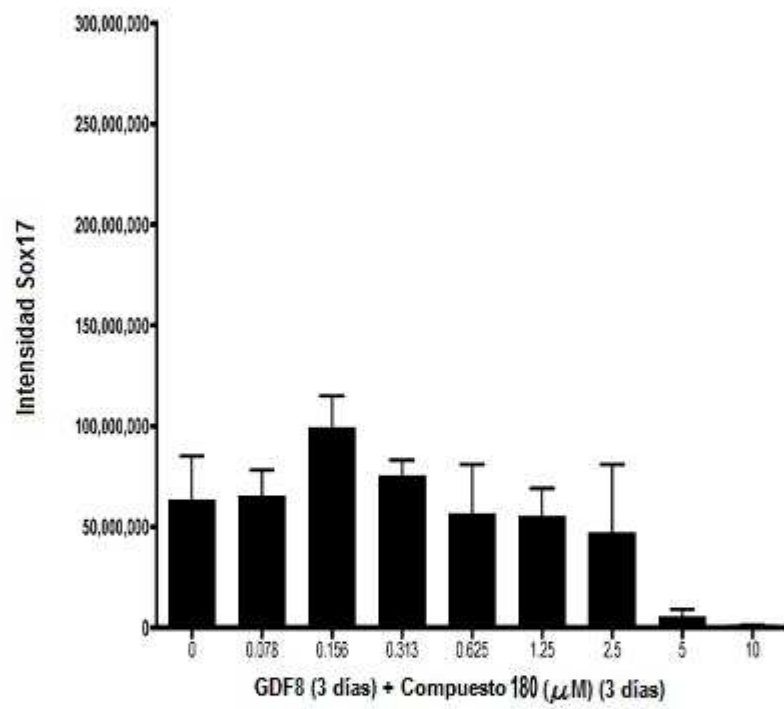


Figura 14C

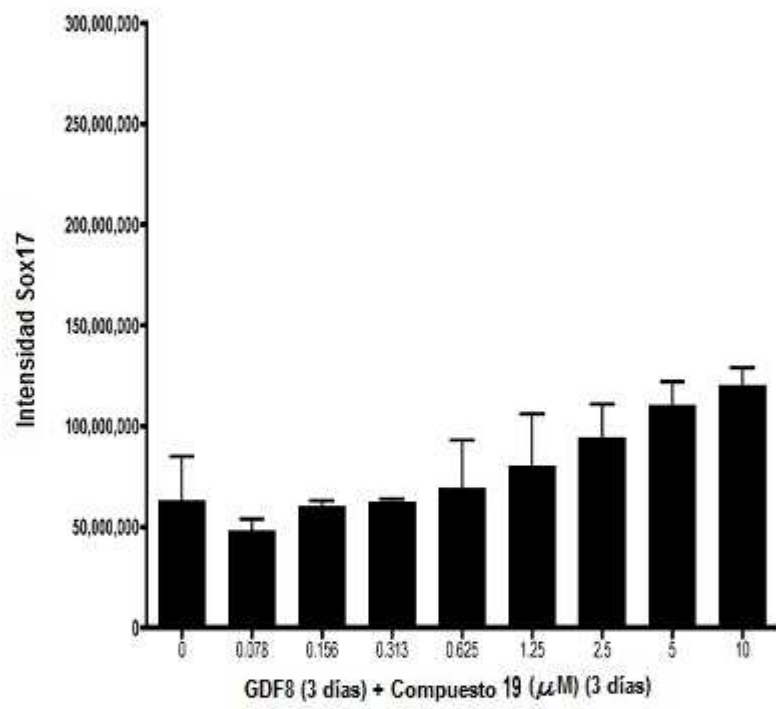


Figura 14D

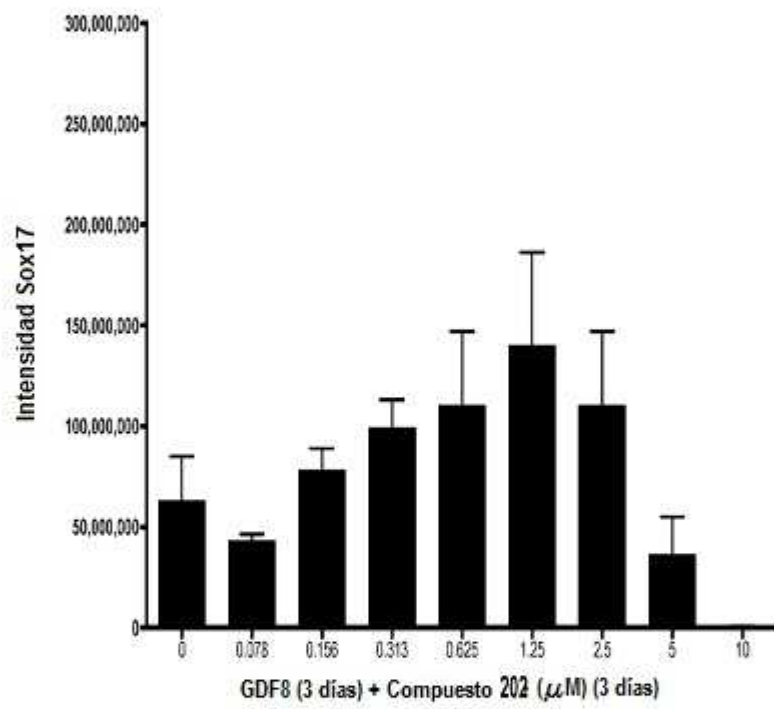


Figura 14E

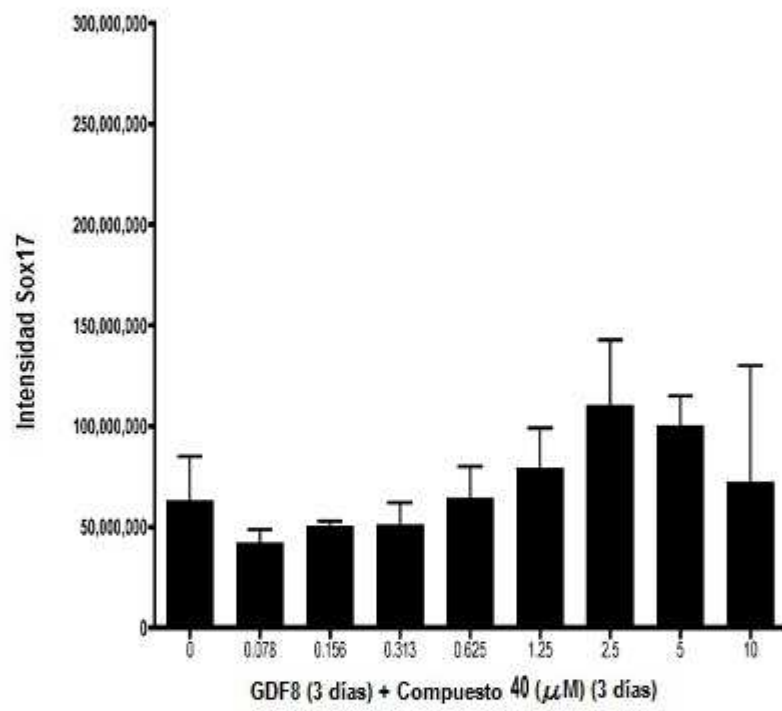


Figura 14F

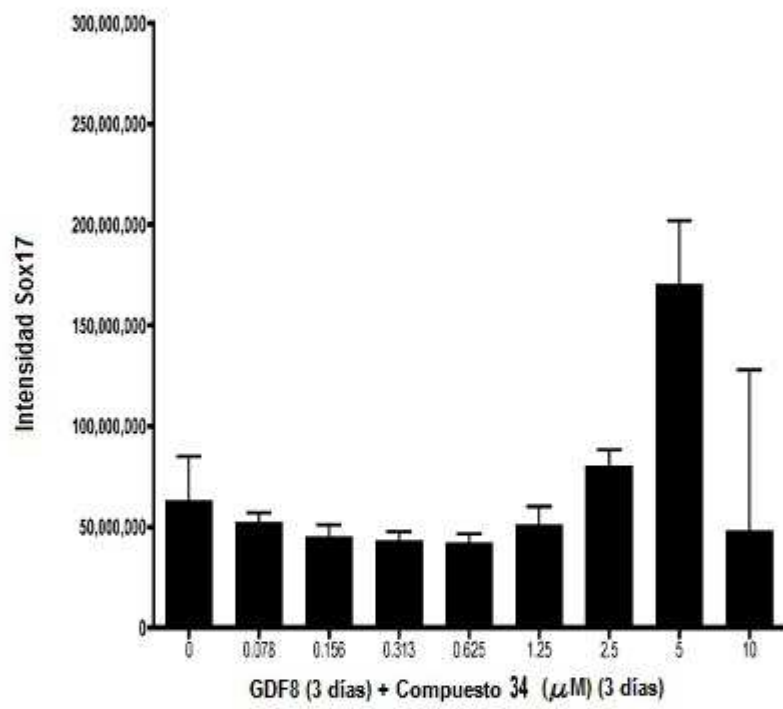




Figura 14G

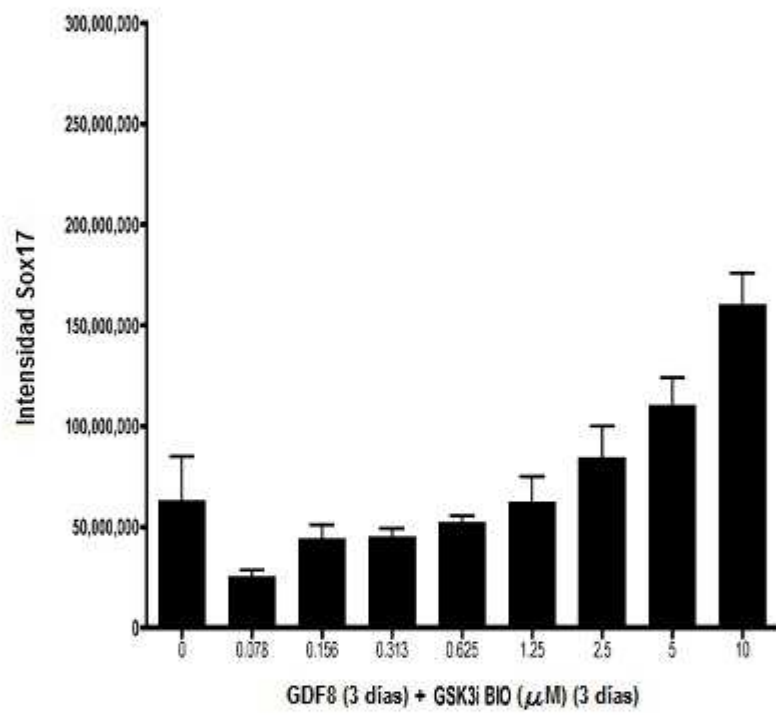


Figura 15

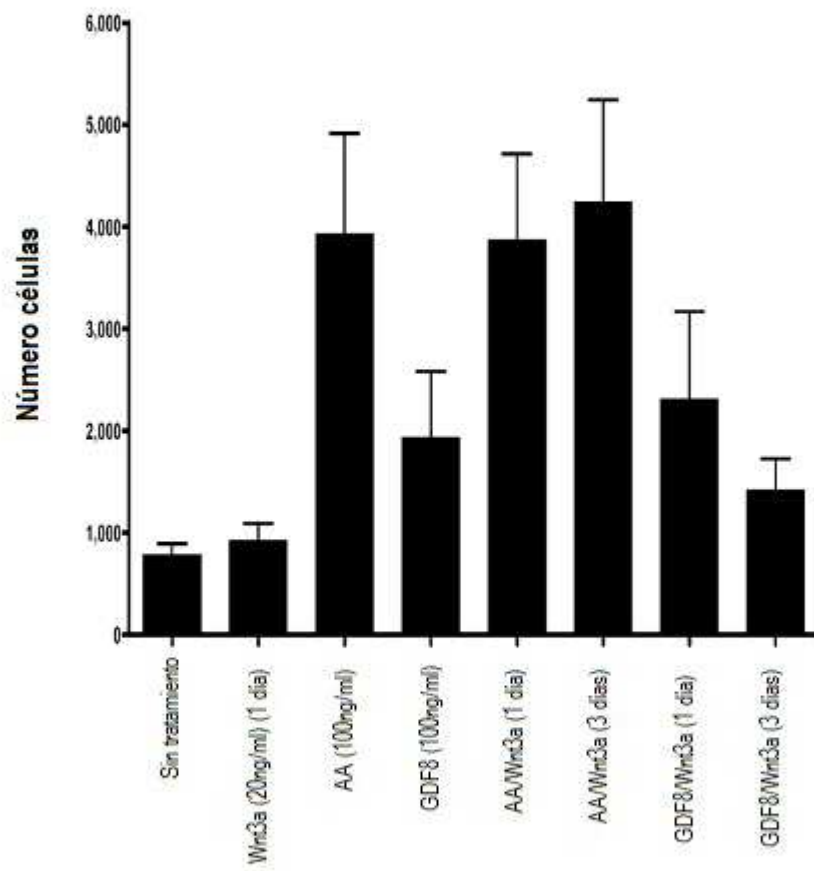


Figura 16A

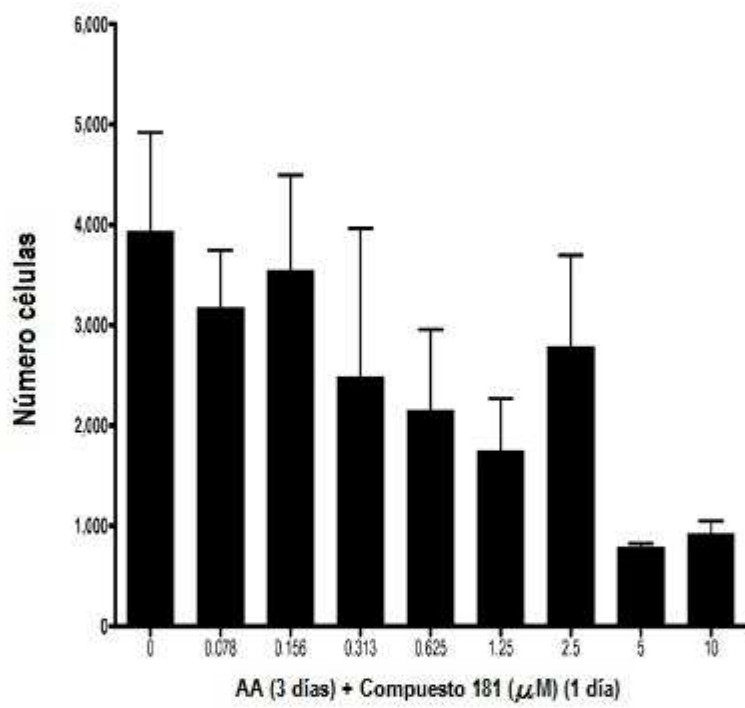


Figura 16B

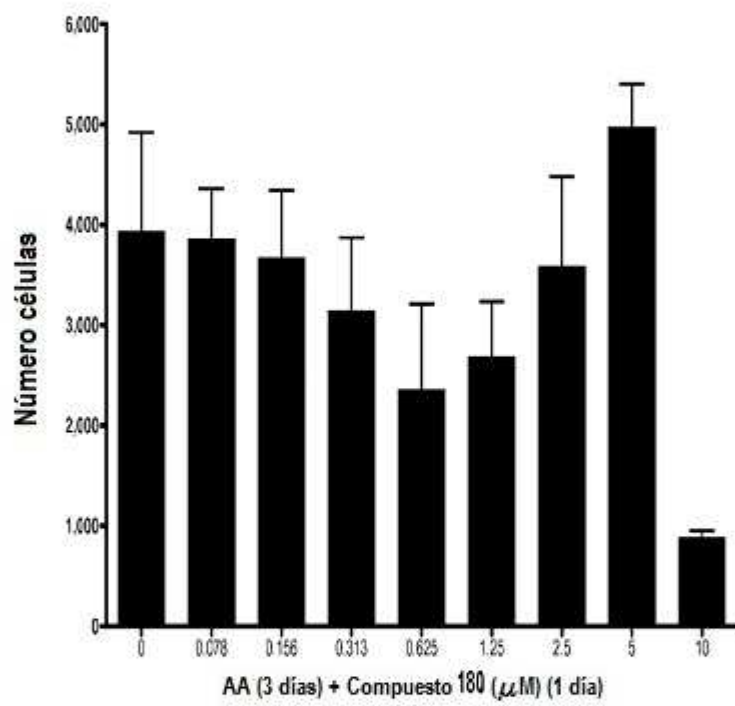


Figura 16C

