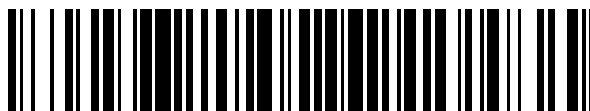


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 233**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2006 PCT/US2006/042413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2007 WO07051038**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06827129 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 1957636**

54 Título: **Endodermo de intestino proximal dorsal y ventral que expresa PDX-1**

30 Prioridad:

27.10.2005 US 730917 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2018

73 Titular/es:

**VIACYTE, INC. (100.0%)
3550 General Atomics Court Building No 2-503
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**D'AMOUR, KEVIN, ALLEN;
AGULNICK, ALAN, D.;
ELIAZER, SUSAN y
BAETGE, EMMANUEL, E.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 687 233 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

Endodermo de intestino proximal dorsal y ventral que expresa PDX-1

Solicitudes relacionadas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la biología celular. En particular, se dan a conocer composiciones que comprenden células de endodermo de intestino proximal de mamífero y composiciones que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales y métodos de preparación, aislamiento y uso de tales células.

Antecedentes

- 10 Las células madre pluripotentes humanas, tales como célula madre embrionarias (ES) y célula germinales embrionarias (EG), se aislaron por primera vez en cultivo sin capas alimentadoras de fibroblastos en 1994 (Bongso *et al.*, 1994) y con capas alimentadoras de fibroblastos (Hogan, 1997). Más tarde, Thomson, Reubinoff y Shambloott establecieron cultivos continuos de células ES y EG humanas usando capas alimentadoras de ratón inactivadas de manera mitótica (Reubinoff *et al.*, 2000; Shambloott *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1998).
- 15 Las células ES y EG humanas (hESC) ofrecen oportunidades únicas para investigar las fases iniciales del desarrollo humano así como para la intervención terapéutica en varios estados patológicos, tales como diabetes mellitus y enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, el uso de células β productoras de insulina derivadas de las hESC ofrecería una amplia mejora con respecto a los procedimientos de terapia celular actuales que utilizan células de páncreas de donantes para el tratamiento de diabetes. Sin embargo, actualmente no se sabe cómo generar una célula β
- 20 productora de insulina a partir de las hESC. Como tal, los tratamientos de terapia celular actuales para diabetes mellitus, que utilizan células de islote de páncreas de donantes, están limitados por la carencia de células de islote de alta calidad necesarias para trasplante. La terapia celular para un único paciente con diabetes tipo I requiere un trasplante de aproximadamente 8×10^8 células de islote pancreático. (Shapiro *et al.*, 2000; Shapiro *et al.*, 2001a; Shapiro *et al.*, 2001b). Como tal, se requieren al menos dos órganos de donante sano para obtener suficientes
- 25 células de islote para un trasplante satisfactorio. Las células madre embrionarias humanas ofrecen una fuente de material de partida a partir del cual desarrollar cantidades sustanciales de células diferenciadas de alta calidad para terapias con células humanas.

- Dos propiedades que hacen que las hESC sean aptas de manera única para aplicaciones de terapia celular son su pluripotencia y la capacidad para mantener estas células en cultivo durante periodos prolongados. La pluripotencia se define mediante la capacidad de las hESC para diferenciarse en derivados de las 3 capas germinales primarias (endodermo, mesodermo, ectodermo) que forman, a su vez, todos los tipos de células somáticas del organismo maduro además de tejidos extraembrionarios (por ejemplo, placenta) y células germinales. Aunque la pluripotencia confiere una extraordinaria utilidad a las hESC, esta propiedad también plantea retos únicos para el estudio y la manipulación de estas células y sus derivados. Debido a la gran variedad de tipos de células que pueden surgir en
- 30 cultivos de hESC en diferenciación, la amplia mayoría de tipos de células se producen con eficiencias muy bajas. Adicionalmente, tener éxito al evaluar la producción de cualquier tipo de células dado depende de forma crítica de la definición de marcadores apropiados. Lograr una diferenciación eficiente, dirigida es de gran importancia para la aplicación terapéutica de las hESC.

- Para usar las hESC como material de partida para generar células que sean útiles en aplicaciones de terapia celular, sería ventajoso superar los problemas anteriores. Por ejemplo, para lograr el nivel de material celular requerido para la terapia de trasplante de célula del islote, sería ventajoso dirigir eficientemente las hESC hacia el linaje de células β /del islote pancreático en las fases más iniciales de la diferenciación.

- Además de una dirección eficiente del procedimiento de diferenciación, también sería beneficioso aislar y caracterizar tipos de células intermedios a lo largo de la ruta de diferenciación al linaje de células β /del islote pancreático y usar tales células como precursores de linaje apropiados para etapas posteriores en la diferenciación.

Sumario de la invención.

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a los siguientes puntos:

- 50 1. Un cultivo celular *in vitro* que comprende células humanas, en el que al menos el 10% de dichas células humanas son células de endodermo que expresan un marcador seleccionado del grupo que consiste en ONECUT2, SOX9 y PROX1 y que expresan la proteína factor 1 de homeocaja pancreático-duodenal (PDX1).
2. El cultivo celular del punto 1, que comprende además un retinoide.
3. El cultivo celular del punto 2, en el que dicho retinoide comprende ácido retinoico (RA).

4. El cultivo celular de uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho cultivo celular está sustancialmente libre de células seleccionadas del grupo que consiste en células de endodermo visceral, células de endodermo parietal y células neurales.
5. El cultivo celular de uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dichas células de endodermo son células multipotentes que pueden diferenciarse adicionalmente en células derivadas del intestino proximal.
6. Un método de producción de células de endodermo positivas para PDX1, comprendiendo dicho método:
 - (a) cultivar una población obtenida de células que comprende células pluripotentes humanas en presencia de un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β exógeno, produciendo de ese modo una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1;
 - 10 (b) cultivar las células de la etapa (a) en presencia de un factor de crecimiento de la familia de FGF exógeno seleccionado del grupo que consiste en FGF10 y FGF7, produciendo de ese modo células de endodermo de intestino proximal; y
 - (c) cultivar las células de la etapa (b) en presencia de un retinoide, produciendo de ese modo células de endodermo positivas para PDX1 multipotentes.
- 15 7. El método del punto 6, en el que el factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β comprende activina A, en el que el factor de crecimiento de la familia de FGF comprende FGF-7 o en el que el retinoide comprende ácido retinoico (RA).
8. El método del punto 6 o el punto 7, en el que el factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β exógeno se retira antes de la etapa (b).
- 20 9. El método de uno cualquiera de los puntos 6-8, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo positivas para PDX1 tal como se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o mediante inmunocitoquímica.
- 25 También se dan a conocer cultivos celulares de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 (células de endodermo de intestino proximal). También se da a conocer que el endodermo de intestino proximal expresa los marcadores HNF1b y FOXA 1 pero no expresa sustancialmente PDX1. También se dan a conocer cultivos celulares de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 (células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales). También se da a conocer que las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 expresan uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 y/o uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4. También se dan a conocer cultivos celulares de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 (células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales). También se da a conocer que las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 expresan uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 pero no expresan sustancialmente un marcador seleccionado de la tabla 4
- 30 en comparación con la expresión del mismo marcador en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
- 35 También se dan a conocer poblaciones de células enriquecidas, aisladas y/o purificadas que comprenden células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1.
- 40 También se dan a conocer células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
- También se dan a conocer poblaciones de células enriquecidas, aisladas y/o purificadas que comprenden células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
- 45 También se dan a conocer métodos o procedimientos para la producción de cultivos celulares de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 a partir de células de endodermo definitivo. Tales procedimientos incluyen la reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en un cultivo celular o una población celular de células de endodermo definitivo.
- La reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β puede estar mediada por la dilución o la retirada de un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β añadido de manera exógena, tal como activina A, del cultivo celular o la población celular de endodermo definitivo. También se da a conocer que se potencia la diferenciación de células de endodermo definitivo en células de endodermo de intestino proximal proporcionando al cultivo celular o la población celular de endodermo definitivo un factor de crecimiento de la familia de FGF y/o un inhibidor de la ruta de Hedgehog. Se da a conocer que las células de endodermo definitivo se derivan de células madre. Se describe que las células madre son células madre embrionarias. Incluso más preferiblemente, se describe que las células madre son células madre embrionarias humanas (hESC). También se
- 50

da a conocer que las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 se diferencian en células de endodermo positivas para PDX1 (células de endodermo pancreático) mediante la adición de un retinoide, tal como ácido retinoico. También se dan a conocer métodos o procedimientos para la producción de cultivos celulares de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1. Tales procedimientos incluyen proporcionar a las células de endodermo definitivo ácido retinoico. Se da a conocer que las células de endodermo definitivo se derivan de células madre. Se describe que las células madre son células madre embrionarias. Se describe que las células madre son células madre embrionarias humanas (hESC). También se dan a conocer métodos o procedimientos para la producción de cultivos celulares de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1. Tales procedimientos incluyen proporcionar a las células de endodermo definitivo un factor de crecimiento de la familia de FGF. También se da a conocer que las células de endodermo definitivo se derivan de células madre. Se describe que las células madre son células madre embrionarias. Incluso más preferiblemente, se describe que las células madre son hESC.

También se dan a conocer métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1. Las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 pueden separarse de otras células en la población celular usando un anticuerpo, ligando u otra molécula que se une a una molécula que se expresa en la superficie celular de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1, tal como una molécula de superficie celular. También se dan a conocer métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1. Las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, negativas para PDX1 pueden separarse de otras células en la población celular usando un anticuerpo, ligando u otra molécula que se une a una molécula que se expresa en la superficie celular de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, tal como una molécula de superficie celular seleccionada de la tabla 3 o una molécula de superficie celular seleccionada de la tabla 4. También se dan a conocer métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1. Las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 pueden separarse de otras células en la población celular usando un anticuerpo, ligando u otra molécula que se une a una molécula que se expresa en la superficie celular de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, tal como una molécula de superficie celular seleccionada de la tabla 3.

También se dan a conocer métodos adicionales de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1.

Pueden modificarse por ingeniería células pluripotentes o multipotentes que son precursores para células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 para que contengan un gen indicador fluorescente bajo el control de un promotor que controla de manera endógena la expresión de un gen marcador tal como HNF1b o FOXA1. Las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 marcadas con etiqueta fluorescente se separan entonces de otras células en la población celular mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

También se dan a conocer métodos adicionales de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

Pueden modificarse por ingeniería células pluripotentes o multipotentes negativas para PDX1 que son precursores para células positivas para PDX1 para que contengan un gen indicador fluorescente bajo el control de un promotor que controla de manera endógena la expresión de un gen marcador seleccionado de la tabla 3 o la tabla 4. Las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 marcadas con etiqueta fluorescente se separan entonces de otras células en la población celular mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). También se dan a conocer métodos adicionales de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1. Pueden modificarse por ingeniería células pluripotentes o multipotentes negativas para PDX1 que son precursores para células positivas para PDX1 para que contengan un gen indicador fluorescente bajo el control de un promotor que controla de manera endógena la expresión de un gen marcador seleccionado de la tabla 3. Las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 marcadas con etiqueta fluorescente se separan entonces de otras células en la población celular mediante FACS.

También se dan a conocer métodos de identificación de un factor de diferenciación que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 humanas en una población celular que comprende células humanas. El método incluye las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 humanas, proporcionar un factor de diferenciación candidato a la población celular, determinar la expresión de un marcador, tal como HNF1b, FOXA1 o PDX1, en la población celular en un primer punto de tiempo y determinar la expresión del mismo marcador en la población celular en un segundo punto de tiempo. El segundo punto de tiempo puede ser posterior al primer punto de tiempo y el segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. Si la expresión del marcador en la población celular en el segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en la población celular en el primer punto de tiempo, entonces el factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de las células de endodermo de intestino

proximal negativas para PDX1 humanas. También se dan a conocer métodos de identificación de un factor de diferenciación que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas en una población celular que comprende células humanas. El método incluye las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas, proporcionar un factor de diferenciación candidato a la población celular, determinar la expresión de un marcador, tal como un marcador seleccionado de la tabla 3 o un marcador seleccionado de la tabla 4, en la población celular en un primer punto de tiempo y determinar la expresión del mismo marcador en la población celular en un segundo punto de tiempo. El segundo punto de tiempo puede ser posterior al primer punto de tiempo y el segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. Si la expresión del marcador en la población celular en el segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en la población celular en el primer punto de tiempo, entonces el factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas. También se dan a conocer métodos de identificación de un factor de diferenciación que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas en una población celular que comprende células humanas. El método incluye las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas, proporcionar un factor de diferenciación candidato a la población celular, determinar la expresión de un marcador, tal como un marcador seleccionado de la tabla 3, en la población celular en un primer punto de tiempo y determinar la expresión del mismo marcador en la población celular en un segundo punto de tiempo.

El segundo punto de tiempo puede ser posterior al primer punto de tiempo y el segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. Si la expresión del marcador en la población celular en el segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en la población celular en el primer punto de tiempo, entonces el factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de las células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas.

En determinadas jurisdicciones, puede no haber ninguna definición aceptada generalmente del término “que comprende”. Tal como se usa en el presente documento, el término “que comprende” pretende representar lenguaje “abierto” que permite la inclusión de cualquier elemento adicional.

En el contexto de la presente invención también se da a conocer los siguientes párrafos 1 a 171:

1. Un cultivo celular que comprende células humanas en el que al menos aproximadamente el 26% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para el factor 1 de homeocaja pancreático-duodenal (PDX1) que expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 3, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal.

2. El cultivo celular del párrafo 1, en el que dicho marcador seleccionado de la tabla 3 es un marcador expresado en la superficie celular.

3. El cultivo celular del párrafo 2, en el que dicho marcador expresado en la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.

4. El cultivo celular del párrafo 1, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 4.

5. El cultivo celular del párrafo 4, en el que dicho marcador seleccionado de la tabla 4 es un marcador expresado en la superficie celular.

6. El cultivo celular del párrafo 5, en el que dicho marcador expresado en la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1.

7. El cultivo celular del párrafo 1, en el que al menos aproximadamente el 30% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

8. El cultivo celular del párrafo 1, en el que al menos aproximadamente el 40% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

9. El cultivo celular del párrafo 1, en el que al menos aproximadamente el 50% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

10. El cultivo celular del párrafo 1, en el que al menos aproximadamente el 60% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

11. El cultivo celular del párrafo 1, en el que al menos aproximadamente el 75% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
12. El cultivo celular del párrafo 1, en el que están presentes células alimentadoras humanas en dicho cultivo, y en el que al menos aproximadamente el 2% de células humanas distintas de dichas células alimentadoras humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
13. El cultivo celular del párrafo 1, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
14. El cultivo celular del párrafo 1, en el que dicho cultivo celular está sustancialmente libre de células seleccionadas del grupo que consiste en células de endodermo visceral, células de endodermo parietal y células neurales.
15. El cultivo celular del párrafo 1, que comprende además un retinoide.
16. El cultivo celular del párrafo 15, en el que dicho retinoide es ácido retinoico (RA).
17. El cultivo celular del párrafo 16, que comprende además B27.
18. Un cultivo celular que comprende células humanas en el que al menos aproximadamente el 2% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para factor 1 de homeocaja pancreático-duodenal (PDX1) que expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 3, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral.
19. El cultivo celular del párrafo 18, en el que dicho marcador seleccionado de la tabla 3 es un marcador expresado en la superficie celular.
20. El cultivo celular del párrafo 19, en el que dicho marcador expresado en la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.
21. El cultivo celular del párrafo 18, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 no expresan sustancialmente uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4.
22. El cultivo celular del párrafo 18, en el que al menos aproximadamente el 5% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
23. El cultivo celular del párrafo 18, en el que al menos aproximadamente el 10% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
24. El cultivo celular del párrafo 18, en el que al menos aproximadamente el 25% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
25. El cultivo celular del párrafo 18, en el que al menos aproximadamente el 50% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
26. El cultivo celular del párrafo 18, en el que al menos aproximadamente el 75% de dichas células humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
27. El cultivo celular del párrafo 18, en el que están presentes células alimentadoras humanas en dicho cultivo, y en el que al menos aproximadamente el 2% de células humanas distintas de dichas células alimentadoras humanas son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
28. El cultivo celular del párrafo 18, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
29. El cultivo celular del párrafo 18, en el que dicho cultivo celular está sustancialmente libre de células seleccionadas del grupo que consiste en células de endodermo visceral, células de endodermo parietal y células neurales.
30. El cultivo celular del párrafo 18 que comprende además un retinoide.
31. El cultivo celular del párrafo 30, en el que dicho retinoide es ácido retinoico (RA).
32. El cultivo celular del párrafo 31 que comprende además B27.
33. Una población celular que comprende células en la que al menos aproximadamente el 90% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas que

expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 3, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal.

- 5 34. La población celular del párrafo 33, en la que dicho marcador seleccionado de la tabla 3 es un marcador expresado en la superficie celular.
35. La población celular del párrafo 34, en la que dicho marcador expresado en la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.
- 10 36. La población celular del párrafo 33, en la que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 4.
37. La población celular del párrafo 36, en la que dicho marcador seleccionado de la tabla 4 es un marcador expresado en la superficie celular.
- 15 38. La población celular del párrafo 37, en la que dicho marcador expresado en la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1.
39. La población celular del párrafo 33, en la que al menos aproximadamente el 95% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
40. La población celular del párrafo 33, en la que al menos aproximadamente el 98% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
- 20 41. La población celular del párrafo 33, en la que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
- 25 42. Una población celular que comprende células en la que al menos aproximadamente el 90% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas que expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 3, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral.
43. La población celular del párrafo 42, en la que dicho marcador seleccionado de la tabla 3 es un marcador expresado en la superficie celular.
- 30 44. La población celular del párrafo 43, en la que dicho marcador expresado en la superficie celular se selecciona del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.
45. La población celular del párrafo 42, en la que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 no expresan sustancialmente uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4.
- 35 46. La población celular del párrafo 42, en la que al menos aproximadamente el 95% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
47. La población celular del párrafo 42, en la que al menos aproximadamente el 98% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
- 40 48. La población celular del párrafo 42, en la que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
49. Un método de producción de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1 y proporcionar a dicha población celular un retinoide en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de al menos el 26% de dicha población de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 que expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 3, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal.
- 45 50. El método del párrafo 49, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 también expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 4.
- 50

51. El método del párrafo 50 que comprende además la etapa de permitir que pase tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, en el que se ha determinado dicho tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 detectando la presencia de un marcador de la tabla 4 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal en dicha población celular.
52. El método del párrafo 50, en el que la expresión de dicho marcador seleccionado de la tabla 3 o la tabla 4 se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).
53. El método del párrafo 50, en el que la expresión de dicho marcador seleccionado de la tabla 3 o la tabla 4 se determina mediante inmunocitoquímica.
54. El método del párrafo 49, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
55. El método del párrafo 49, en el que dicho retinoide es RA.
56. El método del párrafo 55, en el que se proporciona RA en una concentración que oscila entre aproximadamente 0,5 μ M y aproximadamente 50 μ M.
57. El método del párrafo 56, en el que se proporciona RA en una concentración que oscila entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 20 μ M.
58. El método del párrafo 57, en el que se proporciona RA en una concentración de aproximadamente 2 μ M.
59. El método del párrafo 55, en el que se proporciona RA cuando dicho cultivo tiene aproximadamente 5 días.
60. El método del párrafo 49 que comprende además proporcionar B27 a dicho cultivo.
61. El método del párrafo 60, en el que dicho B27 se proporciona en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 20% del medio total.
62. El método del párrafo 61, en el que se proporciona B27 en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 2% del medio total.
63. El método del párrafo 62, en el que se proporciona B27 en una concentración de aproximadamente el 0,5% del medio total.
64. El método del párrafo 60, en el que se proporciona B27 aproximadamente en el mismo momento que dicho retinoide.
65. El método del párrafo 49 que comprende además proporcionar activina A a dicho cultivo.
66. El método del párrafo 65, en el que se proporciona activina A en una concentración que oscila entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 200 ng/ml.
67. El método del párrafo 66, en el que se proporciona activina A en una concentración que oscila entre aproximadamente 20 ng/ml y aproximadamente 100 ng/ml.
68. El método del párrafo 67, en el que se proporciona activina A en una concentración de aproximadamente 25 ng/ml.
69. El método del párrafo 49, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 se hacen crecer en medio CMRL.
70. El método del párrafo 69, en el que dicho medio CMRL comprende RA a aproximadamente 2 μ M, activina A a aproximadamente 25 ng/ml y B27 a aproximadamente el 0,5% del medio total.
71. El método del párrafo 49, en el que dicha etapa de obtener una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1 comprende obtener una población celular que comprende células humanas pluripotentes, proporcionar a dicha población celular al menos un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células pluripotentes en células de endodermo definitivo y permitir que pase tiempo suficiente para que se formen células de endodermo definitivo, en el que se ha determinado dicho tiempo suficiente para que se formen células de endodermo definitivo detectando la presencia de células de endodermo definitivo en dicha población celular.
72. Una célula de endodermo de intestino proximal, desviada a la ruta dorsal, positiva para PDX1 producida mediante el método del párrafo 49.

73. Un método de producción de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1 y proporcionar a dicha población celular un factor de crecimiento de la familia de FGF en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de al menos una parte de dicha población de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 que expresan al menos un marcador seleccionado de la tabla 3, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral.
74. El método del párrafo 73, en el que dicha población celular se diferencia en ausencia de RA.
75. El método del párrafo 73, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 no expresan uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4.
76. El método del párrafo 75 que comprende además la etapa de permitir que pase tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, en el que se ha determinado dicho tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 detectando la presencia de un marcador de la tabla 3 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral en dicha población celular.
77. El método del párrafo 76, en el que la expresión de dicho marcador seleccionado de la tabla 3 se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).
78. El método del párrafo 76, en el que la expresión de dicho marcador seleccionado de la tabla 3 se determina mediante inmunocitoquímica.
79. El método del párrafo 73, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
80. El método del párrafo 73, en el que dicho factor de crecimiento de la familia de FGF es FGF-10, proporcionándose dicho FGF-10 en una concentración que oscila entre aproximadamente 5 ng/ml y aproximadamente 500 ng/ml.
81. El método del párrafo 80, en el que se proporciona FGF-10 en una concentración que oscila entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 ng/ml.
82. El método del párrafo 81, en el que se proporciona FGF-10 en una concentración de aproximadamente 50 ng/ml.
83. El método del párrafo 73, en el que dicho factor de crecimiento de la familia de FGF se proporciona cuando dicho cultivo tiene aproximadamente 3 días.
84. El método del párrafo 73, que comprende además proporcionar B27 a dicho cultivo.
85. El método del párrafo 84, en el que dicho B27 se proporciona en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 20% del medio total.
86. El método del párrafo 85, en el que se proporciona B27 en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 2% del medio total.
87. El método del párrafo 86, en el que se proporciona B27 en una concentración de aproximadamente el 0,5% del medio total.
88. El método del párrafo 84, en el que se proporciona B27 aproximadamente en el mismo momento que dicho factor de crecimiento de la familia de FGF.
89. El método del párrafo 73 que comprende además proporcionar un inhibidor de Hedgehog a dicho cultivo.
90. El método del párrafo 89, en el que dicho inhibidor de Hedgehog es KAAD-ciclopamina, proporcionándose dicha KAAD-ciclopamina en una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 50 μ M.
91. El método del párrafo 90, en el que se proporciona KAAD-ciclopamina en una concentración que oscila entre aproximadamente 0,5 μ M y aproximadamente 10 μ M.
92. El método del párrafo 91, en el que se proporciona KAAD-ciclopamina en una concentración de aproximadamente 0,5 μ M.
93. El método del párrafo 73, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 se hacen crecer en medio CMRL.

94. El método del párrafo 93, en el que dicho medio CMRL comprende FGF-10 a aproximadamente 50 ng/ml, KAAD-ciclopamina a aproximadamente 0,5 μ M, y B27 a aproximadamente el 0,5% del medio total.

95. El método del párrafo 94, en el que dicho medio CMRL carece de RA.

96. El método del párrafo 73, en el que dicha etapa de obtener una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1 comprende obtener una población celular que comprende células humanas pluripotentes, proporcionar a dicha población celular al menos un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células pluripotentes en células de endodermo definitivo y permitir que pase tiempo suficiente para que se formen células de endodermo definitivo, en el que se ha determinado dicho tiempo suficiente para que se formen células de endodermo definitivo detectando la presencia de células de endodermo definitivo en dicha población celular.

97. Una célula de endodermo de intestino proximal, desviada a la ruta ventral, positiva para PDX1 producida mediante el método del párrafo 73.

98. Un método de producción de una población celular enriquecida en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, comprendiendo dicho método las etapas de diferenciar células en una población de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 para producir células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal, proporcionar a dicha población celular un reactivo que se une a un marcador expresado en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 pero que no se expresa sustancialmente en otros tipos de células presentes en dicha población celular y separar dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 unidas a dicho reactivo de dichos otros tipos de células presentes en dicha población celular, produciendo de ese modo una población celular enriquecida en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

99. El método para el párrafo 98, en el que dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1.

100. El método para el párrafo 98, en el que dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.

101. El método del párrafo 98, en el que la etapa de diferenciación comprende además obtener una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, proporcionar a dicha población celular un retinoide en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal, y permitir que pase tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, en el que se ha determinado dicho tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 detectando la presencia de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 en dicha población celular.

102. El método del párrafo 101, en el que la etapa de provisión comprende además proporcionar B27.

103. El método del párrafo 101, en el que la detección comprende detectar la expresión de al menos un marcador seleccionado de la tabla 4.

104. El método del párrafo 98, en el que al menos aproximadamente el 95% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

105. El método del párrafo 98, en el que al menos aproximadamente el 98% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

106. El método del párrafo 98, en el que dicho reactivo es un anticuerpo.

107. El método del párrafo 106, en el que dicho anticuerpo tiene afinidad por un polipéptido de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4, XPR1, CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.

108. Una población enriquecida de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 producida mediante el método del párrafo 98.

109. Un método de producción de una población celular enriquecida en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, comprendiendo dicho método las etapas de diferenciar células en

- una población de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 para producir células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral, proporcionar a dicha población celular un reactivo que se une a un marcador expresado en dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 pero que no se expresa sustancialmente en otros tipos de células presentes en dicha población celular y separar dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 unidas a dicho reactivo de dichos otros tipos de células presentes en dicha población celular, produciendo de ese modo una población celular enriquecida en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
110. El método para el párrafo 109, en el que dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.
111. El método del párrafo 109, en el que la etapa de diferenciación comprende además obtener una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, proporcionar a dicha población celular un factor de crecimiento de la familia de FGF en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral, y permitir que pase tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, en el que se ha determinado dicho tiempo suficiente para que se formen células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 detectando la presencia de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 en dicha población celular.
112. El método del párrafo 111, en el que la etapa de provisión comprende además proporcionar B27.
113. El método del párrafo 111, en el que la detección comprende detectar la expresión de al menos un marcador seleccionado de la tabla 3.
114. El método del párrafo 109, en el que al menos aproximadamente el 95% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
115. El método del párrafo 109, en el que al menos aproximadamente el 98% de dichas células son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.
116. El método del párrafo 109, en el que dicho reactivo es un anticuerpo.
117. El método del párrafo 116, en el que dicho anticuerpo tiene afinidad por un polipéptido de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2.
118. Una población enriquecida de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 producida mediante el método del párrafo 109.
119. Un método de producción de una población celular enriquecida en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población de células pluripotentes, en el que al menos una célula de dicha población de células pluripotentes comprende al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control de un promotor de uno cualquiera de los genes marcadores seleccionados de la tabla 4, comprendiendo dicho ácido nucleico una secuencia que codifica para una proteína fluorescente o un fragmento biológicamente activo de la misma, diferenciar dichas células pluripotentes para producir células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal, y separar dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 de otros tipos de células presentes en la población celular.
120. El método del párrafo 119, en el que dicha población celular enriquecida comprende al menos aproximadamente el 95% de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
121. El método del párrafo 119, en el que dicha población celular enriquecida comprende al menos aproximadamente el 98% de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.
122. El método del párrafo 119, en el que la etapa de diferenciación comprende además proporcionar a dicha población de células pluripotentes al menos un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células pluripotentes en células de endodermo definitivo negativas para PDX1, y proporcionar a dichas células de endodermo definitivo negativas para PDX1 un retinoide en

una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

123. El método del párrafo 122, en el que dicho retinoide es RA.

124. El método del párrafo 123, en el que la etapa de provisión comprende además proporcionar B27.

5 125. El método del párrafo 119, en el que dicha proteína fluorescente es proteína fluorescente verde (GFP).

126. El método del párrafo 119, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 se separan de otros tipos de células presentes en la población celular mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

10 127. Una población enriquecida de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 producida mediante el método del párrafo 119.

15 128. Un método de producción de una población celular enriquecida en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población de células pluripotentes, en el que al menos una célula de dicha población de células pluripotentes comprende al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control del un promotor de uno cualquiera de los genes marcadores seleccionados de la tabla 3, comprendiendo dicho ácido nucleico una secuencia que codifica para una proteína fluorescente o un fragmento biológicamente activo de la misma, diferenciar dichas células pluripotentes para producir células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1, siendo dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 multipotentes que pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral y separar dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 de células de endodermo de intestino proximal, no desviadas a la ruta ventral.

20 129. El método del párrafo 128, en el que dicha población celular enriquecida comprende al menos aproximadamente el 95% de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.

25 130. El método del párrafo 128, en el que dicha población celular enriquecida comprende al menos aproximadamente el 98% de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.

30 131. El método del párrafo 128, en el que la etapa de diferenciación comprende además proporcionar a dicha población de células pluripotentes al menos un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células pluripotentes en células de endodermo definitivo negativas para PDX1, y proporcionar a dichas células de endodermo definitivo negativas para PDX1 un factor de crecimiento de la familia de FGF en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación de dichas células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.

35 132. El método del párrafo 128, en el que la etapa de provisión comprende además proporcionar B27.

133. El método del párrafo 128, en el que dicha proteína fluorescente es proteína fluorescente verde (GFP).

134. El método del párrafo 128, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 se separan de otros tipos de células presentes en la población celular mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

40 135. Una población enriquecida de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 producida mediante el método del párrafo 128.

45 136. Un método de identificación de un factor de diferenciación que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas en una población celular que comprende células humanas, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas, proporcionar un factor de diferenciación candidato a dicha población celular, determinar la expresión de un marcador en dicha población celular en un primer punto de tiempo, determinar la expresión del mismo marcador en dicha población celular en un segundo punto de tiempo, en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a dicho primer punto de tiempo y en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar a dicha población celular dicho factor de diferenciación candidato y determinar si la expresión del marcador en dicha población celular en dicho segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en dicha población celular en dicho primer punto de tiempo, en el que un aumento o una disminución de la expresión de dicho marcador en dicha población celular indica que dicho factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1

humanas.

137. El método del párrafo 136, en el que dicho marcador se selecciona de la tabla 4.

138. El método del párrafo 136, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas comprenden al menos aproximadamente el 10% de las células humanas en dicha población celular.

139. El método del párrafo 136, en el que están presentes células alimentadoras humanas en dicha población celular y en el que al menos aproximadamente el 10% de las células humanas distintas de dichas células alimentadoras son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

140. El método del párrafo 136, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas comprenden al menos aproximadamente el 90% de las células humanas en dicha población celular.

141. El método del párrafo 136, en el que dicho están presentes células alimentadoras humanas en dicha población celular y en el que al menos aproximadamente el 90% de las células humanas distintas de dichas células alimentadoras son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1.

142. El método del párrafo 136, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta dorsal, positivas para PDX1 humanas pueden diferenciarse en células de la yema pancreática dorsal.

143. El método del párrafo 136, en el que dichas células de endodermo definitivo humanas se diferencian en células precursoras pancreáticas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.

144. El método del párrafo 136, en el que dicho primer punto de tiempo es antes de proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

145. El método del párrafo 136, en el que dicho primer punto de tiempo es aproximadamente el mismo momento en que se proporciona dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

146. El método del párrafo 136, en el que dicho primer punto de tiempo es posterior a proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

147. El método del párrafo 136, en el que aumenta la expresión de dicho marcador.

148. El método del párrafo 136, en el que disminuye la expresión de dicho marcador.

149. El método del párrafo 136, en el que se determina la expresión de dicho marcador mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

150. El método del párrafo 136, en el que se determina la expresión de dicho marcador mediante inmunocitoquímica.

151. El método del párrafo 136, en el que dicho factor de diferenciación comprende una molécula pequeña.

152. El método del párrafo 136, en el que dicho factor de diferenciación comprende un polipéptido.

153. El método del párrafo 136, en el que dicho factor de diferenciación comprende un factor de crecimiento.

154. Un método de identificación de un factor de diferenciación que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas en una población celular que comprende células humanas, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas, proporcionar un factor de diferenciación candidato a dicha población celular, determinar la expresión de un marcador en dicha población celular en un primer punto de tiempo, determinar la expresión del mismo marcador en dicha población celular en un segundo punto de tiempo, en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a dicho primer punto de tiempo y en el que dicho segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar a dicha población celular dicho factor de diferenciación candidato y determinar si la expresión del marcador en dicha población celular en dicho segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en dicha población celular en dicho primer punto de tiempo, en el que un aumento o una disminución de la expresión de dicho marcador en dicha población celular indica que dicho factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas.

155. El método del párrafo 154, en el que dicho marcador se selecciona de la tabla 3.

156. El método del párrafo 154, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas comprenden al menos aproximadamente el 10% de las células humanas en

dicha población celular.

157. El método del párrafo 154, en el que están presentes células alimentadoras humanas en dicha población celular y en el que al menos aproximadamente el 10% de las células humanas distintas de dichas células alimentadoras son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.

5 158. El método del párrafo 154, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas comprenden al menos aproximadamente el 90% de las células humanas en dicha población celular.

10 159. El método del párrafo 154, en el que dichas células alimentadoras humanas están presentes en dicha población celular y en el que al menos aproximadamente el 90% de las células humanas distintas de dichas células alimentadoras son células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1.

160. El método del párrafo 154, en el que dichas células de endodermo de intestino proximal, desviadas a la ruta ventral, positivas para PDX1 humanas pueden diferenciarse en células de la yema pancreática ventral.

161. El método del párrafo 154, en el que dichas células de endodermo definitivo humanas se diferencian en células precursoras pancreáticas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.

15 162. El método del párrafo 154, en el que dicho primer punto de tiempo es antes de proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

163. El método del párrafo 154, en el que dicho primer punto de tiempo es aproximadamente el mismo momento en que se proporciona dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

20 164. El método del párrafo 154, en el que dicho primer punto de tiempo es posterior a proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

165. El método del párrafo 154, en el que aumenta la expresión de dicho marcador.

166. El método del párrafo 154, en el que disminuye la expresión de dicho marcador.

167. El método del párrafo 154, en el que se determina la expresión de dicho marcador mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

25 168. El método del párrafo 154, en el que se determina la expresión de dicho marcador mediante inmunocitoquímica.

169. El método del párrafo 154, en el que dicho factor de diferenciación comprende una molécula pequeña.

170. El método del párrafo 154, en el que dicho factor de diferenciación comprende un polipéptido.

171. El método del párrafo 154, en el que dicho factor de diferenciación comprende un factor de crecimiento.

30 Se apreciará que las composiciones y los métodos descritos anteriormente se refieren a células cultivadas *in vitro*. Sin embargo, las composiciones de células diferenciadas *in vitro* descritas anteriormente pueden usarse para aplicaciones *in vivo*.

35 También puede hallarse una divulgación adicional relacionada con el contexto de la presente invención en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/532.004, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2003; la solicitud de patente provisional estadounidense número 60/566.293, titulada PDX1 EXPRESSING ENDODERM, presentada el 27 de abril de 2004; la solicitud de patente provisional estadounidense número 60/586.566, titulada CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 9 de julio de 2004; la solicitud de patente provisional estadounidense número 60/587.942, titulada CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE
40 ENDODERM, presentada el 14 de julio de 2004; la solicitud de patente estadounidense número 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004 y la solicitud de patente estadounidense número 11/115.868, titulada PDX1 EXPRESSING ENDODERM, presentada el 26 de abril de 2005; la solicitud de patente estadounidense número 11/165.305, titulada METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de junio de 2005.

45 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de una ruta de diferenciación propuesta para la producción de células beta a partir de hESC. La primera etapa en la ruta compromete la célula ES al linaje de endodermo definitivo y también representa la primera etapa antes de los eventos de diferenciación posteriores en endodermo pancreático, endodermo endocrino, o células de islote/beta. La segunda etapa en la ruta muestra la conversión de endodermo definitivo positivo para SOX17/negativo para PDX1 en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1. Algunos factores útiles para
50

mediar en estas transiciones están en cursiva. Los marcadores relevantes para definir las células diana están subrayados.

La figura 2 es un diagrama del ADNc de SOX17 humana que presenta las posiciones de motivos conservados y destaca la región usada para el procedimiento de inmunización mediante GENOVAC.