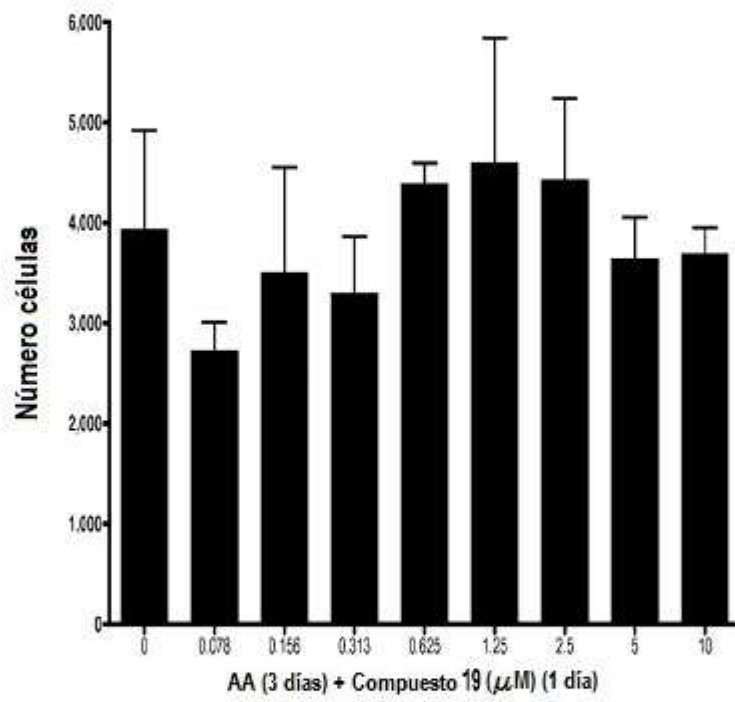


Figura 16D

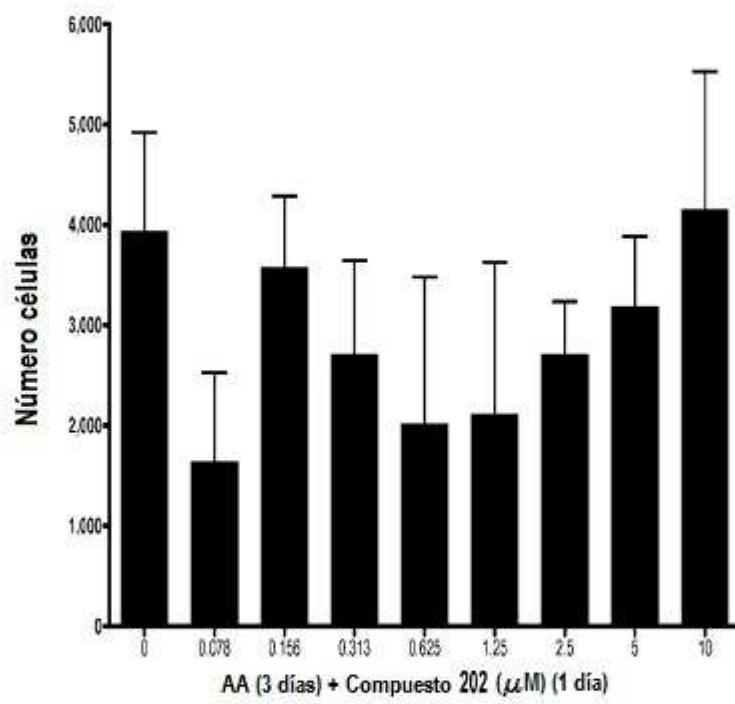


Figura 16E

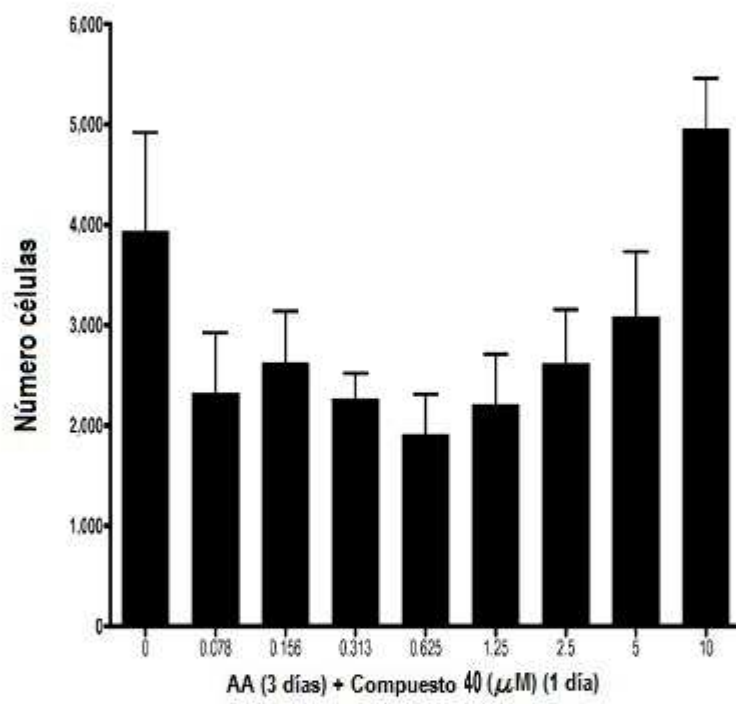


Figura 16F

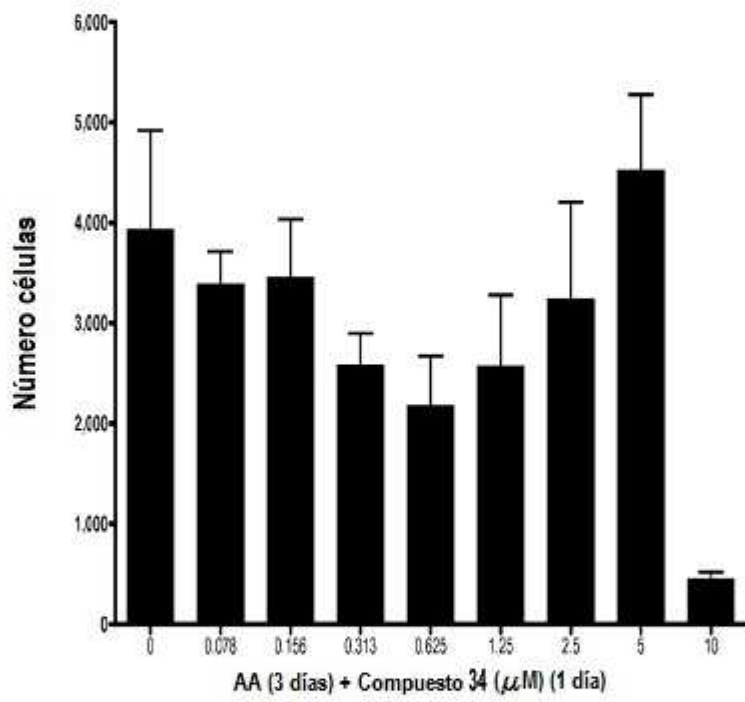




Figura 16G

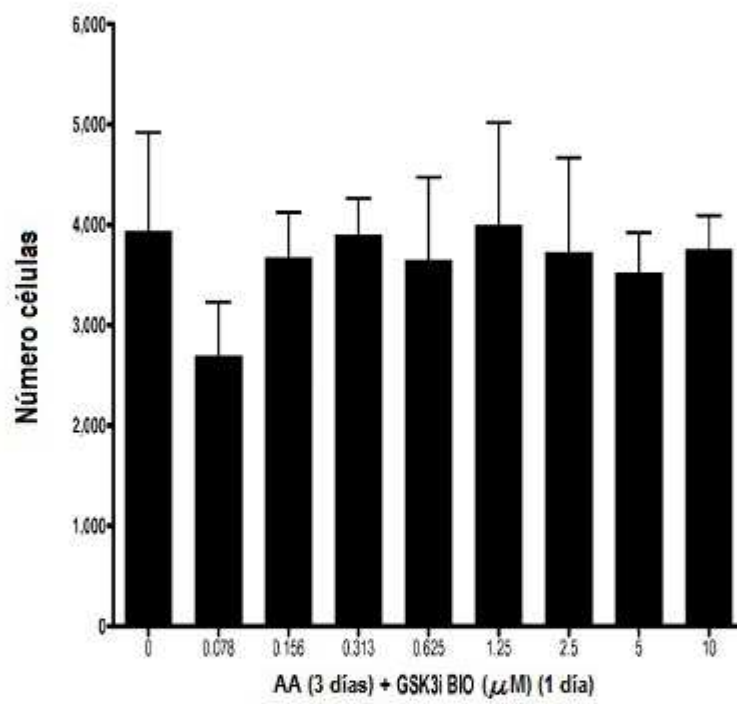


Figura 17A

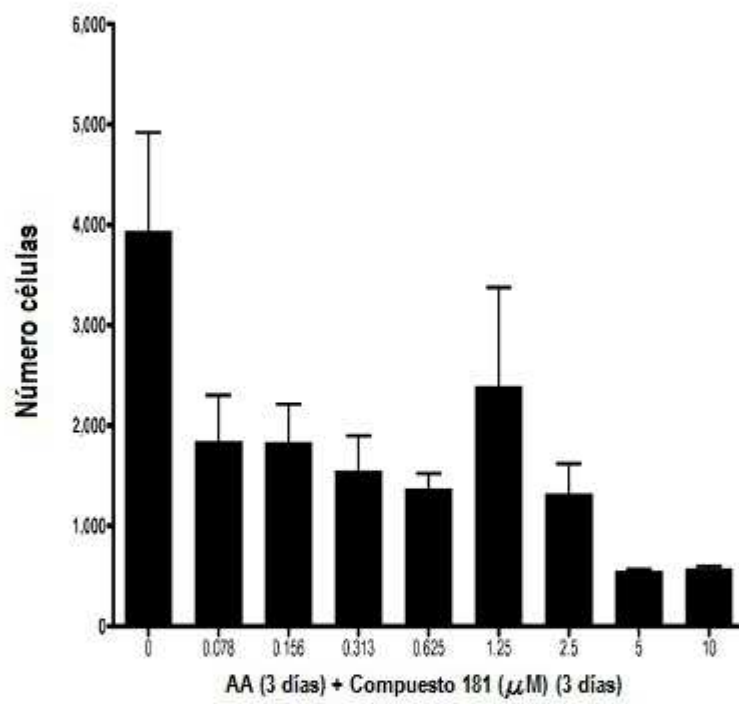


Figura 17B

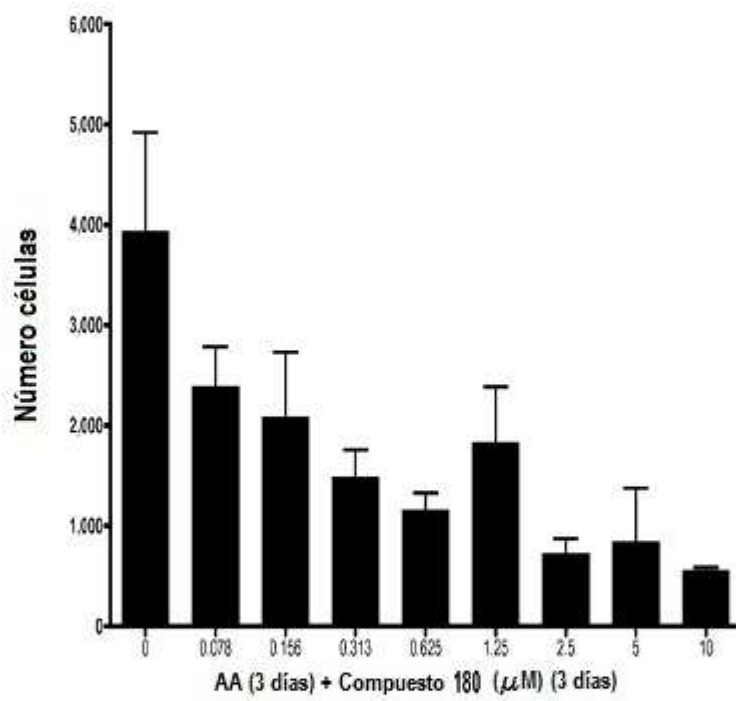


Figura 17C

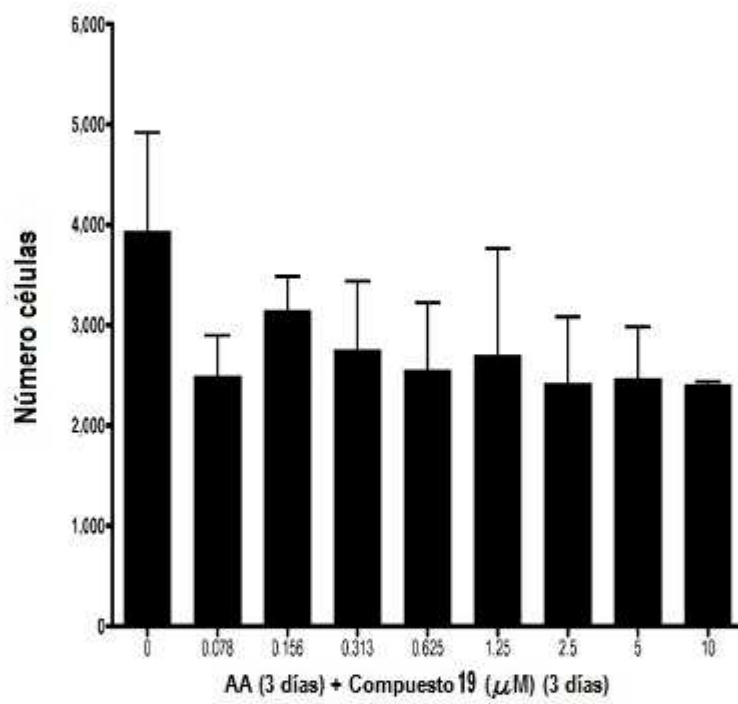


Figura 17D

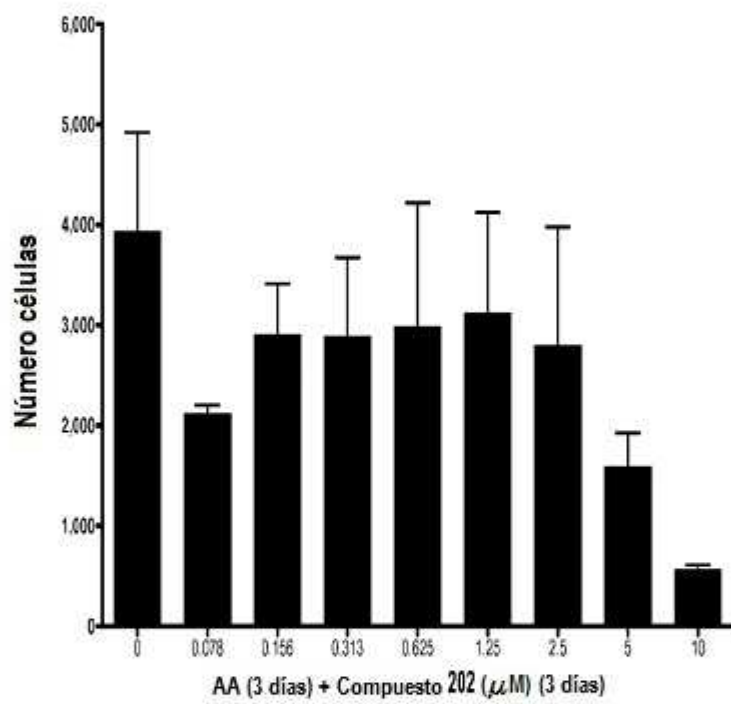


Figura 17E