- 5 La figura 3 es un dendrograma relacional que ilustra que SOX17 es la relacionada más estrechamente con SOX7 y algo menos con SOX18. Las proteínas SOX17 están relacionadas más estrechamente entre homólogos de especie que con otros miembros de la subfamilia de grupo F de SOX dentro de la misma especie.

- 10 La figura 4 es una inmunotransferencia de tipo Western tratada con sonda con el anticuerpo de rata anti-SOX17. Esta inmunotransferencia demuestra la especificidad de este anticuerpo para proteína SOX17 humana sobreexpresada en fibroblastos (carril 1) y una falta de inmunorreactividad con EGFP (carril 2) o el miembro de la familia de SOX relacionado más estrechamente, SOX7 (carril 3).

Las figuras 5A-B son micrografías que muestran una agrupación de células SOX17⁺ que presentan un número significativo de células marcadas conjuntamente AFP⁺ (A). Esto contrasta de manera notable con otras agrupaciones SOX17⁺ (B) en las que se observa poca cantidad o ninguna de células AFP⁺.

- 15 Las figuras 6A-C son micrografías que muestran endodermo parietal y SOX17. El panel A muestra inmunocitoquímica para la proteína trombosmodulina (TM) humana ubicada en la superficie celular de células de endodermo parietal en cultivos diferenciados de manera aleatoria de células hES. El panel B es el campo idéntico mostrado en A doblemente marcado para TM y SOX17. El panel C es la imagen de contraste de fase del mismo campo con núcleos marcados con DAPI. Obsérvese la correlación completa de núcleos marcados con DAPI y el marcaje de SOX17.

- 20 Las figuras 7A-B son gráficos de barras que muestran la expresión génica de SOX17 mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) y células positivas anti-SOX17 mediante anticuerpo específico de SOX17. El panel A muestra que la activina A aumenta la expresión génica de SOX17 mientras que el ácido retinoico (RA) suprime intensamente la expresión de SOX17 con relación a los medios de control indiferenciados (SR20). El panel B muestra que el patrón idéntico así como una magnitud similar de estos cambios se refleja en el número de células SOX17⁺, lo que indica que la medición mediante Q-PCR de la expresión génica de SOX17 refleja muy bien los cambios a nivel de célula individual.

- 30 La figura 8A es un gráfico de barras que muestra que un cultivo de diferenciación de las hESC en presencia de activina A mantiene un bajo nivel de expresión génica de AFP mientras que células que se permitió que se diferenciases de manera aleatoria en suero bovino fetal (FBS) al 10% muestran una intensa regulación por incremento de AFP. La diferencia en los niveles de expresión es de aproximadamente 7 veces.

- 35 Las figuras 8B-C son imágenes de dos micrografías que muestran que la supresión de la expresión de AFP por activina A también es evidente a nivel de célula individual tal como se indica mediante las agrupaciones muy raras y pequeñas de células AFP⁺ observadas en condiciones de tratamiento con activina A (parte inferior) con relación a FBS al 10% solo (parte superior).

- 40 Las figuras 9A-B son imágenes comparativas que muestran la cuantificación del número de células AFP⁺ usando citometría de flujo. Esta figura demuestra que la magnitud de cambio en la expresión génica de AFP (figura 8A) en presencia (panel derecho) y ausencia (panel izquierdo) de activina A corresponde exactamente al número de células AFP⁺, lo que respalda además la utilidad de los análisis mediante Q-PCR para indicar que se producen cambios a nivel de célula individual.

- 45 Las figuras 10A-F son micrografías que muestran que la exposición de las hESC a nodal, activina A y activina B (NAA) produce un aumento notable en el número de células SOX17⁺ a lo largo del periodo de 5 días (A-C). Comparando la abundancia relativa de células SOX17⁺ con el número total de células presentes en cada campo, tal como se indica mediante los núcleos teñidos con DAPI (D-F), puede observarse que aproximadamente el 30-50% de todas las células son inmunorreactivas para SOX17 después de tratamiento durante cinco días con NAA.

La figura 11 es un gráfico de barras que demuestra que la activina A (0, 10, 30 ó 100 ng/ml) aumenta de manera dependiente de la dosis la expresión génica de SOX17 en hESC en diferenciación. La expresión aumentada ya es robusta después de 3 días de tratamiento en cultivos adherentes y también continúa a través de los 1, 3 y 5 días posteriores de cultivo en suspensión.

- 50 Las figuras 12A-C son gráficos de barras que demuestran el efecto de activina A sobre la expresión de MIXL1 (panel A), GATA4 (panel B) y HNF3b (panel C). También se observan aumentos dependientes de la dosis de activina A para otros tres marcadores de endodermo definitivo; MIXL1, GATA4 y HNF3b. Las magnitudes de la expresión aumentada en respuesta a la dosis de activina son notablemente similares a las observadas para SOX17, lo que indica de manera notable que la activina A está especificando una población de células que coexpresan los cuatro genes (SOX17⁺, MIXL1⁺, GATA4⁺ y HNF3b⁺).

- Las figuras 13A-C son gráficos de barras que demuestran el efecto de activina A sobre la expresión de AFP (panel A), SOX7 (panel B) y SPARC (panel C). Hay una disminución dependiente de la dosis de activina A de la expresión del marcador de endodermo visceral, AFP. Los marcadores de endodermo primitivo (SOX7) y endodermo parietal (SPARC) o bien permanecen inalterados o bien muestran supresión en algunos puntos de tiempo, lo que indica que la activina A no actúa para especificar estos tipos de células de endodermo extraembrionario. Esto respalda además el hecho de que la expresión aumentada de SOX17, MIXL1, GATA4 y HNF3b se debe a un aumento del número de células de endodermo definitivo en respuesta a activina A.
- Las figuras 14A-B son gráficos de barras que muestran el efecto de activina A sobre la expresión de ZIC1 (panel A) y Brachyury (panel B). La expresión coherente del marcador neural, ZIC1 demuestra que no hay un efecto dependiente de la dosis de activina A sobre la diferenciación neural. Hay una supresión notable de la diferenciación en mesodermo mediada por el tratamiento con 100 ng/ml de activina A tal como se indica mediante la expresión disminuida de Brachyury. Esto es probablemente el resultado de la especificación aumentada de endodermo definitivo a partir de los precursores de mesendodermo. Los menores niveles de tratamiento con activina A (10 y 30 ng/ml) mantienen la expresión de Brachyury en puntos de tiempo posteriores de la diferenciación con relación a cultivos de control no tratados.
- Las figuras 15A-B son micrografías que muestran diferenciación disminuida en endodermo parietal en respuesta a tratamiento con activinas. Se hallan regiones de endodermo parietal TM^{hi} a través del cultivo (A) cuando se diferencia en suero solo, mientras que la diferenciación en células TM^{+} es escasa cuando se incluyen activinas (B) y la intensidad global de inmunoreactividad de TM es menor.
- Las figuras 16A-D son micrografías que muestran la expresión de marcadores en respuesta al tratamiento con activina A y activina B. Se trataron hESC durante cuatro días consecutivos con activina A y activina B y se marcaron de manera triple con anticuerpos para SOX17, AFP y TM. Panel A - SOX17; panel B - AFP; panel C - TM; y panel D - fase/DAPI. Obsérvense las numerosas células positivas para SOX17 (A) asociadas con la ausencia completa de inmunoreactividad de AFP (B) y TM (C).
- La figura 17 es una micrografía que muestra el aspecto de endodermo definitivo y endodermo visceral *in vitro* a partir de hESC. Las regiones de endodermo visceral se identifican mediante $AFP^{hi}/SOX17^{lo/-}$ mientras que el endodermo definitivo presenta el perfil opuesto completo, $SOX17^{hi}/AFP^{lo/-}$. Este campo se eligió de manera selectiva debido a la proximidad de estas dos regiones entre sí. Sin embargo, hay numerosas veces en las que se observan regiones $SOX17^{hi}/AFP^{lo/-}$ en aislamiento absoluto de cualquier región de células AFP^{hi} , lo que sugiere el origen independiente de las células de endodermo definitivo con respecto a las células de endodermo visceral.
- La figura 18 es un diagrama que representa la familia de $TGF\beta$ de ligandos y receptores. Los factores activantes de AR Smads y BR Smads, son útiles en la producción de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas (véase, J Cell Physiol. 187:265-76).
- La figura 19 es un gráfico de barras que muestra la inducción de la expresión de SOX17 a lo largo del tiempo como resultado de tratamiento con factores $TGF\beta$ individuales y combinaciones de los mismos.
- La figura 20 es un gráfico de barras que muestra el aumento del número de células $SOX17^{+}$ con el tiempo como resultado del tratamiento con combinaciones de factores $TGF\beta$.
- La figura 21 es un gráfico de barras que muestra inducción de la expresión de SOX17 a lo largo del tiempo como resultado de tratamiento con combinaciones de factores $TGF\beta$.
- La figura 22 es un gráfico de barras que muestra que la activina A induce un aumento dependiente de la dosis del número de células $SOX17^{+}$.
- La figura 23 es un gráfico de barras que muestra que la adición de Wnt3a a cultivos tratados con activina A y activina B aumenta la expresión de SOX17 por encima de los niveles inducidos por activina A y activina B solas.
- Las figuras 24A-C son gráficos de barras que muestran que se potencia la diferenciación en endodermo definitivo en condiciones de bajo contenido de FBS. El tratamiento de las hESC con activinas A y B en medios que contienen FBS al 2% (2AA) produce un nivel 2-3 veces mayor de la expresión de SOX17 en comparación con el mismo tratamiento en medios con FBS al 10% (10AA) (panel A). La inducción del marcador de endodermo definitivo, MIXL1 (panel B) también se ve afectada del mismo modo y la supresión de AFP (endodermo visceral) (panel C) es mayor en las condiciones en FBS al 2% que en FBS al 10%.
- Las figuras 25A-D son micrografías que muestran que están dividiéndose células $SOX17^{+}$ en cultivo. Están presentes células inmunorreactivas a SOX17 en el borde de diferenciación de una colonia de hESC (C, D) y se marcan con antígeno nuclear de células en diferenciación (PCNA) (panel B) aunque no se marcan conjuntamente con OCT4 (panel C). Además, pueden observarse claras figuras mitóticas mediante marcaje con DAPI de los núcleos tanto en células $SOX17^{+}$ (flechas) así como en hESC $OCT4^{+}$, indiferenciadas (puntas de flecha) (D).
- La figura 26 es un gráfico de barras que muestra el nivel de expresión relativa de CXCR4 en hESC en diferenciación

en diversas condiciones de los medios.

Las figuras 27A-D son gráficos de barras que muestran cómo un panel de marcadores de endodermo definitivo comparten un patrón de expresión muy similar al de CXCR4 a través de los mismos tratamientos de diferenciación presentados en la figura 26.

- 5 Las figuras 28A-E son gráficos de barras que muestran cómo marcadores para mesodermo (BRACHYURY, MOX1), ectodermo (SOX1, ZIC1) y endodermo visceral (SOX7) muestran una relación inversa con la expresión de CXCR4 a través de los mismos tratamientos presentados en la figura 26.

Las figuras 29A-F son micrografías que muestran la diferencia relativa en células inmunorreactivas a SOX17 a través de las tres de condiciones de los medios presentadas en las figuras 26-28.

- 10 Las figuras 30A-C son gráficos de puntos de citometría de flujo que demuestran el aumento del número de células CXCR4⁺ con la concentración creciente de activina A añadida a los medios de diferenciación.

Las figuras 31A-D son gráficos de barras que muestran las células CXCR4⁺ aisladas del tratamiento con activina A a alta dosis (A100-CX⁺) se enriquecen incluso más para marcadores de endodermo definitivo que la población parental (A100).

- 15 La figura 32 es un gráfico de barras que muestra la expresión génica de células CXCR4⁺ y CXCR4⁻ aisladas usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) así como la expresión génica en las poblaciones parentales. Esto demuestra que las células CXCR4⁺ contienen esencialmente toda la expresión génica de CXCR4 presentes en cada población parental y las poblaciones CXCR4⁻ contienen muy poca cantidad o ninguna de la expresión génica de CXCR4.

- 20 Las figuras 33A-D son gráficos de barras que demuestran la reducción de la expresión génica de mesodermo (BRACHYURY, MOX1), ectodermo (ZIC1) y endodermo visceral (SOX7) en las células CXCR4⁺ aisladas del tratamiento con activina A a alta dosis cuya expresión ya se suprimió para estos marcadores de endodermo no definitivo.

- 25 Las figuras 34A-M son gráficos de barras que muestran los patrones de expresión de genes marcadores que pueden usarse para identificar células de endodermo definitivo. El análisis de expresión de marcadores de endodermo definitivo, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 se muestra en los paneles G-L, respectivamente. El análisis de expresión de genes marcadores de linaje descritos anteriormente, SOX17, SOX7, SOX17/SOX7, TM, ZIC1 y MOX1 se muestra en los paneles A-F, respectivamente. El panel M muestra el análisis de expresión de CXCR4. Con respecto a cada uno de los paneles A-M, la columna marcada como hESC indica la expresión génica de células madre embrionarias humanas purificadas; 2NF indica células tratadas con FBS al 2%, sin adición de activina; 0.1A100 indica células tratadas con FBS al 0,1%, activina A 100 ng/ml; 1A100 indica células tratadas con FBS al 1%, activina A 100 ng/ml; y 2A100 indica células tratadas con FBS al 2%, activina A 100 ng/ml.

- 30 La figura 35 es un gráfico que muestra la expresión relativa del gen de PDX1 en un cultivo de hESC después de 4 días y 6 días con y sin activina en presencia de ácido retinoico (RA) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) añadidos en el día 4.

- 35 Las figuras 36A-F son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC después de 4 días y 6 días con y sin activina en presencia de ácido retinoico (RA) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) añadidos en el día 4. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) SOX17; (B) SOX7; (C) AFP; (D) SOX1; (E) ZIC1; y (F) NFM.

- 40 Las figuras 37A-C son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC después de 4 días y 8 días con y sin activina en presencia o ausencia de combinaciones de ácido retinoico (RA), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-4) añadidos en el día 4. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) SOX7; y (C) NFM.

- 45 Las figuras 38A-G son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de células de endodermo definitivo puesto en contacto con FGF-10 50 ng/ml en combinación con ácido retinoico (RA) a cualquiera de 1 μ M, 0,2 μ M o 0,04 μ M añadido en el día 4. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) HOXA3; (C) HOXC6; (D) HOXA13; (E) CDX1; (F) SOX1; y (G) NFM.

- 50 Las figuras 39A-E son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC después de 4 días y 8 días con y sin activina en presencia de combinaciones de ácido retinoico (RA), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) y uno de los siguientes: sustituto de suero (SR), suero bovino fetal (FBS) o B27. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) SOX7; (C) AFP; (D) ZIC1; y (E) NFM.

Las figuras 40A-B son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores para páncreas (PDX1,

- 5 HNF6) e hígado (HNF6) en un cultivo de hESC después de 6 días (justo antes de la adición de RA) y a los 9 días (tres días después de la exposición a RA). Se incluyeron diversas condiciones para comparar la adición de activina B a dosis de 10 ng/ml (a10), 25 ng/ml (a25) o 50 ng/ml (a50) en presencia de activina A o bien 25 ng/ml (A25) o bien 50 ng/ml (A50). La condición sin ninguna cantidad de activina A o activina B (NF) sirve como control negativo para la producción de endodermo definitivo y endodermo positivo para PDX1. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1 y (B) HNF6.
- 10 Las figuras 41A-C son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC con activina A 100 ng/ml (A100), 50 ng/ml (A50) o sin ella (NF) a los 5 días (justo antes de la adición de ácido retinoico) y a los 2, 4 y 6 días después de la exposición a RA (días 7, 9 y 11, respectivamente). La etiqueta en porcentaje directamente bajo cada barra indica la dosis de FBS durante días 3-5 de diferenciación. Empezando en el día 7, se hicieron crecer células tratadas con RA (R) en medio RPMI que comprende FBS al 0,5%. La concentración de RA fue de 2 μ M en el día 7, 1 μ M en el día 9 y 0,2 μ M en el día 11. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) ZIC1; (C) SOX7.
- 15 Las figuras 42A-B son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC tratadas en primer lugar con activina A en bajo contenido de FBS para inducir endodermo definitivo (día 5) y entonces con nuevo medio (A25R) que comprende activina A 25 ng/ml y RA o diversos medios condicionados (MEFCM, CM#2, CM#3 y CM#4) y RA para inducir endodermo que expresa PDX1. Se determinó la expresión de marcadores en los días 5, 6, 7, 8 y 9. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) CDX1.
- 20 La figura 43 es un gráfico que muestra la expresión relativa de PDX1 en un cultivo de hESC tratadas en primer lugar con activina A en bajo contenido de FBS para inducir endodermo definitivo y seguido por nuevos medios que comprenden activina A y ácido retinoico (A25R) o cantidades variables de RA en medios condicionados diluidos con nuevos medios. El volumen total de los medios es de 5 ml en todos los casos.
- 25 La figura 44 es una inmunotransferencia de tipo Western que muestra PDX1 inmunoprecipitado a partir de células de endodermo definitivo tratadas con RA 3 días (d8) y 4 días (d9) después de la adición de RA y activina A 50 ng/ml.
- La figura 45 es un gráfico resumen que presenta los resultados de una clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 marcadas con etiqueta genéticamente con un indicador de EGFP bajo el control del promotor de PDX1.
- 30 La figura 46 es un gráfico que muestra los niveles relativos de expresión de PDX1 normalizados con respecto a genes de mantenimiento para poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células negativas para EGFP (Neg) y células positivas para EGFP (GFP⁺).
- La figura 47 es un gráfico que muestra los niveles relativos de expresión de PDX1 normalizados con respecto a genes de mantenimiento para poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células negativas para EGFP (Neg), la mitad de la población celular positiva para EGFP que tiene la menor intensidad de señal de EGFP (Lo) y la mitad de la población celular positiva para EGFP que tiene la mayor intensidad de señal de EGFP (Hi).
- 35 Las figuras 48A-E son unos gráficos que muestran los niveles relativos de expresión normalizados con respecto a genes de mantenimiento de cinco marcadores de endodermo pancreático en poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células negativas para EGFP (Neg) y células positivas para EGFP (GFP⁺). Paneles: A - NKX2.2; B - GLUT2; C - HNF3 β ; D - KRT19 y E - HNF4 α .
- 40 La figura 49 son unos gráficos que muestran los niveles relativos de expresión normalizados con respecto a genes de mantenimiento de dos marcadores de endodermo no pancreático en poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células negativas para EGFP (Neg) y células positivas para EGFP (GFP⁺). Paneles: A - ZIC1 y B - GFAP.
- 45 Las figuras 50A-D son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC al inicio de la diferenciación antes de la adición de cualquier factor (0 d), y o bien en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 3 días (3 d) seguido por BMP4 3 ng/ml y FGF-10 50 ng/ml (B3F50) en los días 4-11 (7d, 9d y 11d) o bien en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 5 días (5d) seguido por activina A 25 ng/ml y RA 2 μ M (A25R) en los días 6 y 7 (7 d). Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) ALB; (B) PDX1; (C) HB9 y (D) HHX.
- 50 Las figuras 51A-D son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC al inicio de la diferenciación antes de la adición de cualquier factor (0 d), y después de cuatro días de diferenciación en una de las cuatro condiciones siguientes: (a) BMP4 100 ng/ml y SU5402 5 μ M (B/SU); (b) sin factor (NF); (c) activina A 15 ng/ml (A15); o (d) activina A 100 ng/ml. Esta diferenciación va seguida por incubación en presencia de BMP4 3 ng/ml, FGF-10 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina 0,5 μ M (B3F50K0.5) en los días 5-12 (6d, 8d, 10d y 12d). Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) CER; (B) SOX17; (C) PDX1 y
- 55 (D) ALB.
- Las figuras 52A-B son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC al

inicio de la diferenciación antes de la adición de cualquier factor (0 d); en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 3 días (3 d); en presencia de ningún factor (NF), FGF-10 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina 0,5 μ M (FK) o BMP4 3 ng/ml, FGF-10 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina 0,5 μ M (BFK) en los días 4 y 5 (5d); y en presencia de ningún factor en medio RPMI (2R), sin factor en medio RPMI complementado con B27 (ORB), sin factor en medio CMRL complementado con B27 (0CB), FGF-10 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina 0,5 μ M en medio CMRL complementado con B27 (FK) o BMP4 3 ng/ml, FGF-10 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina 0,5 μ M en medio CMRL complementado con B27 (BFK) en los días 6-13 (7d, 9d, 11d y 13d). Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1 y (B) ALB.

Las figuras 53A-E son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC al inicio de la diferenciación antes de la adición de cualquier factor (0 d), y o bien en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 3 días (3 d) seguido por BMP4 3 ng/ml y FGF-10 50 ng/ml (B3F50) en los días 4-11 (7d, 9d y 11d) o bien en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 5 días (5d) seguido por activina A 25 ng/ml y RA 2 μ M (A25R) en los días 6 y 7 (7 d). Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) SERPINF2; (C) DUSP9; (D) CDH6 y (E) SOX9.

Las figuras 54A-D son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESC al inicio de la diferenciación antes de la adición de cualquier factor (0 d), y o bien en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 3 días (3 d) seguido por BMP4 3 ng/ml y FGF-10 50 ng/ml (B3F50) en los días 4-11 (7d, 9d y 11d) o bien en presencia de activina A 100 ng/ml (A100) durante 5 días (5d) seguido por activina A 25 ng/ml y RA 2 μ M (A25R) en los días 6 y 7 (7 d). Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) HOXA1; (B) PDE11A; (C) FAM49A y (D) WNT5A.

Descripción detallada

Una fase crucial en el desarrollo humano temprano denominada gastrulación se produce 2-3 semanas después de la fecundación. La gastrulación es extremadamente importante porque en este momento se especifican y organizan en primer lugar las tres capas germinales primarias (Lu *et al.*, 2001; Schoenwolf y Smith, 2000). El ectodermo es responsable de la eventual formación de los revestimientos exteriores del cuerpo y de todo el sistema nervioso mientras que el corazón, la sangre, el hueso, músculo esquelético y otros tejidos conjuntivos se derivan del mesodermo. El endodermo definitivo se define como la capa germinal que es responsable de la formación de todo el tubo digestivo que incluye el esófago, estómago e intestinos delgado y grueso, y los órganos que derivan del tubo digestivo tales como pulmones, hígado, timo, glándulas paratiroides y tiroides, vesícula biliar y páncreas (Grapin-Botton y Melton, 2000; Kimelman y Griffin, 2000; Tremblay *et al.*, 2000; Wells y Melton, 1999; Wells y Melton, 2000). Debe hacerse una distinción muy importante entre el endodermo definitivo y el linaje completamente independiente de células denominado endodermo primitivo. El endodermo primitivo es responsable fundamentalmente de la formación de tejidos extraembrionarios, principalmente las partes de endodermo parietal y visceral del saco vitelino placentario y el material de matriz extracelular de la membrana de Reichert.

Durante la gastrulación, el proceso de formación de endodermo definitivo comienza con un acontecimiento de migración celular en el que células de mesendodermo (células competentes para formar mesodermo o endodermo) migran a través de una estructura denominada línea primitiva. El endodermo definitivo se deriva de células que migran a través de la parte anterior de la línea y a través del nodo (una estructura especializada en la región más anterior de la línea). A medida que se produce la migración, el endodermo definitivo puebla en primer lugar la parte más anterior del tubo digestivo y culmina con la formación del extremo posterior del tubo digestivo.

La expresión génica de PDX1 durante el desarrollo

PDX1 (también denominado STF-1, IDX-1, IPF-1, IUF-1 y GSF) es un factor de transcripción que es necesario para el desarrollo del páncreas y la parte rostral del duodeno. PDX1 se expresa en primer lugar en el endodermo pancreático, que surge del endodermo de intestino proximal posterior y producirá tanto células exocrinas como endocrinas, empezando en E8.5 en el ratón. Más tarde, PDX1 queda restringido a células beta y algunas células delta. Este patrón de expresión se mantiene en el adulto. PDX1 también se expresa en el endodermo duodenal de manera temprana en el desarrollo, que es adyacente al páncreas en formación, luego en los enterocitos duodenales y células enteroendocrinas, parte antral del estómago y en los conductos colédoco y cístico y las vías biliares. Esta región de expresión también queda limitada, en el momento en que la expresión pancreática queda restringida predominantemente a la parte rostral del duodeno.

La perturbación dirigida del gen de PDX1 en ratón y ser humano conduce a agénesis pancreática (Jonsson, J., *et al.*, Nature, 606-609, 1994; Offield, MF, *et al.* Devel. 983-995, 1996; Stoffers, D.A., *et al.* Nature Genetics, 106-110, 1997). También se requiere PDX1 durante la diferenciación terminal de las células endocrinas pancreáticas de somatostatina e insulina y la perturbación funcional de un único alelo en seres humanos se asocia con una grave disfunción pancreática de MODY tipo 4 (diabetes de los jóvenes de aparición en la madurez) y diabetes tipo II de aparición tardía (Stoffers D.A., *et al.* Nature Genetics 138-139, 1997).

Durante la embriogénesis del páncreas, se produce una gemación del tejido pancreático prospectivo en ambos lados dorsal y ventral del endodermo intestinal primitivo. Estos salientes aparecen de una manera definida regionalmente

en el extremo más posterior del endodermo de intestino proximal. En ratones, esto se produce aproximadamente a los 8,5-9,5 días tras la concepción (dte) y en seres humanos a los 30 dte. Hacia el 35 dte en el ser humano, han crecido las yemas ventral y dorsal, se ha desarrollado un sistema ductal ramificado y se fusiona para formar el órgano definitivo. Se requiere la proteína PDX1 para que las yemas pancreáticas tempranas se expandan y se diferencien en las células principales que comprende el páncreas que incluyen células ductales, acinares y endocrinas.

Debido a sus ubicaciones en lados opuestos del tubo digestivo y sus respectivas asociaciones con la notocorda y el mesodermo cardiaco, los programas de desarrollo para las estructuras pancreáticas dorsales y ventrales son claramente diferentes. Con respecto a los programas de desarrollo únicos que controlan la especificación de los primordios pancreáticos dorsales y ventrales, se han desarrollado dos metodologías independientes para producir endodermo de intestino proximal que expresa PDX1 desviado a la ruta dorsal y desviado a la ruta ventral a partir de cultivos de endodermo definitivo (DE) generados a partir de células madre embrionarias humanas (hESC). Estas células de endodermo de intestino proximal que expresan PDX1 (positivas para PDX1) son competentes para desarrollarse en epitelio pancreático y duodenal así como células endocrinas de la mucosa gástrica anterior.

Aspectos de la presente divulgación se refieren al descubrimiento de que pueden diferenciarse células de endodermo definitivo en al menos dos tipos distinguibles de células de endodermo de intestino proximal que expresan PDX1 (positivas para PDX1). También se ha descubierto que antes de la expresión de PDX1, pueden diferenciarse células de endodermo definitivo en una célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1. Proporcionando a estas células negativas para PDX1 un compuesto retinoide, tal como ácido retinoico, se induce la expresión de PDX1. En otro aspecto de la presente divulgación, se diferencian células de endodermo definitivo para formar células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. Tal como se usa en el presente documento, con respecto a endodermo de intestino proximal positivo para PDX1, "dorsal" o "desviado a la ruta dorsal" significa que las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 son aquellas que pueden dar lugar a tejidos derivados del lado dorsal de la parte posterior del intestino proximal, tal como la yema pancreática dorsal. Una vez que una célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 se "desvía a la ruta dorsal", normalmente no se desarrolla en tejidos derivados del lado ventral de la parte posterior del intestino proximal. En otro aspecto tal como se da a conocer en el presente documento, se diferencian células de endodermo definitivo para formar células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales. Tal como se usa en el presente documento, con respecto a endodermo de intestino proximal positivo para PDX1, "ventral" o "desviado a la ruta ventral" significa que las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 son aquellas que pueden dar lugar a tejidos derivados del lado ventral de la parte posterior del intestino proximal, tal como la yema hepática y la pancreática ventral. Una vez que una célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 se "desvía a la ruta ventral" normalmente no se desarrolla en tejidos derivados del lado dorsal de la parte posterior del intestino proximal.

En vista del descubrimiento anterior, se dan a conocer composiciones de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1, células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta dorsal, células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta ventral y/o composiciones que comprenden mezclas de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta dorsal y desviadas a la ruta ventral así como métodos para la producción de tales composiciones. También se da a conocer el examen de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 para detectar factores que fomentan la diferenciación de tales células. También se da a conocer el examen de poblaciones dorsales, ventrales o mixtas de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 para detectar factores que fomentan la diferenciación de tales células. Por "poblaciones mixtas" quiere decirse una población celular que comprende cantidades importantes tanto de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales como de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales.

Tal como se usa en el presente documento, factor de crecimiento de la familia de FGF incluye, pero no se limita a, un factor de crecimiento de la familia de FGF seleccionado del grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 y/o FGF23.

Tal como se usa en el presente documento, inhibidor de Hedgehog incluye, pero no se limita a, KKAD-ciclopamina, análogos de KKAD-ciclopamina, jervina, análogos de jervina, anticuerpos de bloqueo de la ruta de Hedgehog y cualquier otro inhibidor de la función de la ruta de Hedgehog conocido por los expertos habituales en la técnica.

Células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 y procedimientos relacionados con las mismas

También se dan a conocer procedimientos novedosos, definidos para la producción de células de endodermo negativas para PDX1, en los que las células de endodermo negativas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la región de intestino proximal/intestino medio del tubo digestivo (endodermo de intestino proximal/intestino medio negativo para PDX1). Tal como se usa en el presente documento, "multipotente" o "célula multipotente" se refiere a un tipo de células que pueden dar lugar a un número limitado de otros tipos de células particulares pero que no pueden dar lugar a los tres linajes primarios de células embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo). Tal como se usa en el presente documento, "intestino

proximal/intestino medio" se refiere a células de la parte anterior del tubo digestivo así como células de la parte central del tubo digestivo, incluyendo células de la unión del intestino proximal/intestino medio.

También se dan a conocer procedimientos para la producción de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1. Tal como se da a conocer en el presente documento, estas células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 pueden ser células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte anterior del tubo digestivo (endodermo de intestino proximal negativo para PDX1).

Poblaciones dorsales, ventrales y mixtas de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 y procedimientos relacionados con las mismas

Se dan a conocer procedimientos novedosos, definidos para la producción de células de endodermo negativas para PDX1, en los que las células de endodermo positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la región de intestino proximal/intestino medio del tubo digestivo (endodermo de intestino proximal/intestino medio positivo para PDX1). Otras realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos novedosos, definidos para la producción de células de endodermo positivas para PDX1, en los que las células de endodermo positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la región de intestino proximal/intestino medio del tubo digestivo (endodermo de intestino proximal/intestino medio positivo para PDX1). Tal como se usa en el presente documento, "multipotente" o "célula multipotente" se refiere a un tipo de células que pueden dar lugar a un número limitado de otros tipos de células particulares pero que no pueden dar lugar a los tres linajes primarios de células embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo). Tal como se usa en el presente documento, "intestino proximal/intestino medio" se refiere a células de la parte anterior del tubo digestivo así como células de la parte central del tubo digestivo, incluyendo células de la unión del intestino proximal/intestino medio. En algunas realizaciones, las células de endodermo positivas para PDX1 son células de endodermo de intestino proximal dorsales. En otras realizaciones, las células de endodermo positivas para PDX1 son células de endodermo de intestino proximal ventrales.

Algunas realizaciones preferidas de la presente invención se refieren a procedimientos para la producción de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. En algunas realizaciones, estas células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte anterior del tubo digestivo (endodermo de intestino proximal positivo para PDX1). En algunas realizaciones, las células de endodermo positivas para PDX1 son células de endodermo de intestino proximal dorsales. En otras realizaciones, las células de endodermo positivas para PDX1 son células de endodermo de intestino proximal ventrales.

Realizaciones preferidas adicionales se refieren a procedimientos para la producción de células de endodermo positivas para PDX1 de la parte posterior del intestino proximal. En algunas realizaciones, estas células de endodermo positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte posterior de la región del intestino proximal del tubo digestivo. En algunas realizaciones, las células de endodermo positivas para PDX1 son células de endodermo dorsal que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte posterior del intestino proximal, tales como células de la yema pancreática dorsal. En otras realizaciones, las células de endodermo positivas para PDX1 son células de endodermo de intestino proximal ventrales que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte posterior del intestino proximal, tales como células de la yema pancreática ventral.

Las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, tales como las producidas según los métodos descritos en el presente documento, pueden usarse para producir células β productoras de insulina totalmente diferenciadas. En algunas realizaciones de la presente invención, se producen células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales mediante la diferenciación de células de endodermo definitivo que no expresan sustancialmente PDX1 (células de endodermo definitivo negativas para PDX1; también denominadas en el presente documento endodermo definitivo) para formar células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Se da a conocer que pueden prepararse células de endodermo definitivo negativas para PDX1 mediante la diferenciación de células pluripotentes, tales como células madre embrionarias, tal como se describe en el presente documento o mediante cualquier otro método conocido. Se describe un método conveniente y altamente eficaz para producir endodermo definitivo negativo para PDX1 a partir de células pluripotentes en la patente estadounidense n.º 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004.

Los procedimientos de producción de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, proporcionan la base para la producción eficaz de tejidos pancreáticos tales como células acinares, células ductales y células de islote a partir de células pluripotentes. Tal como se da a conocer en el presente documento, pueden derivarse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 humanas, que a su vez, se derivan de las hESC. Estas células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales pueden usarse entonces para producir células β productoras de insulina funcionales. Para obtener cantidades útiles de células β productoras de insulina, se desea una alta eficiencia de diferenciación para cada una de las etapas de diferenciación que se producen antes de

alcanzar el destino de célula β /de islote pancreático. Dado que la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales representa una etapa temprana para la producción de células β /de islote pancreático funcionales (tal como se muestra en la figura 1), se desea particularmente una alta eficiencia de diferenciación en esta etapa.

En vista del deseo de una diferenciación eficiente de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, algunos aspectos tal como se dan a conocer en el presente documento se refieren a la metodología *in vitro* que da como resultado una conversión de aproximadamente el 2-25% de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. Algunos aspectos tal como se dan a conocer en el presente documento se refieren a metodología *in vitro* que da como resultado una conversión de aproximadamente el 26% a al menos aproximadamente el 75% de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. Otros aspectos tal como se dan a conocer en el presente documento se refieren a la metodología *in vitro* que da como resultado una conversión de aproximadamente el 26% a al menos aproximadamente el 75% de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales. Normalmente, los métodos descritos anteriormente engloban la aplicación de condiciones de cultivo y factor de crecimiento de un modo definido y especificado temporalmente. El enriquecimiento adicional de la población celular para células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, puede lograrse mediante el aislamiento y/o la purificación de las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 de otras células en la población usando un reactivo que se une específicamente a las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. Como alternativa, pueden marcarse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, con un gen indicador, tal como proteína fluorescente verde (GFP), para permitir la detección de expresión de PDX1. Tales células con marcaje fluorescente pueden purificarse entonces mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Aspectos adicionales tal como se dan a conocer en el presente documento se refieren a cultivos celulares y poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 así como métodos para identificar factores útiles en la diferenciación en y a partir de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1. Aspectos adicionales tal como se dan a conocer en el presente documento se refieren a cultivos celulares y poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales así como métodos para identificar factores útiles en la diferenciación en y a partir de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal. Todavía otros aspectos tal como se dan a conocer en el presente documento se refieren a cultivos celulares y poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales así como métodos para identificar factores útiles en la diferenciación en y a partir de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 ventral.

Para determinar la cantidad de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 en un cultivo celular o una población celular, se desea un método de distinción de este tipo de células de las demás células en el cultivo o en la población. Por consiguiente, determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a marcadores celulares cuya presencia, ausencia y/o niveles relativos de expresión son indicativos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, así como métodos para detectar y determinar la expresión de tales marcadores. Tal como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere a la producción de un material o una sustancia así como el nivel o la cantidad de producción de un material o una sustancia. Por tanto, determinar la expresión de un marcador específico se refiere a detectar o bien la cantidad relativa o absoluta del marcador que se expresa o bien detectar simplemente la presencia o ausencia del marcador. Tal como se usa en el presente documento, "marcador" se refiere a cualquier molécula que puede observarse o detectarse. Por ejemplo, un marcador puede incluir, pero no se limita a, un ácido nucleico, tal como un transcrito de un gen específico, un producto polipeptídico de un gen, un polipeptido producto no génico, una glicoproteína, un hidrato de carbono, un glicolípido, un lípido, una lipoproteína o una molécula pequeña (por ejemplo, moléculas que tienen un peso molecular menor de 10.000 uma).