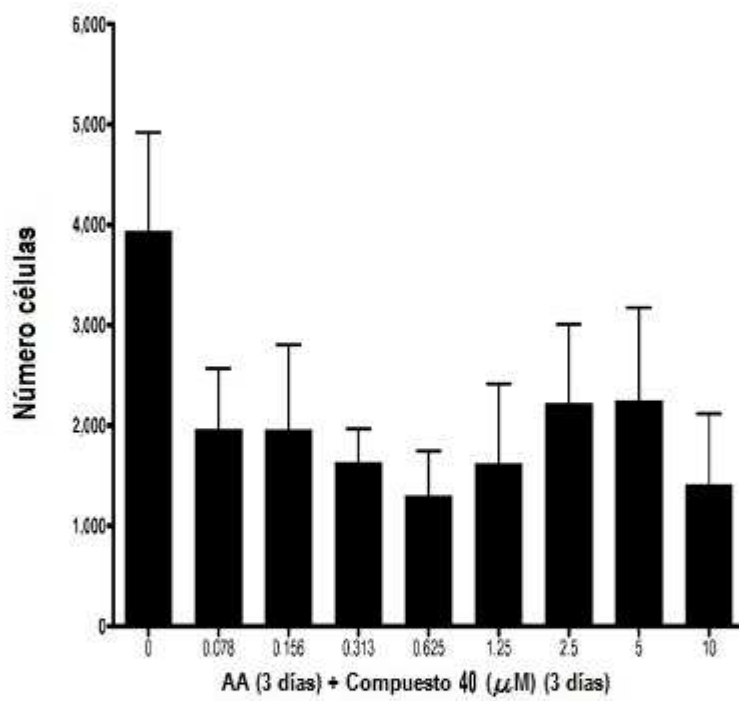


Figura 17F

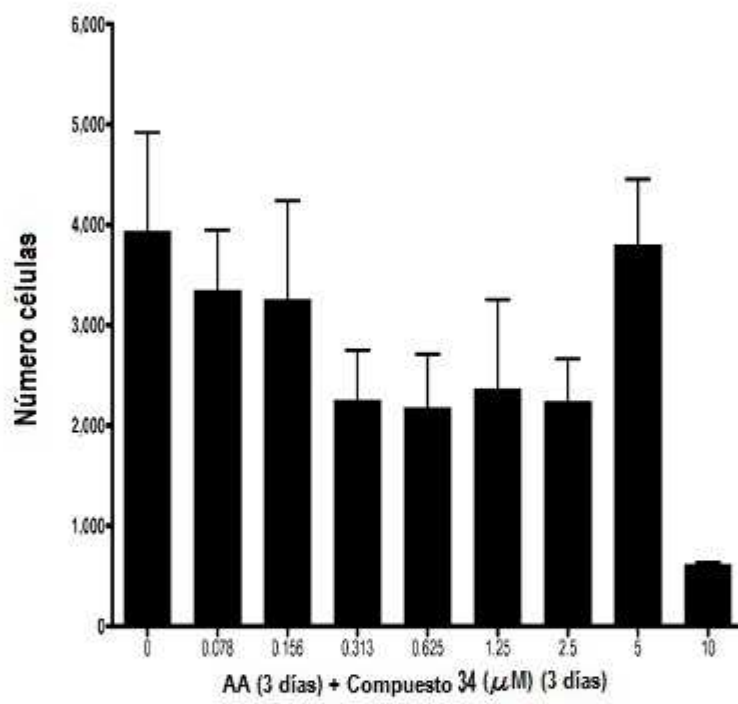


Figura 17G

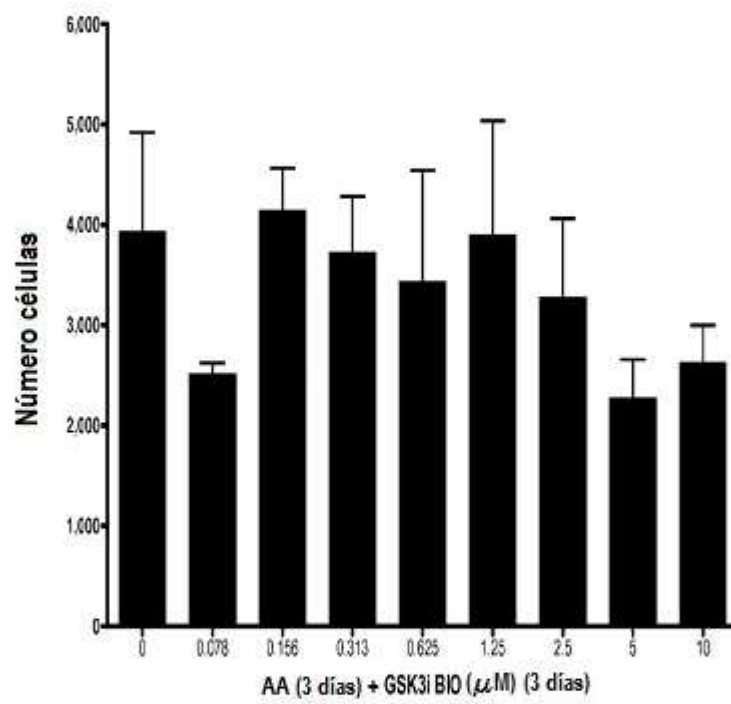




Figura 18A

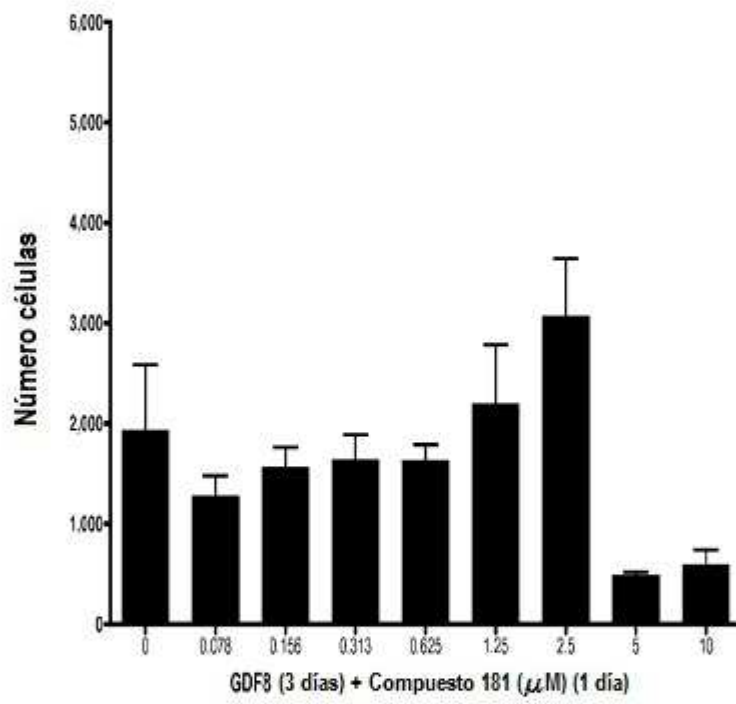


Figura 18B

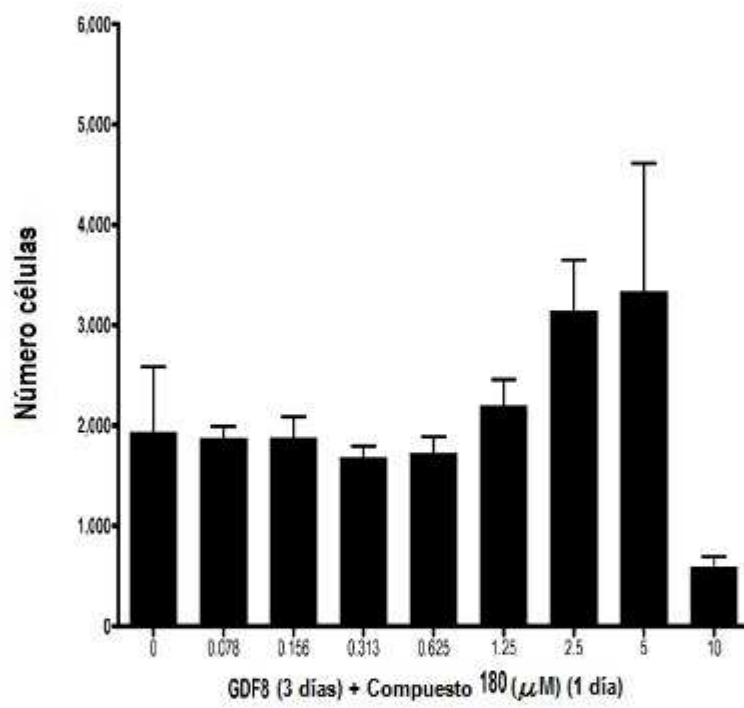


Figura 18C

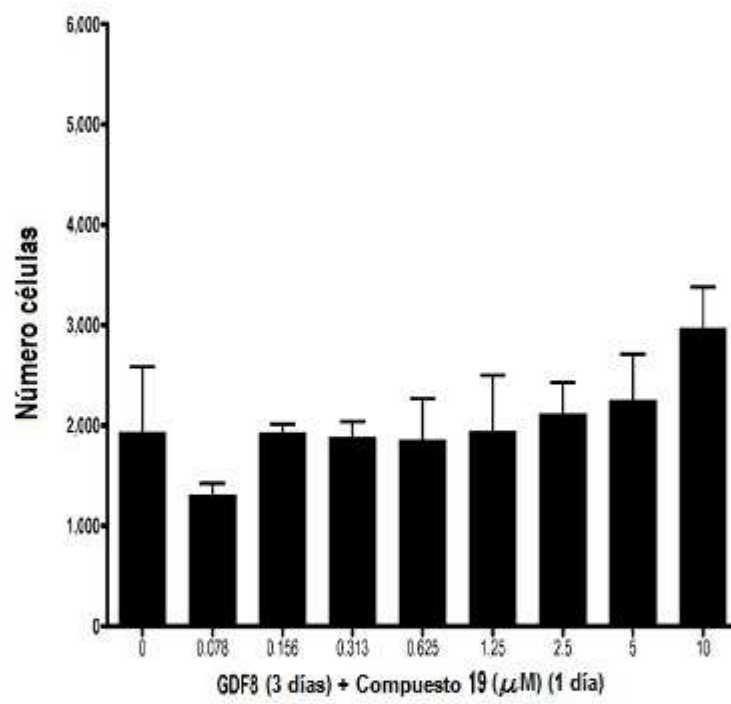


Figura 18D

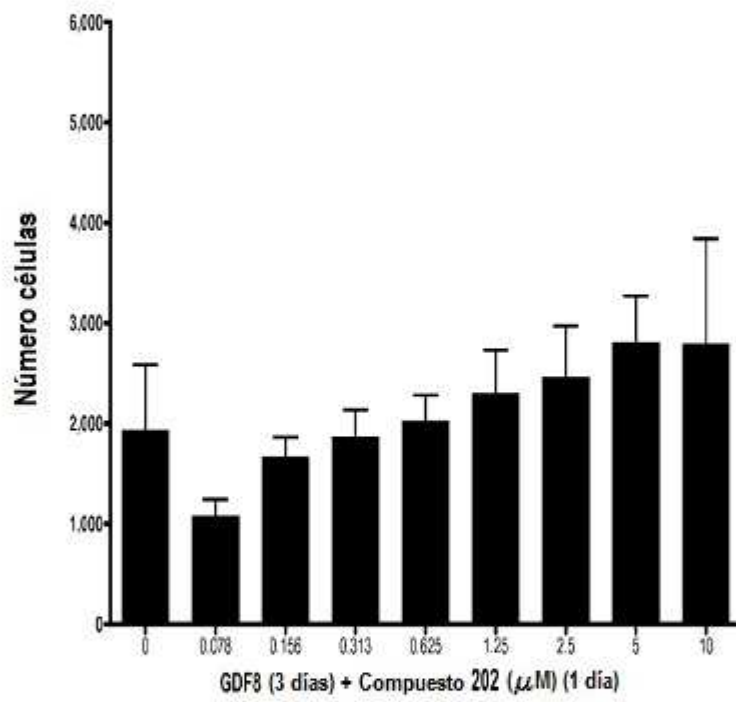


Figura 18E

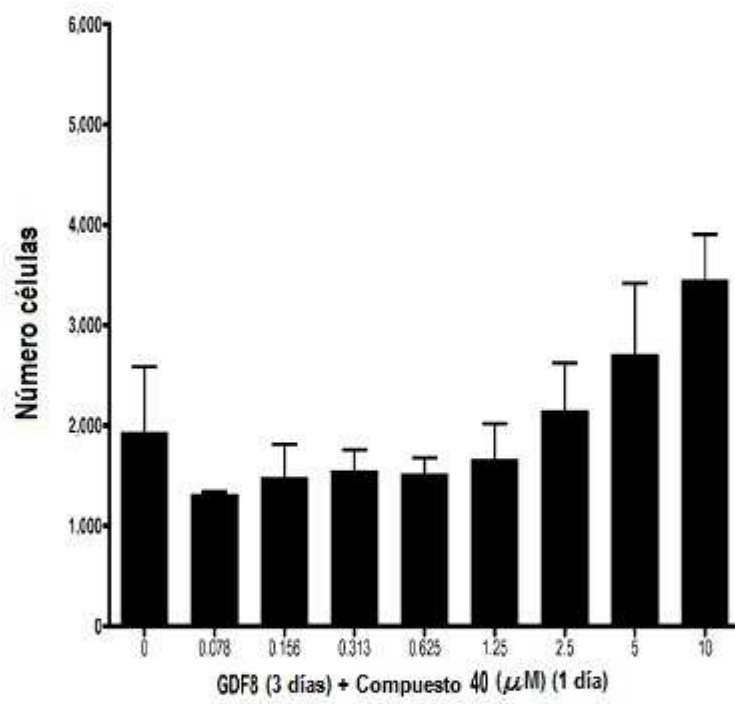


Figura 18F

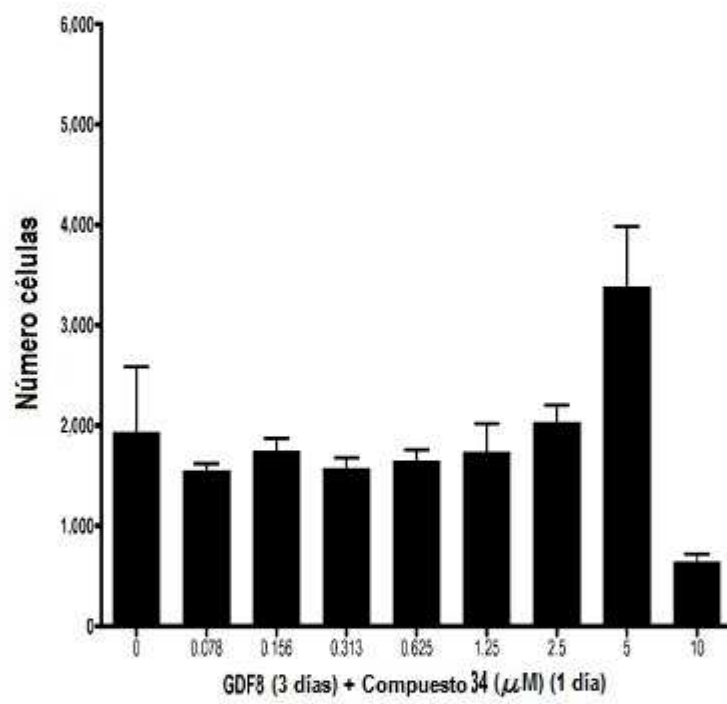


Figura 18G

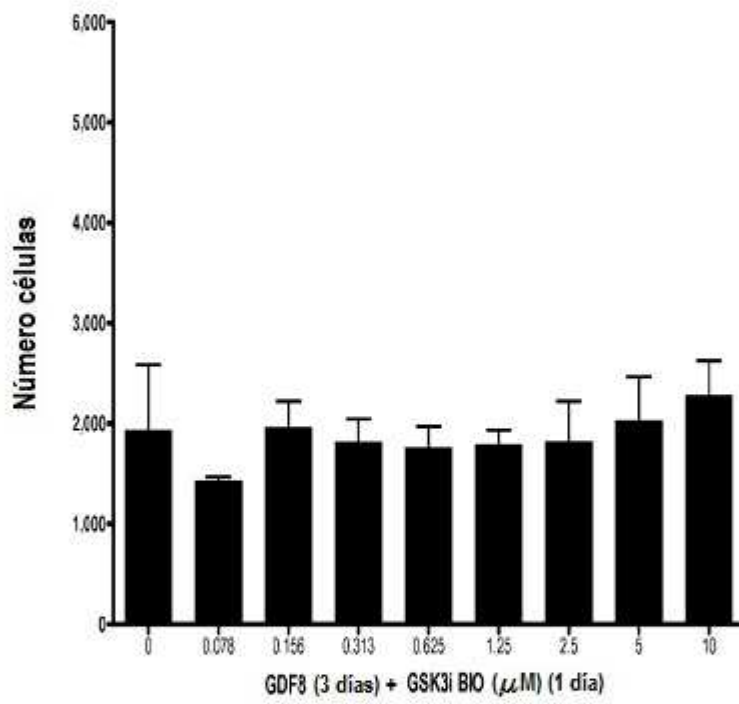