En algunas realizaciones de la presente invención, la presencia, ausencia y/o el nivel de expresión de un marcador se determina mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). Por ejemplo, la cantidad de transcrito producida por determinados marcadores genéticos, tales como PDX1, SOX17, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, alfa-fetoproteína (AFP), homeocaja A13 (HOXA13), homeocaja C6 (HOXC6), y/u otros marcadores descritos en el presente documento se determina mediante Q-PCR. En otras realizaciones, se usa inmunohistoquímica para detectar las proteínas expresadas por los genes mencionados anteriormente. En todavía otras realizaciones, se usan técnicas tanto de Q-PCR como de inmunohistoquímicas para identificar y determinar la cantidad o las proporciones relativas de tales marcadores. En algunas realizaciones, se detectan marcadores que son comunes para las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 tanto dorsales como ventrales, tales como PDX1 y/o uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3, mediante Q-PCR y/o inmunohistoquímica. En otras realizaciones, se detectan marcadores que se expresan de manera preferente, específica o única en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales, tales como uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4, mediante Q-PCR y/o inmunohistoquímica.

Usando los métodos de diferenciación y detección descritos en el presente documento, es posible identificar células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, así como determinar la proporción de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en un cultivo celular o una población celular. Por ejemplo, tal como se da a conocer en el presente documento, las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales o poblaciones celulares que se producen, expresan el gen de PDX1 a un nivel de al menos aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones celulares negativas para PDX1. Las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales y poblaciones celulares que se producen, pueden expresar el gen de PDX1 a un nivel de más de 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones celulares negativas para PDX1.

Tal como se da a conocer en el presente documento, las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales o poblaciones celulares que se producen, expresan uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en PDX1, SOX17, HOXA13 y HOXC6 a un nivel de aproximadamente 2 o más de 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones celulares de endodermo definitivo negativas para PDX1. Las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales o poblaciones celulares que se producen, pueden expresar uno o más de los marcadores seleccionados de la tabla 3 a un nivel de aproximadamente 2 o más de 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones celulares de endodermo definitivo negativas para PDX1. Las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales o poblaciones celulares que se producen, pueden expresar uno o más de los marcadores seleccionados de la tabla 4 a un nivel de aproximadamente 2 o más de 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones celulares de endodermo definitivo negativas para PDX1.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento tienen varias características útiles. Por ejemplo, los cultivos celulares y las poblaciones celulares que comprenden endodermo positivo para PDX1, incluyendo endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal y/o ventral, así como los métodos para producir tales cultivos celulares y poblaciones celulares, son útiles para modelar las fases tempranas del desarrollo humano. Además, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento también pueden servir para intervención terapéutica en estados patológicos, tales como diabetes mellitus. Por ejemplo, puesto que el endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 sirve como fuente sólo para un número limitado de tejidos, puede usarse en el desarrollo de tipos de células o tejidos puros.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 (ENDODERMO DEFINITIVO) A PARTIR DE CÉLULAS PLURIPOTENTES

Se producen cultivos celulares y/o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 a partir de células pluripotentes produciendo en primer lugar endodermo definitivo negativo para PDX1 (también denominado "endodermo definitivo"). Se describen procedimientos para la diferenciación de células pluripotentes para producir cultivos celulares y poblaciones celulares enriquecidas que comprenden endodermo definitivo brevemente a continuación y en detalle en la patente estadounidense n.º 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004. En algunos de estos procedimientos, las células pluripotentes usadas como material de partida son células madre. En determinados procedimientos, en el contexto de la presente divulgación, los cultivos celulares de endodermo definitivo y las poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo definitivo se producen a partir de células madre embrionarias. Tal como se usa en el presente documento, "embrionario" se refiere a una gama de fases de desarrollo de un organismo que comienzan con un cigoto individual y que terminan con una estructura multicelular que ya no comprende células pluripotentes o totipotentes distintas de las células gaméticas desarrolladas. Un método preferido tal como se da a conocer para derivar células de endodermo definitivo utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida para la producción de endodermo definitivo. Las células madre embrionarias humanas pueden mantenerse en cultivo en un estado pluripotente sin diferenciación sustancial usando métodos que se conocen en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.453.357, 5.670.372, 5.690.926, 5.843.780, 6.200.806 y 6.251.671.

En el contexto de la presente divulgación, en algunos procedimientos para producir células de endodermo definitivo, las hESC se mantienen sobre una capa alimentadora. En tales procedimientos, puede usarse cualquier capa alimentadora que permita que se mantengan las hESC en un estado pluripotente. Una capa alimentadora usada habitualmente para el cultivo de las células madre embrionarias humanas es una capa de fibroblastos de ratón. Más recientemente, se han desarrollado capas alimentadoras de fibroblasto humanos para su uso en el cultivo de las hESC (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0072117).

Procedimientos alternativos para producir endodermo definitivo permiten el mantenimiento de hESC pluripotentes sin el uso de una capa alimentadora. Se han descrito métodos de mantenimiento de hESC pluripotentes en condiciones carentes de capa alimentadora en la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0175956.

Las células madre embrionarias humanas usadas en el presente documento pueden mantenerse en cultivo o bien con o bien sin suero. En algunos procedimientos de mantenimiento de células madre embrionarias, se usa sustituto de suero. En otros, se usan técnicas de cultivo sin suero, tales como las descritas en la solicitud de patente

estadounidense n.º 2003/0190748.

Las células madre se mantienen en cultivo en un estado pluripotente mediante pases de rutina hasta que se desee que se diferencien en endodermo definitivo. En algunos procedimientos, la diferenciación en endodermo definitivo se logra proporcionando al cultivo de células madre un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en una cantidad suficiente para fomentar la diferenciación en endodermo definitivo. Los factores de crecimiento de la superfamilia de TGF β que son útiles para la producción de endodermo definitivo se seleccionan de los subgrupos de nodal/activina o BMP. En algunos procedimientos de diferenciación preferidos, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en nodal, activina A, activina B y BMP4. Adicionalmente, el factor de crecimiento Wnt3a y otros miembros de la familia de Wnt son útiles para la producción de células de endodermo definitivo. En determinados procedimientos de diferenciación, pueden usarse combinaciones de cualquiera de los factores de crecimiento mencionados anteriormente.

Con respecto a algunos de los procedimientos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células de endodermo definitivo, se proporcionan los factores de crecimiento mencionados anteriormente a las células de modo que los factores de crecimiento están presentes en los cultivos a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una parte de las células madre en células de endodermo definitivo. En algunos procedimientos, los factores de crecimiento mencionados anteriormente están presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml, al menos aproximadamente 1000 ng/ml, al menos aproximadamente 2000 ng/ml, al menos aproximadamente 3000 ng/ml, al menos aproximadamente 4000 ng/ml, al menos aproximadamente 5000 ng/ml o más de aproximadamente 5000 ng/ml.

En determinados procedimientos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células de endodermo definitivo, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se retiran del cultivo celular de manera posterior a su adición. Por ejemplo, los factores de crecimiento pueden retirarse en un plazo de aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición. En un procedimiento preferido, los factores de crecimiento se retiran aproximadamente cuatro días después de su adición.

Pueden hacerse crecer cultivos de células de endodermo definitivo en medio que contiene suero reducido o no contiene suero. En determinadas condiciones de cultivo, las concentraciones de suero pueden oscilar entre aproximadamente el 0,05% v/v y aproximadamente el 20% v/v. Por ejemplo, en algunos procedimientos de diferenciación, la concentración de suero del medio puede ser menor de aproximadamente el 0,05% (v/v), menor de aproximadamente el 0,1% (v/v), menor de aproximadamente el 0,2% (v/v), menor de aproximadamente el 0,3% (v/v), menor de aproximadamente el 0,4% (v/v), menor de aproximadamente el 0,5% (v/v), menor de aproximadamente el 0,6% (v/v), menor de aproximadamente el 0,7% (v/v), menor de aproximadamente el 0,8% (v/v), menor de aproximadamente el 0,9% (v/v), menor de aproximadamente el 1% (v/v), menor de aproximadamente el 2% (v/v), menor de aproximadamente el 3% (v/v), menor de aproximadamente el 4% (v/v), menor de aproximadamente el 5% (v/v), menor de aproximadamente el 6% (v/v), menor de aproximadamente el 7% (v/v), menor de aproximadamente el 8% (v/v), menor de aproximadamente el 9% (v/v), menor de aproximadamente el 10% (v/v), menor de aproximadamente el 15% (v/v) o menor de aproximadamente el 20% (v/v). En algunos procedimientos, se hacen crecer células de endodermo definitivo sin suero o con sustituto de suero. En todavía otros procedimientos, se hacen crecer células de endodermo definitivo en presencia de B27. En tales procedimientos, la concentración del complemento B27 puede oscilar entre aproximadamente el 0,1% v/v y aproximadamente el 20% v/v.

MONITORIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES EN ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 (ENDODERMO DEFINITIVO)

Puede monitorizarse la progresión del cultivo de hESC en endodermo definitivo determinando la expresión de marcadores característicos de endodermo definitivo. En algunos procedimientos, la expresión de determinados marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de determinados marcadores puede determinarse midiendo el nivel al que está presente el marcador en las células del cultivo celular o la población celular. En tales procedimientos, la medición de la expresión de marcadores puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método de cuantificación de la expresión de marcadores que se producen por genes marcadores es a través del uso de PCR cuantitativa (Q-PCR). Se conocen bien en la técnica métodos de realización de Q-PCR. Otros métodos que se conocen en la técnica también pueden usarse para cuantificar la expresión de genes marcadores. Por ejemplo, la expresión de un producto de gen marcador puede detectarse usando anticuerpos específicos para el producto de gen marcador de interés. En determinados procedimientos, se determina la expresión de genes marcadores característicos de endodermo definitivo así como la falta de expresión significativa de genes marcadores característicos de las hESC y otros tipos de células.

Tal como se describe adicionalmente en los ejemplos a continuación, un marcador fiable de endodermo definitivo es el gen de SOX17. Como tal, las células de endodermo definitivo producidas mediante los procedimientos descritos

en el presente documento expresan el gen marcador de SOX17, produciendo de ese modo el producto génico de SOX17. Otros marcadores de endodermo definitivo son MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1. Puesto que las células de endodermo definitivo expresan el gen marcador de SOX17 a un nivel mayor que el del gen marcador de SOX7, que es característico de endodermo primitivo y visceral (véase la tabla 1), en algunos procedimientos, se monitoriza la expresión tanto de SOX17 como de SOX7. En otros procedimientos, se monitoriza la expresión tanto del gen marcador de SOX17 como del gen marcador de OCT4, que es característico de las hESC. Adicionalmente, dado que las células de endodermo definitivo expresan el gen marcador de SOX17 a un nivel mayor que el de los genes marcadores de AFP, SPARC o trombomodulina (TM), también puede monitorizarse la expresión de estos genes.

Otro marcador de endodermo definitivo es el gen de CXCR4. El gen de CXCR4 codifica para un receptor de quimiocina de superficie celular cuyo ligando es el componente quimiotáctico SDF-1. Se cree que los papeles principales de las células que portan el receptor CXCR4 en el adulto son la migración de células hematopoyéticas a la médula ósea, el tráfico de linfocitos y la diferenciación de diversos linajes de células sanguíneas de macrófagos y células [Kim, C., y Broxmeyer, H. J. *Leukocyte Biol.* 65, 6-15 (1999)]. El receptor CXCR4 también funciona como correceptor para la entrada de VIH-1 en las células T [Feng, Y., *et al.* *Science*, 272, 872-877 (1996)]. En una serie extensa de estudios llevados a cabo por [McGrath, K.E. *et al.* *Dev. Biology* 213, 442-456 (1999)], la expresión del receptor de quimiocina CXCR4 y su ligando único, SDF-1 [Kim, C., y Broxmeyer, H. J. *Leukocyte Biol.* 65, 6-15 (1999)], se delinearon durante el desarrollo temprano y la vida adulta en el ratón. La interacción CXCR4/SDF1 en el desarrollo resultó evidente cuando se demostró que si se perturbaba cualquier gen en ratones transgénicos [Nagasawa *et al.* *Nature*, 382, 635-638 (1996)], Ma, Q., *et al.* *Immunity*, 10, 463-471 (1999)] dio como resultado letalidad embrionaria tardía. McGrath *et al.* demostraron que CXCR4 es el ARN mensajero de receptor de quimiocina más abundante detectado durante la gastrulación temprana de embriones (E7.5) usando una combinación de metodologías de protección por ARNasa e hibridación *in situ*. En el embrión en gastrulación, la señalización de CXCR4/SDF-1 parece estar implicada principalmente en la inducción de migración de capa germinal de línea primitiva y se expresa en endodermo definitivo, mesodermo y mesodermo extraembrionario presentes en este momento. En embriones de ratón en E7.2-7.8, CXCR4 y alfa-fetoproteína son mutuamente excluyentes, lo que indica una falta de expresión en endodermo visceral [McGrath, K.E. *et al.* *Dev. Biology* 213, 442-456 (1999)].

Puesto que las células de endodermo definitivo producidas mediante la diferenciación de células pluripotentes expresan el gen marcador de CXCR4, puede monitorizarse la expresión de CXCR4 para seguir la pista de la producción de células de endodermo definitivo. Adicionalmente, las células de endodermo definitivo producidas mediante los métodos descritos en el presente documento expresan otros marcadores de endodermo definitivo incluyendo, pero sin limitarse a, SOX17, MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1. Puesto que las células de endodermo definitivo expresan el gen marcador de CXCR4 a un nivel mayor que el del gen marcador de SOX7, puede monitorizarse la expresión tanto de CXCR4 como de SOX7. En otros procedimientos, se monitoriza la expresión tanto del gen marcador de CXCR4 como del gen marcador de OCT4. Adicionalmente, dado que las células de endodermo definitivo expresan el gen marcador de CXCR4 a un nivel mayor que el de los genes marcadores AFP, SPARC o trombomodulina (TM), también puede monitorizarse la expresión de estos genes.

Se apreciará que la expresión de CXCR4 en células de endodermo no excluye la expresión de SOX17. Como tal, las células de endodermo definitivo producidas mediante los procedimientos descritos en el presente documento expresarán sustancialmente SOX17 y CXCR4 pero no expresarán sustancialmente AFP, TM, SPARC o PDX1.

ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y/O PURIFICACIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO

Las células de endodermo definitivo producidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente pueden enriquecerse, aislarse y/o purificarse usando una etiqueta de afinidad que es específica para tales células. Ejemplos de etiquetas de afinidad específicas para células de endodermo definitivo son anticuerpos, ligandos u otros agentes de unión que son específicos para una molécula de marcador, tal como un polipéptido, que está presente en la superficie celular de células de endodermo definitivo pero que no está presente sustancialmente en otros tipos de células que se encontrarían en un cultivo celular producido mediante los métodos descritos en el presente documento. En algunos procedimientos, un anticuerpo que se une a CXCR4 se usa como etiqueta de afinidad para el enriquecimiento, aislamiento o la purificación de células de endodermo definitivo. En otros procedimientos, la quimiocina SDF-1 u otras moléculas basadas en SDF-1 también pueden usarse como etiquetas de afinidad. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de SDF-1, fusiones de SDF-1 o miméticos de SDF-1.

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos y usarlos para el aislamiento de células y tales métodos pueden implementarse para su uso con los anticuerpos y las células de endodermo definitivo descritos en el presente documento. En un procedimiento, un anticuerpo que se une a CXCR4 se fija a una perla magnética y entonces se permite que se una a células de endodermo definitivo en un cultivo celular que se ha tratado enzimáticamente para reducir la adhesión intercelular y a sustrato. Los complejos de célula/anticuerpo/perla se exponen entonces a un campo magnético móvil que se usa para separar células de endodermo definitivo unidas a perla de las células no unidas. Una vez que las células de endodermo definitivo se separan físicamente de otras células en cultivo, se perturba la unión a anticuerpo y vuelven a sembrarse en placa las células en medio de cultivo tisular apropiado.

También pueden usarse métodos adicionales para obtener poblaciones o cultivos de células de endodermo definitivo enriquecidos, aislados o purificados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se incuba el anticuerpo para CXCR4 con un cultivo celular que contiene endodermo definitivo que se ha tratado para reducir la adhesión intercelular y a sustrato. Entonces, se lavan las células, se centrifugan y se resuspenden. Entonces, se incuba la suspensión celular con un anticuerpo secundario, tal como un anticuerpo conjugado con FITC que puede unirse al anticuerpo primario. Entonces, se lavan las células, se centrifugan y se resuspenden en tampón. Entonces se analiza la suspensión celular y se clasifica usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Se recogen las células positivas para CXCR4 por separado de las células negativas para CXCR4, dando como resultado de ese modo el aislamiento de tales tipos de células. Si se desea, las composiciones de células aisladas pueden purificarse adicionalmente usando un método basado en afinidad alternativo o mediante tandas adicionales de clasificación usando los mismos o diferentes marcadores que son específicos para endodermo definitivo.

En todavía otros procedimientos, se enriquecen, aíslan y/o purifican células de endodermo definitivo usando un ligando u otra molécula que se une a CXCR4. En algunos procedimientos, la molécula es SDF-1 o un fragmento, una fusión o un mimético del mismo.

En procedimientos preferidos, se enriquecen, aíslan y/o purifican células de endodermo definitivo de otras células de endodermo no definitivo después de inducir los cultivos de células madre para que se diferencien hacia el linaje de endodermo definitivo. Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos anteriormente pueden usarse con tales cultivos en cualquier fase de diferenciación.

Además de los procedimientos que acaban de describirse, también pueden aislarse células de endodermo definitivo mediante otras técnicas para aislamiento de células. Adicionalmente, también pueden enriquecerse o aislarse células de endodermo definitivo mediante métodos de subcultivo en serie en condiciones de crecimiento que fomentan la supervivencia selectiva o expansión selectiva de las células de endodermo definitivo.

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse *in vitro* poblaciones de células y/o tejidos de endodermo definitivo enriquecidos, aislados y/o purificados a partir de cultivos celulares o poblaciones celulares pluripotentes, tales como cultivos o poblaciones de células madre, que se han sometido al menos a cierta diferenciación. En algunos métodos, las células experimentan diferenciación aleatoria. En un método preferido, sin embargo, las células se dirigen a diferenciarse principalmente en endodermo definitivo. Algunos métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación preferidos se refieren a la producción *in vitro* de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas. Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden enriquecerse poblaciones celulares o cultivos celulares en contenido de endodermo definitivo en al menos aproximadamente 2 a aproximadamente 1000 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar.

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 (ENDODERMO DEFINITIVO)

Las composiciones de células producidas mediante los métodos descritos anteriormente incluyen cultivos celulares que comprenden endodermo definitivo y poblaciones celulares enriquecidas en endodermo definitivo. Por ejemplo, pueden producirse cultivos celulares que comprenden células de endodermo definitivo, en los que al menos aproximadamente el 50-80% de las células en cultivo son células de endodermo definitivo. Dado que la eficiencia del procedimiento de diferenciación puede ajustarse modificando determinados parámetros, que incluyen pero no se limitan a, condiciones de crecimiento celular, concentraciones de factor de crecimiento y el momento de las etapas de cultivo, los procedimientos de diferenciación descritos en el presente documento pueden dar como resultado una conversión de aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o mayor que aproximadamente el 95% de células pluripotentes en endodermo definitivo. En procedimientos en los que se emplea el aislamiento de células de endodermo definitivo, por ejemplo, usando un reactivo de afinidad que se une al receptor de CXCR4, puede recuperarse una población celular de endodermo definitivo sustancialmente pura.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL NEGATIVO PARA PDX1

Las células de endodermo definitivo pueden especificarse hacia la diferenciación pancreática mediante la diferenciación adicional de estas células para producir células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1. En algunos de los procedimientos de diferenciación descritos en el presente documento, cultivos celulares así como poblaciones celulares enriquecidas o purificadas que comprenden células de endodermo definitivo pueden usarse para la diferenciación adicional en cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1.

Normalmente, se diferencian células de endodermo definitivo en células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 mediante la reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la

superfamilia de TGF β en un cultivo celular o una población celular de células de endodermo definitivo positivas para SOX17.

La reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β puede estar mediada por la dilución o la retirada de un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β añadido de manera exógena, tal como activina A, del cultivo celular o la población celular de endodermo definitivo.

La señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β pueden reducirse o eliminarse proporcionando a las células de endodermo definitivo un compuesto que bloquea la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β , tal como folistatina y/o nogina. La señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β puede reducirse o eliminarse durante aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días o más de aproximadamente diez días posteriores a la diferenciación de las células pluripotentes humanas en células de endodermo definitivo.

En algunas realizaciones, se potencia la diferenciación de células de endodermo definitivo en células de endodermo de intestino proximal proporcionando al cultivo celular o la población celular de endodermo definitivo un factor de crecimiento de la familia de FGF y/o un inhibidor de la ruta de Hedgehog. En tales realizaciones, el factor de crecimiento de la familia de FGF y/o el inhibidor de la ruta de Hedgehog se proporciona en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días o más de aproximadamente diez días posteriores a la reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en el cultivo celular de endodermo definitivo. En una realización preferida, el factor de crecimiento de la familia de FGF y/o el inhibidor de la ruta de Hedgehog se proporciona aproximadamente en el mismo momento que la reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en el cultivo celular de endodermo definitivo.

En una realización preferida, el factor de crecimiento de la familia de FGF proporcionado al cultivo celular o a la población celular de endodermo definitivo es FGF10 y/o FGF7. Sin embargo, se apreciará que pueden proporcionarse otros factores de crecimiento de la familia de FGF o análogos o miméticos de factor de crecimiento de la familia de FGF en vez de o además de FGF10 y/o FGF7. Por ejemplo, puede proporcionarse un factor de crecimiento de la familia de FGF seleccionado del grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 y/o FGF23. En tales realizaciones, el factor de crecimiento de la familia de FGF y/o el análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF se proporciona a las células de un cultivo celular de tal manera que está presente a una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el inhibidor de Hedgehog puede ser KAAD-ciclopamina. Sin embargo, se apreciará que pueden usarse otros inhibidores de Hedgehog. Tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a, análogos de KAAD-ciclopamina, jervina, análogos de jervina, anticuerpos de bloqueo de la ruta de Hedgehog y cualquier otro inhibidor de la función de la ruta de Hedgehog conocido por los expertos habituales en la técnica. Cuando se usa solo o junto con un factor de crecimiento de la familia de FGF, el inhibidor de Hedgehog puede proporcionarse a una concentración de al menos aproximadamente 0,01 μ M, al menos aproximadamente 0,02 μ M, al menos aproximadamente 0,04 μ M, al menos aproximadamente 0,08 μ M, al menos aproximadamente 0,1 μ M, al menos aproximadamente 0,2 μ M, al menos aproximadamente 0,3 μ M, al menos aproximadamente 0,4 μ M, al menos aproximadamente 0,5 μ M, al menos aproximadamente 0,6 μ M, al menos aproximadamente 0,7 μ M, al menos aproximadamente 0,8 μ M, al menos aproximadamente 0,9 μ M, al menos aproximadamente 1 μ M, al menos aproximadamente 1,1 μ M, al menos aproximadamente 1,2 μ M, al menos aproximadamente 1,3 μ M, al menos aproximadamente 1,4 μ M, al menos aproximadamente 1,5 μ M, al menos aproximadamente 1,6 μ M, al menos aproximadamente 1,7 μ M, al menos aproximadamente 1,8 μ M, al menos aproximadamente 1,9 μ M, al menos aproximadamente 2 μ M, al menos aproximadamente 2,1 μ M, al menos aproximadamente 2,2 μ M, al menos aproximadamente 2,3 μ M, al menos aproximadamente 2,4 μ M, al menos aproximadamente 2,5 μ M, al menos aproximadamente 2,6 μ M, al menos aproximadamente 2,7 μ M, al menos aproximadamente 2,8 μ M, al menos aproximadamente 2,9 μ M, al menos aproximadamente 3 μ M, al menos aproximadamente 3,5 μ M, al menos aproximadamente 4 μ M, al menos aproximadamente 4,5 μ M, al menos aproximadamente 5 μ M, al menos aproximadamente 10 μ M, al menos aproximadamente 20 μ M, al menos aproximadamente 30 μ M, al menos aproximadamente 40 μ M o al menos aproximadamente 50 μ M.

En un procedimiento preferido para la producción de una población de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 a partir de células de endodermo definitivo, la señalización de factor de crecimiento de la

superfamilia de TGF β se reduce o elimina durante aproximadamente dos días posteriores a la diferenciación de una parte sustancial de las células pluripotentes humanas en endodermo definitivo (por ejemplo, después de un protocolo de diferenciación de tres días, cuatro o cinco días tal como se describe en los ejemplos a continuación). Aproximadamente en el mismo momento, se proporciona al cultivo celular o a la población celular de células de endodermo definitivo 50 ng/ml de FGF-10 y KAAD-ciclopamina 0,2 μ M.

Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 pueden diferenciarse y hacerse crecer adicionalmente en un medio que contiene suero reducido o no contiene suero. Las concentraciones de suero pueden oscilar entre aproximadamente el 0,05% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v). En algunos procedimientos, se hacen crecer células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 con sustituto de suero. Por ejemplo, en determinados procedimientos, la concentración de suero del medio puede ser menor de aproximadamente el 0,05% (v/v), menor de aproximadamente el 0,1% (v/v), menor de aproximadamente el 0,2% (v/v), menor de aproximadamente el 0,3% (v/v), menor de aproximadamente el 0,4% (v/v), menor de aproximadamente el 0,5% (v/v), menor de aproximadamente el 0,6% (v/v), menor de aproximadamente el 0,7% (v/v), menor de aproximadamente el 0,8% (v/v), menor de aproximadamente el 0,9% (v/v), menor de aproximadamente el 1% (v/v), menor de aproximadamente el 2% (v/v), menor de aproximadamente el 3% (v/v), menor de aproximadamente el 4% (v/v), menor de aproximadamente el 5% (v/v), menor de aproximadamente el 6% (v/v), menor de aproximadamente el 7% (v/v), menor de aproximadamente el 8% (v/v), menor de aproximadamente el 9% (v/v), menor de aproximadamente el 10% (v/v), menor de aproximadamente el 15% (v/v) o menor de aproximadamente el 20% (v/v). En determinados procedimientos descritos en el presente documento, el medio de diferenciación no incluye suero, sustituto de suero o cualquier complemento que comprende insulina o factores de crecimiento similares a insulina.

En determinados procedimientos, se hacen crecer células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 en presencia de B27. En tales procedimientos de diferenciación, puede proporcionarse B27 al medio de cultivo en concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v) o en concentraciones mayores de aproximadamente el 20% (v/v). En determinados procedimientos, la concentración de B27 en el medio es de aproximadamente el 0,1% (v/v), aproximadamente el 0,2% (v/v), aproximadamente el 0,3% (v/v), aproximadamente el 0,4% (v/v), aproximadamente el 0,5% (v/v), aproximadamente el 0,6% (v/v), aproximadamente el 0,7% (v/v), aproximadamente el 0,8% (v/v), aproximadamente el 0,9% (v/v), aproximadamente el 1% (v/v), aproximadamente el 2% (v/v), aproximadamente el 3% (v/v), aproximadamente el 4% (v/v), aproximadamente el 5% (v/v), aproximadamente el 6% (v/v), aproximadamente el 7% (v/v), aproximadamente el 8% (v/v), aproximadamente el 9% (v/v), aproximadamente el 10% (v/v), aproximadamente el 15% (v/v) o aproximadamente el 20% (v/v). Alternativamente, la concentración del complemento B27 añadido puede medirse en cuanto a múltiplos de la concentración de una disolución madre de B27 disponible comercialmente. Por ejemplo, B27 está disponible de Invitrogen (Carlsbad, CA) como disolución madre 50X. La adición de una cantidad suficiente de esta disolución madre a un volumen suficiente de medio de crecimiento produce un medio complementado con la cantidad deseada de B27. Por ejemplo, la adición de 10 ml de disolución madre de B27 50X a 90 ml de medio de crecimiento produciría un medio de crecimiento complementado con B27 5X. La concentración del complemento B27 en el medio puede ser de aproximadamente 0,1X, aproximadamente 0,2X, aproximadamente 0,3X, aproximadamente 0,4X, aproximadamente 0,5X, aproximadamente 0,6X, aproximadamente 0,7X, aproximadamente 0,8X, aproximadamente 0,9X, aproximadamente 1X, aproximadamente 1,1X, aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,4X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,6X, aproximadamente 1,7X, aproximadamente 1,8X, aproximadamente 1,9X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 3X, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, aproximadamente 11X, aproximadamente 12X, aproximadamente 13X, aproximadamente 14X, aproximadamente 15X, aproximadamente 16X, aproximadamente 17X, aproximadamente 18X, aproximadamente 19X, aproximadamente 20X y mayor de aproximadamente 20X.

En algunas realizaciones, las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 pueden diferenciarse adicionalmente en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 poniendo en contacto las células con un medio que comprende, o si no proporcionando a las células, un retinoide, tal como ácido retinoico (RA). En algunas realizaciones, el retinoide se proporciona a las células de un cultivo celular de tal manera que está presente a una concentración de al menos aproximadamente 1 nM, al menos aproximadamente 0,01 μ M, al menos aproximadamente 0,02 μ M, al menos aproximadamente 0,04 μ M, al menos aproximadamente 0,08 μ M, al menos aproximadamente 0,1 μ M, al menos aproximadamente 0,2 μ M, al menos aproximadamente 0,3 μ M, al menos aproximadamente 0,4 μ M, al menos aproximadamente 0,5 μ M, al menos aproximadamente 0,6 μ M, al menos aproximadamente 0,7 μ M, al menos aproximadamente 0,8 μ M, al menos aproximadamente 0,9 μ M, al menos aproximadamente 1 μ M, al menos aproximadamente 1,1 μ M, al menos aproximadamente 1,2 μ M, al menos aproximadamente 1,3 μ M, al menos aproximadamente 1,4 μ M, al menos aproximadamente 1,5 μ M, al menos aproximadamente 1,6 μ M, al menos aproximadamente 1,7 μ M, al menos aproximadamente 1,8 μ M, al menos aproximadamente 1,9 μ M, al menos aproximadamente 2 μ M, al menos aproximadamente 2,1 μ M, al menos aproximadamente 2,2 μ M, al menos aproximadamente 2,3 μ M, al menos aproximadamente 2,4 μ M, al menos aproximadamente 2,5 μ M, al menos aproximadamente 2,6 μ M, al menos aproximadamente 2,7 μ M, al menos

aproximadamente 2,8 μM , al menos aproximadamente 2,9 μM , al menos aproximadamente 3 μM , al menos aproximadamente 3,5 μM , al menos aproximadamente 4 μM , al menos aproximadamente 4,5 μM , al menos aproximadamente 5 μM , al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 20 μM , al menos aproximadamente 30 μM , al menos aproximadamente 40 μM o al menos aproximadamente 50 μM . En tales realizaciones, el retinoide se proporciona a las células en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días o más de aproximadamente diez días posteriores a la reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en el cultivo celular de endodermo definitivo. En una realización preferida, se proporciona RA desde aproximadamente 0,05 μM hasta RA aproximadamente 2 μM al cultivo de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente de 2 a 3 días posteriores a la reducción o eliminación de la señalización de factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β .

En algunos de los procedimientos de diferenciación descritos en el presente documento, los factores de diferenciación mencionados anteriormente se retiran del cultivo celular de manera posterior a su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación mencionados anteriormente pueden retirarse en un plazo de aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

MONITORIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 EN ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL NEGATIVO PARA PDX1

La expresión de HNF1b y/o FOXA1 y la falta de expresión de PDX1 pueden detectarse y/o cuantificarse usando los métodos descritos anteriormente, tales como Q-PCR y/o inmunocitoquímica, para monitorizar la diferenciación de endodermo definitivo negativo para PDX1 en endodermo de intestino proximal negativo para PDX1. Además de los marcadores descritos anteriormente, en algunas realizaciones de la presente invención, también se determina la expresión de SOX17.

Tal como se da a conocer en el presente documento, los cultivos de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de células que expresan los genes marcadores SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 o NFM. Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 producidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento carecen sustancialmente de endodermo visceral, endodermo parietal y/o células neurales.

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL NEGATIVO PARA PDX1

Se dan a conocer composiciones de células, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1, en las que las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte anterior del tubo digestivo. Según determinadas realizaciones, las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 son células de mamífero, y en una realización preferida, tales células son células humanas.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de uno o más tipos de células seleccionados del grupo que consiste en las hESC, células de endodermo definitivo negativas para PDX1, células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 y células de mesodermo. Se da a conocer que las hESC pueden comprender menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de las células totales en el cultivo. Las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 pueden comprender menos de aproximadamente el 90%, menos de aproximadamente el 85%, menos de aproximadamente el 80%, menos de aproximadamente el 75%, menos de aproximadamente el 70%, menos de aproximadamente el 65%, menos de aproximadamente el 60%, menos de aproximadamente el 55%, menos de aproximadamente el 50%, menos de aproximadamente el 45%, menos de aproximadamente el 40%, menos de aproximadamente el 35%, menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de las células totales en el cultivo. Las células de mesodermo pueden comprender menos de aproximadamente el 90%, menos de aproximadamente el 85%, menos de aproximadamente el 80%, menos de aproximadamente el 75%, menos de aproximadamente el 70%, menos de aproximadamente el 65%, menos de aproximadamente el 60%, menos de aproximadamente el 55%, menos de aproximadamente el 50%, menos de aproximadamente el 45%, menos de aproximadamente el 40%, menos de aproximadamente el 35%, menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de

aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de las células totales en el cultivo.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, producidas mediante los procedimientos descritos en el presente documento que comprenden endodermo de intestino proximal negativo para PDX1 como tipo de células mayoritario. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden producir cultivos celulares y/o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente el 99%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 89%, al menos aproximadamente el 88%, al menos aproximadamente el 87%, al menos aproximadamente el 86%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 84%, al menos aproximadamente el 83%, al menos aproximadamente el 82%, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 79%, al menos aproximadamente el 78%, al menos aproximadamente el 77%, al menos aproximadamente el 76%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 74%, al menos aproximadamente el 73%, al menos aproximadamente el 72%, al menos aproximadamente el 71%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 69%, al menos aproximadamente el 68%, al menos aproximadamente el 67%, al menos aproximadamente el 66%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 64%, al menos aproximadamente el 63%, al menos aproximadamente el 62%, al menos aproximadamente el 61%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 59%, al menos aproximadamente el 58%, al menos aproximadamente el 57%, al menos aproximadamente el 56%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 54%, al menos aproximadamente el 53%, al menos aproximadamente el 52%, al menos aproximadamente el 51% o al menos aproximadamente el 50% de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1. Las células de los cultivos celulares o las poblaciones celulares pueden comprender células humanas. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden producir cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 24%, al menos aproximadamente el 23%, al menos aproximadamente el 22%, al menos aproximadamente el 21%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 19%, al menos aproximadamente el 18%, al menos aproximadamente el 17%, al menos aproximadamente el 16%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 14%, al menos aproximadamente el 13%, al menos aproximadamente el 12%, al menos aproximadamente el 11%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 9%, al menos aproximadamente el 8%, al menos aproximadamente el 7%, al menos aproximadamente el 6%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 2% o al menos aproximadamente el 1% de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1. Las células de los cultivos celulares o las poblaciones celulares pueden comprender células humanas. El porcentaje de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 en los cultivos celulares o las poblaciones puede calcularse sin considerar las células alimentadoras que quedan en el cultivo.

También se dan a conocer composiciones, composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 y células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Por ejemplo, pueden producirse cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 5 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 95 células negativas para PDX1 de endodermo definitivo. También se dan a conocer cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 95 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 5 células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Adicionalmente, se contemplan cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden otras razones de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 con respecto a células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Por ejemplo, se contemplan composiciones que comprenden al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 1.000.000 de células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 100.000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 10.000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 1000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 500 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 100 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 10 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 5 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 4 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 2 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos

aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 2 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 4 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 5 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 10 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 20 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 50 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 100 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 1000 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 10.000 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 100.000 células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1 y al menos aproximadamente 1.000.000 de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1.

También se da a conocer que las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 a partir de las que se producen las células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1, se derivan de células pluripotentes humanas, tales como células madre pluripotentes humanas. Tal como se da a conocer, las células pluripotentes humanas pueden derivarse de una mórula, la masa celular interior de un embrión o las crestas gonadales de un embrión. Tal como se da a conocer, las células pluripotentes humanas pueden derivarse de los tejidos gonadales o germinales de una estructura multicelular que se ha desarrollado más allá de la fase embrionaria.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, incluyendo células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 humanas, en las que la expresión del marcador SOX17, HNF1b y/o FOXA1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células humanas. La expresión del marcador SOX17, HNF1b y/o FOXA1 puede ser mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. En algunas realizaciones, el porcentaje de células humanas en los cultivos celulares o las poblaciones, en el que la expresión de SOX17, HNF1b y/o FOXA1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM, se calcula sin considerar las células alimentadoras.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 humanas, en las que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HNF1b y/o FOXA1 es mayor que la expresión del marcador PDX1 en desde al menos aproximadamente el 2% hasta mayor de al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. La expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HNF1b y/o FOXA1 puede ser mayor que la expresión del marcador PDX1 en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas.