Figura 19A

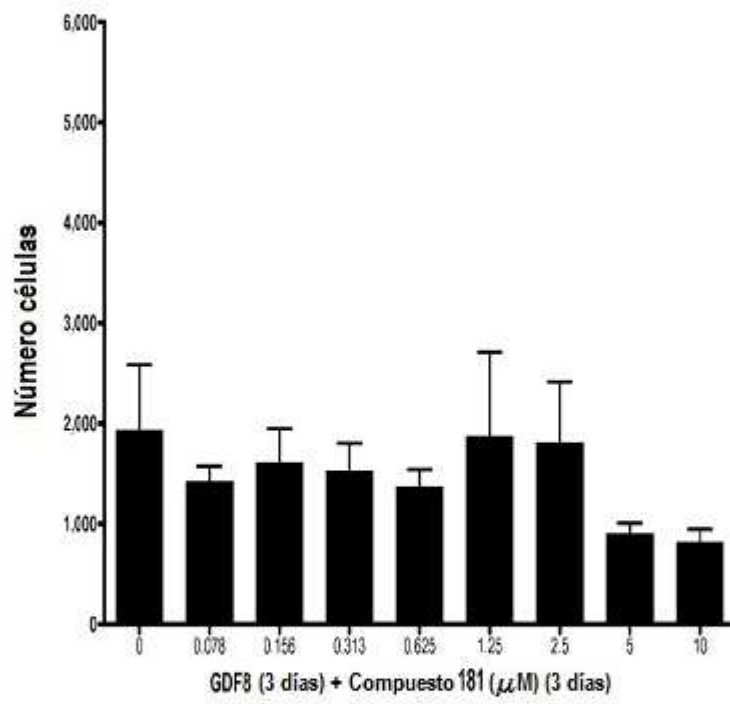




Figura 19B

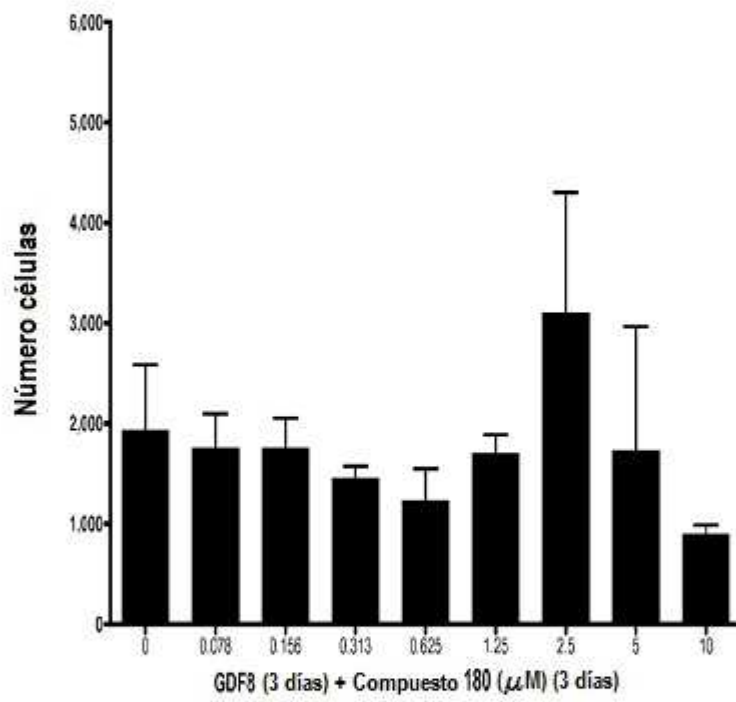


Figura 19C

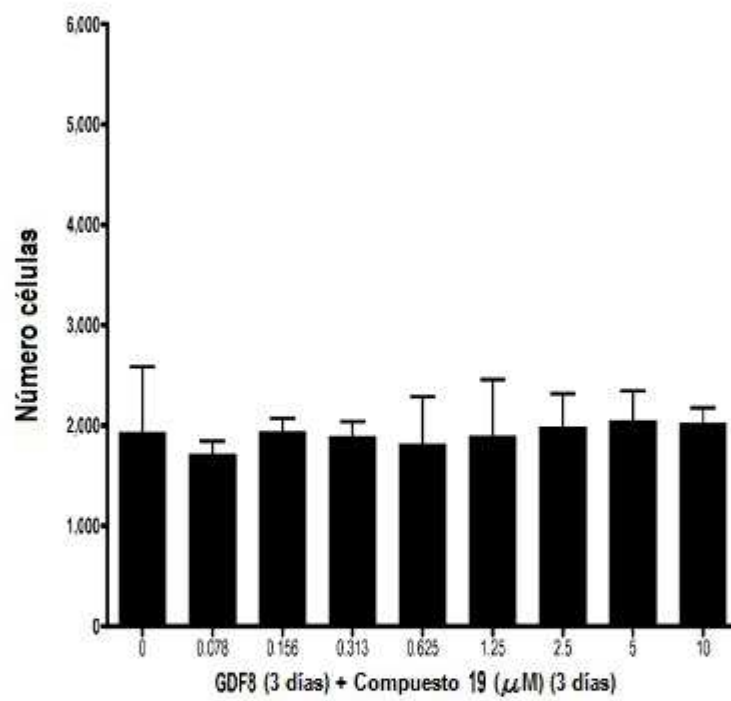


Figura 19D

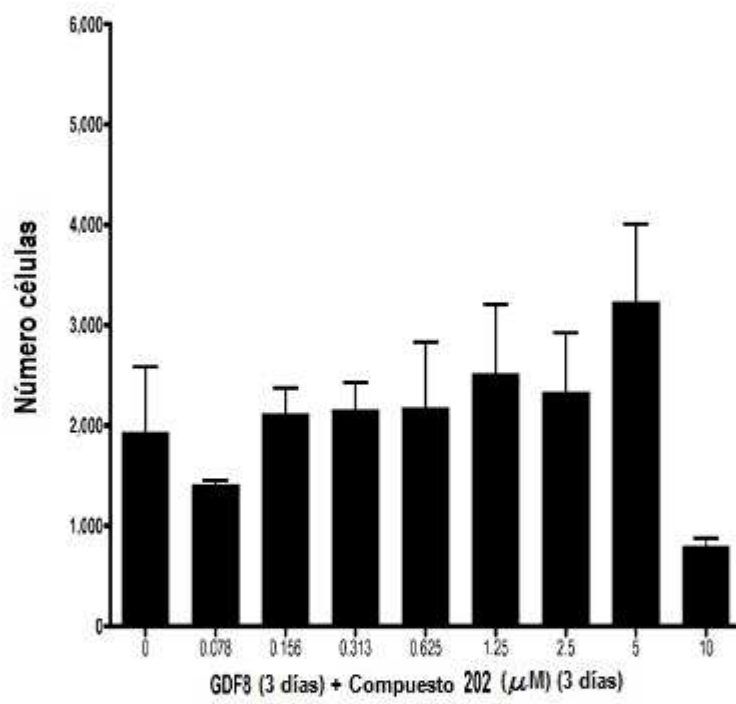


Figura 19E

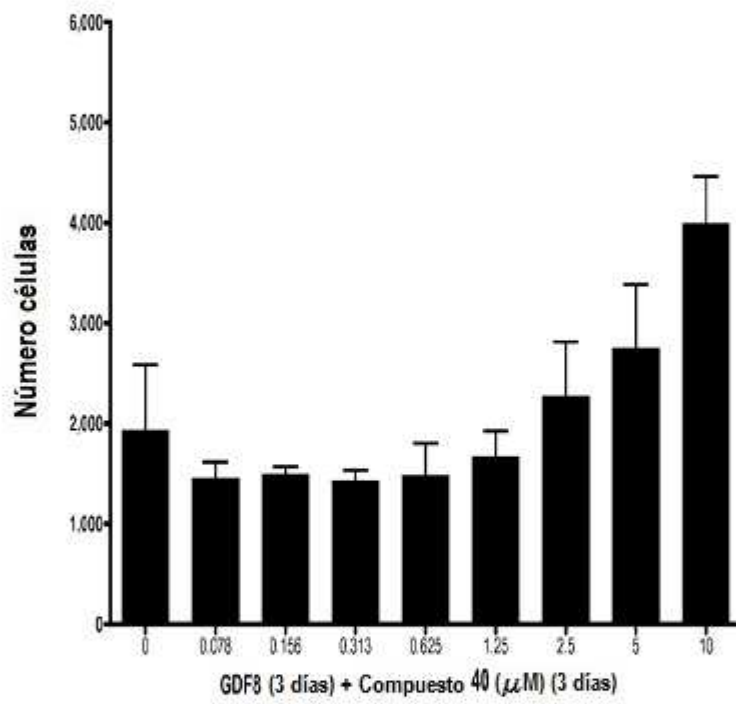


Figura 19F

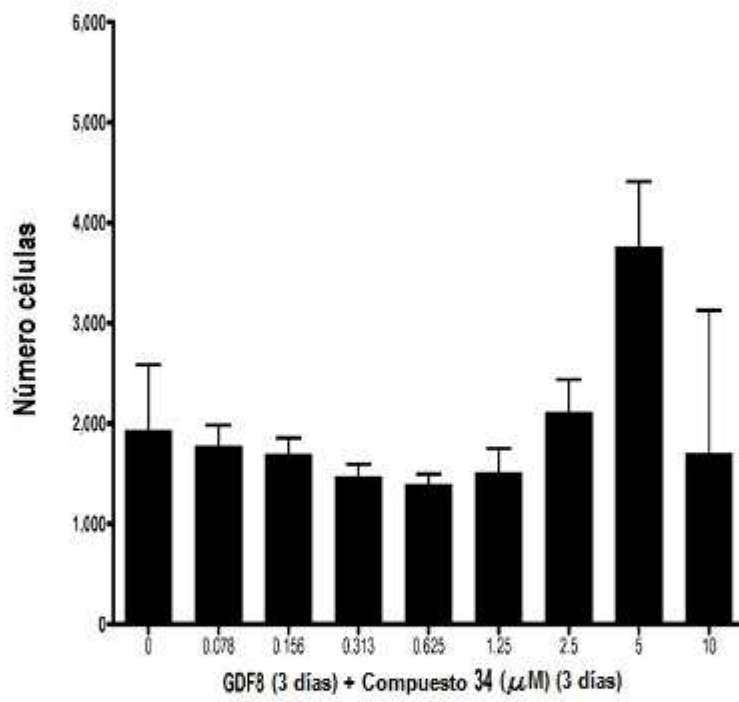


Figure 19G

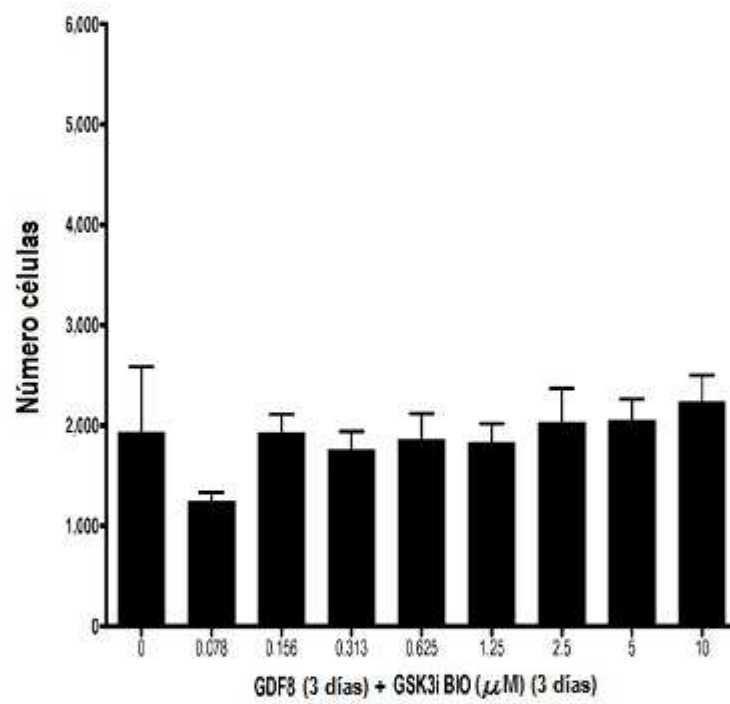


Figura 20A

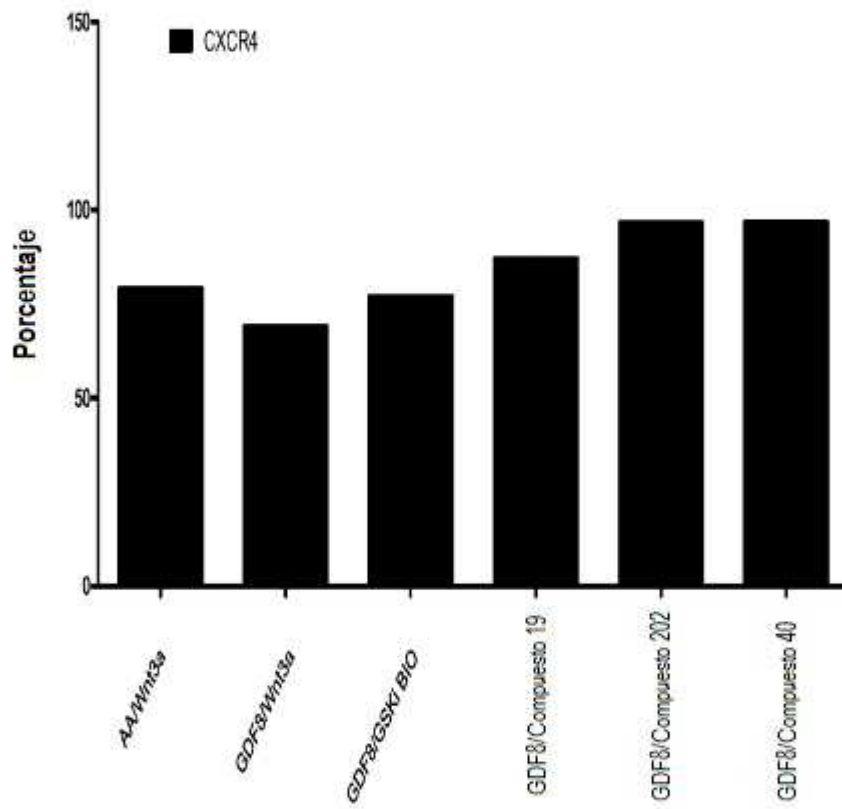
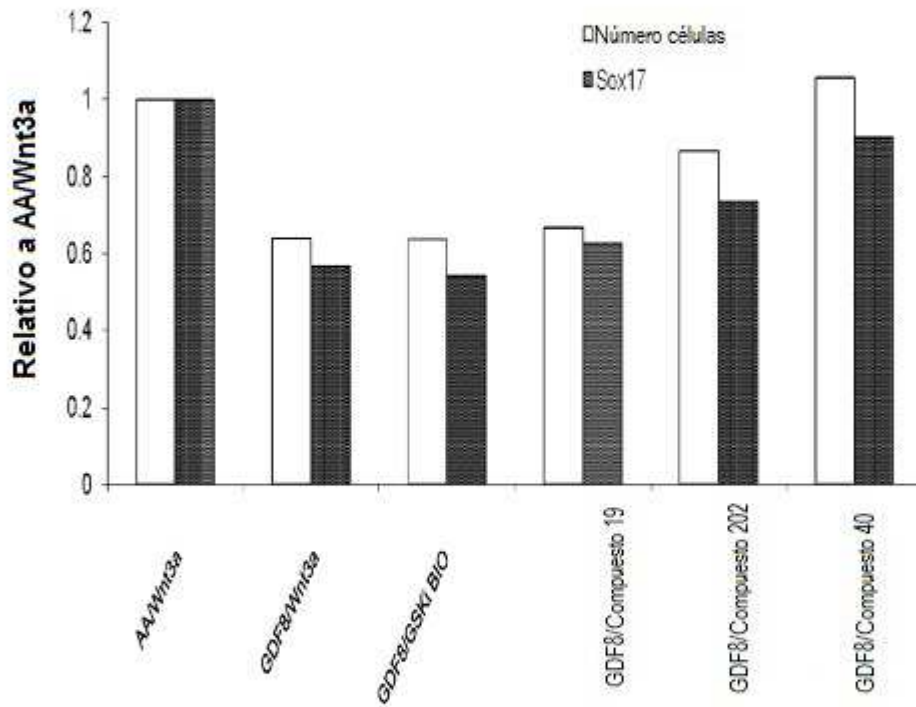


Figura 20B





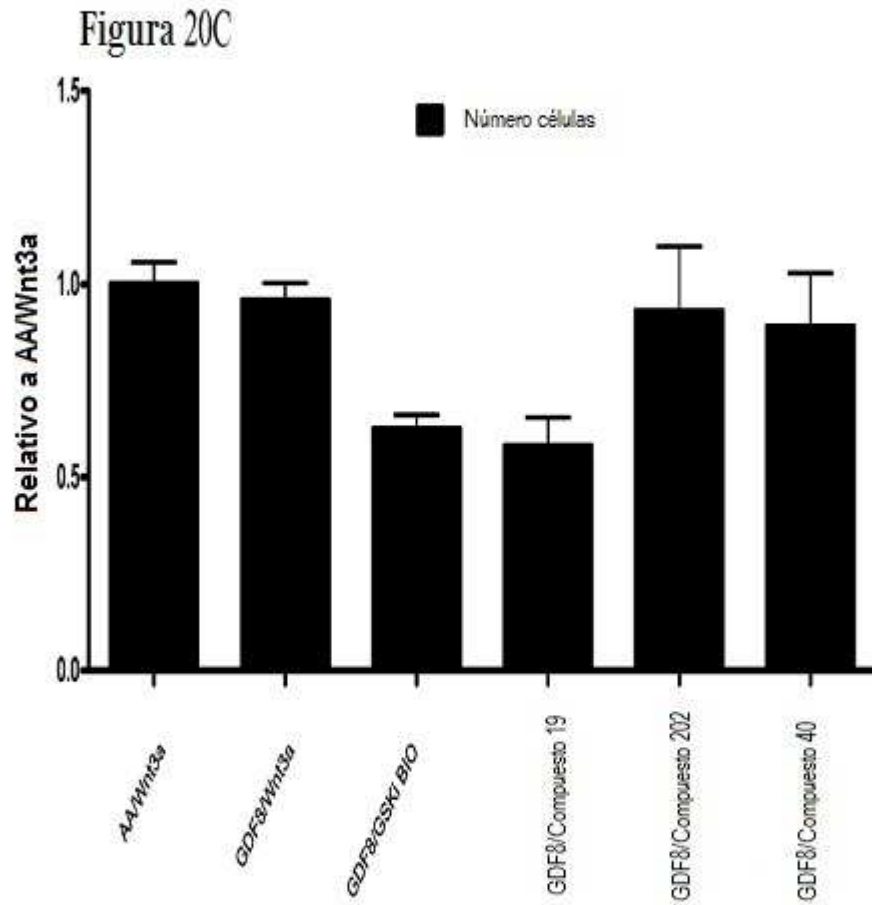


Figura 20D

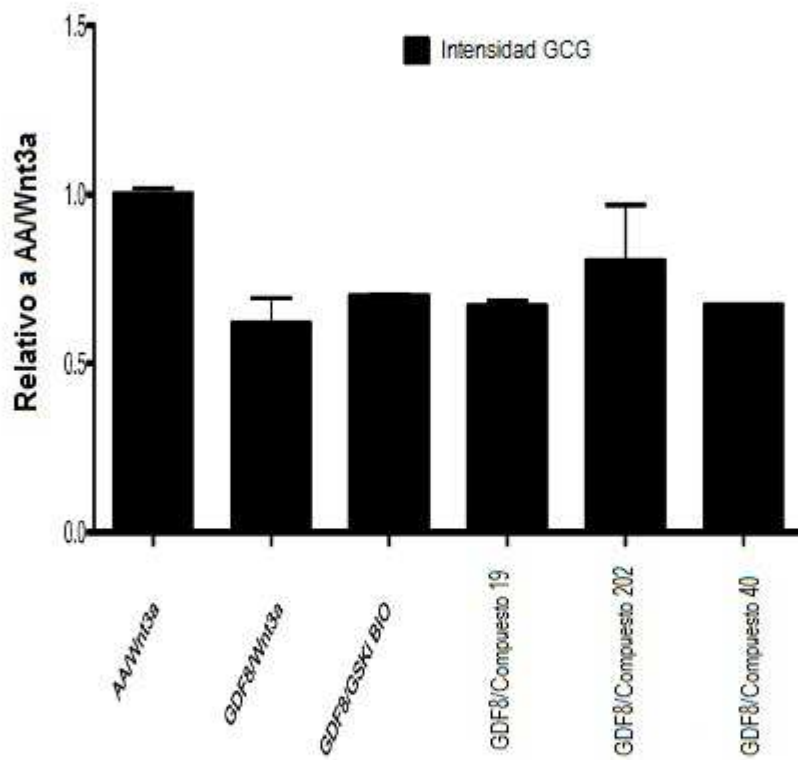


Figura 20E

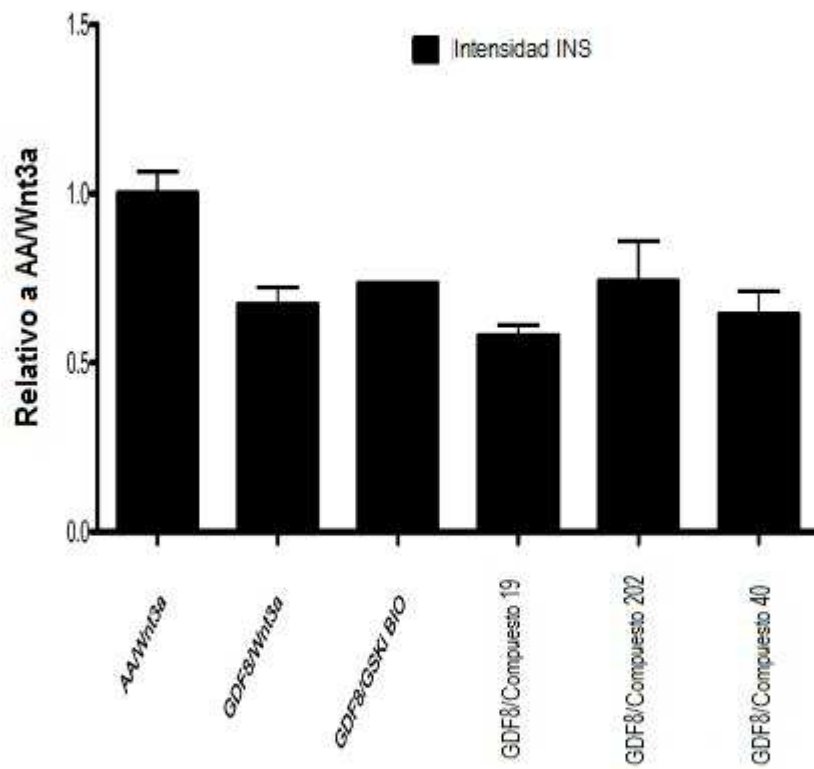


Figura 20F

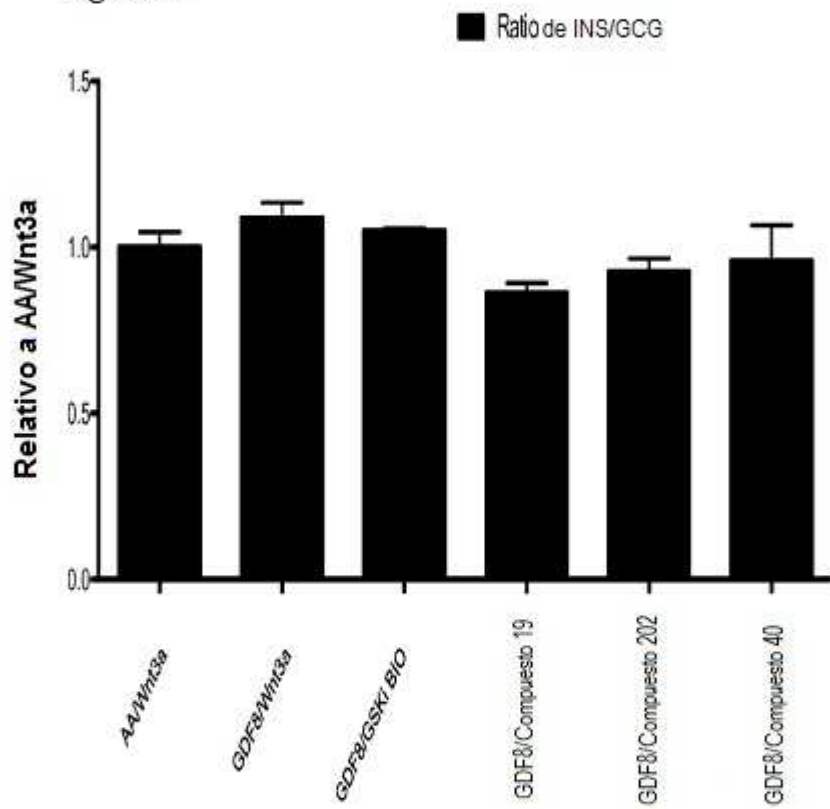


Figura 21A

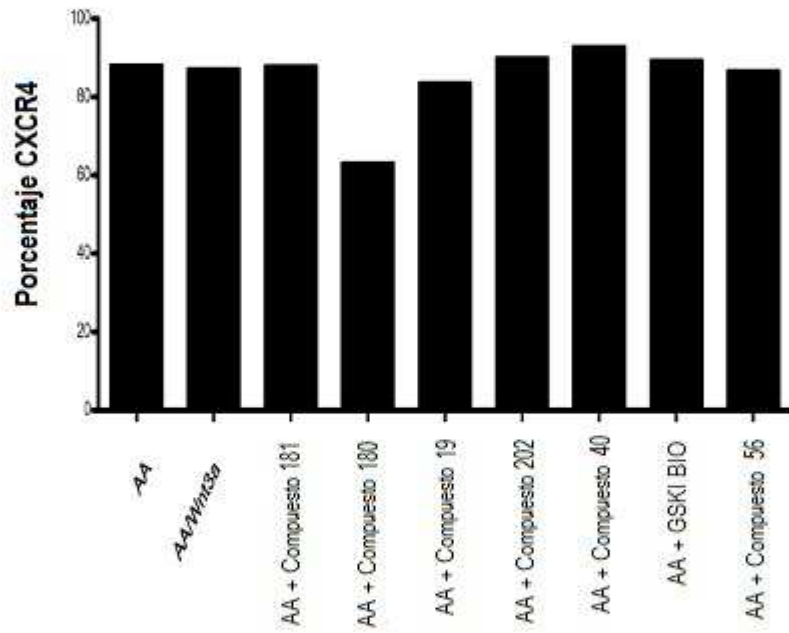


Figura 21B

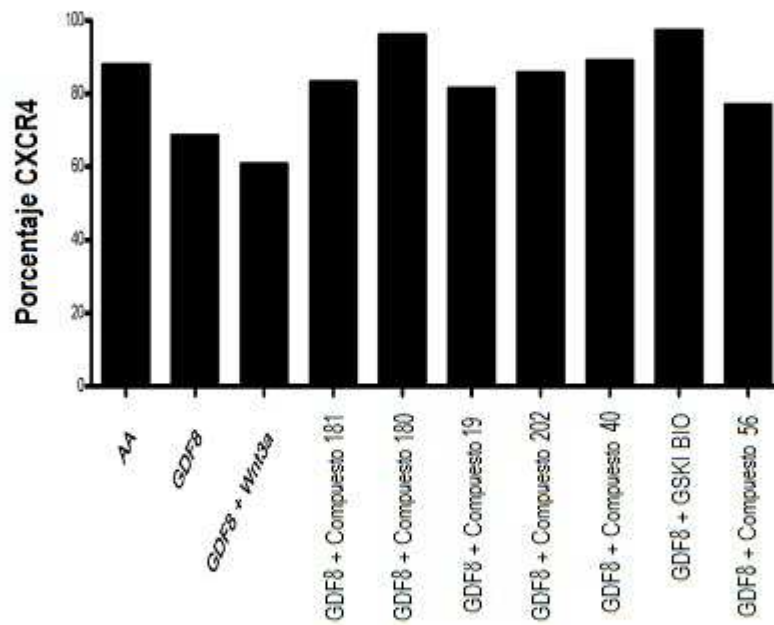
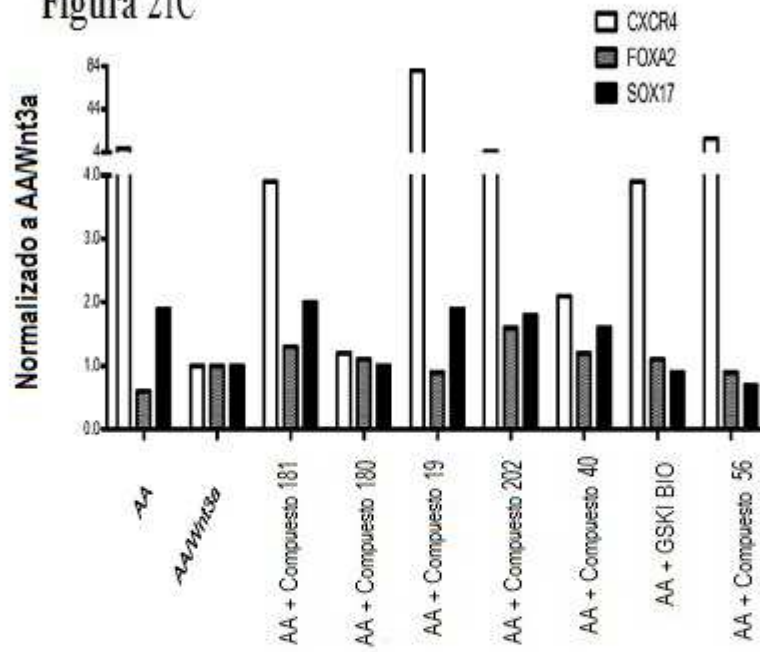
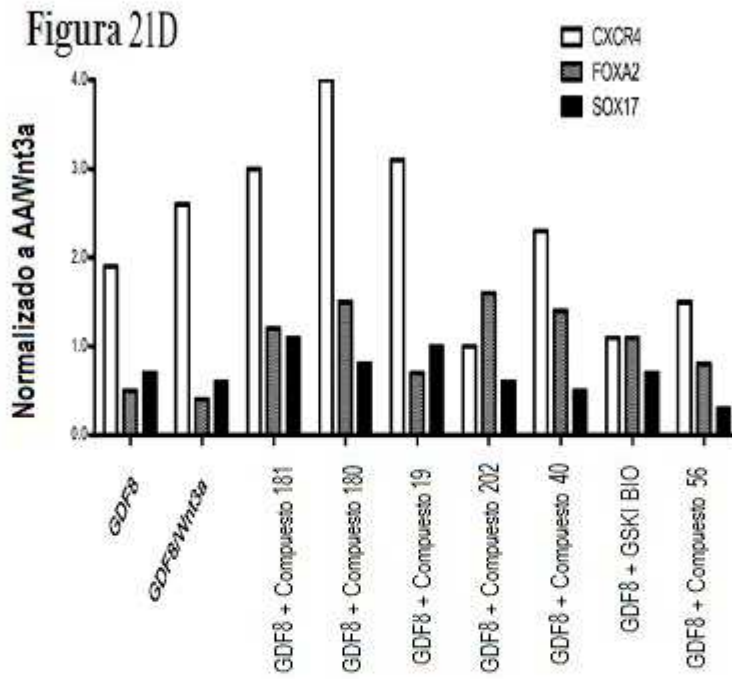


Figura 21C

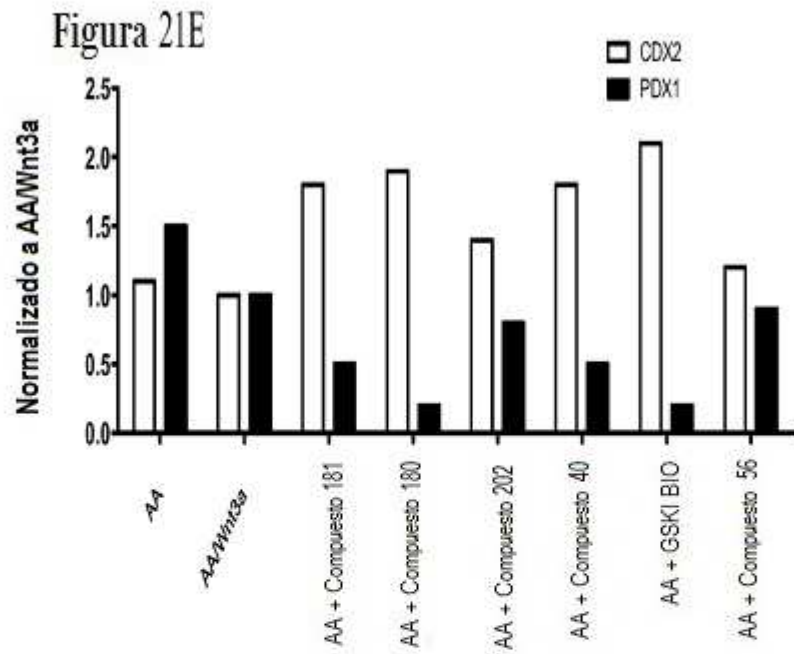


Compuesto/CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
ninguno	19.4	20.4	25.1	21.6
Wnt3a	19.2	22.0	22.9	21.2
Compuesto 181	20.1	22.0	25.6	22.2
Compuesto 180	19.4	22.0	24.0	21.4
Compuesto 19	20.1	17.7	25.6	22.3
Compuesto 202	20.3	22.0	25.7	22.6
Compuesto 40	19.9	22.7	25.5	22.3
GSK3i W(bio)	20.2	22.2	25.8	23.4
Compuesto 56	19.8	19.6	24.4	23.3



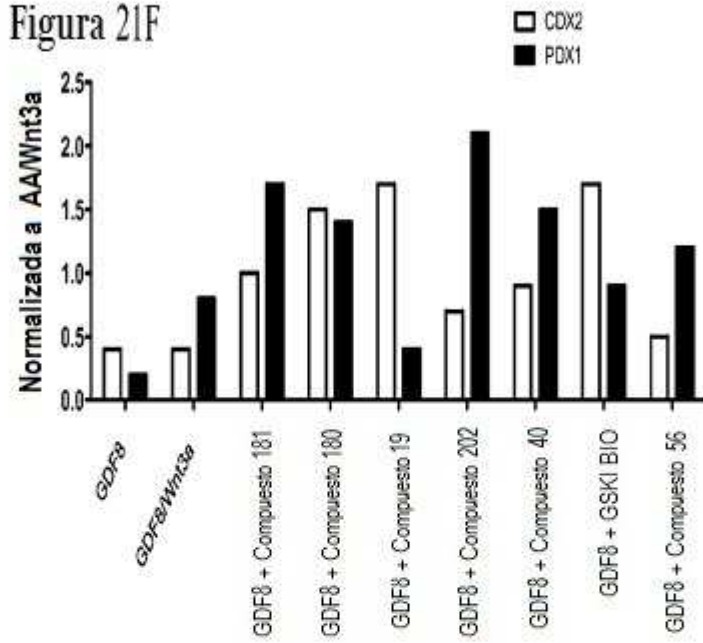
Compuesto/CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
ninguno	21.6	24.6	25.9	25.2
Wnt3a	21.2	23.6	25.7	25.0
Compuesto 181	20.7	23.0	25.2	23.7
Compuesto 180	20.9	22.7	25.0	24.2
Compuesto 19	19.6	21.8	24.2	22.6
Compuesto 202	18.5	22.4	23.6	22.3
Compuesto 40	19.7	22.4	24.9	23.7
GSK3 I(bio)	19.6	23.3	24.7	23.3
Compuesto 56	19.7	23.0	25.3	24.4