El porcentaje de células humanas en los cultivos celulares o las poblaciones, en el que la expresión de uno o más

marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HNF1b y/o FOXA1 es mayor que la expresión del marcador PDX1, se calcula sin considerar las células alimentadoras.

Usando los procedimientos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 sustancialmente carentes de otros tipos de células. Con respecto a células en cultivos celulares o en poblaciones celulares, el término “sustancialmente carente de” significa que el tipo de células especificado del que carece el cultivo celular o la población celular, está presente en una cantidad de menos de aproximadamente el 5% del número total de células presentes en el cultivo celular o la población celular. En algunas realizaciones de la presente invención, los cultivos celulares o poblaciones de células de endodermo de intestino proximal negativas para PDX1 producidos mediante los métodos descritos en el presente documento carecen sustancialmente de células que expresan significativamente los genes marcadores AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

Tal como se da a conocer en el presente documento, una descripción de una célula de endodermo de intestino proximal negativa para PDX1 basada en la expresión de genes marcadores es, SOX17 alto, HNF1b alto, FOXA1 alto, PDX1 bajo, AFP bajo, SOX7 bajo, SOX1 bajo, ZIC1 bajo y NFM bajo.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 DIRECTAMENTE A PARTIR DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1

Las poblaciones y los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 que se describen en el presente documento se producen a partir de endodermo definitivo negativo para PDX1, que se genera a partir de células pluripotentes tal como se describió anteriormente. Un método tal como se da a conocer en el presente documento puede utilizar células madre embrionarias humanas como material de partida.

En una realización, las hESC se convierten en primer lugar en células de endodermo definitivo negativas para PDX1, que se convierten entonces en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. Se apreciará, sin embargo, que los materiales de partida para la producción de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 no se limitan a células de endodermo definitivo producidas usando métodos de diferenciación de células pluripotentes. Más bien, puede usarse cualquier célula de endodermo definitivo negativa para PDX1 en los métodos descritos en el presente documento independientemente de su origen.

Tal como se da a conocer en el presente documento, pueden usarse cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo negativas para PDX1 para la diferenciación adicional en cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. Por ejemplo, pueden usarse un cultivo celular o una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 humanas. En algunas realizaciones, el cultivo celular o la población celular también puede comprender factores de diferenciación, tales como activinas, nodales y/o BMP, que quedan de la etapa de diferenciación previa (es decir, la etapa de diferenciar células pluripotentes en células de endodermo definitivo). En otras realizaciones, los factores utilizados en la etapa de diferenciación previa se retiran del cultivo celular o la población celular antes de la adición de factores usados para la diferenciación de las células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. En otras realizaciones, se usan poblaciones celulares enriquecidas para células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 como fuente para la producción de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1.

Se diferencian células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en cultivo en células de endodermo positivas para PDX1 proporcionando a un cultivo celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 un factor de diferenciación que fomenta la diferenciación de las células en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 (factor de diferenciación de intestino proximal). En algunas realizaciones de la presente invención, el factor de diferenciación de intestino proximal es un retinoide, tal como ácido retinoico (RA). Tal como se da a conocer en el presente documento, el retinoide puede usarse junto con un factor de crecimiento de fibroblastos, tal como FGF-4 o FGF-10. En otras realizaciones, el retinoide se usa junto con un miembro de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento y/o un medio condicionado.

Por “medio condicionado” quiere decirse, un medio que está alterado en comparación con un medio de base. Por ejemplo, el condicionamiento de un medio puede provocar que moléculas, tales como nutrientes y/o factores de crecimiento, se añadan o se reduzcan con respecto a los niveles originales en el medio de base. Un medio puede condicionarse permitiendo que crezcan células de determinados tipos o se mantengan en el medio en determinadas condiciones durante un periodo de tiempo determinado. Por ejemplo, un medio puede condicionarse permitiendo que las hESC se expandan, diferencien o mantengan en un medio de composición definida a una temperatura definida durante un número definido de horas. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, pueden usarse numerosas combinaciones de células, tipos de medios, duraciones y condiciones ambientales para producir un conjunto casi infinito de medios condicionados. Tal como se da a conocer en el presente documento, un medio puede condicionarse permitiendo que crezcan células pluripotentes diferenciadas o se mantengan en un medio que comprende una concentración de suero de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20%. Tal como se da a

conocer en el presente documento, un medio puede condicionarse permitiendo que crezcan células pluripotentes diferenciadas o se mantengan en un medio que comprende activina A aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. Tal como se da a conocer en el presente documento, un medio puede condicionarse permitiendo que crezcan células pluripotentes diferenciadas o se mantengan en un medio que comprende BMP4 aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente el 1000 ng/ml. Tal como se da a conocer en el presente documento, se prepara un medio condicionado permitiendo que crezcan las hESC diferenciadas o se mantengan durante 24 horas en un medio, tal como RPMI, que comprende activina A aproximadamente 25 ng/ml y RA aproximadamente 2 μ M.

Tal como se da a conocer en el presente documento, las células usadas para condicionar el medio, que se usa para potenciar la diferenciación de endodermo definitivo negativo para PDX1 en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1, son células que se diferencian a partir de células pluripotentes, tales como las hESC, a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 5 días en un medio tal como RPMI que comprende de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 20% de suero y/o uno o más factores de crecimiento/diferenciación de la superfamilia de TGF β . Se suministran factores de diferenciación, tales como activina A y BMP4, a concentraciones que oscilan entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml. Tal como se da a conocer en el presente documento, las células usadas para condicionar el medio pueden diferenciarse de las hESC a lo largo de un periodo de aproximadamente 5 días en RPMI con bajo contenido de suero. Tal como se da a conocer en el presente documento, RPMI con bajo contenido de suero se refiere a un medio que contiene bajo contenido de suero, en el que la concentración de suero se aumenta gradualmente a lo largo de un periodo de tiempo definido. Por ejemplo RPMI con bajo contenido de suero comprende una concentración de aproximadamente el 0,2% de suero bovino fetal (FBS) en el primer día de crecimiento celular, aproximadamente el 0,5% de FBS en el segundo día de crecimiento celular y aproximadamente el 2% de FBS en los días tercero a quinto de crecimiento celular. RPMI con bajo contenido de suero comprende una concentración de aproximadamente el 0% en el día uno, aproximadamente el 0,2% en el día dos y aproximadamente el 2% en los días 3-6. RPMI con bajo contenido de suero se complementa con uno o más factores de diferenciación, tales como activina A y BMP4. Además de su uso en la preparación de las células usadas para condicionar medios, RPMI con bajo contenido de suero puede usarse como medio para la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 a partir de células de endodermo definitivo negativas para PDX1.

Los expertos habituales en la técnica apreciarán que pueden prepararse medios condicionados a partir de medios distintos de RPMI siempre que tales medios no interfieran en el crecimiento o mantenimiento de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. También apreciarán que las células usadas para condicionar el medio pueden ser de diversos tipos.

Cuando se usan células recién diferenciadas para condicionar un medio, tales células puede diferenciarse en un medio distinto de RPMI siempre que el medio no inhiba el crecimiento o mantenimiento de tales células. Además, un experto en la técnica apreciará que no se requiere ni que la duración de condicionamiento ni que la duración de preparación de células usadas para condicionamiento sea de 24 horas o 5 días, respectivamente, ya que otros periodos de tiempo serán suficientes para lograr efectos notificados en el presente documento.

En general, el uso de un retinoide en combinación con un factor de crecimiento de fibroblastos, un miembro de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento, un medio condicionado o una combinación de cualquiera de estos factores de diferenciación de intestino proximal provoca una mayor diferenciación de endodermo definitivo negativo para PDX1 en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 que el uso de un retinoide solo. RA y FGF-10 pueden proporcionarse ambos al cultivo de células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 pueden diferenciarse en un cultivo que comprende un medio condicionado, activina A, activina B y RA.

Con respecto a algunas de las realizaciones de procedimientos de diferenciación descritas en el presente documento, los factores de diferenciación de intestino proximal mencionados anteriormente se proporcionan a las células de modo que estos factores están presentes en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una parte de la población celular o el cultivo de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. Cuando se usa en relación con cultivos celulares y/o poblaciones celulares, el término "parte" significa cualquier cantidad distinta de cero del cultivo celular o la población celular, que oscila entre una célula individual y la totalidad del cultivo celular o la población celular.

Tal como se da a conocer en el presente documento, puede proporcionarse un retinoide a las células de un cultivo celular de tal manera que está presente a una concentración de al menos aproximadamente 0,01 μ M, al menos aproximadamente 0,02 μ M, al menos aproximadamente 0,04 μ M, al menos aproximadamente 0,08 μ M, al menos aproximadamente 0,1 μ M, al menos aproximadamente 0,2 μ M, al menos aproximadamente 0,3 μ M, al menos aproximadamente 0,4 μ M, al menos aproximadamente 0,5 μ M, al menos aproximadamente 0,6 μ M, al menos aproximadamente 0,7 μ M, al menos aproximadamente 0,8 μ M, al menos aproximadamente 0,9 μ M, al menos aproximadamente 1 μ M, al menos aproximadamente 1,1 μ M, al menos aproximadamente 1,2 μ M, al menos aproximadamente 1,3 μ M, al menos aproximadamente 1,4 μ M, al menos aproximadamente 1,5 μ M, al menos

aproximadamente 1,6 μM , al menos aproximadamente 1,7 μM , al menos aproximadamente 1,8 μM , al menos aproximadamente 1,9 μM , al menos aproximadamente 2 μM , al menos aproximadamente 2,1 μM , al menos aproximadamente 2,2 μM , al menos aproximadamente 2,3 μM , al menos aproximadamente 2,4 μM , al menos aproximadamente 2,5 μM , al menos aproximadamente 2,6 μM , al menos aproximadamente 2,7 μM , al menos aproximadamente 2,8 μM , al menos aproximadamente 2,9 μM , al menos aproximadamente 3 μM , al menos aproximadamente 3,5 μM , al menos aproximadamente 4 μM , al menos aproximadamente 4,5 μM , al menos aproximadamente 5 μM , al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 20 μM , al menos aproximadamente 30 μM , al menos aproximadamente 40 μM o al menos aproximadamente 50 μM . Tal como se usa en el presente documento, "retinoide" se refiere a retinol, retinal o ácido retinoico así como derivados de cualquiera de estos compuestos. En una realización preferida, el retinoide es ácido retinoico.

Tal como se da a conocer en el presente documento, uno o más factores de diferenciación de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos están presentes en el cultivo celular. Por ejemplo, FGF-4 puede estar presente en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml.

FGF-10 está presente en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml. Puede proporcionarse o bien FGF-4 o bien FGF-10, FGF-10, pero no ambos, al cultivo celular junto con RA.

RA puede estar presente en el cultivo celular a 1 μM y FGF-10 está presente a una concentración de 50 ng/ml.

Tal como se da a conocer en el presente documento, factores de crecimiento de la superfamilia de TGF β y/o un medio condicionado pueden estar presentes en el cultivo celular. Estos factores de diferenciación pueden usarse en combinación con RA y/u otros factores de diferenciación de intestino proximal-medio incluyendo, pero sin limitarse a, FGF-4 y FGF-10. Por ejemplo, activina A y/o activina B pueden estar presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml. Un medio condicionado puede estar presente en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 100% del medio total. Pueden proporcionarse activina A, activina B y un medio condicionado al cultivo celular junto con RA. Las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 pueden diferenciarse en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 en cultivos que comprenden RA aproximadamente 1 μM , activina A aproximadamente 25 ng/ml y medio RPMI con bajo contenido en suero que se ha condicionado durante aproximadamente 24 horas por las hESC diferenciadas, en el que las hESC diferenciadas se han diferenciado durante aproximadamente 5 días en RPMI con bajo contenido de suero que comprende activina A aproximadamente 100 ng/ml. Activina B y/o FGF-10 también pueden estar presentes en el cultivo a 25 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente.

Los factores de diferenciación de intestino proximal mencionados anteriormente pueden retirarse del cultivo celular de manera posterior a su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación de intestino proximal pueden retirarse en un plazo de aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

Pueden hacerse crecer cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 en un medio que contiene suero reducido. Las concentraciones de suero pueden oscilar entre aproximadamente el 0,05% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v). Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 con sustituto de suero. Por ejemplo, la concentración de suero del medio puede ser menor de aproximadamente el 0,05% (v/v), menor de aproximadamente el 0,1 % (v/v), menor de aproximadamente el 0,2% (v/v), menor de aproximadamente el 0,3% (v/v), menor de aproximadamente el 0,4% (v/v), menor de aproximadamente el 0,5% (v/v), menor de aproximadamente el 0,6% (v/v), menor de aproximadamente el 0,7% (v/v), menor de aproximadamente el 0,8% (v/v), menor de aproximadamente el 0,9% (v/v), menor de aproximadamente el 1% (v/v), menor de aproximadamente el 2% (v/v), menor de aproximadamente el 3% (v/v), menor de aproximadamente el 4% (v/v), menor de aproximadamente el 5% (v/v), menor de aproximadamente el 6% (v/v), menor de aproximadamente el 7% (v/v), menor de aproximadamente el 8% (v/v), menor de aproximadamente el 9% (v/v), menor de aproximadamente el 10% (v/v), menor de aproximadamente el 15% (v/v) o menor de aproximadamente el 20% (v/v). Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para

PDX1 sin suero. Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 con sustituto de suero.

Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 en presencia de B27. En tales realizaciones, puede proporcionarse B27 al medio de cultivo en concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v) o en concentraciones mayores de aproximadamente el 20% (v/v). La concentración de B27 en el medio puede ser de aproximadamente el 0,1% (v/v), aproximadamente el 0,2% (v/v), aproximadamente el 0,3% (v/v), aproximadamente el 0,4% (v/v), aproximadamente el 0,5% (v/v), aproximadamente el 0,6% (v/v), aproximadamente el 0,7% (v/v), aproximadamente el 0,8% (v/v), aproximadamente el 0,9% (v/v), aproximadamente el 1% (v/v), aproximadamente el 2% (v/v), aproximadamente el 3% (v/v), aproximadamente el 4% (v/v), aproximadamente el 5% (v/v), aproximadamente el 6% (v/v), aproximadamente el 7% (v/v), aproximadamente el 8% (v/v), aproximadamente el 9% (v/v), aproximadamente el 10% (v/v), aproximadamente el 15% (v/v) o aproximadamente el 20% (v/v). Alternativamente, la concentración del complemento B27 añadido puede medirse en cuanto a múltiplos de la concentración de una disolución madre de B27 disponible comercialmente. Por ejemplo, B27 está disponible de Invitrogen (Carlsbad, CA) como disolución madre 50X. La adición de una cantidad suficiente de esta disolución madre a un volumen suficiente de medio de crecimiento produce un medio complementado con la cantidad deseada de B27. Por ejemplo, la adición de 10 ml de disolución madre de B27 50X a 90 ml de medio de crecimiento produciría un medio de crecimiento complementado con B27 5X. La concentración del complemento B27 en el medio puede ser de aproximadamente 0,1X, aproximadamente 0,2X, aproximadamente 0,3X, aproximadamente 0,4X, aproximadamente 0,5X, aproximadamente 0,6X, aproximadamente 0,7X, aproximadamente 0,8X, aproximadamente 0,9X, aproximadamente 1X, aproximadamente 1,1X, aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,4X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,6X, aproximadamente 1,7X, aproximadamente 1,8X, aproximadamente 1,9X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 3X, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, aproximadamente 11X, aproximadamente 12X, aproximadamente 13X, aproximadamente 14X, aproximadamente 15X, aproximadamente 16X, aproximadamente 17X, aproximadamente 18X, aproximadamente 19X, aproximadamente 20X y mayor de aproximadamente 20X.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 DORSAL A PARTIR DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1

Las poblaciones y los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales que se describen en el presente documento se producen a partir de endodermo definitivo negativo para PDX1, que se genera a partir de células pluripotentes tal como se describió anteriormente. Además, tal como se describió anteriormente, un método preferido utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida. Tal como se da a conocer en el presente documento, las hESC pueden convertirse en primer lugar en células de endodermo definitivo negativas para PDX1, que se convierten entonces en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. Se apreciará, sin embargo, que los materiales de partida para la producción de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal no se limitan a células de endodermo definitivo producidas usando métodos de diferenciación de células pluripotentes. Más bien, puede usarse cualquier célula de endodermo definitivo negativa para PDX1 en los métodos descritos en el presente documento independientemente de su origen.

Tal como se describe en relación con la producción de poblaciones mixtas de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, pueden usarse cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo negativas para PDX1 para la diferenciación adicional en cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. Por ejemplo, puede usarse un cultivo celular o una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 humanas.

El cultivo celular o la población celular también puede comprender factores de diferenciación, tales como activinas, nodales y/o BMP, que quedan de la etapa de diferenciación previa (es decir, la etapa de diferenciar células pluripotentes en células de endodermo definitivo).

Los factores utilizados en la etapa de diferenciación previa pueden retirarse del cultivo celular o la población celular antes de la adición de factores usados para la diferenciación de las células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. Pueden usarse poblaciones celulares enriquecidas para células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 como fuente para la producción de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales.

Se diferencian células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en cultivo en células de endodermo positivas para PDX1 dorsales proporcionando a un cultivo celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 un retinoide, tal como ácido retinoico (RA). En algunas realizaciones, el retinoide se usa junto con un miembro de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento y/o medio de Connaught Medical Research Labs (medio CRML) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Con respecto a algunas de las realizaciones de procedimientos de diferenciación descritas en el presente documento, el RA o una combinación de los factores de diferenciación mencionados anteriormente se proporcionan a las células de modo que estos factores están presentes en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una parte de la población celular o el cultivo de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. Cuando se usa en relación con cultivos celulares y/o poblaciones celulares, el término “parte” significa cualquier cantidad distinta de cero del cultivo celular o la población celular, que oscila entre una célula individual y la totalidad del cultivo celular o la población celular. El término “parte” puede significar al menos el 5%, al menos el 6%, al menos el 7%, al menos el 8%, al menos el 9%, al menos el 10%, al menos el 11%, al menos el 12%, al menos el 13%, al menos el 14%, al menos el 15%, al menos el 16%, al menos el 17%, al menos el 18%, al menos el 19%, al menos el 20%, al menos el 21%, al menos el 22%, al menos el 23%, al menos el 24%, al menos el 25%, al menos el 26%, al menos el 27%, al menos el 28%, al menos el 29%, al menos el 30%, al menos el 31%, al menos el 32%, al menos el 33%, al menos el 34%, al menos el 35%, al menos el 36%, al menos el 37%, al menos el 38%, al menos el 39%, al menos el 40%, al menos el 41%, al menos el 42%, al menos el 43%, al menos el 44%, al menos el 45%, al menos el 46%, al menos el 47%, al menos el 48%, al menos el 49%, al menos el 50%, al menos el 51%, al menos el 52%, al menos el 53%, al menos el 54%, al menos el 55%, al menos el 56%, al menos el 57%, al menos el 58%, al menos el 59%, al menos el 60%, al menos el 61%, al menos el 62%, al menos el 63%, al menos el 64%, al menos el 65%, al menos el 66%, al menos el 67%, al menos el 68%, al menos el 69%, al menos el 70%, al menos el 71%, al menos el 72%, al menos el 73%, al menos el 74% o al menos el 75% del cultivo celular o la población celular.

Puede proporcionarse un retinoide a las células de un cultivo celular de tal manera que está presente a una concentración de al menos aproximadamente 0,01 μM , al menos aproximadamente 0,02 μM , al menos aproximadamente 0,04 μM , al menos aproximadamente 0,08 μM , al menos aproximadamente 0,1 μM , al menos aproximadamente 0,2 μM , al menos aproximadamente 0,3 μM , al menos aproximadamente 0,4 μM , al menos aproximadamente 0,5 μM , al menos aproximadamente 0,6 μM , al menos aproximadamente 0,7 μM , al menos aproximadamente 0,8 μM , al menos aproximadamente 0,9 μM , al menos aproximadamente 1 μM , al menos aproximadamente 1,1 μM , al menos aproximadamente 1,2 μM , al menos aproximadamente 1,3 μM , al menos aproximadamente 1,4 μM , al menos aproximadamente 1,5 μM , al menos aproximadamente 1,6 μM , al menos aproximadamente 1,7 μM , al menos aproximadamente 1,8 μM , al menos aproximadamente 1,9 μM , al menos aproximadamente 2 μM , al menos aproximadamente 2,1 μM , al menos aproximadamente 2,2 μM , al menos aproximadamente 2,3 μM , al menos aproximadamente 2,4 μM , al menos aproximadamente 2,5 μM , al menos aproximadamente 2,6 μM , al menos aproximadamente 2,7 μM , al menos aproximadamente 2,8 μM , al menos aproximadamente 2,9 μM , al menos aproximadamente 3 μM , al menos aproximadamente 3,5 μM , al menos aproximadamente 4 μM , al menos aproximadamente 4,5 μM , al menos aproximadamente 5 μM , al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 20 μM , al menos aproximadamente 30 μM , al menos aproximadamente 40 μM o al menos aproximadamente 50 μM .

Tal como se da a conocer en el presente documento, puede producirse una población de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta dorsal proporcionando ácido retinoico en ausencia de FGF-10 exógeno u otro factor de crecimiento de la familia de FGF. Puede proporcionarse RA a una concentración de aproximadamente 2 μM . Puede proporcionarse RA a una concentración de aproximadamente 2 μM en medio CMRL.

Pueden proporcionarse activina A y/o activina B al cultivo celular junto con RA. Por ejemplo, se proporciona RA al cultivo celular a una concentración de aproximadamente 2 μM y activina A y/o activina B se proporcionan al cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml.

Pueden proporcionarse factores de diferenciación y/o medio CRML a las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en aproximadamente tres días, en aproximadamente cuatro días, en aproximadamente cinco días, en aproximadamente seis días, en aproximadamente siete días, en aproximadamente ocho días, en aproximadamente nueve días, en aproximadamente diez días o en aproximadamente más de diez días posteriores a la iniciación de la diferenciación de las hESC. Pueden proporcionarse factores de diferenciación y/o medio CRML a las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en aproximadamente cinco días posteriores a la iniciación de la diferenciación de las hESC.

También se da a conocer que los factores de diferenciación mencionados anteriormente pueden retirarse del cultivo celular de manera posterior a su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación mencionados anteriormente pueden retirarse en un plazo de aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

Pueden hacerse crecer cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales en un medio que contiene suero reducido. Las concentraciones de suero pueden oscilar entre aproximadamente el 0,05% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v). Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales con sustituto de suero. Por ejemplo, la concentración de suero del medio puede ser menor de aproximadamente el 0,05% (v/v), menor de aproximadamente el 0,1% (v/v), menor de aproximadamente el 0,2% (v/v), menor de aproximadamente el 0,3% (v/v), menor de aproximadamente el 0,4% (v/v), menor de aproximadamente el 0,5% (v/v), menor de aproximadamente el 0,6% (v/v), menor de aproximadamente el 0,7% (v/v), menor de aproximadamente el 0,8% (v/v), menor de aproximadamente el 0,9% (v/v), menor de aproximadamente el 1% (v/v), menor de aproximadamente el 2% (v/v), menor de aproximadamente el 3% (v/v), menor de aproximadamente el 4% (v/v), menor de aproximadamente el 5% (v/v), menor de aproximadamente el 6% (v/v), menor de aproximadamente el 7% (v/v), menor de aproximadamente el 8% (v/v), menor de aproximadamente el 9% (v/v), menor de aproximadamente el 10% (v/v), menor de aproximadamente el 15% (v/v) o menor de aproximadamente el 20% (v/v). Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales sin suero. Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales con sustituto de suero.

Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales en presencia de B27. Puede proporcionarse B27 al medio de cultivo en concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v) o en concentraciones mayores de aproximadamente el 20% (v/v). La concentración de B27 en el medio puede ser de aproximadamente el 0,1% (v/v), aproximadamente el 0,2% (v/v), aproximadamente el 0,3% (v/v), aproximadamente el 0,4% (v/v), aproximadamente el 0,5% (v/v), aproximadamente el 0,6% (v/v), aproximadamente el 0,7% (v/v), aproximadamente el 0,8% (v/v), aproximadamente el 0,9% (v/v), aproximadamente el 1% (v/v), aproximadamente el 2% (v/v), aproximadamente el 3% (v/v), aproximadamente el 4% (v/v), aproximadamente el 5% (v/v), aproximadamente el 6% (v/v), aproximadamente el 7% (v/v), aproximadamente el 8% (v/v), aproximadamente el 9% (v/v), aproximadamente el 10% (v/v), aproximadamente el 15% (v/v) o aproximadamente el 20% (v/v). Alternativamente, la concentración del complemento B27 añadido puede medirse en cuanto a múltiplos de la concentración de una disolución madre de B27 disponible comercialmente. Por ejemplo, B27 está disponible de Invitrogen (Carlsbad, CA) como disolución madre 50X. La adición de una cantidad suficiente de esta disolución madre a un volumen suficiente de medio de crecimiento produce un medio complementado con la cantidad deseada de B27. Por ejemplo, la adición de 10 ml de disolución madre de B27 50X a 90 ml de medio de crecimiento produciría un medio de crecimiento complementado con B27 5X. La concentración del complemento B27 en el medio puede ser de aproximadamente 0,1X, aproximadamente 0,2X, aproximadamente 0,3X, aproximadamente 0,4X, aproximadamente 0,5X, aproximadamente 0,6X, aproximadamente 0,7X, aproximadamente 0,8X, aproximadamente 0,9X, aproximadamente 1X, aproximadamente 1,1X, aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,4X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,6X, aproximadamente 1,7X, aproximadamente 1,8X, aproximadamente 1,9X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 3X, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, aproximadamente 11X, aproximadamente 12X, aproximadamente 13X, aproximadamente 14X, aproximadamente 15X, aproximadamente 16X, aproximadamente 17X, aproximadamente 18X, aproximadamente 19X, aproximadamente 20X y mayor de aproximadamente 20X.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 VENTRAL A PARTIR DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1

Las poblaciones y los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales que se describen en el presente documento se producen a partir de endodermo definitivo negativo para PDX1, que se genera a partir de células pluripotentes tal como se describió anteriormente. Además, tal como se describió anteriormente, se da a conocer un método que utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida. Tal como se da a conocer en el presente documento, pueden convertirse hESC en primer lugar en células de endodermo definitivo negativas para PDX1, que se convierten entonces en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales. Se apreciará, sin embargo, que los materiales de partida para la producción de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 ventral no se limitan a células de endodermo definitivo producidas usando métodos de diferenciación de células pluripotentes. Más bien, puede usarse cualquier célula de endodermo definitivo negativa para PDX1 en los métodos descritos en el presente documento independientemente de su origen.

Tal como se describe en relación con la producción de poblaciones mixtas de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, pueden usarse cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo negativas para PDX1 para la diferenciación adicional en cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales. Por ejemplo, puede usarse un cultivo celular o una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 humanas.

El cultivo celular o la población celular también puede comprender factores de diferenciación, tales como activinas, nodales y/o BMP, que quedan de la etapa de diferenciación previa (es decir, la etapa de diferenciar células pluripotentes en células de endodermo definitivo).

Los factores utilizados en la etapa de diferenciación previa pueden retirarse del cultivo celular o la población celular antes de la adición de factores usados para la diferenciación de las células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales. Pueden usarse poblaciones celulares enriquecidas para células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 como fuente para la producción de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales.

Las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en cultivo pueden diferenciarse en células de endodermo positivas para PDX1 ventrales proporcionando a un cultivo celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 un factor de crecimiento de la familia de FGF o análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF. El factor de crecimiento de la familia de FGF o análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF pueden usarse junto con un inhibidor de Hedgehog y/o medio de Connaught Medical Research Labs (medio CRML) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Pueden proporcionarse FGF-10 y/o KAAD-ciclopamina a un cultivo celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en ausencia de RA u otro retinoide. Puede incluirse BMP4 en FGF-10 y/o KAAD-ciclopamina en ausencia de RA u otro retinoide. Después de aproximadamente un día a aproximadamente diez días posteriores a la adición del análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF y/o inhibidor de Hedgehog, se proporciona un retinoide, tal como RA, o un complemento que contiene retinoide, tal como B27, para inducir la expresión de PDX1. Puede proporcionarse RA en aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días o aproximadamente 5 días posteriores a la adición del análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF y/o inhibidor de Hedgehog.

Puede proporcionarse B27 aproximadamente en el mismo momento en que se proporciona el análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF y/o inhibidor de Hedgehog.

Con respecto a los procedimientos de diferenciación descritos en el presente documento, pueden proporcionarse un retinoide y una combinación de los factores de diferenciación mencionados anteriormente a las células de modo que estos factores están presentes en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una parte de la población celular o el cultivo de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales. Cuando se usa en relación con cultivos celulares y/o poblaciones celulares, el término "parte" significa cualquier cantidad distinta de cero del cultivo celular o la población celular, que oscila entre una célula individual y la totalidad del cultivo celular o la población celular.

El término "parte" puede significar al menos el 5%, al menos el 6%, al menos el 7%, al menos el 8%, al menos el 9%, al menos el 10%, al menos el 11%, al menos el 12%, al menos el 13%, al menos el 14%, al menos el 15%, al menos el 16%, al menos el 17%, al menos el 18%, al menos el 19%, al menos el 20%, al menos el 21%, al menos el 22%, al menos el 23%, al menos el 24%, al menos el 25%, al menos el 26%, al menos el 27%, al menos el 28%, al menos el 29%, al menos el 30%, al menos el 31%, al menos el 32%, al menos el 33%, al menos el 34%, al menos el 35%, al menos el 36%, al menos el 37%, al menos el 38%, al menos el 39%, al menos el 40%, al menos el 41%, al menos el 42%, al menos el 43%, al menos el 44%, al menos el 45%, al menos el 46%, al menos el 47%, al menos el 48%, al menos el 49%, al menos el 50%, al menos el 51%, al menos el 52%, al menos el 53%, al menos el 54%, al menos el 55%, al menos el 56%, al menos el 57%, al menos el 58%, al menos el 59%, al menos el 60%, al menos el 61%, al menos el 62%, al menos el 63%, al menos el 64%, al menos el 65%, al menos el 66%, al menos el 67%, al menos el 68%, al menos el 69%, al menos el 70%, al menos el 71%, al menos el 72%, al menos el 73%, al menos el 74% o al menos el 75% del cultivo celular o la población celular.

El factor de crecimiento de la familia de FGF o análogo o mimético de factor de crecimiento de la familia de FGF puede proporcionarse a las células de un cultivo celular de tal manera que está presente a una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml. Cuando se usa solo o junto con un FGF-10, puede proporcionarse KAAD-ciclopamina a una concentración de al menos aproximadamente 0,01 μ M, al menos aproximadamente 0,02 μ M, al menos aproximadamente 0,04 μ M, al menos aproximadamente 0,08 μ M, al menos aproximadamente 0,1 μ M, al menos aproximadamente 0,2 μ M, al menos aproximadamente 0,3 μ M, al menos aproximadamente 0,4 μ M, al menos aproximadamente 0,5 μ M, al menos aproximadamente 0,6 μ M, al menos aproximadamente 0,7 μ M, al menos aproximadamente 0,8 μ M, al menos aproximadamente 0,9 μ M, al menos aproximadamente 1 μ M, al menos aproximadamente 1,1 μ M, al menos aproximadamente 1,2 μ M, al menos aproximadamente 1,3 μ M, al menos aproximadamente 1,4 μ M, al menos aproximadamente 1,5 μ M, al menos aproximadamente 1,6 μ M, al menos aproximadamente 1,7 μ M, al menos aproximadamente 1,8 μ M, al menos aproximadamente 1,9 μ M, al menos aproximadamente 2 μ M, al menos aproximadamente 2,1 μ M, al menos aproximadamente 2,2 μ M, al menos aproximadamente 2,3 μ M, al menos aproximadamente 2,4 μ M, al menos aproximadamente 2,5 μ M, al menos aproximadamente 2,6 μ M, al menos aproximadamente 2,7 μ M, al menos aproximadamente 2,8 μ M, al menos aproximadamente 2,9 μ M, al menos aproximadamente 3 μ M, al menos aproximadamente 3,5 μ M, al menos aproximadamente 4 μ M, al menos aproximadamente 4,5 μ M, al menos aproximadamente 5 μ M, al menos

aproximadamente 10 μ M, al menos aproximadamente 20 μ M, al menos aproximadamente 30 μ M, al menos aproximadamente 40 μ M o al menos aproximadamente 50 μ M.

Tal como se da a conocer en el presente documento, puede producirse una población de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta ventral proporcionando a una población de endodermo definitivo negativo para PDX1 50 ng/ml de FGF-10 y KAAD-ciclopamina 0,5 μ M en medio CMRL en ausencia de RA. Aproximadamente dos días posteriores a la adición de FGF-10 y KAAD-ciclopamina, se añade RA 2 μ M para la diferenciación completa de las células en células positivas para PDX1.

Pueden proporcionarse factores de diferenciación y/o medio CRML a las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en aproximadamente tres días, en aproximadamente cuatro días, en aproximadamente cinco días, en aproximadamente seis días, en aproximadamente siete días, en aproximadamente ocho días, en aproximadamente nueve días, en aproximadamente diez días o en aproximadamente más de diez días posteriores a la iniciación de la diferenciación de las hESC. Pueden proporcionarse factores de diferenciación y/o medio CRML a las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en aproximadamente tres días posteriores a la iniciación de la diferenciación de las hESC.

Los factores de diferenciación mencionados anteriormente pueden retirarse del cultivo celular de manera posterior a su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación mencionados anteriormente pueden retirarse en un plazo de aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

Pueden hacerse crecer cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales en un medio que contiene suero reducido. Las concentraciones de suero pueden oscilar entre aproximadamente el 0,05% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v). Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales con sustituto de suero. Por ejemplo, la concentración de suero del medio puede ser menor de aproximadamente el 0,05% (v/v), menor de aproximadamente el 0,1 % (v/v), menor de aproximadamente el 0,2% (v/v), menor de aproximadamente el 0,3% (v/v), menor de aproximadamente el 0,4% (v/v), menor de aproximadamente el 0,5% (v/v), menor de aproximadamente el 0,6% (v/v), menor de aproximadamente el 0,7% (v/v), menor de aproximadamente el 0,8% (v/v), menor de aproximadamente el 0,9% (v/v), menor de aproximadamente el 1% (v/v), menor de aproximadamente el 2% (v/v), menor de aproximadamente el 3% (v/v), menor de aproximadamente el 4% (v/v), menor de aproximadamente el 5% (v/v), menor de aproximadamente el 6% (v/v), menor de aproximadamente el 7% (v/v), menor de aproximadamente el 8% (v/v), menor de aproximadamente el 9% (v/v), menor de aproximadamente el 10% (v/v), menor de aproximadamente el 15% (v/v) o menor de aproximadamente el 20% (v/v). Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales sin suero.

Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales con sustituto de suero.

Pueden hacerse crecer células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales en presencia de B27. Puede proporcionarse B27 al medio de cultivo en concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v) o en concentraciones mayores de aproximadamente el 20% (v/v). La concentración de B27 en el medio puede ser de aproximadamente el 0,1% (v/v), aproximadamente el 0,2% (v/v), aproximadamente el 0,3% (v/v), aproximadamente el 0,4% (v/v), aproximadamente el 0,5% (v/v), aproximadamente el 0,6% (v/v), aproximadamente el 0,7% (v/v), aproximadamente el 0,8% (v/v), aproximadamente el 0,9% (v/v), aproximadamente el 1% (v/v), aproximadamente el 2% (v/v), aproximadamente el 3% (v/v), aproximadamente el 4% (v/v), aproximadamente el 5% (v/v), aproximadamente el 6% (v/v), aproximadamente el 7% (v/v), aproximadamente el 8% (v/v), aproximadamente el 9% (v/v), aproximadamente el 10% (v/v), aproximadamente el 15% (v/v) o aproximadamente el 20% (v/v). Alternativamente, la concentración del complemento B27 añadido puede medirse en cuanto a múltiplos de la concentración de una disolución madre de B27 disponible comercialmente. Por ejemplo, B27 está disponible de Invitrogen (Carlsbad, CA) como disolución madre 50X. La adición de una cantidad suficiente de esta disolución madre a un volumen suficiente de medio de crecimiento produce un medio complementado con la cantidad deseada de B27. Por ejemplo, la adición de 10 ml de disolución madre de B27 50X a 90 ml de medio de crecimiento produciría un medio de crecimiento complementado con B27 5X. La concentración del complemento B27 en el medio puede ser de aproximadamente 0,1X, aproximadamente 0,2X, aproximadamente 0,3X, aproximadamente 0,4X, aproximadamente 0,5X, aproximadamente 0,6X, aproximadamente 0,7X, aproximadamente 0,8X, aproximadamente 0,9X, aproximadamente 1X, aproximadamente 1,1X, aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,4X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,6X, aproximadamente 1,7X, aproximadamente 1,8X, aproximadamente 1,9X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 3X, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, aproximadamente 11X, aproximadamente 12X, aproximadamente 13X, aproximadamente 14X, aproximadamente 15X, aproximadamente 16X, aproximadamente 17X, aproximadamente 18X, aproximadamente 19X, aproximadamente 20X y mayor de aproximadamente 20X.

Cuando se proporciona B27, puede no proporcionarse un retinoide para la diferenciación completa de las células negativas para PDX1 en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 ventral.

MONITORIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 EN ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1

- 5 Como con la diferenciación de células de endodermo definitivo a partir de células pluripotentes, puede monitorizarse la progresión de la diferenciación a partir de endodermo definitivo negativo para PDX1, positivo para SOX17 en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 determinando la expresión de marcadores característicos de estos tipos de células. Tal monitorización permite que se determine la cantidad de tiempo que es suficiente para la producción de una cantidad deseada de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 en diversas condiciones, por ejemplo, una o más concentraciones de factor de diferenciación y condiciones ambientales.

La cantidad de tiempo que es suficiente para la producción de una cantidad deseada de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 puede determinarse detectando la expresión de PDX1.

- 15 La expresión de determinados marcadores puede determinarse detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de determinados marcadores puede determinarse midiendo el nivel al que está presente el marcador en las células del cultivo celular o la población celular. La medición de la expresión de marcadores puede ser cualitativa o cuantitativa. Tal como se describió anteriormente, un método preferido de cuantificación de la expresión de marcadores que se producen por genes marcadores es a través del uso de Q-PCR. En realizaciones particulares, se usa Q-PCR para monitorizar la progresión de células del cultivo de endodermo definitivo negativo para PDX1, positivo para SOX17 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 mediante la cuantificación de la expresión de genes marcadores característicos de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 y la falta de expresión de genes marcadores característicos de otros tipos de células. Otros métodos que se conocen en la técnica también pueden usarse para cuantificar la expresión de genes marcadores. Por ejemplo, la expresión de un producto de gen marcador puede detectarse usando anticuerpos específicos para el producto de gen marcador de interés.

- 25 Puede determinarse la expresión de genes marcadores característicos de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 así como la falta de expresión significativa de genes marcadores característicos de endodermo definitivo negativo para PDX1, las hESC y otros tipos de células.

- 30 Tal como se describe adicionalmente en los ejemplos a continuación, PDX1 es un gen marcador que está asociado con endodermo de intestino proximal positivo para PDX1. Como tal, puede determinarse la expresión de PDX1. También puede determinarse la expresión de otros marcadores, que se expresan en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1, incluyendo, pero sin limitarse a, SOX17, HOXA13 y/o HOXC6. Puesto que PDX1 también puede expresarse por otros determinados tipos de células (es decir, endodermo visceral y determinado ectodermo neural), lo que demuestra la ausencia o ausencia sustancial de expresión de genes marcadores que está asociada con endodermo visceral y/o ectodermo neural también se determina. Por ejemplo, se determina la expresión de marcadores, que se expresan en endodermo visceral y/o células neurales, incluyendo, pero sin limitarse a, SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

- 40 Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de células que expresan los genes marcadores SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 o NFM. Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 producidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de endodermo visceral, endodermo parietal y/o células neurales.

MONITORIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 EN ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 DORSAL

- 45 La expresión de uno o más de los marcadores descritos en la tabla 3 y/o la tabla 4, en los ejemplos a continuación, puede detectarse y/o cuantificarse usando los métodos descritos anteriormente, tales como Q-PCR y/o inmunocitoquímica, para monitorizar la diferenciación de endodermo definitivo negativo para PDX1 en endodermo positivo para PDX1 dorsal. Los marcadores asociados tanto con células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta dorsal como con desviadas a la ruta ventral se describen en la tabla 3. De estos marcadores, los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2 son marcadores de superficie celular. Algunos marcadores preferidos enumerados en la tabla 3 para la monitorización de la producción de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal se seleccionan del grupo que consiste en SERPINF2, DUSP9, CDH6 y SOX9. Los marcadores asociados con endodermo de intestino proximal desviado a la ruta dorsal se describen en la tabla 4. Cada uno de los marcadores de la tabla 4 se expresa de manera preferente, específica o única en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales en comparación con otras células positivas para PDX1. De estos marcadores, los marcadores seleccionados del grupo que consiste en ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1 son marcadores de superficie celular. Algunos marcadores preferidos enumerados en la tabla 4 para la monitorización de la producción de

endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal se seleccionan del grupo que consiste en HOXA1, PDE11A, FAM49A y WNT5A.

Además de los marcadores descritos anteriormente, también puede determinarse la expresión de otros marcadores, que se expresan en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1, incluyendo, pero sin limitarse a, SOX17, HOXA13 y/o HOXC6. Puesto que PDX1 también puede expresarse por otros determinados tipos de células (es decir, endodermo visceral y determinado ectodermo neural), lo que demuestra ausencia o ausencia sustancial de expresión de genes marcadores que está asociada con endodermo visceral y/o ectodermo neural también se da a conocer. Por ejemplo, se determina la expresión de marcadores, que se expresan en endodermo visceral y/o células neurales, incluyendo, pero sin limitarse a, SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de células que expresan los genes marcadores SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 o NFM. Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales producidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de endodermo visceral, endodermo parietal y/o células neurales.

MONITORIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVO PARA PDX1 EN ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 VENTRAL

Tal como se describe en la sección previa, se describen marcadores asociados tanto con células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 desviadas a la ruta dorsal como con desviadas a la ruta ventral en la tabla 3. Como tal, expresión de uno o más de los marcadores descritos en la tabla 3 puede detectarse y/o cuantificarse usando los métodos descritos anteriormente, tales como Q-PCR y/o inmunocitoquímica, para monitorizar la diferenciación de endodermo definitivo negativo para PDX1 en endodermo positivo para PDX1 ventral. De los marcadores descritos en la tabla 3, los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2 y SLC27A2 son marcadores de superficie celular. Algunos marcadores preferidos enumerados en la tabla 3 para la monitorización de la producción de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 ventral se seleccionan del grupo que consiste en SERPINF2, DUSP9, CDH6 y SOX9. Además, dado que los marcadores descritos en la tabla 4 se expresan de manera preferente, específica o única en endodermo de intestino proximal desviado a la ruta dorsal, la detección de la falta de expresión, o expresión reducida con relación a la expresión en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal, de uno o más de estos marcadores también es útil para la monitorización de la diferenciación de endodermo definitivo negativo para PDX1 en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 ventral. De los marcadores de la tabla 4, los marcadores seleccionados del grupo que consiste en ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1 son marcadores de superficie celular. Algunos marcadores preferidos enumerados en la tabla 4 para la monitorización de la producción de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal se seleccionan del grupo que consiste en HOXA1, PDE11A, FAM49A y WNT5A. Como tal, la ausencia, o expresión insustancial, de estos marcadores en células positivas para PDX1 que expresan uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3, es indicativa de células positivas para PDX1 ventrales.

Además de los marcadores descritos anteriormente, también puede determinarse la expresión de otros marcadores, que se expresan en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1, incluyendo, pero sin limitarse a, SOX17, HOXA13 y/o HOXC6. Puesto que PDX1 también puede expresarse por otros determinados tipos de células (es decir, endodermo visceral y determinado ectodermo neural), lo que demuestra ausencia o ausencia sustancial de expresión de genes marcadores que está asociada con endodermo visceral y/o ectodermo neural también se da a conocer. Por ejemplo, puede determinarse la expresión de marcadores, que se expresan en endodermo visceral y/o células neurales, incluyendo, pero sin limitarse a, SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de células que expresan los genes marcadores SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 o NFM. Los cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales producidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de endodermo visceral, endodermo parietal y/o células neurales.

ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y/O PURIFICACIÓN DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 DORSAL Y/O VENTRAL

Las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, producidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente pueden enriquecerse, aislarse y/o purificarse usando una etiqueta de afinidad que es específica para tales células. Ejemplos de etiquetas de afinidad específicas para células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales son anticuerpos, ligandos u otros agentes de unión que son específicos para una molécula de marcador, tal como un polipéptido, que está presente en la superficie celular de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales pero que no está presente sustancialmente en otros tipos de células que se encontrarían en un cultivo celular producido mediante los métodos descritos en el presente documento. En algunos procedimientos, se usa un anticuerpo que se une a un marcador de

superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2, SLC27A2, ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1, como etiqueta de afinidad para el enriquecimiento, aislamiento o la purificación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales.

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos y usarlos para el aislamiento de células y tales métodos pueden implementarse para su uso con los anticuerpos y las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales descritos en el presente documento. En un procedimiento, un anticuerpo que se une a un marcador seleccionado de CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2, SLC27A2, ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1 se fija a una perla magnética y entonces se permite que se una a células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en un cultivo celular que se ha tratado enzimáticamente para reducir la adhesión intercelular y a sustrato. Los complejos de célula/anticuerpo/perla se exponen entonces a un campo magnético móvil que se usa para separar células de endodermo definitivo unidas a perla de las células no unidas. Una vez que las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales se separan físicamente de otras células en cultivo, se perturba la unión a anticuerpo y vuelven a sembrarse en placa las células en medio de cultivo tisular apropiado.

También pueden usarse métodos adicionales para obtener poblaciones o cultivos de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales enriquecidos, aislados o purificados. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a un marcador seleccionado del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2, SLC27A2, ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1 se incuba con un cultivo que contiene células endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales que se ha tratado para reducir la adhesión intercelular y a sustrato. Entonces, se lavan las células, se centrifugan y se resuspenden. Entonces, se incuba la suspensión celular con un anticuerpo secundario, tal como un anticuerpo conjugado con FITC que puede unirse al anticuerpo primario. Entonces, se lavan las células, se centrifugan y se resuspenden en tampón. Entonces se analiza la suspensión celular y se clasifica usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células positivas para marcador se recogen por separado de las células negativas para marcador, dando como resultado de ese modo el aislamiento de tales tipos de células. Si se desea, las composiciones de células aisladas pueden purificarse adicionalmente usando un método basado en afinidad alternativo o mediante tandas adicionales de clasificación usando los mismos o diferentes marcadores que son específicos para células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales.

En todavía otros procedimientos, se enriquecen, aíslan o purifican células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales usando un ligando u otra molécula que se une a un marcador seleccionado del grupo que consiste en CDH6, GABRA2, GRIA3, IL6R, KCNJ2, LGALS3, LGALS3/GALIG, SERPINF2, SLC27A2, ADORA2A, CD47, EPB41L1, MAG, SFRP5, SLC16A10, SLC16A2, SLC1A3, SLC30A4, SLICK, SLITRK4 y XPR1.

En procedimientos preferidos, se enriquecen, aíslan o purifican células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales de otras células después de inducirse cultivos celulares del endodermo definitivo negativo para PDX1 para diferenciarse hacia el linaje de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal y/o ventral. Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos anteriormente pueden usarse con tales cultivos en cualquier fase de diferenciación.

Además de los procedimientos que acaban de describirse, también pueden aislarse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales mediante otras técnicas para aislamiento de células. Adicionalmente, también pueden enriquecerse o aislarse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales mediante métodos de subcultivo en serie en condiciones de crecimiento que fomentan la supervivencia selectiva o expansión selectiva de las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales.

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse *in vitro* tejidos y/o poblaciones de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales enriquecidos, aislados y/o purificados a partir de cultivos celulares o poblaciones de células de endodermo definitivo negativo para PDX1, que han experimentado al menos cierta diferenciación. En algunos métodos, las células experimentan diferenciación aleatoria. En un método preferido, sin embargo, las células se dirigen a diferenciarse principalmente en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Algunos métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación preferidos se refieren a la producción *in vitro* de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales a partir de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 humanas. Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden enriquecerse poblaciones celulares o cultivos celulares en contenido de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal y/o ventral en al menos de aproximadamente 2 a aproximadamente 1000 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en al menos de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino

proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar.

Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 20 hasta aproximadamente 100 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar.

Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 40 hasta aproximadamente 80 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar.

ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y/O PURIFICACIÓN DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 DORSAL Y/O VENTRAL

Con respecto a aspectos adicionales tal como se dan a conocer en el presente documento pueden enriquecerse, aislarse y/o purificarse, células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales.

Pueden producirse poblaciones celulares enriquecidas para células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales mediante el aislamiento de tales células de los cultivos celulares.

Pueden marcarse con fluorescencia células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, entonces aislarse de las células no marcadas usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Puede usarse un ácido nucleico que codifica para proteína fluorescente (GFP) u otro ácido nucleico que codifica para un gen marcador fluorescente expresable, tal como el gen que codifica para luciferasa, para marcar células positivas para PDX1. Por ejemplo, se introduce al menos una copia de un ácido nucleico que codifica para GFP o un fragmento biológicamente activo de la misma en una célula pluripotente, preferiblemente una célula madre embrionaria humana, de manera posterior al promotor de un gen seleccionado de la tabla 3 o la tabla 4 de tal manera que la expresión del producto génico de GFP o fragmento biológicamente activo del mismo está bajo el control del tal promotor. Toda la región codificante del ácido nucleico, que codifica para el marcador seleccionado de la tabla 3 o la tabla 4, pueden reemplazarse por un ácido nucleico que codifica para GFP o un fragmento biológicamente activo del mismo.

El ácido nucleico que codifica para GFP o un fragmento biológicamente activo del mismo puede fusionarse en marco con al menos una parte del ácido nucleico que codifica para el marcador seleccionado de la tabla 3 o la tabla 4, generando de ese modo una proteína de fusión. La proteína de fusión puede conservar una actividad de fluorescencia similar a GFP.

Las células marcadas con fluorescencia, tales como las células pluripotentes descritas anteriormente, se diferencian en endodermo definitivo y luego en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales tal como se describió con anterioridad previamente. Dado que las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales expresan el gen marcador fluorescente, mientras que las células negativas para PDX1 no lo hacen, estos dos tipos de células pueden separarse. Pueden clasificarse suspensiones celulares que comprenden una mezcla de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales marcadas con fluorescencia y células negativas para PDX1 no marcadas, usando un FACS. Se recogen células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales por separado a partir de células negativas para PDX1, dando como resultado de ese modo el aislamiento de tales tipos de células. Si se desea, las composiciones de células aisladas pueden purificarse adicionalmente mediante tandas adicionales de clasificación usando los mismos o diferentes marcadores que son específicos para endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal y/o ventral.

Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos anteriormente pueden usarse con tales cultivos en cualquier fase de diferenciación.

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse *in vitro* poblaciones de células y/o tejidos de endodermo de intestino proximal positivos para PDX1 dorsales y/o ventrales enriquecidos, aislados o purificados a partir de poblaciones celulares o cultivos de células de endodermo definitivo negativas para PDX1, positivas para SOX17 que han experimentado al menos cierta diferenciación. Las células pueden experimentar diferenciación aleatoria. Sin embargo, las células pueden dirigirse a diferenciarse principalmente en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Los métodos de aislamiento y/o purificación pueden referirse a la producción *in vitro* de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales a partir de células madre embrionarias humanas, células de endodermo a partir de células madre embrionarias humanas.

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden enriquecerse poblaciones celulares o cultivos celulares en contenido de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en al menos de aproximadamente 2 a aproximadamente 1000 veces en comparación con poblaciones celulares o

cultivos celulares sin tratar. Tal como se da a conocer en el presente documento, pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en al menos de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 20 hasta aproximadamente 100 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 40 hasta aproximadamente 80 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar. Pueden enriquecerse células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales desde al menos aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares sin tratar.

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVO PARA PDX1 DORSAL Y/O VENTRAL

Se dan a conocer composiciones de células, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, en las que las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la parte anterior del tubo digestivo, tales como la yema pancreática dorsal y/o la yema pancreática ventral. Las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales tal como se dan a conocer en el presente documento pueden ser células de mamífero, y se da a conocer que tales células pueden ser células humanas.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de uno o más tipos de células seleccionados del grupo que consiste en las hESC, células de endodermo definitivo negativas para PDX1, células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales y células de mesodermo. Se da a conocer que las hESC pueden comprender menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de las células totales en el cultivo. Células de endodermo definitivo negativas para PDX1 pueden comprender menos de aproximadamente el 90%, menos de aproximadamente el 85%, menos de aproximadamente el 80%, menos de aproximadamente el 75%, menos de aproximadamente el 70%, menos de aproximadamente el 65%, menos de aproximadamente el 60%, menos de aproximadamente el 55%, menos de aproximadamente el 50%, menos de aproximadamente el 45%, menos de aproximadamente el 40%, menos de aproximadamente el 35%, menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de las células totales en el cultivo. En aún otras realizaciones, las células de mesodermo comprenden menos de aproximadamente el 90%, menos de aproximadamente el 85%, menos de aproximadamente el 80%, menos de aproximadamente el 75%, menos de aproximadamente el 70%, menos de aproximadamente el 65%, menos de aproximadamente el 60%, menos de aproximadamente el 55%, menos de aproximadamente el 50%, menos de aproximadamente el 45%, menos de aproximadamente el 40%, menos de aproximadamente el 35%, menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de las células totales en el cultivo.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, producidas mediante los procedimientos descritos en el presente documento que comprenden endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal y/o ventral como tipo de células mayoritario. Se da a conocer que los procedimientos descritos en el presente documento pueden producir cultivos celulares y/o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente el 99%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 89%, al menos aproximadamente el 88%, al menos aproximadamente el 87%, al menos aproximadamente el 86%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 84%, al menos aproximadamente el 83%, al menos aproximadamente el 82%, al menos aproximadamente el 81%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 79%, al menos aproximadamente el 78%, al menos aproximadamente el 77%, al menos aproximadamente el 76%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 74%, al menos aproximadamente el 73%, al menos aproximadamente el 72%, al menos aproximadamente el 71%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 69%, al menos aproximadamente el 68%, al menos aproximadamente el 67%, al menos aproximadamente el 66%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 64%, al menos aproximadamente el 63%, al menos aproximadamente el 62%, al menos aproximadamente el 61%, al menos

aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 59%, al menos aproximadamente el 58%, al menos aproximadamente el 57%, al menos aproximadamente el 56%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 54%, al menos aproximadamente el 53%, al menos aproximadamente el 52%, al menos aproximadamente el 51% o al menos aproximadamente el 50% de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Se da a conocer que las células de los cultivos celulares o las poblaciones celulares pueden comprender células humanas. Se da a conocer que los procedimientos descritos en el presente documento pueden producir cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 24%, al menos aproximadamente el 23%, al menos aproximadamente el 22%, al menos aproximadamente el 21%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 19%, al menos aproximadamente el 18%, al menos aproximadamente el 17%, al menos aproximadamente el 16%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 14%, al menos aproximadamente el 13%, al menos aproximadamente el 12%, al menos aproximadamente el 11%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 9%, al menos aproximadamente el 8%, al menos aproximadamente el 7%, al menos aproximadamente el 6%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 2% o al menos aproximadamente el 1% de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Las células de los cultivos celulares o las poblaciones celulares pueden comprender células humanas. Tal como se da a conocer en el presente documento el porcentaje de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en los cultivos celulares o las poblaciones se calcula sin considerar las células alimentadoras que quedan en el cultivo.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden mezclas de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales y células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Por ejemplo, pueden producirse cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 5 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 95 células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Pueden producirse cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 95 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 5 células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Adicionalmente, se contemplan cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden otras razones de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales en células de endodermo definitivo negativas para PDX1. Por ejemplo, se contemplan composiciones que comprenden al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 1.000.000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 100.000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 10.000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 1000 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 500 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 100 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 10 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 5 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 2 células de endodermo definitivo negativas para PDX1, al menos aproximadamente 1 célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal o ventral aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 2 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 4 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 5 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 10 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 20 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 50 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 100 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 1000 células de endodermo de

intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 10.000 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1, al menos aproximadamente 100.000 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1 y al menos aproximadamente 1.000.000 células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales aproximadamente por cada 1 célula de endodermo definitivo negativa para PDX1.

En el contexto de la presente divulgación, se da a conocer que las células de endodermo definitivo negativas para PDX1 a partir de las que pueden producirse las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales a partir de células pluripotentes humanas, tales como células madre pluripotentes humanas. En el contexto de la presente divulgación, se da a conocer que las células pluripotentes humanas pueden derivarse de una mórula, la masa celular interior de un embrión o las crestas gonadales de un embrión. En el contexto de la presente divulgación, se da a conocer que las células pluripotentes humanas pueden derivarse de los tejidos gonadales o germinales de una estructura multicelular que se ha desarrollado más allá de la fase embrionaria. También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales, en las que la expresión del marcador PDX1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células humanas. Se da a conocer que la expresión del marcador PDX1 puede ser mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. Se da a conocer que el porcentaje de células humanas en los cultivos celulares o las poblaciones, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM, se calcula sin considerar las células alimentadoras.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales, en las que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en desde al menos aproximadamente el 2% hasta mayor que al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. La expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 puede ser mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. También se da a conocer que el porcentaje de células humanas en los cultivos celulares o las poblaciones, en el que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 puede ser mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM, se calcula sin considerar las células alimentadoras.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, incluyendo células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales, en las que la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células humanas. También se da a conocer que la expresión del uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos

de endodermo, en al menos aproximadamente el 15% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 20% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 25% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 30% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 35% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 40% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 45% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 50% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 55% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 60% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 65% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 70% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 75% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 80% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 85% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 90% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 95% de las células de endodermo o en al menos aproximadamente el 98% de las células de endodermo.

También se dan a conocer composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo de mamífero, tales como células de endodermo humanas, en las que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 y la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 o la tabla 4 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células de endodermo. También se da a conocer que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 y la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 o la tabla 4 puede ser mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 10% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 15% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 20% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 25% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 30% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 35% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 40% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 45% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 50% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 55% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 60% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 65% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 70% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 75% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 80% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 85% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 90% de las células de endodermo, en al menos aproximadamente el 95% de las células de endodermo o al menos aproximadamente el 98% de las células de endodermo.

Usando los procedimientos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales sustancialmente carentes de otros tipos de células. Con respecto a células en cultivos celulares o en poblaciones celulares, el término "sustancialmente carente de" significa que el tipo de células especificado del que carece el cultivo celular o la población celular, está presente en una cantidad de menos de aproximadamente el 5% del número total de células presentes en el cultivo celular o la población celular. Tal como se da a conocer en el presente documento, los cultivos celulares o poblaciones de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden carecer sustancialmente de células que expresan significativamente los genes marcadores AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

Tal como se da a conocer en el presente documento, la descripción de una célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 dorsal basada en la expresión de genes marcadores puede ser, PDX1 alto, un marcador seleccionado de la tabla 3 alto, un marcador seleccionado de la tabla 4 alto, AFP bajo, SOX7 bajo, SOX1 bajo, ZIC1 bajo y NFM bajo.

Tal como se da a conocer en el presente documento, una descripción de una célula de endodermo de intestino proximal positiva para PDX1 ventral basada en la expresión de genes marcadores pueden ser, PDX1 alto, un marcador seleccionado de la tabla 3 alto, un marcador seleccionado de la tabla 4 bajo en comparación con la expresión del mismo marcador en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal, AFP bajo, SOX7 bajo, SOX1 bajo, ZIC1 bajo y NFM bajo.

AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE PDX1 EN UNA CÉLULA DE ENDODERMO DEFINITIVO POSITIVA PARA SOX17

También se dan a conocer métodos de aumento de la expresión del producto génico de PDX1 en cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo positivas para SOX17. Se da a conocer que las células de endodermo definitivo positivas para SOX17 pueden ponerse en contacto con un factor de diferenciación en una cantidad que es suficiente para aumentar la expresión del producto génico de PDX1. Las células de endodermo definitivo positivas para SOX17 que pueden ponerse en contacto con el factor de diferenciación pueden ser o bien negativas para PDX1 o bien positivas para PDX1. Se da a conocer que el factor de diferenciación puede ser un retinoide.

Se da a conocer que células de endodermo definitivo positivas para SOX17 se ponen en contacto con un retinoide a una concentración que oscila entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 50 μ M. Tal como se da a conocer

en el presente documento, el retinoide es RA.

Tal como se da a conocer en el presente documento, la expresión del producto génico de PDX1 en cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo positivas para SOX17 aumenta poniendo en contacto las células positivas para SOX17 con un factor de diferenciación de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos. Tales factores de diferenciación pueden usarse o bien solos o bien junto con RA. También se da a conocer que las células de endodermo definitivo positivas para SOX17 pueden ponerse en contacto con un factor de crecimiento de fibroblastos a una concentración que oscila entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml. Se da a conocer que el factor de crecimiento de FGF es FGF-10.

También se da a conocer que la expresión del producto génico de PDX1 en cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo positivas para SOX17 puede aumentarse poniendo en contacto las células positivas para SOX17 con B27. Este factor de diferenciación puede usarse o bien solo o bien junto con uno o ambos del retinoide y factores de diferenciación de la familia de FGF. Las células de endodermo definitivo positivas para SOX17 pueden ponerse en contacto con B27 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v). Se da a conocer que las células de endodermo definitivo positivas para SOX17 pueden ponerse en contacto con RA, FGF-10 y B27.

Los métodos para aumentar la expresión del producto génico de PDX1 en cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivo positivas para SOX17 pueden llevarse a cabo en medio de crecimiento que contiene suero reducido o no contiene suero. En algunas realizaciones, las concentraciones de suero oscilan entre aproximadamente el 0,05% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v). También se da a conocer que las células positivas para SOX17 se hacen crecer con sustituto de suero.

Se apreciará que los métodos descritos anteriormente también pueden usarse para aumentar la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 y/o la tabla 4 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales. De manera similar, tales métodos pueden usarse para aumentar la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES QUE PUEDEN FOMENTAR LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE ENDODERMO DEFINITIVO NEGATIVAS PARA PDX1 EN CÉLULAS DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVAS PARA PDX1

También se dan a conocer métodos de identificación de uno o más factores de diferenciación que pueden fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. En tales métodos, se obtiene un cultivo celular o una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1 y se determina la expresión de PDX1 en el cultivo celular o la población celular. Después de determinar la expresión de PDX1, las células del cultivo celular o la población celular se ponen en contacto con un factor de diferenciación candidato. Puede determinarse la expresión de PDX1 en el momento de la puesta en contacto o poco después de la puesta en contacto de las células con un factor de diferenciación candidato. Entonces se determina la expresión de PDX1 en uno o más momentos después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato. Si la expresión de PDX1 ha aumentado después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con expresión de PDX1 antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, se identifica el factor de diferenciación candidato como que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1.

Los métodos descritos anteriormente de identificación de factores que pueden fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 también pueden incluir determinar la expresión del gen HOXA13 y/o del gen HOXC6 en el cultivo celular o la población celular.

La expresión de HOXA13 y/o HOXC6 puede determinarse tanto antes como después de que las células se ponen en contacto con el factor de diferenciación candidato. Si la expresión de PDX1 y HOXA13 ha aumentado después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión de PDX1 y HOXA13 antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, se identifica el factor de diferenciación candidato como que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. De manera similar, si la expresión de PDX1 y HOXC6 ha aumentado después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión de PDX1 y HOXC6 antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, se identifica el factor de diferenciación candidato como que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1. Tal como se da a conocer en el presente documento, puede identificarse un factor de diferenciación candidato como que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 determinando la expresión de PDX1, HOXA13 y HOXC6 tanto antes como después de la puesta en contacto de las células del cultivo celular o la población celular con el factor de diferenciación candidato.

La expresión de PDX1, HOXA13 y/o HOXC6 puede determinarse mediante Q-PCR.

La expresión de uno o más de PDX1, HOXA13 y HOXC6 puede determinarse en el momento de la puesta en contacto o poco después de la puesta en contacto de las células de los cultivos celulares o las poblaciones celulares con un factor de diferenciación candidato más que antes de la puesta en contacto de las células con un factor de diferenciación candidato. La expresión de uno o más de PDX1, HOXA13 y HOXC6 en el momento de la puesta en contacto o poco después de la puesta en contacto de las células con un factor de diferenciación candidato puede compararse con la expresión de uno o más de PDX1, HOXA13 y HOXC6 en uno o más momentos después de la puesta en contacto de las células con un factor de diferenciación candidato.

Se da a conocer que en los métodos descritos anteriormente, el uno o más momentos en los que se determina la expresión de PDX1 después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato puede oscilar entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 10 días. Por ejemplo, puede determinarse la expresión de PDX1 aproximadamente 1 hora después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 2 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 4 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 6 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 8 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 10 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 12 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 16 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 24 horas después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 2 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 3 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 4 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 5 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 6 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 7 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 8 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 9 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 10 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato o más de 10 días después de la puesta en contacto de las células con el factor de diferenciación candidato.

Los factores de diferenciación candidatos para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden seleccionarse de compuestos, tales como polipéptidos y moléculas pequeñas. Por ejemplo, los polipéptidos candidatos pueden incluir, pero no se limitan a, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, proteínas de la matriz extracelular y péptidos sintéticos.

El factor de crecimiento puede ser de la familia de FGF, por ejemplo FGF-10. Las moléculas pequeñas candidatas incluyen, pero no se limitan a, compuestos generados a partir de síntesis química combinatoria y productos naturales, tales como esteroides, isoprenoides, terpenoides, fenilpropanoides, alcaloides y flavinoides. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que están disponibles miles de clases de moléculas pequeñas naturales y sintéticas y que las moléculas pequeñas contempladas para su uso en los métodos descritos en el presente documento no se limitan a las clases ejemplificadas con anterioridad. Normalmente, las moléculas pequeñas tendrán un peso molecular menor de 10.000 uma. La molécula pequeña puede ser un retinoide, por ejemplo RA.

Se apreciará que los métodos descritos anteriormente pueden usarse para identificar factores que pueden fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales mediante la monitorización de la expresión de uno o más marcadores de la tabla 4. Se monitoriza la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 y uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4.

De manera similar, también se apreciará que los métodos descritos anteriormente pueden usarse para identificar factores que pueden fomentar la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 ventrales mediante la monitorización de la expresión de uno o más marcadores expresión de la tabla 3. Se monitoriza la expresión de uno o más marcadores seleccionados de la tabla 3 y uno o más marcadores seleccionados de la tabla 4.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES QUE PUEDEN FOMENTAR LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL POSITIVAS PARA PDX1 DORSALES Y/O VENTRALES

Determinados métodos de examen descritos en el presente documento se refieren a métodos para identificar al menos un factor de diferenciación que puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Se da a conocer que en estos métodos, se obtienen poblaciones celulares que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, tales como células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o

ventrales. A la población celular se le proporciona entonces un factor de diferenciación candidato. En un primer punto de tiempo, que es antes de o aproximadamente en el mismo momento en que se proporciona el factor de diferenciación candidato, se determina la expresión de un marcador. Alternativamente, puede determinarse la expresión de un marcador después de proporcionar el factor de diferenciación candidato. En un segundo punto de tiempo, que es posterior al primer punto de tiempo y posterior a la etapa de proporcionar el factor de diferenciación candidato a la población celular, se determina de nuevo la expresión del mismo marcador. Se determina si el factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales comparando la expresión del marcador en el primer punto de tiempo con la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo. Si la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con expresión del marcador en el primer punto de tiempo, entonces el factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. Puede determinarse la expresión de un marcador mediante Q-PCR.

Los métodos de examen descritos en el presente documento pueden utilizar poblaciones celulares o cultivos celulares que comprenden células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales. Por ejemplo, la población celular puede ser una población sustancialmente purificada de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales. Alternativamente, la población celular puede ser una población enriquecida de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales, en la que al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97% o mayor que al menos aproximadamente el 97% de las células humanas en la población celular son células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales. En otras realizaciones descritas en el presente documento, la población celular comprende células humanas en la que al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85% o más de al menos aproximadamente el 85% de las células humanas son células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales. Se da a conocer que la población celular puede incluir células no humanas tales como células alimentadoras no humanas. La población celular puede incluir células alimentadoras humanas. Tal como se da a conocer en el presente documento, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o más de al menos aproximadamente el 95% de las células humanas, distintas de dichas células alimentadoras, son células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, la población celular puede ponerse en contacto o proporcionárseles de otro modo un factor de diferenciación candidato (de prueba). El factor de diferenciación candidato puede comprender cualquier molécula que pueda tener el potencial para fomentar la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales. Tal como se da a conocer en el presente documento, el factor de diferenciación candidato puede comprender una molécula que se conoce que es un factor de diferenciación para uno o más tipos de células. También se da a conocer que el factor de diferenciación candidato comprende una molécula que no se conoce que fomente la diferenciación celular. El factor de diferenciación candidato puede comprender una molécula que no se conoce que fomente la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato comprende una molécula pequeña. Una molécula pequeña puede ser una molécula que tiene una masa molecular de aproximadamente 10.000 uma o menos. Se da a conocer que la molécula pequeña comprende un retinoide. Se da a conocer que la molécula pequeña comprende ácido retinoico.

También se da a conocer que el factor de diferenciación candidato comprende un polipéptido. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, una glicoproteína, una lipoproteína, una proteína de la matriz celular, una citocina, una quimiocina, una hormona peptídica, una interleucina o un factor de crecimiento. Los polipéptidos preferidos incluyen factores de crecimiento.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, los factores de diferenciación candidatos comprenden uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en anfiregulina, estimulador de linfocitos B, IL-16, timopoyetina, TRAIL/Apo-2, factor potenciador de colonias pre-B, factor 1 asociado a diferenciación endotelial (EDF1), polipéptido II activador de monocitos y del endotelio, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), factor potenciador de linfocitos citolíticos naturales (NKEFA), proteína morfogenética

ósea 2, proteína morfogenética ósea 8 (proteína osteogénica 2), proteína morfogenética ósea 6, proteína morfogenética ósea 7, factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), proteína CGI-149 (factor de diferenciación neuroendocrino), citocina A3 (proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa), proteína asociada a diferenciación celular de glioblastoma (GBDR1), factor de crecimiento derivado de hepatoma, precursor de neuromedina U-25, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B), precursor de RANTES específico de células T, factor derivado 1 de células dendríticas tímicas, transferrina, interleucina-1 (IL 1), interleucina-2 (IL 2), interleucina-3 (IL 3), interleucina-4 (IL 4), interleucina-5 (IL 5), interleucina-6 (IL 6), interleucina-7 (IL 7), interleucina-8 (IL 8), interleucina-9 (IL 9), interleucina-10 (IL 10), interleucina-11 (IL 11), interleucina-12 (IL 12), interleucina-13 (IL 13), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina, trombopoyetina, vitamina D₃, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico derivado de cerebro, factor inhibidor de leucemia, hormona tiroidea, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), aFGF, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, factor de crecimiento nervioso beta, activina A, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), interferón-α, interferón-β, interferón-γ, factor de necrosis tumoral-α, factor de necrosis tumoral-β, actividad promotora de estallido (BPA), actividad promotora eritroide (EPA), PGE₂, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), IGF-II, factor de crecimiento neurotrófico (NGF), neurotrofina-3, neurotrofina 4/5, factor neurotrófico ciliar, nexina derivada de la glía, dexametasona, β-mercaptoetanol, ácido retinoico, hidroxianisol butilado, 5-azacitidina, anfotericina B, ácido ascórbico, ascorbato, isobutilxantina, indometacina, β-glicerolfosfato, nicotinamida, DMSO, tiazolidindionas, TWS119, oxitocina, vasopresina, hormona estimulante de melanocitos, corticotropina, lipotropina, tiotropina, hormona del crecimiento, prolactina, hormona luteinizante, gonadotropina coriónica humana, hormona estimulante del folículo, factor de liberación de corticotropina, factor de liberación de gonadotropina, factor de liberación de prolactina, factor inhibidor de prolactina, factor de liberación de hormona del crecimiento, somatostatina, factor de liberación de tiotropina, péptido relacionado con el gen de calcitonina, hormona paratiroidea, péptido similar a glucagón 1, polipéptido insulínico dependiente de glucosa, gastrina, secretina, colecistoquinina, motilina, péptido vasoactivo intestinal, sustancia P, polipéptido pancreático, péptido tirosina-tirosina, tirosina neuropeptídica, insulina, glucagón, lactógeno placentario, relaxina, angiotensina II, calcitriol, péptido natriurético auricular y melatonina. Tiroxina, triyodotironina, calcitonina, estradiol, estrona, progesterona, testosterona, cortisol, corticosterona, aldosterona, epinefrina, norepinefrina, androstieno, calcitriol, colágeno, dexametasona, β-mercaptoetanol, ácido retinoico, hidroxianisol butilado, 5-azacitidina, anfotericina B, ácido ascórbico, ascorbato, isobutilxantina, indometacina, β-glicerolfosfato, nicotinamida, DMSO, tiazolidindionas y TWS119.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato se proporciona a la población celular en una o más concentraciones. Tal como se da a conocer en el presente documento, el factor de diferenciación candidato puede proporcionarse a la población celular de modo que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea las células oscila entre aproximadamente 0,1 ng/ml y aproximadamente 10 mg/ml. La concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea las células puede oscilar entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml. La concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea las células puede oscilar entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 μg /ml. La concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea las células puede oscilar entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 10 μg /ml. La concentración del candidato, factor de diferenciación en el medio que rodea las células pueden ser de aproximadamente el 5 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 75 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 125 ng/ml, aproximadamente 150 ng/ml, aproximadamente 175 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 225 ng/ml, aproximadamente 250 ng/ml, aproximadamente 275 ng/ml, aproximadamente 300 ng/ml, aproximadamente 325 ng/ml, aproximadamente 350 ng/ml, aproximadamente 375 ng/ml, aproximadamente 400 ng/ml, aproximadamente 425 ng/ml, aproximadamente 450 ng/ml, aproximadamente 475 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 525 ng/ml, aproximadamente 550 ng/ml, aproximadamente 575 ng/ml, aproximadamente 600 ng/ml, aproximadamente 625 ng/ml, aproximadamente 650 ng/ml, aproximadamente 675 ng/ml, aproximadamente 700 ng/ml, aproximadamente 725 ng/ml, aproximadamente 750 ng/ml, aproximadamente 775 ng/ml, aproximadamente 800 ng/ml, aproximadamente 825 ng/ml, aproximadamente 850 ng/ml, aproximadamente 875 ng/ml, aproximadamente 900 ng/ml, aproximadamente 925 ng/ml, aproximadamente 950 ng/ml, aproximadamente 975 ng/ml, aproximadamente 1 μg/ml, aproximadamente 2 μg/ml, aproximadamente 3 μg/ml, aproximadamente 4 μg/ml, aproximadamente 5 μg/ml, aproximadamente 6 μg/ml, aproximadamente 7 μg/ml, aproximadamente 8 μg/ml, aproximadamente 9 μg/ml, aproximadamente 10 μg/ml, aproximadamente 11 μg/ml, aproximadamente 12 μg/ml, aproximadamente 13 μg/ml, aproximadamente 14 μg/ml, aproximadamente 15 μg/ml, aproximadamente 16 μg/ml, aproximadamente 17 μg/ml, aproximadamente 18 μg/ml, aproximadamente 19 μg/ml, aproximadamente 20 μg/ml, aproximadamente 25 μg/ml, aproximadamente 50 μg/ml, aproximadamente 75 μg/ml, aproximadamente 100 μg/ml, aproximadamente 125 μg/ml, aproximadamente 150 μg/ml, aproximadamente 175 μg/ml, aproximadamente 200 μg/ml, aproximadamente 250 μg/ml, aproximadamente 300 μg/ml, aproximadamente 350 μg/ml, aproximadamente 400 μg/ml, aproximadamente 450 μg/ml, aproximadamente 500 μg/ml, aproximadamente 550 μg/ml, aproximadamente 600 μg/ml, aproximadamente 650 μg/ml, aproximadamente 700 μg/ml, aproximadamente 750 μg/ml, aproximadamente 800 μg/ml, aproximadamente 850 μg/ml, aproximadamente 900 μg/ml, aproximadamente 950 μg/ml, aproximadamente 1000 μg/ml o mayor de

aproximadamente 1000 µg/ml.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, a la población celular puede proporcionársele un factor de diferenciación candidato que comprende cualquier molécula distinta de un retinoide, FGF-10, FGF-4, BMP-4, activina A, activina B o cualquier otro factor de diferenciación de intestino proximal. A la población celular puede proporcionársele un factor de diferenciación candidato que comprende cualquier molécula distinta de ácido retinoico.