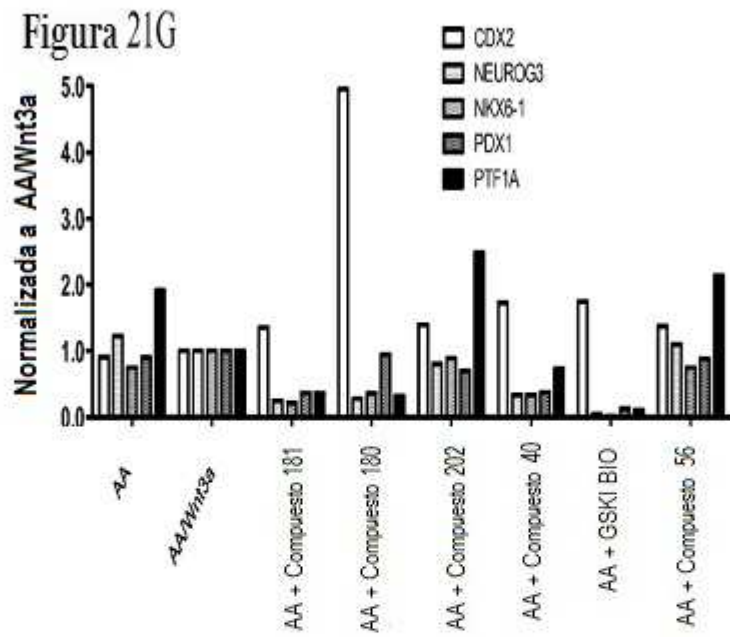


Compuesto/CT	GAPDH	CDX2	PDX1
ninguno	18.5	22.9	23.3
Wnt3a	18.4	23.0	23.8
Compuesto 181	18.6	22.3	25.0
Compuesto 180	18.8	22.5	26.3
Compuesto 202	18.5	22.5	24.1
Compuesto 40	18.5	22.2	24.8
GSK3i (bio)	18.5	22.0	26.1
Compuesto 56	18.3	22.7	23.9

Figura 21F

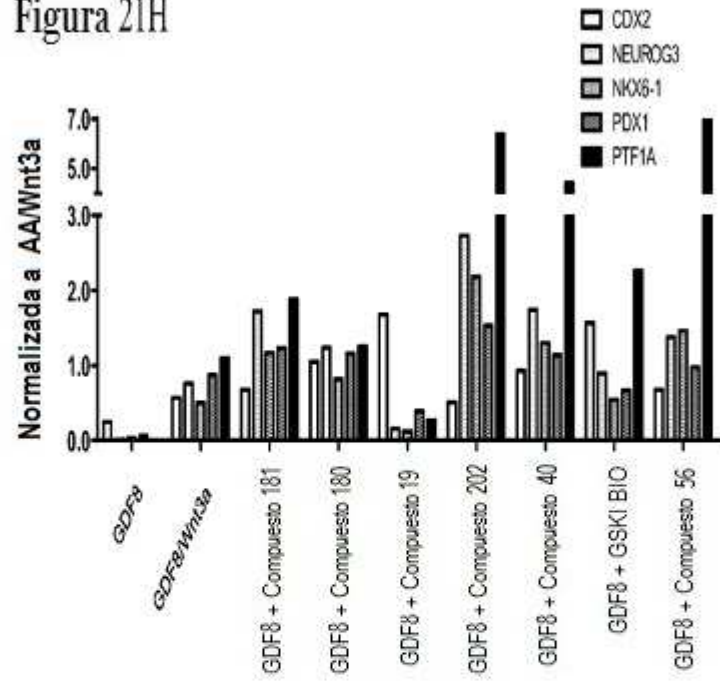


Compuesto/CT	GAPDH	CDX2	PDX1
none	18.0	23.8	25.5
Wnt3a	17.4	23.1	23.1
Compuesto 181	18.8	23.4	23.5
Compuesto 180	18.8	22.8	23.7
Compuesto 19	18.3	22.0	25.0
Compuesto 202	18.7	23.8	23.0
Compuesto 40	18.4	23.0	23.2
GSK3I (bio)	18.4	22.2	24.0
Compuesto 56	18.2	23.8	23.3



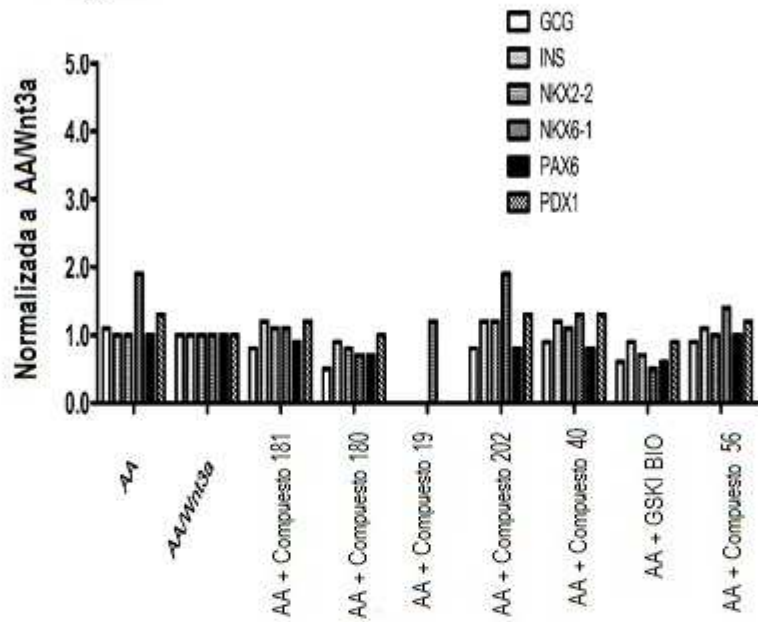
Compuesto/CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
ninguno	19.0	23.7	23.3	27.4	23.7	26.6
Wnt3a	19.5	24.1	24.1	27.5	24.1	31.1
Compuesto 181	18.0	22.1	24.6	28.1	24.0	31.0
Compuesto 180	19.4	21.6	25.8	28.9	24.0	32.6
Compuesto 202	19.2	23.3	24.1	27.4	24.3	29.5
Compuesto 40	19.2	22.9	25.3	28.7	25.1	31.2
GSK3i (bio)	19.0	22.7	27.7	32.9	26.5	33.7
Compuesto 56	18.8	22.9	23.3	27.2	23.6	29.3

Figura 21H

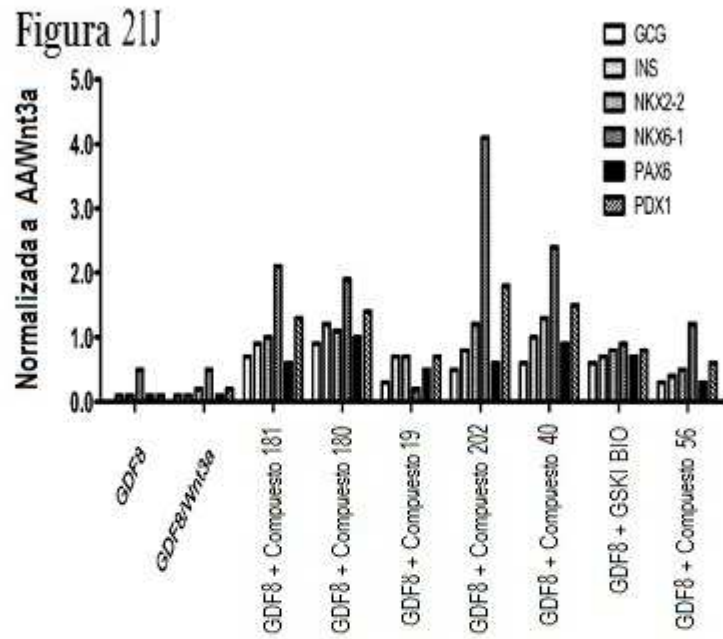


Compuesto/CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
none	18.0	24.6	28.7	31.2	26.5	40.0
Wnt3a	19.0	24.4	24.0	28.0	23.8	30.5
Compuesto 181	18.0	23.1	21.8	25.7	22.3	28.6
Compuesto 180	19.5	23.9	23.7	27.7	23.8	30.7
Compuesto 19	19.1	22.9	26.4	30.2	25.1	32.6
Compuesto 202	19.0	24.5	22.2	25.9	23.0	27.9
Compuesto 40	19.0	23.6	22.7	26.6	23.4	28.4
GSK3i (bio)	19.1	23.0	23.8	27.9	24.2	29.5
Compuesto 56	18.9	24.0	23.0	26.3	23.5	27.7

Figura 211



Compuesto/CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
none	18.3	14.1	14.9	23.7	25.5	24.0	23.2
Wnt3a	18.0	14.0	14.6	23.4	26.1	23.7	23.3
Compuesto 181	18.0	14.3	14.5	23.3	26.1	24.0	23.1
Compuesto 180	18.0	14.9	14.7	23.8	26.5	24.3	23.2
Compuesto 19	17.9	27.0	26.9	28.0	25.8	28.6	29.4
Compuesto 202	18.6	14.9	15.0	23.7	25.8	24.7	23.6
Compuesto 40	18.3	14.6	14.7	23.5	26.1	24.4	23.2
GSK3i (bio)	18.3	15.1	15.1	24.2	27.5	24.9	23.8
Compuesto 56	18.2	14.4	14.8	23.6	25.9	24.1	23.3



Compuesto/CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
ninguno	17.4	18.1	17.7	25.9	26.6	26.6	25.6
Wnt3a	17.8	17.7	17.5	25.6	27.0	26.5	25.6
Compuesto 181	18.0	14.5	14.8	23.4	25.0	24.4	23.0
Compuesto 180	18.0	14.2	14.4	23.2	25.1	23.8	22.9
Compuesto 19	18.3	16.2	15.6	24.3	28.6	25.2	24.2
Compuesto 202	18.7	15.7	15.8	23.8	24.8	25.2	23.2
Compuesto 40	18.1	14.8	14.8	23.2	25.0	24.1	22.9
GSK3i (Wnt)	18.4	15.2	15.5	24.2	26.7	24.8	24.0
Compuesto 56	18.0	16.0	16.0	24.4	25.9	25.4	24.0