Tal como se da a conocer en el presente documento, las etapas de los métodos de examen descritos en el presente documento comprenden determinar la expresión de al menos un marcador en un primer punto de tiempo y un segundo punto de tiempo. Tal como se da a conocer en el presente documento, el primer punto de tiempo puede ser antes de o aproximadamente en el mismo momento en que se proporciona a la población celular el factor de diferenciación candidato. Alternativamente, el primer punto de tiempo es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. Puede determinarse la expresión de una pluralidad de marcadores en un primer punto de tiempo.

Además de determinar la expresión de al menos un marcador en un primer punto de tiempo, los métodos de examen descritos en el presente documento contemplan determinar la expresión de al menos un marcador en un segundo punto de tiempo, que es posterior al primer punto de tiempo y que es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. La expresión del mismo marcador puede determinarse tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. También se da a conocer que se determina la expresión de una pluralidad de marcadores tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. También se da a conocer que se determina la expresión de la misma pluralidad de marcadores tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. Tal como se da a conocer en el presente documento, puede determinarse la expresión de marcadores en una pluralidad de puntos de tiempo, siendo cada uno posterior al primer punto de tiempo, y siendo cada uno posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. La expresión de marcadores puede determinarse mediante Q-PCR. La expresión de marcadores puede determinarse mediante inmunocitoquímica.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, se determina que el marcador que tiene expresión en los puntos de tiempo primero y segundo es un marcador que está asociado con la diferenciación de células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 humanas dorsales y/o ventrales en células que son los precursores de células que componen tejidos y/u órganos que se derivan de la parte posterior del intestino proximal. Los tejidos y/u órganos que se derivan de la parte posterior del intestino proximal pueden comprender células diferenciadas de manera terminal. El marcador es indicativo de células pancreáticas o células precursoras pancreáticas. El marcador es un marcador que se selecciona de la tabla 3 o la tabla 4.

En el contexto de los métodos de examen descritos en el presente documento, se permite que pase tiempo suficiente entre que se proporciona a la población celular el factor de diferenciación candidato y se determina la expresión de marcadores en el segundo punto de tiempo. El tiempo suficiente entre que se proporciona a la población celular el factor de diferenciación candidato y se determina la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo puede ser de tan sólo desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 10 días. La expresión de al menos un marcador puede determinarse múltiples veces de manera posterior a que se proporcione a la población celular el factor de diferenciación candidato. El tiempo suficiente puede ser al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 42 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 54 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 66 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 78 horas, al menos aproximadamente 84 horas, al menos aproximadamente 90 horas, al menos aproximadamente 96 horas, al menos aproximadamente 102 horas, al menos aproximadamente 108 horas, al menos aproximadamente 114 horas, al menos aproximadamente 120 horas, al menos aproximadamente 126 horas, al menos aproximadamente 132 horas, al menos aproximadamente 138 horas, al menos aproximadamente 144 horas, al menos aproximadamente 150 horas, al menos aproximadamente 156 horas, al menos aproximadamente 162 horas, al menos aproximadamente 168 horas, al menos aproximadamente 174 horas, al menos aproximadamente 180 horas, al menos aproximadamente 186 horas, al menos aproximadamente 192 horas, al menos aproximadamente 198 horas, al menos aproximadamente 204 horas, al menos aproximadamente 210 horas, al menos aproximadamente 216 horas, al menos aproximadamente 222 horas, al menos aproximadamente 228 horas, al menos aproximadamente 234 horas o al menos aproximadamente 240 horas.

En el contexto de los métodos descritos en el presente documento, se determina además si la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo ha aumentado o disminuido en comparación con la expresión de este marcador en el primer punto de tiempo. Un aumento o una disminución de la expresión del al menos un marcador indica que el factor de diferenciación candidato puede fomentar la diferenciación de las células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales. De manera similar, si se determina la expresión de una pluralidad de marcadores, se determina además si la expresión de la pluralidad de marcadores en el segundo punto de tiempo ha aumentado o disminuido en comparación con la expresión de esta pluralidad de marcadores en el primer punto de tiempo. Un aumento o una disminución de la expresión de marcadores puede determinarse midiendo o evaluando de otro modo la cantidad, el nivel o la actividad del marcador en la población celular en los

puntos de tiempo primero y segundo. Tal determinación puede ser con relación a otros marcadores, por ejemplo la expresión de genes de mantenimiento, o absoluta. Tal como se da a conocer en el presente documento, cuando la expresión de marcadores aumenta en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo, la cantidad de aumento es de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más de al menos aproximadamente 100 veces. La cantidad de aumento puede ser menor de 2 veces. Cuando la expresión de marcadores disminuye en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo, la cantidad de disminución puede ser de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más de al menos aproximadamente 100 veces. La cantidad de disminución puede ser menor de 2 veces.

Aunque cada uno de los métodos dados a conocer en el presente documento se han descrito con respecto a células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales, se da a conocer que estos métodos pueden usarse para producir composiciones que comprenden las células de endodermo de intestino proximal/intestino medio positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales que se describen en el presente documento y/o las células de endodermo positivas para PDX1 dorsales y/o ventrales de la parte posterior del intestino proximal que se describen en el presente documento. Además, cualquiera de los tipos de células de endodermo positivas para PDX1 dados a conocer en esta memoria descriptiva puede utilizarse en los métodos de examen descritos en el presente documento.

Habiéndose descrito de manera general esta invención, puede obtenerse una comprensión adicional mediante referencia a determinados ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento con fines de ilustración únicamente, y no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

Muchos de los ejemplos a continuación describen el uso de células humanas pluripotentes. Se conocen bien en la técnica métodos de producción de células humanas pluripotentes y se han descrito numerosas publicaciones científicas, incluyendo las patentes estadounidenses n.ºs 5.453.357, 5.670.372, 5.690.926, 6.090.622, 6.200.806 y 6.251.671 así como la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0229350.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Células ES humanas

Para los estudios de desarrollo del endodermo se emplearon células madre embrionarias humanas, que son pluripotentes y pueden dividirse aparentemente de manera indefinida mientras que mantienen un cariotipo normal. Se derivaron células ES de la masa celular interna de un embrión de 5 días usando métodos o bien inmunológicos o bien mecánicos para el aislamiento. En particular, se derivó la línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 de un embrión congelado supernumerario de un ciclo de fertilización *in vitro* tras el consentimiento informado del paciente. Tras descongelar, el blastocisto incubado se sembró en placa sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), en medio ES (DMEM, FBS al 20%, aminoácidos no esenciales, beta-mercaptoetanol, suplemento de ITS). El embrión se adhirió a la placa de cultivo y después de aproximadamente dos semanas, se transfirieron regiones de hESC indiferenciadas a nuevas placas con MEF. Se logró la transferencia con corte mecánico y una breve digestión con dispasa, seguido por eliminación mecánica de las agrupaciones celulares, lavado y resiembra en placa. Desde la derivación, se han realizado pases en serie de hESCyt-25 más de 100 veces. Se empleó la línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 como material de partida para la producción de endodermo definitivo.

Los expertos en la técnica apreciarán que también pueden usarse células madre u otras células pluripotentes como material de partida para los procedimientos de diferenciación descritos en el presente documento. Por ejemplo, en el contexto de la presente divulgación, pueden usarse células obtenidas de las crestas gonadales embrionarias, que pueden aislarse mediante métodos conocidos en la técnica, como material de partida celular pluripotente.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Caracterización de hESCyt-25

La línea de células madre embrionarias humanas, hESCyt-25, ha mantenido propiedades de morfología, cariotipo, crecimiento y autorrenovación normales a lo largo de 18 meses en cultivo. Esta línea celular presenta una fuerte inmunoreactividad para los antígenos OCT4, SSEA-4 y TRA-1-60, todos los cuales son característicos de hESC indiferenciadas y presenta actividad fosfatasa alcalina así como una morfología idéntica a otras líneas de hESC establecidas. Además, la línea de células madre humanas, hESCyt-25, también forma fácilmente cuerpos

embrioides (EB) cuando se cultiva en suspensión. Como demostración de su naturaleza pluripotente, hESCyT-25 se diferencia en diversos tipos de células que representan las tres capas germinales principales. Se demostró producción de ectodermo mediante Q-PCR para ZIC1 así como inmunocitoquímica (ICC) para nestina y más marcadores neuronales maduros. Se observó tinción inmunocitoquímica para tubulina β -III en agrupaciones de células alargadas, características de neuronas tempranas. Previamente, se trataron EB en suspensión con ácido retinoico, para inducir diferenciación de células madre pluripotentes a endodermo visceral (VE), un linaje extraembrionario. Las células tratadas expresaron altos niveles de α -fetoproteína (AFP) y SOX7, dos marcadores de VE, mediante 54 horas de tratamiento. Las células diferenciadas en monocapa expresaban AFP en parches esporádicos tal como se demostró mediante tinción inmunocitoquímica. Tal como se describirá más adelante, la línea celular hESCyT-25 también podía formar endodermo definitivo, tal como se validó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real e inmunocitoquímica para SOX17, en ausencia de expresión de AFP. Para demostrar la diferenciación en mesodermo, se analizaron EB en diferenciación para determinar la expresión génica de Brachyury a varios puntos de tiempo. La expresión de Brachyury aumentó progresivamente a lo largo del transcurso del experimento. En vista de lo anterior, la línea hESCyT-25 es pluripotente tal como se muestra mediante la capacidad para formar células que representan las tres capas germinales.

EJEMPLO 3

Producción de anticuerpo frente a SOX17

Un obstáculo principal para la identificación de endodermo definitivo en cultivos de hESC es la falta de herramientas apropiadas. Por tanto, se emprendió la producción de un anticuerpo generado contra la proteína SOX17 humana.

El marcador SOX17 se expresa a través del endodermo definitivo a medida que se forma durante la gastrulación y su expresión se mantiene en el tubo digestivo (aunque los niveles de expresión varían a lo largo del eje A-P) hasta alrededor del comienzo de la organogénesis. SOX17 también se expresa en un subconjunto de células de endodermo extraembrionarias. No se ha observado expresión de esta proteína en mesodermo o ectodermo. Se ha descubierto ahora que SOX17 es un marcador apropiado para el linaje de endodermo definitivo apropiado cuando se usa conjuntamente con marcadores para excluir linajes extraembrionarios.

Tal como se describe en detalle en el presente documento, se utilizó el anticuerpo frente a SOX17 para examinar específicamente efectos de diversos tratamientos y procedimientos de diferenciación dirigidos a la producción de células positivas para SOX17 de endodermo definitivo. Otros anticuerpos reactivos frente a AFP, SPARC y trombosmodulina se emplearon también para descartar la producción de endodermo visceral y parietal (endodermo extraembrionario).

Con el fin de producir un anticuerpo contra SOX17, una parte del ADNc de SOX17 humana (SEQ ID NO: 1) correspondiente a los aminoácidos 172-414 (SEQ ID NO: 2) en el extremo carboxiterminal de la proteína SOX17 (figura 2) se usó para inmunización genética en ratas en la campaña de producción de anticuerpos, GENOVAC (Freiberg, Alemania), según procedimientos desarrollados allí. Pueden encontrarse procedimientos para la inmunización genética en las patentes estadounidenses n.ºs 5.830.876, 5.817.637, 6.165.993 y 6.261.281 así como las publicaciones de patente internacional n.ºs WO00/29442 y WO99/13915.

Otros métodos adecuados para la inmunización genética se describen también en los documentos no de patente. Por ejemplo, Barry *et al.* describen la producción de anticuerpos monoclonales mediante inmunización genética en Biotechniques 16: 616-620, 1994.

Pueden encontrarse ejemplos específicos de métodos de inmunización genética para producir anticuerpos contra proteínas específicas, por ejemplo, en Costaglia *et al.*, (1998) Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor, J. Immunol. 160: 1458-1465; Kilpatrick *et al.* (1998) Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor, Hybridoma 17: 569-576; Schmolke *et al.*, (1998) Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-especific monoclonal antibodies generated by DNA immunization, J. Virol. 72: 4541-4545; Krasemann *et al.*, (1999) Generation of monoclonal antibodies against proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy, J. Biotechnol. 73: 119-129; y Ulivieri *et al.*, (1996) Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by DNA immunization, J. Biotechnol. 51: 191-194.

SOX7 y SOX18 son los parientes de la familia de Sox más cercanos a SOX17 tal como se representa en el dendrograma de relación mostrado en la figura 3. Se empleó el polipéptido de SOX7 humano como control negativo para demostrar que el anticuerpo frente a SOX17 producido mediante inmunización genética es específico para SOX17 y no reacciona con el miembro de su familia más cercano. En particular, SOX7 y otras proteínas se expresaron en fibroblastos humanos, y entonces, se analizaron para determinar la reactividad cruzada con el anticuerpo frente a SOX17 mediante inmunotransferencia de tipo Western e ICC. Por ejemplo, se utilizaron los siguientes métodos para la producción de los vectores de expresión de SOX17, SOX7 y EGFP, su transfección en fibroblastos humanos y análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western. Los vectores de expresión

empleados para la producción de SOX17, SOX7 y EGFP fueron pCMV6 (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD), pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA), respectivamente. Para la producción de proteínas, se transfectaron de manera transitoria fibroblastos humanos MDX inmortalizados con telomerasa con ADN superenrollado en presencia de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se recogieron los lisados celulares totales 36 horas tras la transfección en TRIS-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato al 0,5%, que contiene un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN). Los análisis de inmunotransferencia de tipo Western de 100 µg de proteínas celulares, separadas mediante SDS-PAGE en NuPAGE (poliacrilamida en gradiente del 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) y transferidas mediante electrotransferencia sobre membranas de PDVF (Hercules, CA), se trataron con sonda con una dilución 1/1000 del anti-suero de SOX17 de rata en TRIS-HCl 10 mM (pH 8), NaCl 150 mM, BSA al 10%, Tween-20 al 0,05% (Sigma, St. Louis, MO), seguido por fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo anti-IgG de rata (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), y se revelaron a través de tinción de fosfatasa alcalina Vector Black (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El patrón de tamaño de proteínas usado fue marcadores de color de intervalo amplio (Sigma, St. Louis, MO).

En la figura 4, extractos proteicos preparados a partir de células de fibroblastos humanos que se transfectaron de manera transitoria con ADNc de SOX17, SOX7 o EGFP se trataron con sonda en inmunotransferencias de tipo Western con el anticuerpo frente a SOX17. Sólo el extracto proteico extraído de células transfectadas con hSOX17 producía una banda de ~51 Kda que coincidía estrechamente con el peso molecular de 46 Kda predicho de la proteína SOX17 humana. No había reactividad del anticuerpo frente a SOX17 con extractos preparados a partir de células transfectadas con o bien SOX7 o bien EGFP humanas. Además, el anticuerpo frente a SOX17 marcaba claramente los núcleos de células de fibroblastos humanos transfectadas con el constructo de expresión de hSOX17 pero no marcaba células transfectadas con EGFP solo. Como tal, el anticuerpo frente a SOX17 presenta especificidad mediante ICC.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Validación del anticuerpo frente a SOX17 como marcador de endodermo definitivo

Se marcaron conjuntamente hESC parcialmente diferenciadas con anticuerpos frente a SOX17 y AFP para demostrar que el anticuerpo frente a SOX17 es específico para proteína SOX17 humana y además marca endodermo definitivo. Se ha demostrado que SOX17, SOX7 (que es un miembro estrechamente relacionado del subgrupo F de la familia génica SOX (figura 3)) y AFP se expresan cada uno en endodermo visceral. Sin embargo, AFP y SOX7 no se expresan en células de endodermo definitivo a niveles detectables mediante ICC, y por tanto, pueden emplearse como marcadores negativos para células de endodermo definitivo auténticas. Se mostró que el anticuerpo frente a SOX17 marca poblaciones celulares que existen como agrupamientos diferenciados de células o están entremezcladas con células positivas para AFP. En particular, la figura 5A muestra que pequeños números de células con SOX17 se marcaban conjuntamente con AFP; sin embargo, también se encontraron regiones en las que había pocas o ninguna célula AFP⁺ en el campo de células SOX17⁺ (figura 5B). De manera similar, puesto que se ha notificado que el endodermo parietal expresa SOX17, el marcaje conjunto de anticuerpos con SOX17 junto con los marcadores parietales SPARC y/o trombomodulina (TM) pueden usarse para identificar las células SOX17⁺ que son endodermo parietal. Tal como se muestra en las figuras 6A-C, se produjeron células de endodermo parietal marcadas conjuntamente con trombomodulina y SOX17 mediante diferenciación al azar de células hES.

En vista de los experimentos de marcaje celular anteriores, la identidad de una célula de endodermo definitivo puede establecerse mediante el perfil de marcadores SOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo} o SPARC^{lo}. En otras palabras, la expresión del marcador SOX17 es mayor que la expresión del marcador AFP, que es característico de endodermo visceral, y los marcadores TM o SPARC, que son característicos de endodermo parietal. Por consiguiente, las células positivas para SOX17 pero negativas para AFP y negativas para TM o SPARC son endodermo definitivo.

Como evidencia adicional de la especificidad del perfil de marcadores SOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo}/SPARC^{lo} como predictivo de endodermo definitivo, se comparó cuantitativamente la expresión génica de SOX17 y AFP con el número relativo de células marcadas con anticuerpo. Tal como se muestra en la figura 7A, las hESC tratadas con ácido retinoico (inductor de endodermo visceral) o activina A (inductor de endodermo definitivo), dieron como resultado una diferencia de 10 veces en el nivel de expresión de ARNm de SOX17. Este resultado reflejó la diferencia de 10 veces en el número de células marcadas con anticuerpo frente a SOX17 (figura 7B). Además, tal como se muestra en la figura 8A, el tratamiento con activina A de las hESC suprimió la expresión génica de AFP en 6,8 veces en comparación con la ausencia de tratamiento. Este se reflejó visualmente mediante una disminución drástica del número de células marcadas con AFP en estos cultivos tal como se muestra en las figuras 8B-C. Para cuantificar esto adicionalmente, se demostró que esta disminución de aproximadamente 7 veces de la expresión génica de AFP era el resultado de una disminución de 7 veces similar del número de células marcadas con anticuerpo frente a AFP tal como se midió mediante citometría de flujo (figuras 9A-B). Este resultado es extremadamente significativo porque indica que cambios cuantitativos en la expresión génica tal como se observan mediante Q-PCR reflejan cambios en la especificación de tipo de células tal como se observa mediante tinción con anticuerpos.

La incubación de las hESC en presencia de miembros de la familia de Nodal (Nodal, activina A y activina B - NAA) dio como resultado un aumento significativo de anticuerpo frente a células marcadas con SOX17 a lo largo del

tiempo. Mediante 5 días de tratamiento con activina continuo, más del 50% de las células se marcaron con SOX17 (figuras 10A-F). Había pocas o ninguna célula marcada con AFP después de 5 días de tratamiento con activina.

En resumen, el anticuerpo producido contra los 242 aminoácidos carboxi-terminales de la proteína SOX17 humana identificó la proteína SOX17 humana en inmunotransferencias de tipo Western pero no reconoció SOX7, su pariente de la familia de Sox más cercano. El anticuerpo frente a SOX17 reconoció un subconjunto de células en cultivos de hESC en diferenciación que eran principalmente SOX17⁺/AFP^{lo/-} (más del 95% de células marcadas) así como un pequeño porcentaje (< 5%) de células que se marcaban conjuntamente para SOX17 y AFP (endodermo visceral). El tratamiento de cultivos de hESC con activinas dio como resultado una elevación marcada de la expresión génica de SOX17 así como células marcadas con SOX17 y suprimió drásticamente la expresión de ARNm de AFP y el número de células marcadas con anticuerpo frente a AFP.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Ensayo de expresión génica mediante Q-PCR

En los siguientes experimentos, una RT-PCR cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real fue el ensayo principal usado para examinar los efectos de diversos tratamientos sobre la diferenciación de hESC. En particular, se analizaron mediciones en tiempo real de la expresión génica para múltiples genes marcadores a múltiples puntos de tiempo mediante Q-PCR. Se evaluaron genes marcadores característicos de los tipos de células deseados así como no deseados para obtener una mejor comprensión de la dinámica global de las poblaciones celulares. La fuerza del análisis de Q-PCR incluye su extrema sensibilidad y relativa facilidad de revelado de los marcadores necesarios, así como que la secuencia del genoma está fácilmente disponible. Además, la sensibilidad extremadamente alta de la Q-PCR permite la detección de la expresión génica de un número relativamente pequeño de células dentro de una población mucho más grande. Además, la capacidad de detectar niveles muy bajos de la expresión génica proporciona indicaciones de “sesgo de diferenciación” dentro de la población. El sesgo hacia una ruta de diferenciación particular, antes de la diferenciación manifiesta de esos fenotipos celulares, es irreconocible usando técnicas inmunocitoquímicas. Por este motivo, la Q-PCR proporciona un método de análisis que es al menos complementario y potencialmente muy superior a las técnicas inmunocitoquímicas para examinar el éxito de tratamientos de diferenciación. Adicionalmente, la Q-PCR proporciona un mecanismo mediante el que evaluar el éxito de un protocolo de diferenciación en un formato cuantitativo a escalas de rendimiento semialto del análisis.

El enfoque adoptado en este caso fue realizar cuantificación relativa usando química de SYBR Green en un instrumento Rotor Gene 3000 (Corbett Research) y un formato de RT-PCR de dos etapas. Un enfoque de este tipo permitió el depósito de muestras de ADNc para el análisis de genes marcadores adicionales en el futuro, evitando así la variabilidad en la eficiencia de transcripción inversa entre las muestras.

Se diseñaron cebadores para cubrir los límites exón-exón o abarcar los intrones de al menos 800 pb cuando era posible, ya que se había determinado empíricamente que esto eliminaba la amplificación de ADN genómico contaminante. Cuando se empleaban genes marcadores que no contenían intrones o presentaban pseudogenes, se realizó tratamiento con ADNasa I de las muestras de ARN.

Se usó rutinariamente Q-PCR para medir la expresión génica de múltiples marcadores de tipos de células diana y no diana con el fin de proporcionar una descripción de perfil amplio de la expresión génica en muestras de células. Los marcadores relevantes para las fases tempranas de la diferenciación de hESC (específicamente ectodermo, mesodermo, endodermo definitivo y endodermo extraembrionario) y para los que están disponibles conjuntos de cebadores validados se proporcionan a continuación en la tabla 1. La especificidad humana de estos conjuntos de cebadores también se ha demostrado. Esto es un hecho importante puesto que las hESC se hicieron crecer a menudo en capas alimentadoras de ratón. Lo más normalmente, se tomaron muestras por triplicado para cada condición y se analizaron independientemente por duplicado para evaluar la variabilidad biológica asociada con cada determinación cuantitativa.

Para generar molde de PCR, se aisló ARN total usando RNeasy (Qiagen) y se cuantificó usando RiboGreen (Molecular Probes). Se llevó a cabo la transcripción inversa a partir de 350-500 ng de ARN total usando el kit de transcriptasa inversa iScript (BioRad), que contiene una mezcla de oligo-dT y cebadores al azar. Cada reacción de 20 µl se diluyó posteriormente hasta un volumen total de 100 µl y se usaron 3 µl en cada reacción Q-PCR de 10 µl que contenía cebadores directos e inversos 400 nM y 5 µl de mezcla maestra 2X SYBR Green (Qiagen). Se usaron parámetros de ciclado de dos etapas empleando una desnaturalización de 5 segundos a 85-94°C (específicamente seleccionada según la temperatura de fusión del amplicón para cada conjunto de cebadores) seguido por un apareamiento/extensión de 45 segundos a 60°C. Se recogieron datos de fluorescencia durante los últimos 15 segundos de cada fase de extensión. Se usó una serie de dilución de tres puntos, de 10 veces para generar la curva patrón para cada ronda y se convirtieron los umbrales de ciclo (Ct) en valores cuantitativos basándose en esta curva patrón. Se normalizaron los valores cuantificados para cada muestra al rendimiento de genes de mantenimiento y entonces se calcularon el promedio y las desviaciones estándar para muestras por triplicado. Al final del ciclado de PCR, se realizó un análisis de curva de fusión para determinar la especificidad de la reacción. Se indicó un único producto específico mediante un único pico a la T_m apropiada para ese amplicón de PCR. Además, reacciones realizadas sin transcriptasa inversa sirvieron como el control negativo y no se amplifican.

Una primera etapa en el establecimiento de la metodología de Q-PCR fue la validación de genes de mantenimiento (HG) apropiados en el sistema experimental. Puesto que se usó el HG para normalizar las muestras para la entrada de ARN, integridad de ARN y eficiencia de RT, era valioso que el HG presentara un nivel de expresión constante a lo largo del tiempo en todos los tipos de muestras con el fin de que la normalización fuese significativa. Se midieron los niveles de expresión de ciclofilina G, hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT), beta-2-microglobulina, hidroximetilbiano sintasa (HMBS), proteína de unión a TATA (TBP) y glucoronidasa beta (GUS) en hESC en diferenciación. Los resultados indicaron que los niveles de expresión de beta-2-microglobulina aumentaban a lo largo del transcurso de la diferenciación y por tanto se excluyó el uso de este gen para la normalización. Los otros genes presentaban niveles de expresión constantes a lo largo del tiempo así como a través de los tratamientos. Se usaron de manera rutinaria tanto ciclofilina G como GUS para calcular un factor de normalización para todas las muestras. El uso de múltiples HG reduce simultáneamente la variabilidad inherente al procedimiento de normalización y aumenta la fiabilidad de los valores de expresión génica relativa.

Después de obtener genes para su uso en normalización, se utilizó entonces Q-PCR para determinar los niveles de expresión génica relativa de muchos genes marcadores a través de muestras que reciben tratamientos experimentales diferentes. Los genes marcadores empleados se han elegido debido a que presentan enriquecimiento en poblaciones específicas representativas de las capas germinales tempranas y en particular se han centrado en conjuntos de genes que se expresan diferencialmente en endodermo definitivo y endodermo extraembrionario. Estos genes así como sus perfiles de enriquecimiento relativo se resaltan en la tabla 1.

TABLA 1

Capa germinal	Gen	Dominios de expresión
Endodermo	SOX17	endodermo definitivo, visceral y parietal
	MIXL1	endodermo y mesodermo
	GATA4	endodermo definitivo y primitivo
	HNF3b	endodermo definitivo y endodermo primitivo, mesodermo, placa neural
Extraembrionario	GSC	endodermo y mesodermo
	SOX7	endodermo visceral
	AFP	endodermo visceral, hígado
	SPARC	endodermo parietal
	TM	endodermo parietal/trofectodermo
Ectodermo	ZIC1	tubo neural, progenitores neurales
Mesodermo	BRACH	mesodermo naciente

Puesto que muchos genes se expresan en más de una capa germinal, es útil comparar cuantitativamente los niveles de expresión de muchos genes dentro del mismo experimento. SOX17 se expresa en endodermo definitivo y en un menor grado en endodermo visceral y parietal. SOX7 y AFP se expresan en endodermo visceral en este punto de tiempo de desarrollo temprano. SPARC y TM se expresan en endodermo parietal y Brachyury se expresa en mesodermo temprano.

Se predijo que células de endodermo definitivo expresan altos niveles de ARNm de SOX17 y bajos niveles de AFP y SOX7 (endodermo visceral), SPARC (endodermo parietal) y Brachyury (mesodermo). Además, se usó ZIC1 en este caso para descartar adicionalmente la inducción de ectodermo temprano. Finalmente, se expresaban GATA4 y HNF3b tanto en endodermo definitivo como extraembrionario, y por tanto, se correlacionan con la expresión de SOX17 en endodermo definitivo (tabla 1). En las figuras 11-14 se muestra un experimento representativo que demuestra cómo los genes marcadores descritos en la tabla 1 se correlacionan entre sí entre las diversas muestras, resaltando por tanto patrones específicos de diferenciación en endodermo definitivo y endodermo extraembrionario así como en tipos de células neurales y mesodérmicas.

En vista de los datos anteriores, está claro que dosis crecientes de activina dieron como resultado un aumento de la expresión génica de SOX17. Además esta expresión de SOX17 representaba predominantemente endodermo definitivo en contraposición a endodermo extraembrionario. Esta conclusión surge de la observación de que la expresión génica de SOX17 estaba inversamente correlacionada con la expresión génica de AFP, SOX7 y SPARC.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

Diferenciación dirigida de células ES humanas a endodermo definitivo

Los cultivos de células ES humanas se diferencian aleatoriamente si se cultivan en condiciones que no mantienen activamente su estado indiferenciado. Esta diferenciación heterogénea da como resultado la producción de células de endodermo extraembrionarias compuestas por endodermo tanto parietal como visceral (expresión de AFP, SPARC y SOX7) así como derivados de mesodermo y ectodermo tempranos marcados por la expresión de ZIC1 y nestina (ectodermo) y Brachyury (mesodermo). La aparición de células de endodermo definitivo no se ha examinado ni especificado para la falta de marcadores de anticuerpo específicos en cultivos de células ES. Como tal, y por defecto, no se ha estudiado bien la producción de endodermo definitivo temprano en cultivos de células ES. Puesto

que no han estado disponibles reactivos de anticuerpos satisfactorios en células de endodermo definitivo, la mayor parte de la caracterización se ha centrado en ectodermo y endodermo extraembrionario. Globalmente, hay números significativamente mayores de tipos de células extraembrionarias y neuroectodérmicas en comparación con células de endodermo definitivo SOX17^{hi} en cultivos de células ES diferenciadas al azar.

- 5 A medida que las colonias de hESC indiferenciadas se expanden sobre un lecho de capas alimentadoras de fibroblastos, las células en los bordes de la colonia adoptan morfologías alternativas que son distintas de las de células que residen dentro del interior de la colonia. Muchas de estas células del borde externo pueden distinguirse por su morfología de cuerpo celular más grande, menos uniforme y por la expresión de niveles superiores de OCT4. Se ha descrito que a medida que las células ES comienzan a diferenciarse, alteran los niveles de expresión de OCT4 arriba o abajo en relación a células ES indiferenciadas. La alteración de los niveles de OCT4 por encima o por debajo del umbral indiferenciado puede significar los estados iniciales de diferenciación lejos del estado pluripotente.

- 10 Cuando se examinaron colonias indiferenciadas mediante inmunocitoquímica de SOX17, se detectaron ocasionalmente pequeñas agrupaciones de 10-15 células de células positivas para SOX17 en ubicaciones al azar en la periferia y en las uniones entre colonias de hESC indiferenciadas. Tal como se indicó anteriormente, estos bolsillos dispersos de bordes de colonias externas parecen ser algunas de las primeras células en diferenciarse lejos de la morfología de células ES clásica a medida que se expande el tamaño de la colonia y se vuelve más poblada. Colonias más jóvenes, más pequeñas completamente indiferenciadas (< 1 mm; 4-5 días de edad) no mostraban células positivas para SOX17 dentro de o en los bordes de las colonias mientras que colonias más antiguas, más grandes (1-2 mm de diámetro, > 5 días de edad) tenían parches aislados esporádicos de células positivas para SOX17, negativas para AFP en la periferia de algunas colonias o en regiones interiores con respecto al borde que no presentaban la morfología de hESC clásica descrita anteriormente. Dado que este fue el primer desarrollo de un anticuerpo eficaz frente a SOX17, nunca se habían demostrado previamente células de endodermo definitivo generadas en tales cultivos de células ES "indiferenciadas" tempranas.

- 25 Basándose en correlaciones negativas de los niveles de expresión génica de SOX17 y SPARC mediante Q-PCR, la gran mayoría de estas células positivas para SOX17, negativas para AFP serán negativas para marcadores de endodermo parietal mediante comarcaje con anticuerpos. Esto se demostró específicamente para células de endodermo parietal que expresan TM tal como se muestra en las figuras 15A-B. La exposición a los factores de Nodal activina A y B dio como resultado una disminución drástica de la intensidad de expresión de TM y el número de células positivas para TM. Mediante marcaje triple usando anticuerpos frente a SOX17, AFP y TM en un cultivo tratado con activina, se observaron agrupaciones de células positivas para SOX17 que eran también negativas para AFP y TM (figuras 16A-D). Estas son las primeras demostraciones celulares de células de endodermo definitivo positivas para SOX17 en cultivos de hESC en diferenciación (figuras 16A-D y 17).

- 30 Con las herramientas de anticuerpo frente a SOX17 y Q-PCR descritas anteriormente, se han explorado varios procedimientos que pueden programar eficazmente las hESC para que se conviertan en células de endodermo definitivo SOX17^{hi}/AFP^{lo}/SPARC/TM^{lo}. Se aplicó una variedad de protocolos de diferenciación dirigidos a aumentar el número y la capacidad de proliferación de estas células tal como se mide al nivel de la población mediante Q-PCR para la expresión génica de SOX17 y al nivel de células individuales mediante marcaje con anticuerpos de la proteína SOX17.

- 40 Los inventores fueron los primeros en analizar y describir el efecto de la familia de factores de crecimiento de TGFβ, tales como Nodal/activina/BMP, para su uso en la creación de células de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias en cultivos celulares *in vitro*. En experimentos típicos, se añadieron activina A, activina B, BMP o combinaciones de estos factores de crecimiento a cultivos de línea de células madre humanas indiferenciadas hESCyt-25 para comenzar el proceso de diferenciación.