Figura 21K

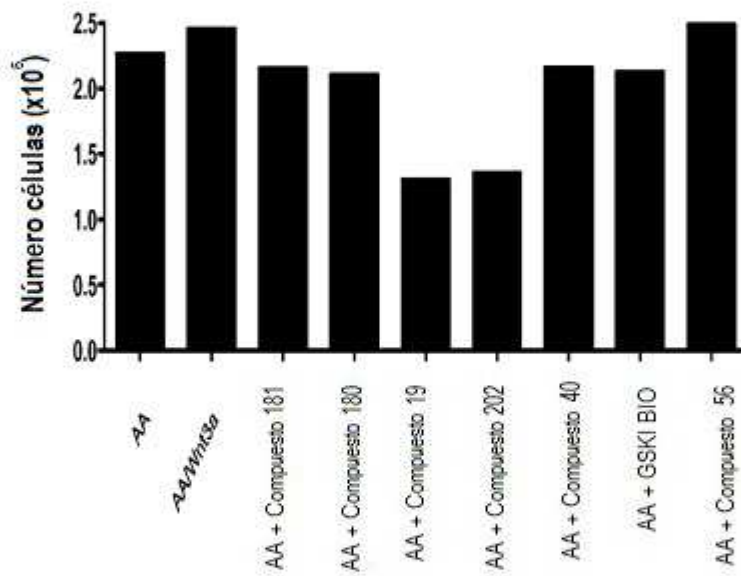


Figura 21L

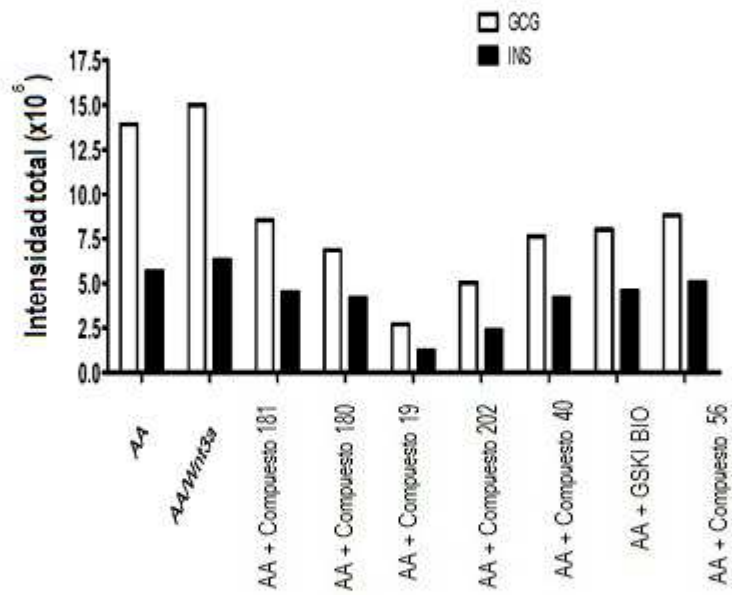




Figura 21M

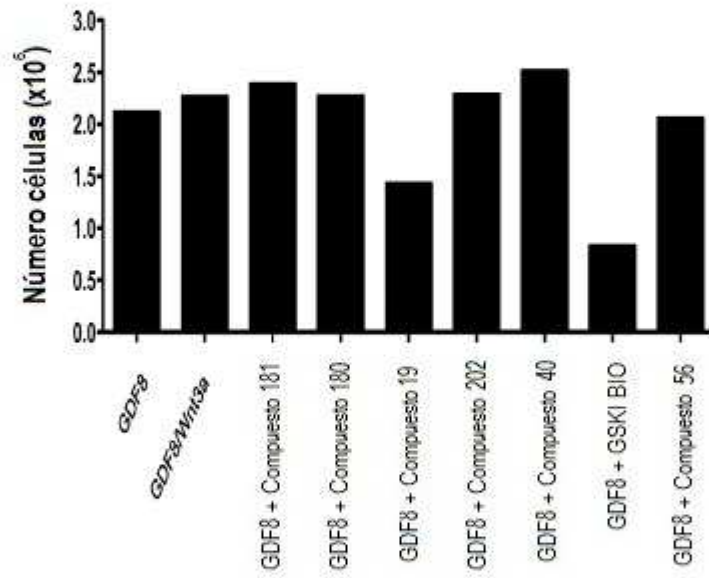


Figura 21N

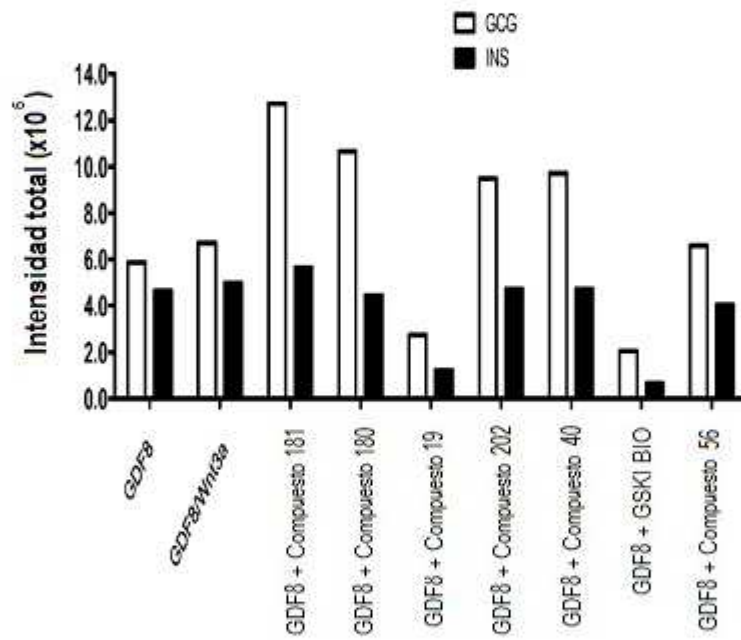


Figura 22A

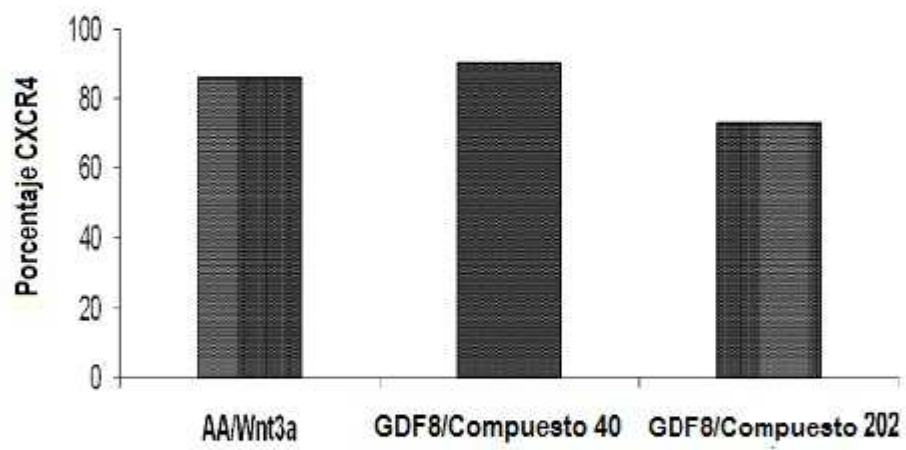


Figura 22B

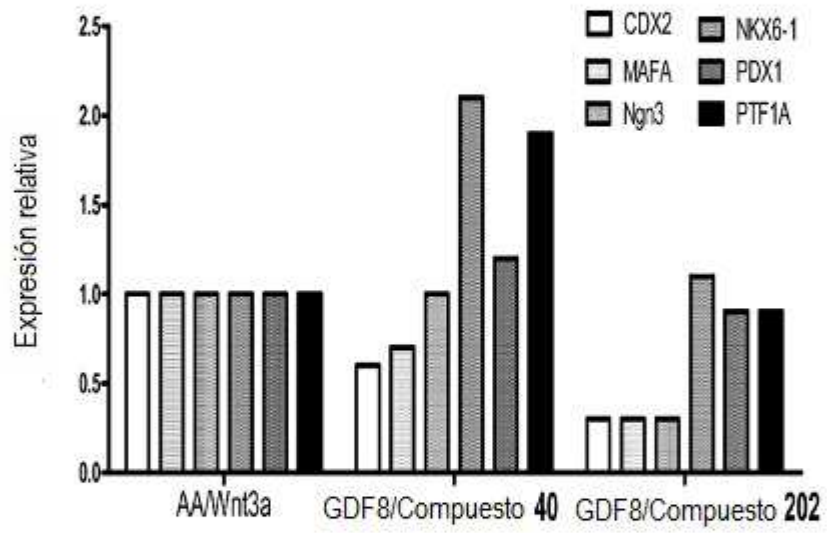


Figura 23A

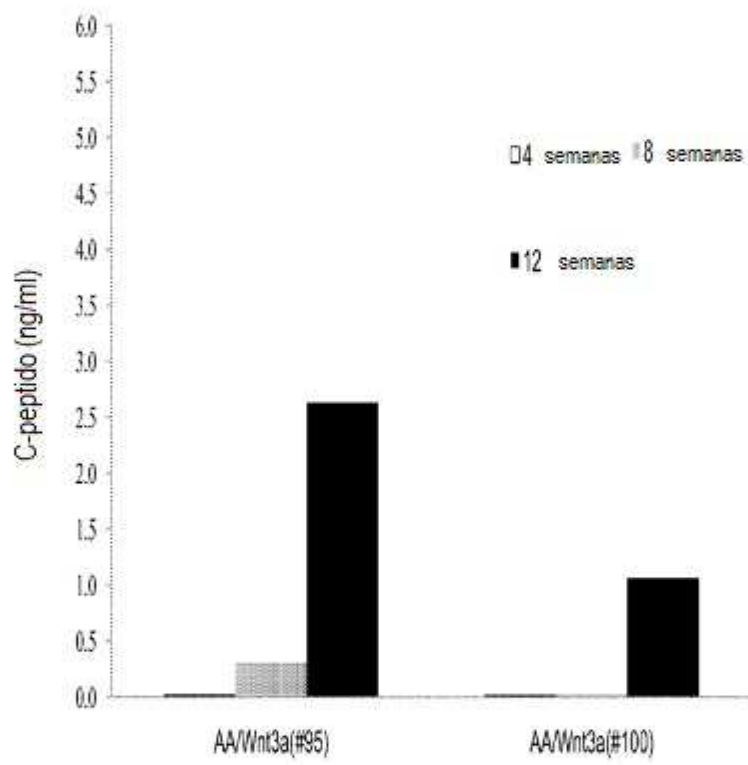


Figura 23B

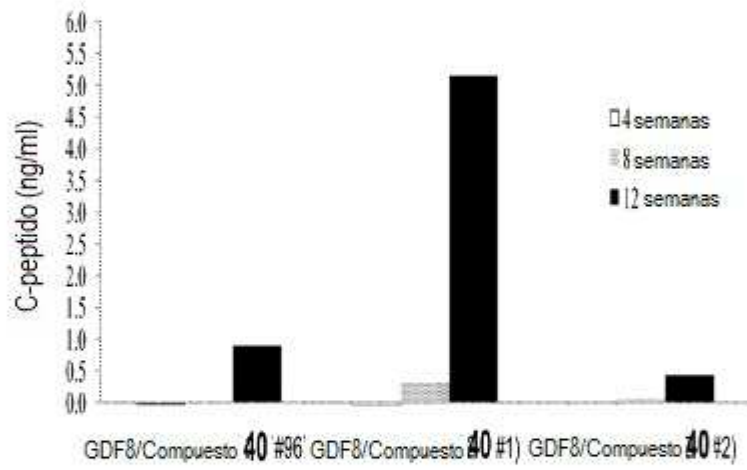


Figura 23C

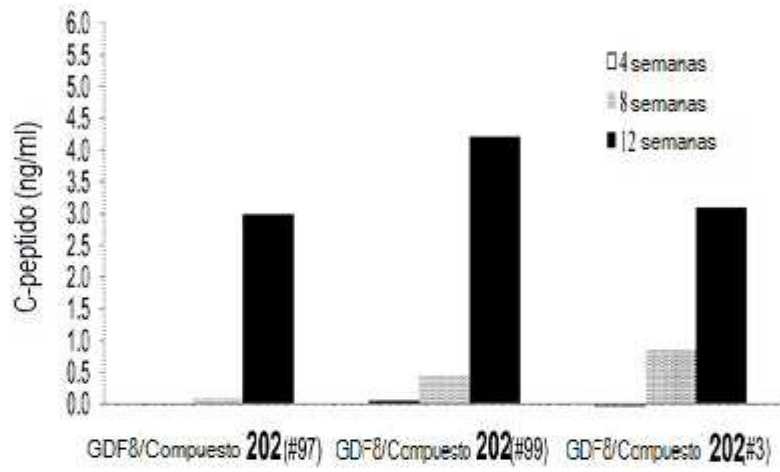


Figura 24A

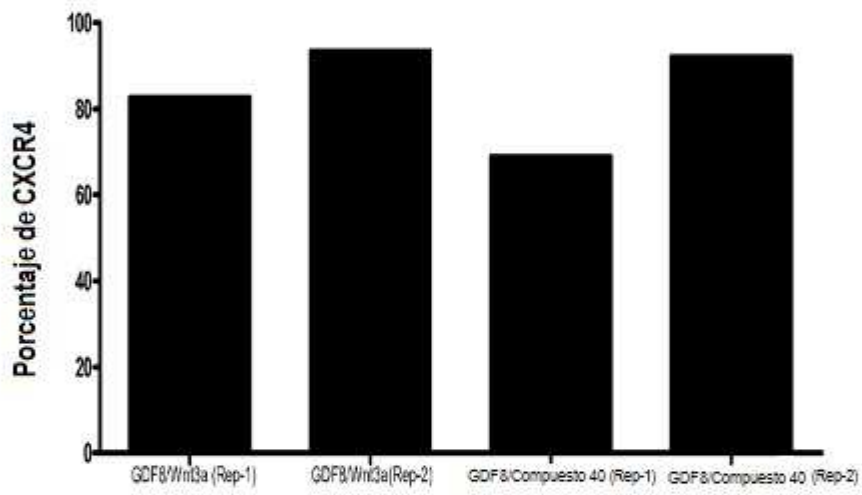
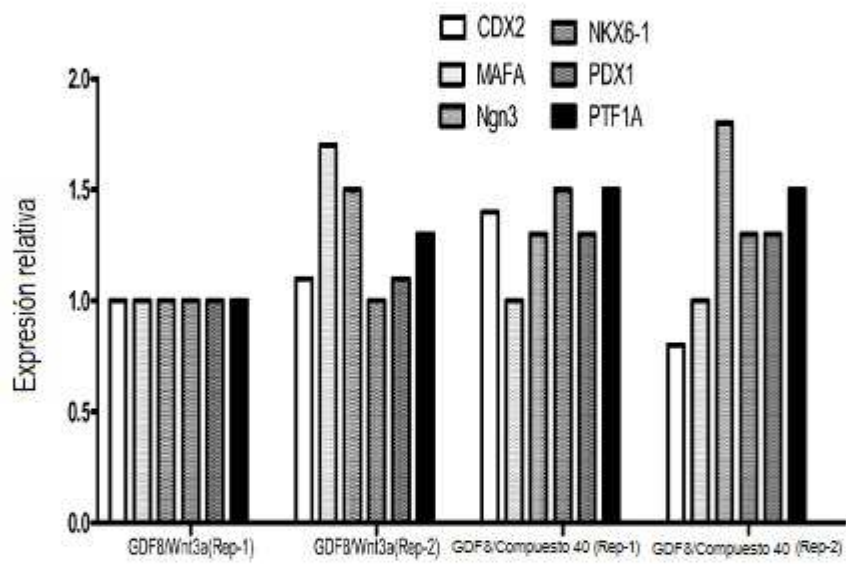




Figura 24B



Tratamiento/CTs	GAPDH	CDX2	MAFA	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
GDF8/Wnt3a (réplica 1)	19.0	24.8	31.0	24.1	24.3	22.5	25.4
GDF8/Wnt3a (réplica 2)	18.6	24.3	29.8	23.1	23.9	22.0	24.7
GDF8/Compuesto 40 (réplica 1)	19.3	24.6	31.3	23.9	24.0	22.3	25.0
GDF8/Compuesto 40 (réplica 2)	18.7	24.9	30.6	22.9	23.7	21.8	24.5

Figura 24C

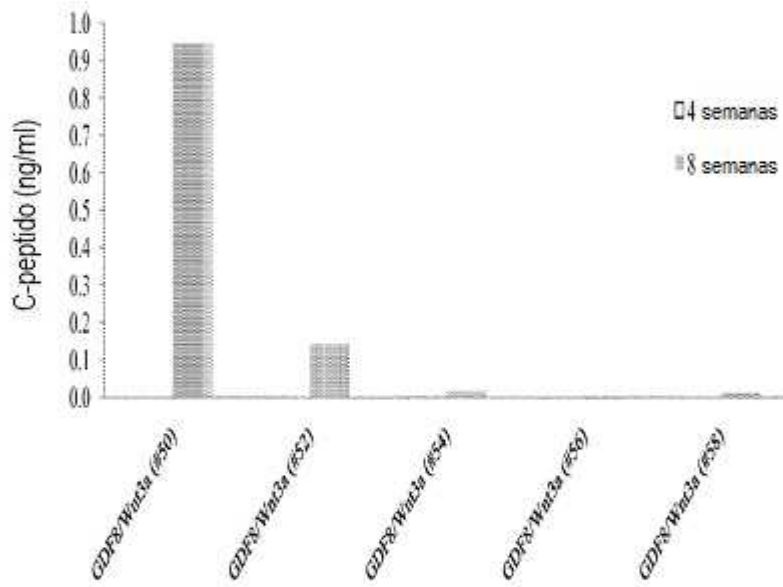


Figura 24D

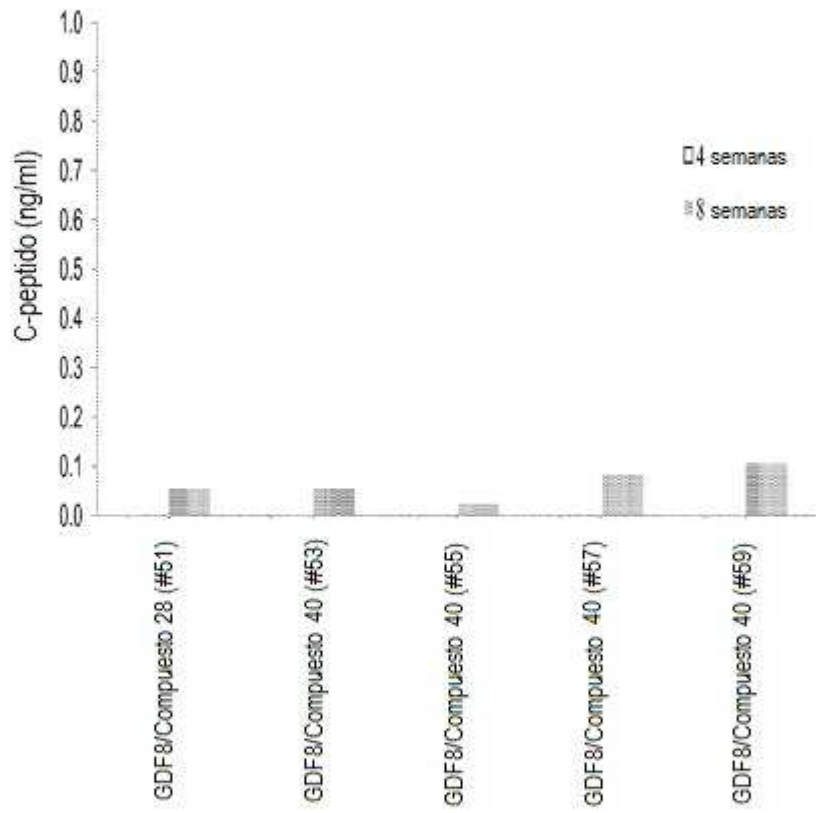


Figura 25A

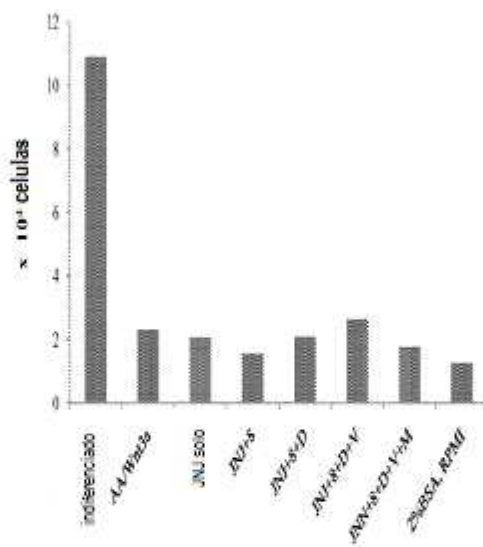


Figura 25B

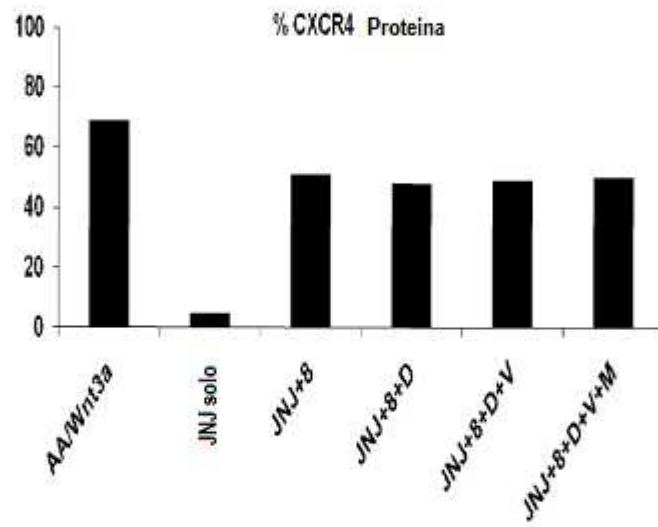


Figura 26A

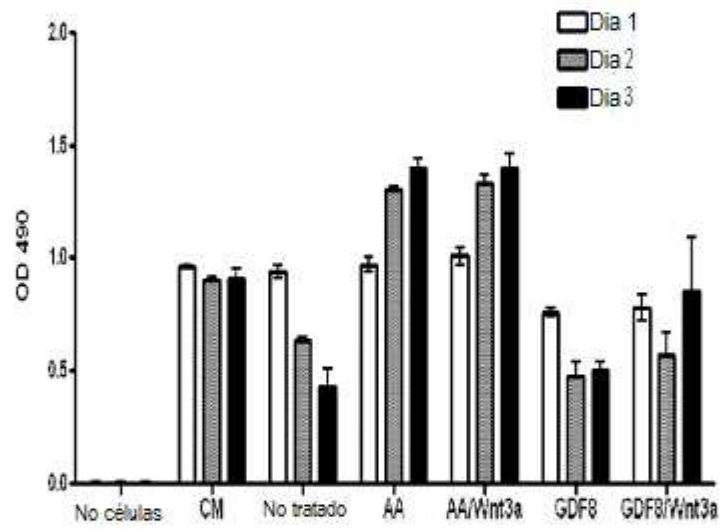


Figura 26B

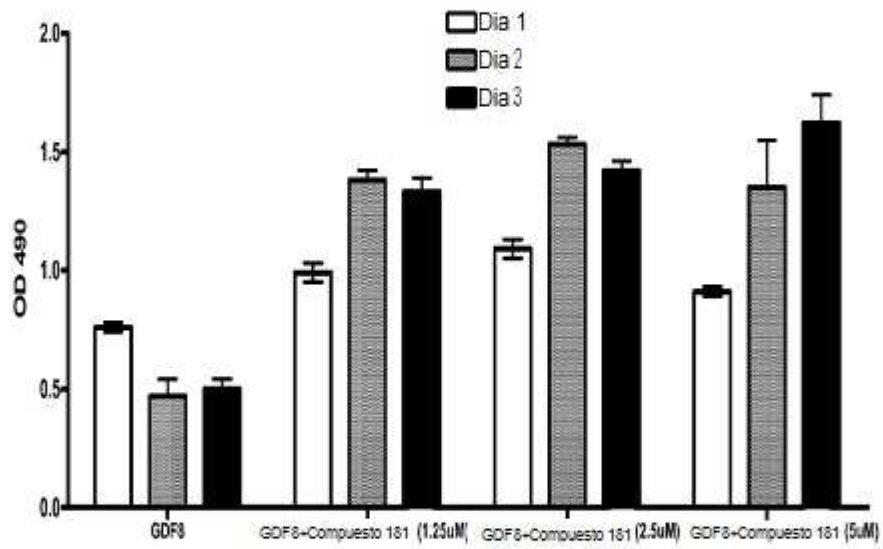


Figura 26C

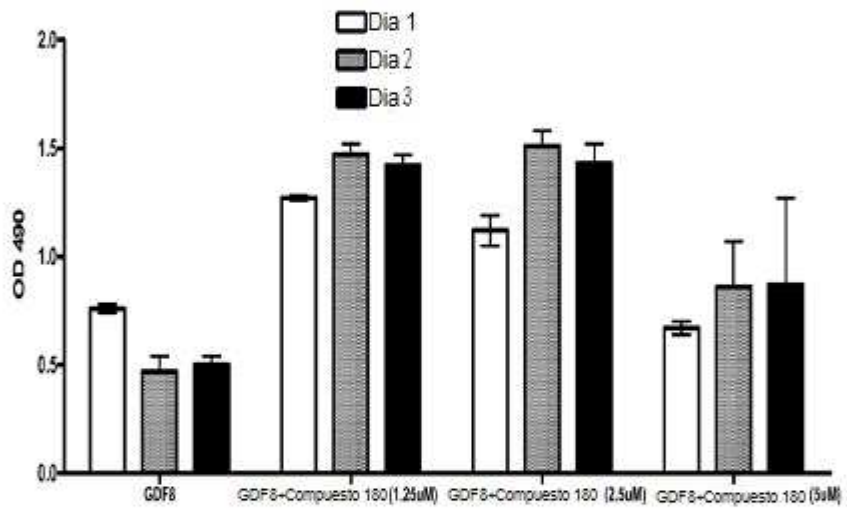




Figura 26D

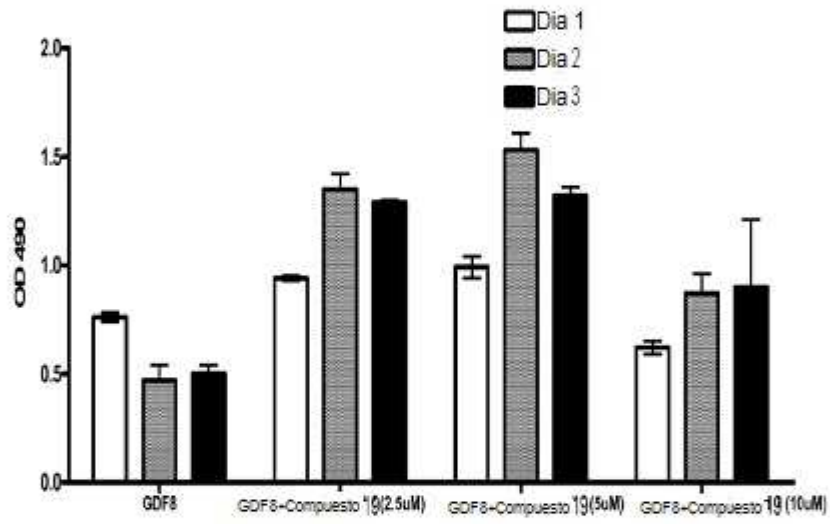


Figura 26E

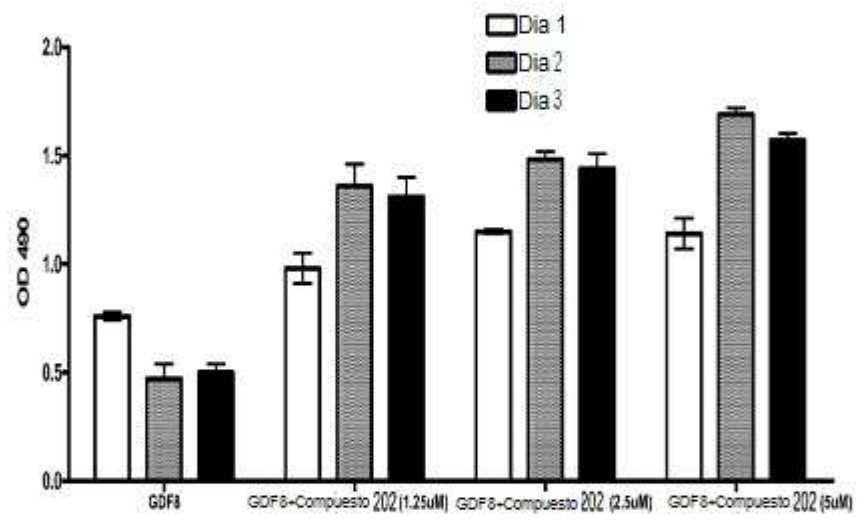


Figura 26F

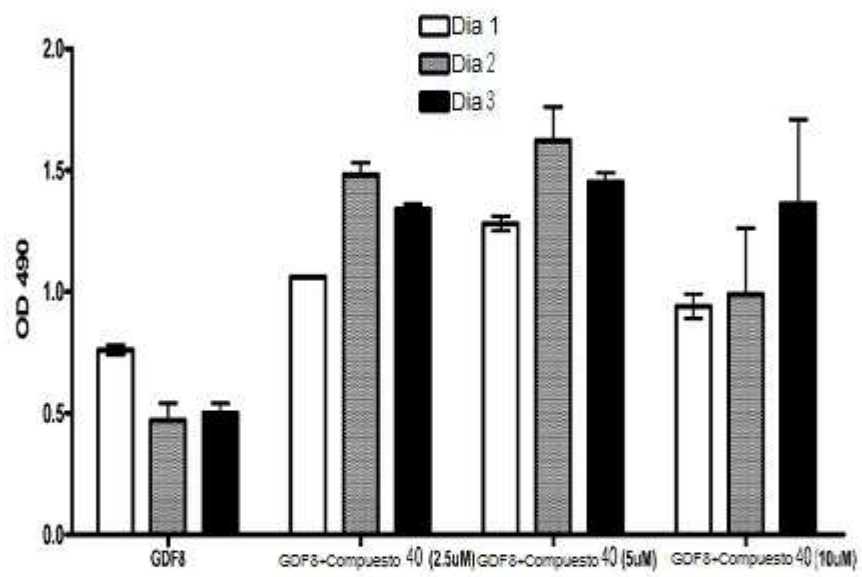


Figura 26G

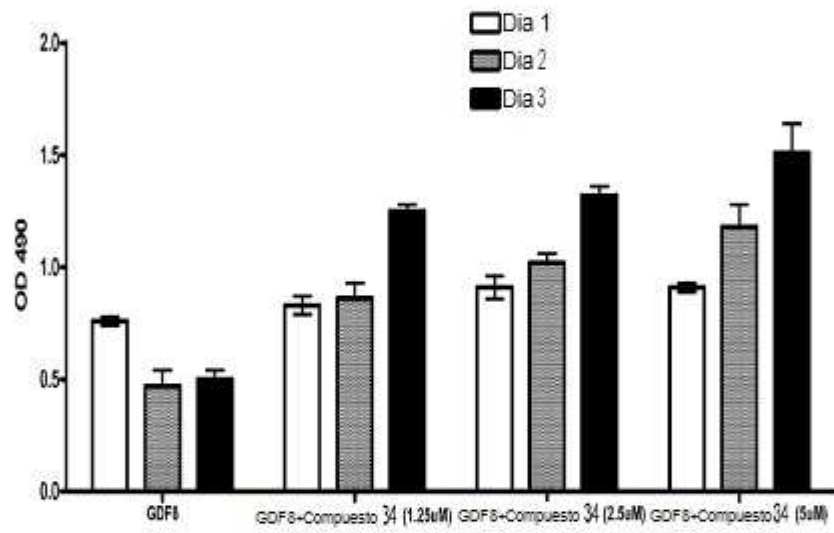


Figura 26H

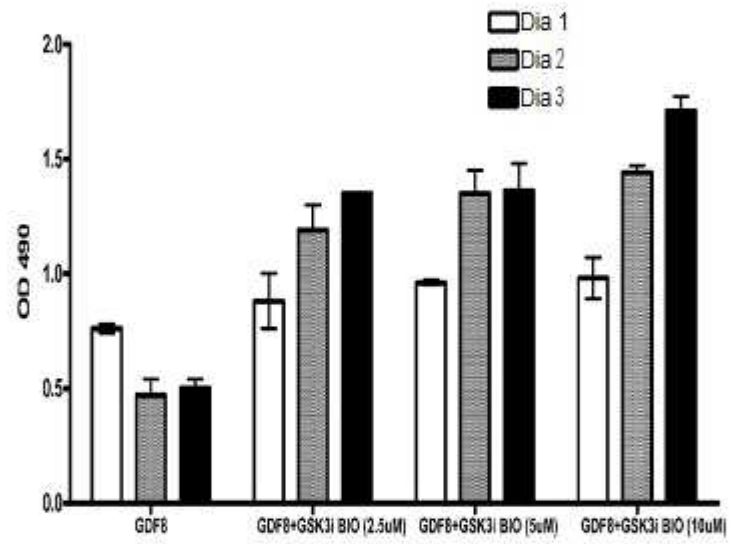


Figura 26l

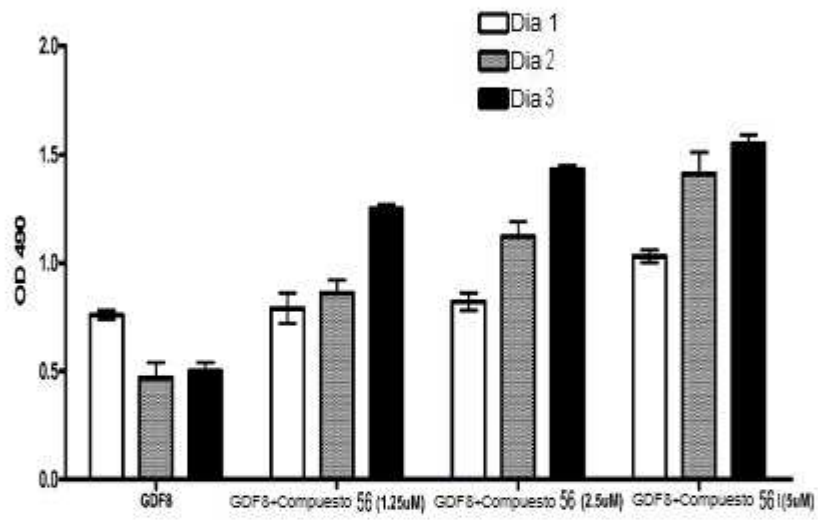


Figura 27A

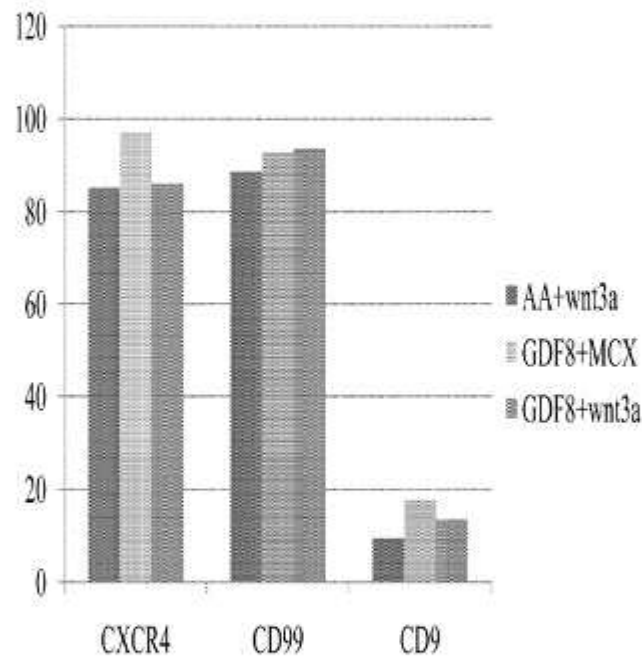


Figura 27B

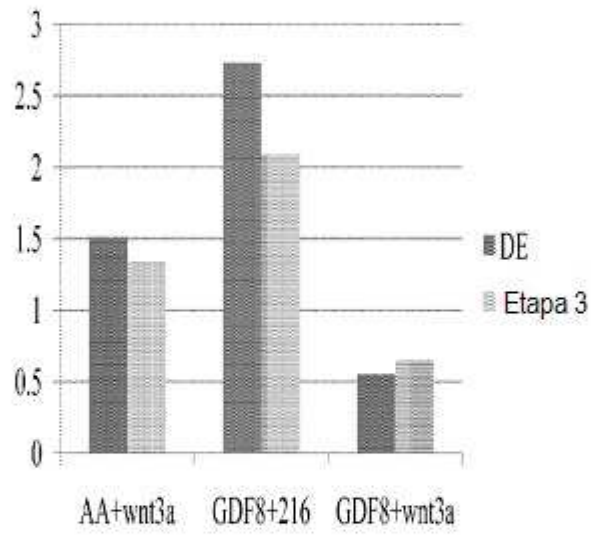




Figura 27C

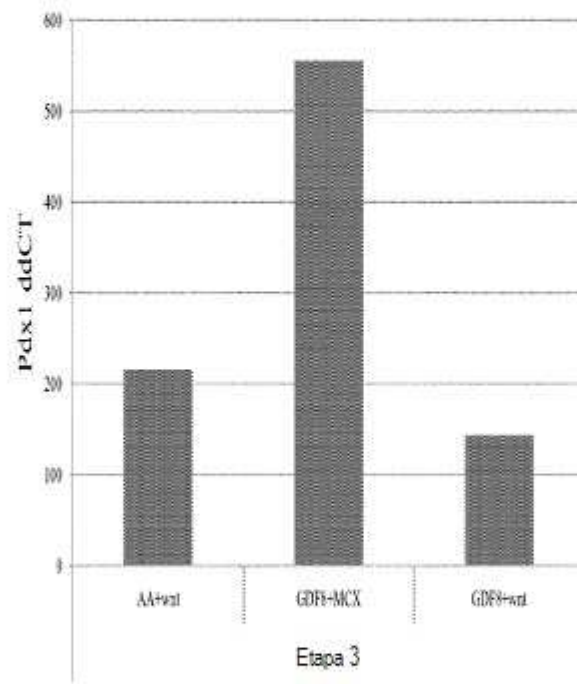


Figura 27D

Etapa 3	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	215	555	142
Cdx2	1614	1567	965
HNF4a	339	210	267

Figura 27E

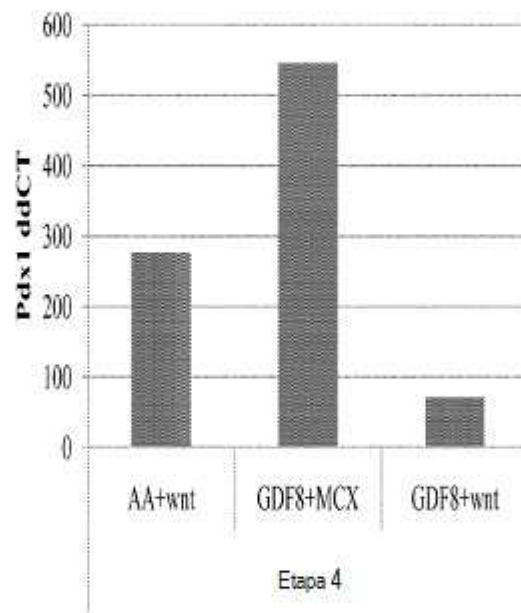


Figura 27F

<b>Etapas 4</b>	<b>AA+wnt</b>	<b>GDF8+MCX</b>	<b>GDF8+wnt</b>
Pdx	276	545	71
Cdx2	1971	2496	983
HNF4a	640	426	609