- 45 Tal como se muestra en la figura 19, la adición de activina A a 100 ng/ml dio como resultado una inducción de 19 veces de la expresión génica de SOX17 frente a hESC indiferenciadas hacia el día 4 de diferenciación. La adición de activina B, un segundo miembro de la familia de activina, junto con activina A, dio como resultado una inducción de 37 veces con respecto a las hESC indiferenciadas hacia el día 4 de tratamiento con activina combinado. Finalmente, la adición de un tercer miembro de la familia de TGFβ a partir de los subgrupos de Nodal/activina y BMP, BMP4, junto con activina A y activina B, aumentó la inducción en veces hasta 57 veces la de hESC indiferenciadas (figura 19). Cuando se comparó la inducción de SOX17 con activinas y BMP con controles de medio sin factor, resultaron inducciones de 5, 10 y 15 veces en el punto de tiempo de 4 días. Mediante cinco días de tratamiento triple con activinas A, B y BMP, se indujo SOX17 más de 70 veces mayor que hESC. Estos datos indican que dosis superiores y tiempos de tratamiento más prolongados de los miembros de la familia de TGFβ Nodal/activina dan como resultado una expresión aumentada de SOX17.

- 55 Nodal y moléculas relacionadas activina A, B y BMP facilitan la expresión de SOX17 y la formación de endodermo definitivo *in vivo* o *in vitro*. Además, la adición de BMP da como resultado una inducción de SOX17 mejorada posiblemente a través de la inducción adicional de Cripto, el correceptor de Nodal.

Se ha demostrado que la combinación de activinas A y B junto con BMP4 da como resultado aumentos aditivos en la inducción de SOX17 y por tanto en la formación de endodermo definitivo. La adición de BMP4 durante periodos

prolongados (>4 días), en combinación con activina A y B puede inducir SOX17 en endodermo parietal y visceral así como endodermo definitivo. En algunas realizaciones de la presente invención, es por tanto valioso eliminar BMP4 del tratamiento en el plazo de 4 días de la adición.

Para determinar el efecto del tratamiento con factores TGF β al nivel de células individuales, se examinó el transcurso de tiempo de la adición de factores TGF β usando marcaje con anticuerpo frente a SOX17. Tal como se mostró previamente en las figuras 10A-F, hubo un aumento drástico del número relativo de células marcadas con SOX17 a lo largo del tiempo. La cuantificación relativa (figura 20) muestra un aumento de más de 20 veces de células marcadas con SOX17. Este resultado indica que tanto los números de células así como el nivel de expresión génica de SOX17 están aumentando con el tiempo de exposición a factores TGF β . Tal como se muestra en la figura 21, después de cuatro días de la exposición a Nodal, activina A, activina B y BMP4, el nivel de inducción de SOX17 alcanzó 168 veces con respecto a hESC indiferenciadas. La figura 22 muestra que el número relativo de células positivas para SOX17 era también sensible a la dosis. Dosis de activina A de 100 ng/ml o más podían inducir potencialmente la expresión génica de SOX17 y el número de células.

Además de los miembros de la familia de TGF β , la familia de moléculas Wnt puede desempeñar un papel en la especificación y/o el mantenimiento de endodermo definitivo. El uso de moléculas Wnt era también beneficioso para la diferenciación de las hESC a endodermo definitivo tal como se indica mediante el aumento de la expresión génica de SOX17 en muestras que se trataron con activinas más Wnt3a con respecto a las que se trataron con activinas solas (figura 23).

Todos los experimentos descritos anteriormente se realizaron usando un medio de cultivo tisular que contenía el 10% de suero con factores añadidos. Sorprendentemente, se descubrió que la concentración de suero tenía un efecto sobre el nivel de expresión de SOX17 en presencia de activinas añadidas tal como se muestra en las figuras 24A-C. Cuando los niveles de suero se redujeron desde el 10% hasta el 2%, la expresión de SOX17 se triplicó en presencia de activinas A y B.

Finalmente, se demostró que células SOX17⁺ inducidas con activina se dividen en cultivo tal como se representa en las figuras 25A-D. Las flechas muestran células marcadas con SOX17/PCNA/DAPI que están en mitosis tal como se evidencia mediante el patrón de placas mitóticas marcadas con PCNA/DAPI y el perfil mitótico de contraste de fases.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

La expresión del receptor de quimiocina 4 (CXCR4) se correlaciona con marcadores para endodermo definitivo y no con marcadores para mesodermo, ectodermo o endodermo visceral

Tal como se describió anteriormente, pueden inducirse hESC para que se diferencien en la capa germinal de endodermo definitivo mediante la aplicación de citocinas de la familia de TGF β y más específicamente de la subfamilia de activina/nodal. Adicionalmente, se ha mostrado que la proporción de suero bovino fetal (FBS) en el medio de cultivo de diferenciación afecta a la eficiencia de diferenciación en endodermo definitivo de las hESC. Este efecto es tal que a una concentración dada de activina A en el medio, niveles superiores de FBS inhibirán la diferenciación máxima en endodermo definitivo. En ausencia de activina A exógena, la diferenciación de las hESC al linaje de endodermo definitivo es muy ineficaz y la concentración de FBS tiene efectos mucho más suaves sobre el proceso de diferenciación de hESC.

En estos experimentos, se diferenciaron hESC mediante crecimiento en medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA; n.º de cat. 61870-036) complementado con FBS al 0,5%, al 2,0% o al 10% y o bien con o bien sin activina A 100 ng/ml durante 6 días. Además, también se usó un gradiente de FBS que oscila entre el 0,5% y el 2,0% a lo largo de los primeros tres días de diferenciación conjuntamente con 100 ng/ml de activina A. Después de los 6 días, se recogieron muestras por duplicado de cada condición de cultivo y se analizaron para determinar la expresión génica relativa mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se fijaron las células restantes para la detección inmunofluorescente de proteína SOX17.

Los niveles de expresión de CXCR4 variaron drásticamente a través de las 7 condiciones de cultivo usadas (figura 26). En general, la expresión de CXCR4 era alta en cultivos tratados con activina A (A100) y baja en los que no recibieron activina exógena A (NF). Además, entre los cultivos tratados con A100, la expresión de CXCR4 era la más alta cuando la concentración de FBS era la más baja. Hubo una disminución notable del nivel de CXCR4 en la condición de FBS al 10% de manera que la expresión relativa estaba más en línea con las condiciones que no recibían activina A (NF).

Tal como se describió anteriormente, la expresión de los genes de SOX17, GSC, MIXL1 y HNF3 β es coherente con la caracterización de una célula como endodermo definitivo. La expresión relativa de estos cuatro genes a través de las 7 condiciones de diferenciación refleja la de CXCR4 (figuras 27A-D). Esto demuestra que CXCR4 es también un marcador de endodermo definitivo.

Los linajes de ectodermo y mesodermo pueden distinguirse del endodermo definitivo mediante su expresión de diversos marcadores. El mesodermo temprano expresa los genes Brachyury y MOX1 mientras que el

neuroectodermo naciente expresa SOX1 y ZIC1. Las figuras 28A-D demuestran que los cultivos que no recibían activina A exógena estaban enriquecidos preferentemente para expresión génica de mesodermo y ectodermo y que entre los cultivos tratados con activina A, la condición de FBS al 10% tenía también niveles aumentados de expresión de marcadores de mesodermo y ectodermo. Estos patrones de expresión eran inversos al de CXCR4 e indicaban que CXCR4 no se expresaba de manera alta en mesodermo o ectodermo derivado de hESC en este periodo de tiempo de desarrollo.

De manera temprana durante el desarrollo de mamíferos, también se produce la diferenciación en linajes extraembrionarios. De particular relevancia en este caso es la diferenciación de endodermo visceral que comparte la expresión de muchos genes en común con endodermo definitivo, incluyendo SOX17. Para distinguir endodermo definitivo de endodermo visceral extraembrionario, debe examinarse un marcador que es distinto entre estos dos. SOX7 representa un marcador que se expresa en el endodermo visceral pero no en el linaje de endodermo definitivo. Por tanto, condiciones de cultivo que presentan una expresión génica robusta de SOX17 en ausencia de expresión de SOX7 es probable que contengan endodermo definitivo y no visceral. Se muestra en la figura 28E que SOX7 se expresaba de manera alta en cultivos que no recibían activina A, SOX7 también presentaba expresión aumentada incluso en presencia de activina A cuando se incluyó FBS al 10%. Este patrón es el inverso del patrón de expresión de CXCR4 y sugiere que CXCR4 no se expresa de manera alta en endodermo visceral.

El número relativo de células inmunorreactivas con SOX17 (SOX17⁺) presentes en cada una de las condiciones de diferenciación anteriores también se determinó. Cuando se diferenciaron hESC en presencia de activina A a dosis alta y una baja concentración de FBS (0,5% - 2,0%), se distribuyeron células SOX17⁺ de manera ubicua por todo el cultivo. Cuando se usó activina A a dosis alta pero se incluyó FBS al 10% (v/v), las células SOX17⁺ aparecían a una frecuencia mucho más baja y siempre aparecían en agrupaciones aisladas más que distribuidas uniformemente por todo el cultivo (figuras 29A y C así como B y E). Se observó una disminución adicional de células SOX17⁺ cuando no se usó activina A exógena. En estas condiciones las células SOX17⁺ también aparecían en agrupaciones y estas agrupaciones eran más pequeñas y mucho más poco comunes que las encontradas en el tratamiento con activina A alta, bajo contenido de FBS (figura 29C y F). Estos resultados demuestran que los patrones de expresión de CXCR4 no sólo corresponden a expresión génica de endodermo definitivo sino también al número de células de endodermo definitivo en cada condición.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

Condiciones de diferenciación que enriquecen endodermo definitivo aumentan la proporción de células positivas para CXCR4

La dosis de activina A también afecta a la eficiencia a la que puede derivarse endodermo definitivo de las hESC. Este ejemplo demuestra que el aumento de la dosis de activina A aumenta la proporción de células CXCR4⁺ en el cultivo.

Se diferenciaron hESC en medio RPMI complementado con FBS al 0,5%-2% (aumentado desde del 0,5% al 1,0% hasta el 2,0% a lo largo de los primeros 3 días de diferenciación) y o bien 0, 10 o bien 100 ng/ml de activina A. Después de 7 días de diferenciación, se disociaron las células en PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ que contenía FBS al 2% y 2 mM (EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se filtraron las células a través de filtros de nailon de 35 µm, se contaron y se sedimentaron. Se resuspendieron los sedimentos en un pequeño volumen del 50% de suero humano/el 50% de suero de asno normal y se incubaron durante 2 minutos sobre hielo para bloquear sitios de unión a anticuerpos no específicos. Para esto, se añadió 1 µl de anticuerpo de ratón anti-CXCR4 (Abcam, n.º de cat. ab 10403-100) por 50 µl (que contenían aproximadamente 10⁵ células) y se procedió al marcaje durante 45 minutos sobre hielo. Se lavaron las células añadiendo 5 ml de PBS que contenía suero humano al 2% (tampón) y se sedimentaron. Se completó un segundo lavado con 5 ml de tampón, se resuspendieron entonces las células en 50 µl de tampón por 10⁵ células. Se añadió anticuerpo secundario (de asno anti-ratón conjugado con FITC; Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 715-096-151) a una concentración final de 5 µg/ml y se permitió que se marcaran durante 30 minutos seguido por dos lavados en tampón como anteriormente. Se resuspendieron las células a 5x10⁶ células/ml en tampón y se analizaron y clasificaron usando un instrumento FACS Vantage (Beckton Dickinson) por el personal en la instalación central de citometría de flujo (The Scripps Research Institute). Se recogieron las células directamente en tampón de lisis RLT (Qiagen) para el aislamiento posterior de ARN total para el análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Se observó que el número de células CXCR4⁺ tal como se determina mediante citometría de flujo aumenta drásticamente a medida que la dosis de activina A aumentaba en los medios de cultivo de diferenciación (figuras 30A-C). Las células CXCR4⁺ eran las que se encontraban dentro de la compuerta R4 y esta compuerta se fijó usando un control de sólo anticuerpo secundario para que el 0,2% de los acontecimientos estuvieran ubicados en la compuerta R4. Los números de células CXCR4⁺ drásticamente aumentados se correlacionan con un aumento robusto de expresión génica de endodermo definitivo a medida que aumenta la dosis de activina A (figuras 31A-D).

EJEMPLO DE REFERENCIA 9

El aislamiento de células positivas para CXCR4 enriquece la expresión génica de endodermo definitivo y agota

células que expresan marcadores de mesodermo, ectodermo y endodermo visceral

Las células CXCR4⁺ y CXCR4⁻ identificadas en el ejemplo 8 anteriormente se recogieron y analizaron para determinar la expresión génica relativa y se determinó simultáneamente la expresión génica de las poblaciones parentales.

- 5 Los niveles relativos de expresión génica de CXCR4 aumentaron drásticamente con la dosis creciente de activina A (figura 32). Esto se correlacionaba muy bien con el aumento dependiente de la dosis de activina A de células CXCR4⁺ (figuras 30A-C). También está claro que el aislamiento de las células CXCR4⁺ de cada población explicaba casi toda la expresión génica de CXCR4 en esa población. Esto demuestra la eficiencia del método de FACS para recoger estas células.
- 10 El análisis de expresión génica reveló que las células CXCR4⁺ contienen no sólo la mayoría de la expresión génica de CXCR4, sino que también contienen la expresión génica para otros marcadores de endodermo definitivo. Tal como se muestra en las figuras 31A-D, las células CXCR4⁺ se enriquecieron adicionalmente con respecto a la población A100 parental para SOX17, GSC, HNF3B y MIXL1. Además, la fracción CXCR4⁻ contenía muy poca expresión génica para estos marcadores de endodermo definitivo. Además, las poblaciones CXCR4⁺ y CXCR4⁻ presentaban el patrón inverso de expresión génica para marcadores de mesodermo, ectodermo y endodermo extraembrionario. Las figuras 33A-D muestran que las células CXCR4⁺ estaban agotadas para la expresión génica de Brachyury, MOX1, ZIC1 y SOX7 con relación a la población parental A100. Esta población parental A100 tenía ya una expresión baja de estos marcadores con relación a las condiciones de dosis baja o sin activina A. Estos resultados muestran que el aislamiento de células CXCR4⁺ de las hESC diferenciadas en presencia de activina A alta produce una población que está altamente enriquecida para endodermo definitivo sustancialmente puro.
- 20

EJEMPLO DE REFERENCIA 10

Cuantificación de células de endodermo definitivo en una población celular usando CXCR4

- 25 Para confirmar la cuantificación de la proporción de células de endodermo definitivo presentes en un cultivo celular o una población celular tal como se determinó previamente en el presente documento y tal como se determinó en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/532,004, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2003, se analizaron células que expresan CXCR4 y otros marcadores de endodermo definitivo mediante FACS.

- 30 Usando los métodos tales como los descritos en los ejemplos anteriores, se diferenciaron hESC para producir endodermo definitivo. En particular, para aumentar el rendimiento y la pureza en cultivos celulares en diferenciación, se controló la concentración de suero del medio tal como sigue: FBS al 0,2% el día 1, FBS al 1,0% el día 2 y FBS al 2,0% los días 3-6. Se clasificaron los cultivos diferenciados mediante FACS usando tres epítomos de superficie celular, E-cadherina, CXCR4 y trombomodulina. Se analizaron entonces las poblaciones celulares clasificadas mediante Q-PCR para determinar los niveles de expresión relativa de marcadores para endodermo definitivo y extraembrionario así como otros tipos de células. Las células clasificadas para CXCR4 tomadas de cultivos óptimamente diferenciados dieron como resultado el aislamiento de células de endodermo definitivo que eran >98% puras.
- 35

La tabla 2 muestra los resultados de un análisis de marcadores para un cultivo de endodermo definitivo que se diferenció a partir de hESC usando los métodos descritos en el presente documento.

Tabla 2

- 40 Composición de cultivos de endodermo definitivo

Marcador(es)	Porcentaje de cultivo	Porcentaje de endodermo definitivo	Porcentaje de endodermo extraembrionario	Porcentaje de células hES
SOX17	70-80	100		
Trombomodulina	<2	0	75	
AFP	<1	0	25	
CXCR4	70-80	100	0	
ECAD	10	0		100
otros (ECAD neg.)	10-20			
Total	100	100	100	100

- 45 En particular, la tabla 2 indica que células positivas para CXCR4 y SOX17 (endodermo) comprendían desde el 70%-80% de las células en el cultivo celular. De estas células que expresaban SOX17, menos del 2% expresaban TM (endodermo parietal) y menos del 1% expresaban AFP (endodermo visceral). Después de restar la proporción de células positivas para TM y positivas para AFP (endodermo parietal y visceral combinados; el 3% total) de la proporción de células positivas para SOX17/CXCR4, puede observarse que de aproximadamente el 67% a

aproximadamente el 77% del cultivo celular es endodermo definitivo. Aproximadamente el 10% de las células eran positivas para p E-cadherina (ECAD), que es un marcador para hESC, y aproximadamente el 10-20% de las células eran de otros tipos de células.

Se ha descubierto que la pureza del endodermo definitivo en los cultivos celulares en diferenciación que se obtienen antes de la separación por FACS puede mejorarse en comparación con el procedimiento bajo en suero descrito anteriormente manteniendo la concentración de FBS a $\leq 0,5\%$ a lo largo de todo el procedimiento de diferenciación de 5-6 días. Sin embargo, mantener el cultivo celular a $\leq 0,5\%$ a lo largo de todo el procedimiento de diferenciación de 5-6 días también da como resultado un número reducido de células de endodermo definitivo totales que se producen.

Las células de endodermo definitivo producidas mediante métodos descritos en el presente documento se han mantenido y expandido en cultivo en presencia de activina durante más de 50 días sin diferenciación apreciable. En tales casos, la expresión de SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3 β se mantiene a lo largo del periodo de cultivo. Adicionalmente, no se detectaron TM, SPARC, OCT4, AFP, SOX7, ZIC1 y BRACH en estos cultivos. Es probable que tales células puedan mantenerse y expandirse en cultivo durante sustancialmente más de 50 días sin diferenciación apreciable.

EJEMPLO DE REFERENCIA 11

Marcador adicional de células de endodermo definitivo

En el siguiente experimento, se aisló ARN de endodermo definitivo purificado y poblaciones de células madre embrionarias humanas. Se analizó entonces la expresión génica mediante análisis en chip génico del ARN de cada población purificada. También se realizó Q-PCR para investigar adicionalmente el potencial de genes expresados en endodermo definitivo, pero no en células madre embrionarias, como marcador para endodermo definitivo.

Se mantuvieron células madre embrionarias humanas (hESC) en medio DMEM/F12 complementado con sustituto de suero desactivado al 20%, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) humano recombinante 4 ng/ml, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomicina. Se diferenciaron hESC a endodermo definitivo mediante cultivo durante 5 días en medio RPMI complementado con 100 ng/ml de activina A humana recombinante, suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina. Se varió la concentración de FBS cada día tal como sigue: 0,1% (primer día), 0,2% (segundo día), 2% (días 3-5).

Se aislaron células mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) con el fin de obtener poblaciones purificadas de hESC y endodermo definitivo para el análisis de la expresión génica. Se logró la inmunopurificación para hESC usando antígeno SSEA4 (R&D Systems, n.º de cat. FAB1435P) y para endodermo definitivo usando CXCR4 (R&D Systems, n.º de cat. FAB170P). Se disociaron las células usando tripsina/EDTA (Invitrogen, n.º de cat. 25300-054), se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero humano al 2% y se resuspendieron en suero humano al 100% sobre hielo durante 10 minutos para bloquear la unión no específica. Se llevó a cabo la tinción durante 30 minutos sobre hielo añadiendo 200 μ l de anticuerpo conjugado con ficoeritrina a 5 x 10⁶ células en 800 μ l de suero humano. Se lavaron las células dos veces con 8 ml de tampón PBS y se resuspendieron en 1 ml del mismo. Se llevó a cabo el aislamiento por FACS mediante la instalación central de The Scripps Research Institute usando un instrumento FACS Vantage (BD Biosciences). Se recogieron células directamente en tampón de lisis RLT y se aisló el ARN mediante RNeasy según las instrucciones del fabricante (Qiagen).

Se envió el ARN purificado por duplicado a Expression analysis (Durham, NC) para generación de los datos del perfil de expresión usando la plataforma Affymetrix y alineamientos de oligonucleótidos de alta densidad U133 Plus 2.0. Los datos presentados son una comparación de grupos que identifica genes expresados diferencialmente entre las dos poblaciones, hESC y endodermo definitivo. Se seleccionaron genes que presentaban un cambio hacia arriba robusto en el nivel de expresión con respecto al encontrado en hESC como nuevos marcadores candidatos que son altamente característicos de endodermo definitivo. Se sometieron a ensayo los genes seleccionados mediante Q-PCR, tal como se describió anteriormente, para verificar los cambios en la expresión génica encontrados en el chip génico y también para investigar el patrón de expresión de estos genes durante el transcurso temporal de la diferenciación de hESC.

Las figuras 34A-M muestran los resultados de expresión génica para determinados marcadores. Se presentan los resultados para cultivos celulares analizados 1, 3 y 5 días después de la adición de activina A 100 ng/ml, células de endodermo definitivo que expresan CXCR4 purificadas al final del procedimiento de diferenciación de cinco días (CXDE) y en hESC purificadas. Una comparación de las figuras 34C y G-M demuestra que los seis genes marcadores, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1, presentan un patrón de expresión que es casi idéntico entre sí y que es también idéntico al patrón de expresión de CXCR4 y la razón de SOX17/SOX7. Tal como se describió anteriormente, SOX17 se expresa en tanto el endodermo definitivo así como en el endodermo extraembrionario que expresa SOX7. Puesto que SOX7 no se expresa en el endodermo definitivo, la razón de SOX17/SOX7 proporciona una estimación fiable de la contribución del endodermo definitivo a la expresión de SOX17 evidenciada en la población en su totalidad. La similitud de los paneles G-L y M con el panel C indica que

FGF17, WWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 son probablemente marcadores de endodermo definitivo y que no se expresan significativamente en células de endodermo extraembrionario.

Se apreciará que los resultados de Q-PCR descritos en el presente documento pueden confirmarse adicionalmente mediante ICC.

5 EJEMPLO DE REFERENCIA 12

Ácido retinoico y FGF-10 inducen PDX1 específicamente en cultivos de endodermo definitivo

El siguiente experimento demuestra que RA y FGF-10 induce la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivo.

10 Se cultivaron células madre embrionarias humanas con o sin activinas durante cuatro días. El día cuatro, se añadieron RA 1 μ M y FGF-10 50 ng/ml al cultivo celular. Cuarentaiocho horas después de la adición de RA/FGF-10, se cuantificaron la expresión del gen marcador PDX1 y otros genes marcadores no específicos para endodermo de intestino proximal mediante Q-PCR.

15 La aplicación de RA a células de endodermo definitivo provocó un aumento robusto de expresión génica de PDX1 (véase la figura 35) sin aumentar la expresión de marcadores de expresión génica de endodermo visceral (SOX7, AFP), neural (SOX1, ZIC1) o neuronal (NFM) (véase la figura 36A-F). Se indujo expresión génica de PDX1 hasta niveles aproximadamente 500 veces superiores a los observados en endodermo definitivo después de 48 horas de exposición a RA 1 μ M y FGF-10 50 ng/ml. Además, estos resultados muestran que la inducción de PDX1 sustancial se producía sólo en cultivos celulares que se habían diferenciado previamente en endodermo definitivo (SOX17) tal como se indica mediante la expresión de PDX1 160 veces superior encontrada en los cultivos celulares tratados con activina con relación a los cultivos que no recibieron activina antes de la aplicación de RA.

EJEMPLO DE REFERENCIA 13

FGF-10 proporciona un aumento adicional de la expresión de PDX1 con respecto a RA solo

Este ejemplo muestra que la combinación de RA y FGF-10 induce la expresión de PDX1 en un mayor grado que RA solo.

25 Como en el ejemplo previo, se cultivaron hESC con o sin activinas durante cuatro días. El día cuatro, se trataron las células con uno de los siguientes: RA 1 μ M solo; RA 1 μ M en combinación con o bien FGF-4 o bien FGF-10; o RA 1 μ M en combinación con tanto FGF-4 como FGF-10. Se cuantificó la expresión de PDX1, SOX7 y NFM mediante Q-PCR noventa y seis horas después de RA o RA/FGF.

30 El tratamiento de cultivos de hESC con activina seguido por ácido retinoico indujo un aumento de 60 veces de expresión génica de PDX1. La adición de FGF-4 al tratamiento con RA indujo ligeramente más PDX1 (aproximadamente 3 veces con respecto a RA solo). Sin embargo, al añadir FGF-10 y ácido retinoico juntos, la inducción de PDX1 se potenció adicionalmente 60 veces con respecto a RA solo (véase la figura 37A). Esta inducción de PDX1 muy robusta fue mayor de 1400 veces más alta que el tratamiento con RA/FGF o sin activina. De manera interesante, la adición de FGF-4 y FGF-10 suprimió simultáneamente el efecto beneficioso del FGF-10, produciendo sólo el aumento de PDX1 modesto atribuido a la adición de FGF-4.

35 La adición de combinaciones de RA/FGF-4 o RA/FGF-10 no aumentó la expresión de genes marcadores no asociados con endodermo de intestino proximal cuando se comparó con células no expuestas a combinaciones de RA/FGF (véase la figura 37B-C).

EJEMPLO DE REFERENCIA 14

La dosis de ácido retinoico afecta a la posición anterior-posterior (A-P) *in vitro*

Para determinar si la dosis de RA afecta a la posición A-P en cultivos celulares *in vitro*, se realizó el siguiente experimento.

45 Se cultivaron células madre embrionarias humanas con o sin activinas durante cuatro días. El día cuatro, se añadió FGF-10 a 50 ng/ml al cultivo en combinación con RA a 0,04 μ M, 0,2 μ M o 1,0 μ M. La expresión del gen marcador PDX1 así como otros marcadores no específicos para endodermo de intestino proximal se cuantificó mediante Q-PCR.

50 La adición de ácido retinoico a diversas dosis, en combinación con FGF-10 a 50 ng/ml, indujo patrones de expresión génica diferencial que se correlacionan con patrones de posición anterior-posterior específicos. La dosis más alta de RA (1 μ M) indujo preferentemente expresión de marcador de endodermo anterior (HOXA3) y también produjo el aumento más robusto de PDX1 (figura 38A-B). La dosis media de RA (0,2 μ M) indujo marcadores de endodermo de intestino medio (CDX1, HOXC6) (véanse las figuras 38C y 41E), mientras que la dosis más baja de RA (0,04 μ M)

indujo preferentemente un marcador de endodermo de intestino distal (HOXA13) (véase la figura 38D). La dosis de RA no tuvo esencialmente ningún efecto sobre la expresión relativa de marcadores o bien neurales (SOX1) o bien neuronales (NFM) (véanse las figuras 38F-G). Este ejemplo resalta el uso de RA como morfógeno *in vitro* y en particular como morfógeno de derivados de endodermo de la diferenciación de hESC.

5 EJEMPLO DE REFERENCIA 15

El uso del suplemento B27 potencia la expresión de PDX1

Puede influirse en la expresión de PDX1 en endodermo definitivo mediante el uso de varios factores y condiciones de crecimiento/diferenciación celular. En el siguiente experimento, se muestra que el uso de suplemento B27 potencia la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivo.

10 Se indujo que células madre embrionarias humanas se diferenciaron a endodermo definitivo mediante tratamiento de células hES indiferenciadas hechas crecer sobre capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón con activina A a dosis alta (100-200 ng/ml en FBS al 0,5-2%/DMEM/F12) durante 4 días. El control sin activina A recibió FBS al 0,5-2%/DMEM/F12 sin activina A añadida. A los cuatro días, los cultivos recibieron o bien nada de activina A en FBS al 2% (ninguna), y en sustituto de suero (SR) al 2%, o bien activina A 50 ng/ml junto con RA 2 μ M y FGF-10
15 50 ng/ml en FBS al 2%/DMEM/F12 (ninguna, +FBS, +B27) y de manera similar en sustituto de suero (SR) al 2%. Se añadió el suplemento B27, (Gibco/BRL), como una dilución 1/50 directamente en FBS al 2%/DMEM/F12 (+B27). Se tomaron muestras de células por duplicado para cada punto, y se aisló ARN total y se sometió a Q-PCR tal como se describió previamente.

20 Las figuras 39A-E muestran que el suplemento libre de suero B27 proporcionó un beneficio adicional para la inducción de expresión génica de PDX1 sin inducir un aumento de la expresión de genes marcadores no específicos para endodermo de intestino proximal en comparación con tal expresión de genes marcadores en células hechas crecer sin suero.

EJEMPLO DE REFERENCIA 16

Uso de activina B para potenciar la inducción de PDX1

25 Este ejemplo muestra que el uso de activina B potencia la diferenciación de células negativas para PDX1 en células positivas para PDX1 en cultivo celular *in vitro*.

Se indujo que células madre embrionarias humanas se diferenciaron en endodermo definitivo mediante tratamiento de hESC indiferenciadas hechas crecer sobre capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón con activina A a dosis alta (50 ng/ml) en RPMI con bajo contenido en suero durante 6 días. La dosis de FBS fue del 0% el día uno, el 0,2% el día dos y el 2% los días 3-6. El control negativo para la producción de endodermo definitivo (NF) recibió FBS al 2%/RPMI sin activina A añadida. Con el fin de inducir la expresión de PDX1, cada uno de los cultivos recibió ácido retinoico a 2 μ M en FBS al 2%/RPMI el día 6. Se les proporcionó a los cultivos tratados con activina A los días uno a cinco diferentes combinaciones de dosificación de activina A y activina B o siguieron con activina A solo a 50 ng/ml. Al cultivo de control sin activina A (NF) no se le proporcionó ni activina A ni activina B.
30 Este tratamiento con RA/activina se llevó a cabo durante 3 días, momento en el que se midió la expresión génica de PDX1 mediante Q-PCR a partir de muestras de células por duplicado.
35

La figura 40A muestra que la adición de activina B a dosis que oscilan entre 10-50 ng/ml (a10, a25 y a50) en presencia de 25 ng/ml (A25) o 50 ng/ml (A50) de activina A aumentó la expresión de PDX1 al menos 2 veces con respecto al cultivo que recibió sólo activina A a 50 ng/ml. El aumento de PDX1 como resultado de la adición de
40 activina B era sin aumento de expresión de HNF6 (véase la figura 40B), que es un marcador para hígado así como páncreas en ese momento en el desarrollo. Este resultado sugiere que la proporción de células que se diferencian en páncreas había aumentado con relación a hígado.

EJEMPLO DE REFERENCIA 17

Uso de una dosis de suero para potenciar la inducción de PDX1

45 Se influye en la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivo mediante la cantidad de suero presente en el cultivo celular a lo largo de todo el proceso de diferenciación. El siguiente experimento muestra que el nivel de suero en un cultivo durante la diferenciación de hESC en endodermo definitivo negativo para PDX1 tiene un efecto sobre la expresión de PDX1 durante la diferenciación adicional de estas células en endodermo positivo para PDX1.

Se indujo que células madre embrionarias humanas se diferenciaron en endodermo definitivo mediante tratamiento de hESC indiferenciadas hechas crecer sobre capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón con activina A a dosis alta (100 ng/ml) en RPMI con bajo contenido en suero durante 5 días. La dosis de FBS fue del 0,1% el día uno, el 0,5% el día dos y o bien el 0,5%, el 2% o bien el 10% los días 3-5. El control sin activina A (NF) recibió la misma dosificación de FBS/RPMI diaria, pero sin activina A añadida. Se indujo la expresión de PDX1 comenzando el día 6 mediante la adición de RA. Durante los días 6-7, los cultivos recibieron ácido retinoico a 2 μ M
50

en FBS al 0,5%/RPMI, 1 μ M el día 8 y 0,2 μ M los días 9-11. La activina A se disminuyó hasta 50 ng/ml durante el tratamiento con ácido retinoico y se dejó ausente del control sin activina A (NF).

La figura 41A muestra que la dosificación de FBS durante el periodo de 3 días de inducción de endodermo definitivo (días 3, 4 y 5) tenía una capacidad duradera para cambiar la inducción de expresión génica de PDX1 durante el tratamiento con ácido retinoico. Este era sin alteración significativa en el patrón de expresión de expresión génica de ZIC1 (figura 41B) o SOX7 (figura 41C).

EJEMPLO DE REFERENCIA 18

Uso de medio condicionado para potenciar la inducción de PDX1

También se estudiaron otros factores y condiciones de crecimiento que influyen en la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivo. El siguiente experimento muestra el efecto de medios condicionados sobre la diferenciación de células de endodermo definitivo negativas para PDX1 en células de endodermo positivas para PDX1.

Se indujo que células madre embrionarias humanas se diferenciaron en endodermo definitivo mediante tratamiento de hESC indiferenciadas hechas crecer sobre capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón con activina A a dosis alta (100 ng/ml) en RPMI con bajo contenido en suero durante 5 días. La dosis de FBS fue del 0,2% el día uno, el 0,5% el día dos y el 2% los días 3-5.

Se indujo entonces que los cultivos de endodermo definitivo generados mediante 5 días de tratamiento con activina A se diferenciaron en endodermo que expresa PDX1 mediante la adición de RA en FBS al 2%/RPMI que contenía activina A a 25 ng/ml durante cuatro días. El RA era 2 μ M durante los primeros dos días de adición, 1 μ M el tercer día y 0,5 μ M el cuarto día. Este medio base para la inducción de PDX1 se proporcionó nuevo (2A25R) o después de acondicionar durante 24 horas mediante una de cuatro poblaciones de células diferentes. Se generaron medios condicionados (CM) a partir de o bien fibroblastos embrionarios de ratón (MEFCM) o bien hESC que se diferenciaron en primer lugar durante 5 días mediante una de tres condiciones; i) FBS al 3%/RPMI (CM2), o ii) activina A (CM3) o iii) proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) (CM4). Se proporcionaron los factores activina A o BMP4 a 100 ng/ml bajo el mismo régimen de dosificación de FBS descrito anteriormente (0,2%, 0,5%, 2%). Estos tres paradigmas de diferenciación diferentes producen tres poblaciones muy diferentes de células humanas mediante las que pueden condicionarse los medios de inducción de PDX1. El FBS al 3% sin factor de crecimiento añadido (NF) produce una población heterogénea compuesta en gran parte de células de endodermo extraembrionario, ectodermo y mesodermo. El cultivo tratado con activina A (A100) produce una proporción grande de endodermo definitivo y el cultivo tratado con BMP4 (B100) produce principalmente trofectodermo y algo de endodermo extraembrionario.

La figura 42A muestra que se indujo PDX1 equivalentemente en medios nuevos y condicionados a lo largo de los primeros dos días de tratamiento con RA. Sin embargo, hacia el tercer día la expresión de PDX1 había comenzado a disminuir en medios nuevos y tratamientos con medios condicionados con MEF. Las hESC diferenciadas produjeron medios condicionados que dieron como resultado el mantenimiento o aumentos adicionales en la expresión génica de PDX1 a niveles de 3 a 4 veces mayores que los medios nuevos. El efecto del mantenimiento de una alta expresión de PDX1 en medios condicionados de hESC se amplificó adicionalmente el día cuatro del tratamiento con RA logrando niveles de 6 a 7 veces mayores que en medios nuevos. La figura 42B muestra que los tratamientos con medios condicionados dieron como resultado niveles mucho más bajos de expresión génica de CDX1, un gen no expresado en la región de PDX1 que expresa endodermo. Esto indica que la pureza global del endodermo que expresa PDX1 se potenció mucho más mediante el tratamiento de endodermo definitivo con medios condicionados generados a partir de cultivos de hESC diferenciados.

La figura 43 muestra que la expresión génica de PDX1 presentaba una respuesta a la dosis positiva con respecto a la cantidad de medios condicionados aplicados a las células de endodermo definitivo. El volumen total de medios añadidos a cada placa fue de 5 ml y se diluyó el volumen indicado (véase la figura 43) de medios condicionados con medios nuevos (A25R). Obsérvese que justo 1 ml de medios condicionados añadidos a 4 ml de medios nuevos todavía podía inducir y mantener niveles de expresión de PDX1 mayores que 5 ml de medios nuevos solos. Esto sugiere que el efecto beneficioso de medios condicionados para la inducción de endodermo que expresa PDX1 depende de la liberación de alguna sustancia o sustancias de las células a los medios condicionados y que esta dosis de sustancia(s) potencia la producción de endodermo que expresa PDX1.

EJEMPLO 19

Validación de anticuerpos que se unen a PDX1

Anticuerpos que se unen a PDX1 son herramientas útiles para monitorizar la inducción de expresión de PDX1 en una población celular. Este ejemplo muestra que pueden usarse anticuerpos de conejo policlonales e IgY frente a PDX1 para detectar la presencia de esta proteína.

En un primer experimento, se validó anticuerpo IgY anti-PDX1 (IgY α -PDX1) que se une a PDX1 en lisados celulares mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. En este análisis, se comparó la unión de anticuerpo IgY

α -PDX1 a 50 μ g de lisado celular total a partir de fibroblastos humanos MDX12 o células MDX12 transfectadas 24 h antes con un vector de expresión de PDX1. Los lisados celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana mediante electrotransferencia y entonces se trataron con sonda con el antisuero primario IgY α -PDX1 seguido por anticuerpos secundarios de conejo anti-IgY (Rb α -IgY) conjugados con fosfatasa alcalina. Se aplicaron diferentes diluciones de anticuerpos primarios y secundarios para separar tiras de la membrana en las siguientes combinaciones: A (dilución 500x de primario, dilución 10.000x de secundario), B (2.000x, 10.000x), C (500x, 40.000x), D (2.000x, 40.000), E (8.000x, 40.000x).

Se detectó la unión en células transfectadas con el vector de expresión de PDX1 (positivas para PDX1) en todas las combinaciones de anticuerpo sometidas a prueba. Sólo se observó unión en fibroblastos no transfectados (negativos para PDX1) cuando se usaron las concentraciones más altas de tanto anticuerpo primario como secundario juntos (combinación A). Tal unión no específica se caracterizó mediante la detección de una banda adicional a un peso molecular ligeramente mayor que PDX1 en tanto los fibroblastos transfectados como no transfectados.

En un segundo experimento, se sometió a prueba la unión anticuerpo de conejo policlonal anti-PDX1 (Rb α -PDX1) a PDX1 mediante inmunocitoquímica. Para producir una célula que expresa PDX1 para tales experimentos, se transfectaron transitoriamente células MS1-V (ATCC n.º CRL-2460) con un vector de expresión de PDX1-EGFP (construido usando pEGFP-N1, Clontech). Entonces se marcaron las células transfectadas con antisueros frente a Rb α -PDX1 y α -EGFP. Se visualizaron las células transfectadas mediante tanto fluorescencia de EGFP así como inmunocitoquímica de α -EGFP a través del uso de un anticuerpo secundario conjugado con Cy5. Se visualizó la inmunofluorescencia de PDX1 a través del uso de un anticuerpo secundario conjugado con α -Rb Cy3.

La unión de los anticuerpos frente a Rb α -PDX1 y α -EGFP se localizó conjuntamente con la expresión de GFP.

EJEMPLO 20

Inmunocitoquímica de tejido pancreático humano

Este ejemplo muestra que pueden usarse anticuerpos que tienen especificidad para PDX1 para identificar células humanas positivas para PDX1 mediante inmunocitoquímica.

En un primer experimento, se tiñeron secciones incrustadas en parafina de páncreas humano para detectar insulina con anticuerpo primario de cobaya anti-insulina (Gp α -Ins) a una dilución 1/200 seguido por anticuerpo secundario de perro anti-cobaya (D α -Gp) conjugado con Cy2 a una dilución 1/100. En un segundo experimento, se tiñeron las mismas secciones incrustadas en parafina de páncreas humano para detectar PDX1 con anticuerpo primario IgY α -PDX1 a una dilución 1/4000 seguido por anticuerpo secundario Rb α -IgY conjugado con AF555 a una dilución 1/300. Entonces se fusionaron las imágenes recogidas de los experimentos primero y segundo. En un tercer experimento, las células que se tiñeron con anticuerpos IgY α -PDX1 también se tiñeron con DAPI.

El análisis de las secciones pancreáticas humanas reveló la presencia de tinción fuerte de los islotes de Langerhans. Aunque la señal de PDX1 más fuerte aparecía en los islotes (positivos para insulina), también se observó tinción débil en tejido acinar (negativo para insulina). La tinción conjunta con DAPI y PDX1 muestra que PDX1 se localizaba principalmente pero no exclusivamente en el núcleo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 21

Inmunoprecipitación de PDX1 a partir de células tratadas con ácido retinoico

Para confirmar adicionalmente la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivo que se han diferenciado en presencia de RA y la falta de PDX1 en células de endodermo definitivo que no se han diferenciado con RA, se usó un anticuerpo de conejo anti-PDX1 (Rb α -PDX1) para inmunoprecipitar PDX1 a partir de células de endodermo definitivo tanto diferenciadas como no diferenciadas con RA. Se detectó RA inmunoprecipitado mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo IgY α -PDX1.

Para obtener lisados celulares de endodermo definitivo no diferenciado y diferenciado para inmunoprecipitación, se trataron hESC durante 5 días con activina A a 100 ng/ml en bajo contenido en suero (endodermo definitivo) seguido por tratamiento con activina A a 50 ng/ml y todo-trans RA 2 μ M durante dos días, 1 μ M durante un día y 0,2 μ M durante un día (endodermo de intestino proximal positivo para PDX1). Como lisados celulares de control positivo, también se prepararon a partir de células MS1-V (ATCC n.º CRL-2460) transfectadas con un vector de expresión de PDX1. Se inmunoprecipitó PDX1 añadiendo Rb α -PDX1 y anticuerpos secundarios específicos para conejo a cada lisado. Se recogió el precipitado mediante centrifugación. Se disolvieron los inmunoprecipitados en tampón que contenía SDS, luego se cargaron sobre un gel de poliacrilamida. Después de la separación, se transfirieron las proteínas a una membrana mediante electrotransferencia, y entonces se trataron con sonda con el anticuerpo primario IgY α -PDX1 seguido por anticuerpos secundarios Rb α -IgY marcados.

Los inmunoprecipitados recogidos de las células de control positivo MS1-V así como los de las células del día 8 (carril d8, tres días después del inicio del tratamiento con RA) y el día 9 (carril d9, cuatro días después del inicio de

RA) eran positivos para proteína PDX1 (figura 44). Los precipitados obtenidos a partir de células de endodermo definitivo indiferenciadas (es decir, células del día 5 tratadas con activina A - designadas (A) en la figura 44) y hESC indiferenciadas (es decir, células del día 5 no tratadas - designadas (NF) en la figura 44) eran negativas para PDX1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 22

5 Generación de líneas de hESC transgénicas para EGFP-promotor de PDX1

Con el fin de usar el marcador PDX1 para el aislamiento de células, se marcaron con etiqueta genéticamente células de endodermo de intestino proximal positivas para PDX1 con un gen indicador expresable. Este ejemplo describe la construcción de un vector que comprende un casete indicador que comprende un gen indicador bajo el control de la región reguladora de PDX1. Este ejemplo también describe la preparación de una célula, tal como una célula madre embrionaria humana, transfectada con este vector así como una célula que tiene este casete indicador integrado en su genoma.

Se construyeron líneas celulares de endodermo definitivo que expresan PDX1 marcadas con etiqueta genéticamente con un gen indicador colocando un gen indicador de GFP bajo el control de la región reguladora (promotor) del gen de PDX1. En primer lugar, se generó un constructo de plásmido en el que la expresión de EGFP está dirigida por el promotor del gen de PDX1 humano reemplazando el promotor de CMV del vector pEGFP-N1 (Clontech) por la región de control de PDX1 humano (n.º de registro de Genbank AF192496, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad), que comprende una secuencia de nucleótidos que oscila entre aproximadamente 4,4 pares de kilobases (kb) en el sentido de 5' y aproximadamente 85 pares de bases (pb) en el sentido de 3' del sitio de inicio de la transcripción de PDX1. Esta región contiene los elementos reguladores caracterizados del gen de PDX1, y es suficiente para conferir el patrón de expresión de PDX1 normal en ratones transgénicos. En el vector resultante, la expresión de EGFP está dirigida por el promotor de PDX1. En algunos experimentos, este vector puede transfectarse en hESC.

El casete de EGFP/promotor de PDX1 se cortó del vector anterior, y entonces se subclonó en un vector de selección que contenía el gen de neomicina fosfotransferasa bajo el control del promotor de fosfoglicerato cinasa-1. El casete de selección estaba flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa flp para permitir la eliminación del casete. Se linealizó este vector de selección, y entonces se introdujo en hESC usando métodos de lipofección convencionales. Tras 10-14 días de selección en G418, se aislaron clones de hESC transgénicas indiferenciadas y se expandieron.

EJEMPLO DE REFERENCIA 23

30 Aislamiento de endodermo de intestino proximal positivo para PDX1

El siguiente ejemplo demuestra que las hESC que comprenden el casete de EGFP/promotor de PDX1 pueden diferenciarse en células de endodermo positivas para PDX1 y entonces posteriormente aislarse mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Las hESC transgénicas para EGFP/promotor de PDX1 se diferenciaron durante 5 días en medios que contenían activina A seguido por dos días en medios que comprendían A y RA. Entonces se recogieron las células diferenciadas mediante digestión con tripsina y se clasificaron en un instrumento FACS Diva de Becton Dickinson directamente en tampón de lisis de ARN o PBS. Se tomó una muestra de células vivas individuales sin separación por compuerta para EGFP (Vivas) y se separaron por compuerta células vivas individuales en poblaciones positivas para EGFP (GFP) y negativas para GFP (Neg). En un experimento, se separó la fracción positiva para EGFP en dos poblaciones de igual tamaño según la intensidad de fluorescencia (Hi y Lo).

Tras la clasificación, se analizaron las poblaciones celulares mediante tanto Q-PCR como inmunocitoquímica. Para el análisis de Q-PCR, se preparó ARN usando columnas Qiagen RNeasy y entonces se convirtió en ADNc. Se realizó Q-PCR tal como se describió previamente. Para el análisis de inmunocitoquímica, se clasificaron las células en PBS, se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% y se adhirieron a portaobjetos de vidrio usando una centrifuga Cytospin. Los anticuerpos primarios frente a citoqueratina 19 (KRT19) fueron de Chemicon; frente a factor nuclear de hepatocitos 3 beta (HNF3β) de Santa Cruz; frente a transportador de glucosa 2 (GLUT2) de R&D Systems. Se usaron anticuerpos secundarios apropiados conjugados con FITC (verde) o rodamina (rojo) para detectar la unión de los anticuerpos primarios.

Una clasificación de FACS típica de células diferenciadas se muestra en la figura 45. El porcentaje de células positivas para PDX1 aisladas en este ejemplo fue de aproximadamente el 7%, que varió dependiendo de la eficiencia de diferenciación desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 20%.

Las células clasificadas se sometieron adicionalmente a análisis de Q-PCR. Las células diferenciadas mostraron una correlación de fluorescencia de EGFP con expresión génica de PDX1 endógena. En comparación con células no fluorescentes, las células positivas para EGFP mostraron un aumento mayor de 20 veces de los niveles de expresión de PDX1 (figura 46). La separación de células de intensidad de EGFP alta y baja indicó que el nivel de expresión de EGFP se correlacionaba con el nivel de expresión de PDX1 (figura 47). Además del análisis del

marcador PDX1, se sometieron las células clasificadas a análisis de Q-PCR de varios genes que se expresan en endodermo pancreático. Los productos de cada uno de estas genes marcadores (NKX2.2, GLUT2, KRT19, HNF4 α y HNF3 β) se enriquecieron todos en la fracción positiva para EGFP (figuras 48A-E). En cambio, los marcadores neurales ZIC1 y GFAP no se enriquecieron en células que expresan EGFP clasificadas (figuras 49A y B).

- 5 Mediante inmunocitoquímica, se observó que prácticamente todas las células positivas para PDX1 aisladas expresaban KRT19 y GLUT2. Este resultado se espera para células del linaje de endodermo pancreático. Muchas de estas células eran también positivas para HNF3 β mediante tinción con anticuerpos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 24

Producción de endodermo de intestino proximal dorsal y ventral positivo para PDX1

- 10 Este ejemplo describe la producción de endodermo de intestino proximal desviado a la ruta dorsal, positivo para PDX1, así como la producción de endodermo de intestino proximal, desviado a la ruta ventral, positivo para PDX1.

Se produjo endodermo definitivo a partir de las hESC indiferenciadas usando un protocolo de tres o cinco días en el que se proporcionó activina A al medio de cultivo a una concentración de 100 ng/ml cada día. Para la diferenciación tanto dorsal como ventral, la composición del medio durante los primeros cinco días fue tal como sigue: Día 1 - RPMI + suero bovino fetal (FBS) al 0%, día 2 - RPMI + FBS al 0,2%, día 3 - RPMI + FBS al 2,0%, día 4 - RPMI + FBS al 2,0% y día 5 - RPMI + FBS al 2,0%. Para la diferenciación ventral, se produjo endodermo definitivo durante 3 días en activina A a 100 ng/ml y entonces se expuso a BMP4 a 3 ng/ml y FGF10 a 50 ng/ml. La adición de BMP4/FGF10 se llevó a cabo en RPMI + FBS al 2% durante los primeros 2 días y luego posteriormente en medio Connaught Medical Research Labs (CMRL) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (véase, Parker R.C., *et al.* 1957. N.Y. Academy of Sciences 5:303, que contiene suplemento B27 (1 parte de B27 en 200 partes de medio en volumen - (1:200)) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el procedimiento de diferenciación dorsal, se produjo endodermo definitivo durante 5 días en activina A a 100 ng/ml y luego se expuso a ácido retinoico (RA) a 2 μ M y activina A a 25 ng/ml en medio CMRL que contenía suplemento B27 (1:200).

En el procedimiento de diferenciación dorsal basado en RA, hubo una fuerte inducción de PDX1 y un mantenimiento de la expresión de HB9 sin expresión inducida de HHEX o albúmina, que son marcadores de hígado ventral (figuras 50A-D). En el protocolo de diferenciación ventral, que no usa RA sino que en su lugar usa FGF10 y BMP, también se indujo fuertemente la expresión génica de PDX1. En contraposición al tratamiento con RA, la expresión de HB9 (marcador de endodermo dorsal) no se mantuvo y se indujeron fuertemente marcadores de hígado ventral, tales como albúmina y HHEX, junto con PDX1 (figuras 50A-D). Estos datos indicaron que, en presencia de RA, el endodermo que expresa PDX1 de intestino proximal carecía de marcadores de hígado (un órgano ventral) y expresaba marcadores dorsales como HB9. En ausencia de RA, la expresión de PDX1 no estaba acompañada por niveles de expresión de HB9 altos. Además, la expresión de marcadores de hígado clásicos, tales como albúmina y HHEX, indicó que el endodermo definitivo estaba ejecutando preferentemente un programa de diferenciación ventral puesto que el hígado se deriva exclusivamente del endodermo ventral.

EJEMPLO DE REFERENCIA 25

La producción de células de endodermo de intestino proximal ventral positivas para PDX1 depende de la formación de endodermo definitivo

Este ejemplo describe la producción de endodermo de intestino proximal, desviado a la ruta ventral, positivo para PDX1 a partir de cultivos que comprenden cantidades variables de células de endodermo definitivo. Los cultivos sin endodermo definitivo muestran muy poca producción de endodermo de intestino proximal, desviado a la ruta ventral, positivo para PDX1. A medida que la cantidad inicial de células de endodermo definitivo aumenta, también lo hace la producción de endodermo de intestino proximal desviado a la ruta ventral.

Se usaron cuatro condiciones diferenciadas para tratar las hESC que dan como resultado proporciones variables de diferenciación en endodermo definitivo. Las cuatro condiciones utilizaron RPMI suplementado con FBS al 0% el primer día, FBS al 0,2% el segundo día y FBS al 2% los días 3 y 4. Las cuatro condiciones fueron las siguientes: (a) BMP4 a 100 ng/ml con SU5402 a 5 μ M; (b) sin factores de crecimiento exógenos; (c) activina A a 15 ng/ml; y (d) activina A a 100 ng/ml. Después de los primeros cuatro días de diferenciación, se indicaron los niveles relativos de endodermo definitivo producido mediante los niveles de expresión de cerberus (CER) y SOX17, mediante lo cual estaba esencialmente ausente endodermo definitivo en la condición (a), era mínimo en la condición (b), estaba presente en la condición (c) y estaba altamente presente en la condición (d). Entonces se incubaron todos los cultivos durante 2 días con BMP4 a 3 ng/ml, FGF10 a 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina a 0,5 μ M en un medio de base de FBS al 2% en RPMI seguido por 6 días con BMP4 a 3 ng/ml, FGF10 a 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina a 0,5 μ M en un medio de base compuesto por CMRL con dilución de 1:200 de extracto de B27.

En presencia de SU5402 y BMP4, condiciones en las que no se produjo endodermo definitivo tal como se demostró mediante la falta de expresión génica de CER y SOX17 (figuras 51A y 51B), no hubo inducción de la expresión génica de PDX1 o albúmina después del tratamiento con BMP4/FGF10 (condición de endodermo ventral) (figuras

51C y 51D). Esto era cierto de manera similar para la condición sin factores de crecimiento (condición (b)), en la que se formaron niveles muy mínimos de endodermo definitivo tal como se indica mediante los bajos niveles de CER y SOX17 (figuras 51A y 51B). Aunque la expresión génica de PDX1 y albúmina era muy baja en la condición sin factores de crecimiento (figuras 51C y 51D), la cantidad de expresión génica era significativamente mayor que la producida a partir de la condición (a). Las hESC tratadas con dosis intermedias (15 ng/ml) y altas (100 ng/ml) de activina A produjeron una diferenciación de endodermo definitivo robusta, indicada por los altos niveles de expresión génica de SOX17 (figura 51B). El tratamiento con activina a dosis alta produjo endodermo definitivo principalmente de carácter anterior tal como se indica mediante los niveles de expresión de CER muy altos. Tanto los tratamientos con la condición (c) como con la condición (d) presentaron una diferenciación de endodermo ventral robusta tal como se indica mediante el alto nivel de expresión génica de PDX1 y albúmina (figuras 51C y 51D). Los niveles de expresión de PDX1 y albúmina fueron los mayores en el endodermo más anterior porque el endodermo anterior sigue siendo competente para diferenciarse en destinos de endodermo más posterior mientras que las células de endodermo posterior han perdido la competencia para adquirir destinos más anteriores. Estos datos indicaron fuertemente que la producción de endodermo de intestino proximal que expresa PDX1 ventral e hígado eran dependientes de la producción eficaz de endodermo definitivo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 26

BMP4 no es necesario para endodermo de intestino proximal ventral positivo para PDX1

Este ejemplo describe la producción de endodermo de intestino proximal, desviado a la ruta ventral, positivo para PDX1 en ausencia de BMP4.

Se produjo endodermo definitivo exponiendo hESC indiferenciadas a activina a 100 ng/ml en medio de base RPMI suplementado con FBS al 0%, 0,2% y 2% los días 1 a 3, respectivamente. Después de 3 días de tratamiento con activina A, se cambiaron los cultivos a un medio de base compuesto por RPMI que contenía FBS al 2% y se mantuvieron en una de las siguientes condiciones: (a) BMP4 a 3 ng/ml con FGF10 a 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina a 0,5 μ M; (b) FGF10 a 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina a 0,5 μ M; o (c-e) sin factores exógenos. Después de dos días, se cambió el medio de base a CMRL más suplemento B27 (1:200) y se mantuvieron las células según las condiciones (a-c) anteriores. Alternativamente, se mantuvieron las células sin factores exógenos en RPMI con suplemento B27 (1:200) (condición (d)) o RPMI con FBS al 2% (condición (e)). Se mantuvieron las mismas condiciones de tratamiento con factores durante 8 más días de diferenciación.

No era necesario BMP4 para producir células de endodermo o bien de hígado o bien de intestino proximal ventral positivas para PDX1 tal como se indica mediante la inducción robusta de expresión de PDX1 y albúmina en ausencia de BMP4 (figuras 52A y 52B). La adición de BMP4 parecía ser menos favorable para la producción de endodermo de intestino proximal ventral positivo para PDX1 pero la adición de BMP4 al tratamiento con FGF10 y KAAD-ciclopamina no disminuye la expresión génica de endodermo de hígado de intestino proximal ventral (figuras 52A y 52B). El uso de CMRL con suplemento B27 tuvo algo de capacidad para inducir expresión de PDX1 en ausencia de factores añadidos (condición (c)) mientras que RPMI con B27 (condición (d)) y RPMI con FBS al 2% (condición (e)) no presentaba ninguna inducción de expresión de PDX1 (figura 52A). No parecía haber un efecto significativo de los medios de base sobre la inducción de expresión génica de hígado. En resumen, FGF10 y KAAD-ciclopamina son suficientes para producir endodermo de intestino proximal ventral positivo para PDX1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 27

Marcadores para la identificación de endodermo de intestino proximal dorsal y ventral positivo para PDX1

Este ejemplo describe marcadores útiles para, entre otras cosas, la identificación, detección, enriquecimiento, aislamiento, purificación, direccionamiento y/o validación de endodermo de intestino proximal dorsal y ventral positivo para PDX1.

Se sometieron cultivos celulares diferenciados tal como se describe en el ejemplo 24 a análisis en chip génico para monitorizar globalmente la dinámica de expresión génica que se produce durante la diferenciación de hESC en endodermo definitivo y además en fenotipos de endodermo dorsal y ventral más maduros. Se aislaron muestras por duplicado a los tiempos indicados en el ejemplo 24. Se determinaron los perfiles de expresión génica usando alineamientos de oligonucleótidos de alta densidad Affymetrix U133 plus 2.0 mediante Expression Analysis (Durham, NC) según sus procedimientos de funcionamiento convencional internos. Se han evaluado los patrones de la expresión génica a través de estas 7 condiciones/puntos de tiempo a través de inspección manual así como a través de análisis de agrupamiento jerárquico. Se han buscado patrones de expresión génica que coincidan con el patrón temporal de expresión de PDX1 (dorsal y ventral) para encontrar genes novedosos que se expresan en los paradigmas de diferenciación tanto ventral como dorsal.

Se proporcionan genes que tienen una similitud significativa en el patrón de expresión para PDX1, y por tanto, pueden coexpresarse en células de endodermo de intestino proximal que expresan PDX1. Los genes enumerados en la tabla 3 se expresan en la diferenciación de PDX1 tanto dorsal como ventral. Los genes en la tabla 4 están desviados a la ruta dorsal y se expresan preferentemente en el patrón de PDX1 dorsal.

La tabla 3 enumera 39 marcadores que se expresan en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 tanto dorsal como ventral. La columna 1 proporciona el símbolo del gen comúnmente conocido para cada marcador. Las columnas 2 a 4 proporcionan los números de registro de Unigene, LocusLink y OMIM, respectivamente. La columna 5 describe el número de registro de Genbank para una secuencia de ácido nucleico que incluye el marcador descrito en la columna 1. Finalmente, la columna 6 proporciona una descripción de la actividad funcional del marcador de polipéptido que está codificado por el marcador genético enumerado.

Se apreciará que los números de registro enumerados en la tabla 3 pueden usarlos los expertos habituales en la técnica para recuperar información específica sobre cada secuencia descrita en la tabla, incluyendo tanto la secuencia de polipéptido como de ácido nucleico primaria de cada uno de estos marcadores.

Tabla 3 - marcadores expresados en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 tanto dorsal como ventral

Símbolo del gen	Unigene	LocusLink	OMIM	Sec. derivada de	Descriptor génico
ANXA4	Hs.422986	307	106491	NM 001153	Anexina A4
ASCL1	Hs.524672	429	100790	BC001638	1 de tipo complejo de achaete-scute (<i>Drosophila</i>)
BNC1	Hs.459153	646	601930	NM_001717	Basonuclina 1
C10orf30	Hs.498740	222389		AW195407	Marco de lectura abierto 30 del cromosoma 10
C2orf23	Hs.368884	65055	609139	BE535746	Marco de lectura abierto 23 del cromosoma 2
C9orf150	Hs.445356	286343		AI972386	Marco de lectura abierto 150 del cromosoma 9
CDH6	Hs.171054	1004	603007	BC000019	Cadherina 6, tipo 2, K-cadherina (riñón fetal)
DACH1	Hs.129452	1602	603803	AI650353	Homólogo 1 de dachshund 1 (<i>Drosophila</i>)
DUSP9	Hs.144879	1852	300134	NM_001395	Fosfatasa de especificidad doble 9
ELMOD1	Hs.495779	55531		AL359601	1 que contiene dominio ELMO
FLJ21462 fis	Hs.24321			AW236803	Clon de ADNC IMAGE:5273964, cds parcial
FLJ22761	Hs.522988	80201		W81116	Proteína hipotética FLJ22761
GABRA2	Hs.116250	2555	137140	NM_000807	Receptor A de ácido gamma-aminobutírico (GABA), alfa 2
GRIA3	Hs.377070	2892	305915	BC032004	Receptor de glutamato, ionotrófico, AMPA 3
HNF4G	Hs.241529	3174	605966	AI916600	Factor nuclear de hepatocitos 4, gamma
IDH2	Hs.513141	3418	147650	U52144	Isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+), mitocondrial
IL6R	Hs.135087	3570	147880	AV700030	Receptor de interleucina 6
KCNJ2	Hs.1547	3759	170390	AF153820	Canal rectificador de entrada de potasio, subfamilia J, miembro 2
KLF3	Hs.298658	51274		AA130132	Factor 3 de tipo Kruppel (básico)
LGALS3	Hs.531081	3958	153619	AW085690	Lectina, unión a galactósido, soluble, 3 (galectina 3)
LGALS3 GALIG	Hs.531081	3958	153619	BC001120	Lectina, unión a galactósido, soluble, 3 (galectina 3) /// gen interno de galectina-3
LIPC	Hs.188630	3990	151670	NM_000236	Lipasa, hepática
MEIS1	Hs.526754	4211	601739	NM 002398	Meis1, homólogo de sitio 1 de integración viral ecotrópico mieloide (ratón)
NR2F1	Hs.519445	7025	132890	AI951185	Subfamilia 2 de receptores nucleares, grupo F, miembro 1
ONECUT2	Hs.194725	9480	604894	NM_004852	Dominio one cut, miembro 2 de la familia
PAPPA	Hs.494928	5069	176385	AA148534	Proteína plasmática A asociada a embarazo, papalisina 1

PDE3B	Hs.445711	5140	602047	NM 000753	Fosfodiesterasa 3B, inhibida por GMPc
PGPEP1	Hs.131776	54858		NM_017712	Piroglutamyl-peptidasa I
PMS2L1	Hs.520575	5379	605038	D38503	1 de tipo 2 de segregación posmeiótica aumentada
SERPINF2	Hs.159509	5345	262850	NM 000934	Inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado F (alfa-2 antiplasmina, factor derivado de epitelio pigmentario), miembro2
SLC27A2	Hs.11729	11001	603247	NM 003645	Familia 27 de portador de solutos (transportador de ácidos grasos), miembro 2
SLN	Hs.334629	6588	602203	NM 003063	sarcolipina
SOX9	Hs.2316	6662	114290	NM_000346	SRY (región de determinación del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, inversión del sexo autosómica)
SULT2A1	Hs.515835	6822	125263	U08024	Familia de sulfotransferasa, citosólica, 2A, deshidroepiandrosterona (DHEA)-preferente, miembro 1
TFPI	Hs.516578	7035	152310	BF511231	Inhibidor de la ruta de factor tisular (inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína)
ZHX1	Hs.521264	11244	604764	AI123518	Dedos de zinc y cajas homeóticas 1
ZNF467	Hs.112158	168544		BE549732	Proteína de dedos de zinc 467
ZNF503	Hs.195710	84858		AA603467	Proteína de dedos de zinc 503
	Hs.142869			AI935586	Locus transcrito

Las figuras 53A-E ilustran adicionalmente la coincidencia del perfil de expresión entre PDX1 y marcadores seleccionados de la tabla 3. En particular, las figuras 53A-E proporcionan ejemplos de genes que presentaban patrones de expresión génica casi idénticos a los de PDX1 a través de 7 condiciones/tiempo monitorizadas en este experimento. El reconocimiento de patrones hasta este grado de similitud refleja lo más probablemente la coexpresión de estos genes en las mismas células que expresan PDX1, lo que hace por tanto que estos marcadores sean marcadores candidatos novedosos excelentes para endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 de orígenes de endodermo tanto dorsal como ventral.

La tabla 4 enumera 50 marcadores que se expresan específica y/o preferentemente en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 dorsal. La columna 1 proporciona el símbolo del gen comúnmente conocido para cada marcador. Las columnas 2 a 4 proporcionan los números de registro de Unigene, LocusLink y OMIM, respectivamente. La columna 5 describe el número de registro de Genbank para una secuencia de ácido nucleico que incluye el marcador descrito en la columna 1. Finalmente, la columna 6 proporciona una descripción de la actividad funcional del marcador de polipéptido que está codificado por el marcador genético enumerado.

Se apreciará que los números de registro enumerados en la tabla 4 pueden usarlos los expertos habituales en la técnica para recuperar información específica sobre cada secuencia descrita en la tabla, incluyendo tanto la secuencia de polipéptido como de ácido nucleico primaria de cada uno de estos marcadores.

Tabla 4 - Marcadores expresados en endodermo de intestino proximal positivo para PDX1 desviado a la ruta dorsal

Símbolo del gen	Unigene	LocusLink	OMIM	Sec. derivada de	Descriptor génico
ADORA2A	Hs. 197029	135	102776	NM_000675	Receptor de adenosina A2a Molécula asociada con el dominio SH3 de tipo STAM (AMSH)
AMSH-LP	Hs.16229	57559		AI638611	Proteína
BAIAP2L1	Hs.489237	55971		AA628400	1 de tipo proteína 2 asociada a BAI1
CD47	Hs.446414	961	601028	BG230614	Antígeno CD47 (antígeno

CHN2	Hs.203663	1124	602857	AK026415	relacionado con Rh, transductor de señales asociado a integrina)
CLDN3	Hs.25640	1365	602910	BE791251	Quimerina (quimaerina) 2
CPVL	Hs.233389	54504		NM_031311	Claudina 3
					Carboxipeptidasa, de tipo vitelogénica ///
					Carboxipeptidasa, de tipo vitelogénica
CREB3L1	Hs.405961	90993		AF055009	1 de tipo proteína 3 de unión a elemento sensible a AMPc
DACT1	Hs.48950	51339	607861	NM_016651	Homólogo 1 de dapper, antagonista de beta-catenina (<i>Xenopus</i>)
DPP6	Hs.490684	1804	126141	AW071705	Dipeptidilpeptidasa 6
ELF3	Hs.67928	1999	602191	AF017307	Factor 3 de tipo E74 (factor de transcripción de dominio ets, específico epitelial)
ENPP2	Hs.190977	5168	601060	L35594	Ectonucleótido
					pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (autotaxina)
EPB41L1	Hs.437422	2036	602879	AA912711	1 de tipo banda 4.1 de proteína de membrana de eritrocitos
FAM46C	Hs.356216	54855		AL046017	Familia con similitud de secuencia 46, miembro C
					Familia con similitud de secuencia 49, miembro A ///
FAM49A	Hs.467769	81553		NM_030797	Familia con similitud de secuencia 49, miembro A
FLJ30596	Hs.81907	133686		AI453203	Proteína hipotética FLJ30596
HOXA1	Hs.67397	3198	142955	S79910	Caja homeótica A1
HOXA3	Hs.533357	3200	142954	AW137982	Caja homeótica A3
HOXB2	Hs.514289	3212	142967	NM_002145	Caja homeótica B2
LAF4	Hs.444414	3899	601464	AW085505	Proteína nuclear linfocito relacionada con AF4
LOC283658	Hs.87194	283658		AA233912	Proteína hipotética LOC283658
MAF	Hs.134859	4094	177075	AF055376	Homólogo de oncogén de fibrosarcoma
					musculoaponeurótico v-maf (aviar)
MAG	Hs.515354	4099	159460	X98405	Glicoproteína asociada a mielina
MYCPBP	Hs.513817	10260	600382	BE268538	Proteína de unión a promotor c-myc
NR4A2	Hs.165258	4929	168600/	NM_006186	Subfamilia de receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
NRXN3	Hs. 368307	9369	600567	AI129949	Neurexina 3
NSE1	Hs. 260855	151354		AI601101	NSE1
PCGF5	Hs. 500512	84333		AL045882	Dedo 5 en anillo del grupo de Polycomb
PDE11A	Hs.130312	50940	604961	AB038041	Fosfodiesterasa 11A
PDE5A	Hs.370661	8654	603310	BF221547	Fosfodiesterasa 5A, específica de GMPc
PGA3		5220	169710	AI570199	Pepsinógeno 3, grupo I (pepsinógeno A)
PLN	Hs.170839	5350	115200	NM_002667	Fosfolambano
PTGIS	Hs.302085	5740	145500	NM_000961	Prostaglandina I2 (prostaciclina)sintasa ///
					prostaglandina I2 (prostaciclina)sintasa
RARB	Hs.436538	5915	180220	NM_000965	Receptor de ácido retinoico, beta
RGN	Hs.77854	9104	300212	D31815	Regucalcina (proteína marcadora de senescencia-30)

RND1	Hs.124940	27289	609038	U69563	GTPasa 1 de familia Rho
SFRP5	Hs.279565	6425	604158	NM_003015	Proteína 5 relacionada con frizzled secretada
SGKL	Hs.380877	23678	607591	AV690866	De tipo cinasa regulada por suero/glucocorticoides
SLC16A10	Hs.520321	117247	607550	N30257	Familia de portador de solutos 16 (transportadores de ácido monocarboxílico), miembro 10
SLC16A2	Hs.75317	6567	300095	NM_006517	Familia de portador de solutos 16 (transportadores de ácido monocarboxílico), miembro 2
SLC1A3	Hs.481918	6507	600111	NM_004172	Familia de portador de solutos 1 (transportador de glutamato de alta afinidad glial), miembro 3
SLC30A4	Hs.162989	7782	602095	NM_013309	Familia de portador de solutos 30 (transportador de zinc), miembro 4
SLICK	Hs.420016	343450		AI732637	Canal de potasio sensible a ATP activado por sodio y cloruro
SLITRK4	Hs.272284	139065		AL080239	Familia de tipo SLIT y NTRK, miembro 4
ST8SIA3	Hs.298923	51046		NM_015879	ST8 alfa-N-acetil-neuraminida alfa-2,8-sialiltransferasa 3
WNT5A	Hs.152213	7474	164975	AI968085	Familia de sitio de integración de MMTV de tipo wingless, miembro 5A /// Familia de sitio de integración de MMTV de tipo wingless, miembro 5A
XPR1	Hs.227656	9213	605237	AF089744	Receptor de retrovirus xenotrópico y politrópico
	Hs.535688			AK001582	ADNC FLJ10720 fis, clon NT2RP3001116
	Hs.127009			AI935541	Locus transcrito
	Hs.4749			AL137310	ADNC FLJ31660 fis, clon NT2RI2004410

Las figuras 54A-D proporcionan ejemplos de genes que presentan patrones de expresión génica que indican expresión específica (HOXA1 y PDE11A) o preferente (FAM49A y WNT5A) en la condición de endodermo dorsal (tratamiento con RA). Estos marcadores son genes candidatos novedosos para la identificación de endodermo de intestino proximal desviado a la ruta dorsal, positivo para PDX1.

5 EJEMPLO DE REFERENCIA 28

Producción de endodermo de intestino proximal negativo para PDX1

Este ejemplo describe la producción de endodermo de intestino proximal negativo para PDX1.

10 Se diferenciaron células madre embrionarias humanas durante 7 días por medio de un protocolo de 2 etapas para lograr células PDX1. La primera etapa comprendía 5 días diferenciación en activina A (100 ng/ml) para producir de manera robusta DE (D'Amour, K., *et al.*, Nature Biotechnology 23, 1534-1541, (2005)). La etapa 2 comprendía diferenciación de 2 días en RPMI nuevo con FBS al 2% que contenía FGF10 (50 ng/ml) y KAAD-ciclopamina (0,5 μ M).

15 La adición de FGF10 (5-500 ng/ml) era beneficiosa junto con la adición de KAAD-ciclopamina (0,1-2 μ M, inhibidor de sonic hedgehog), que especificaba adicionalmente células de endodermo definitivo en el dominio de endodermo de intestino proximal.

20 Tal como se usa en las reivindicaciones a continuación y en toda esta divulgación, mediante la frase "que consiste esencialmente en" significa que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Bibliografía

Se han mencionado numerosas referencias de la bibliografía y de patentes en la presente solicitud de patente.

Para algunas referencias, la mención completa está en el cuerpo del texto. Para otras referencias, la mención en el cuerpo del texto es mediante autor y año, siendo la mención completa tal como sigue:

Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G. L., and Stainier, D. Y. (1999).

- 5 Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Dev Biol* 215, 343-357.

Alexander, J., and Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol* 9, 1147-1157.

Aoki, T. O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M. R., Peyrieras, N., y Rosa, F. M. (2002). Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A, a TGFbeta-related type I receptor. *Dev Biol* 241, 273-288.

- 10 Beck, S., Le Good, J. A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F., y Constam, D. B. (2002). Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4, 981-985.

Beddington, R. S., Rashbass, P., y Wilson, V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl*, 157-165.

- 15 Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C., y Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9, 2110-2117.

Chang, H., Brown, C. W., y Matzuk, M. M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823.

- 20 Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B., y Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-1928.

Dougan, S. T., Warga, R. M., Kane, D. A., Schier, A. F., y Talbot, W. S. (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development* 130, 1837-1851.

- 25 Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F., y Talbot, W. S. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395, 181-185.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., y Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.

- 30 Futaki, S., Hayashi, Y., Yamashita, M., Yagi, K., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., y Sekiguchi, K. (2003). Molecular basis of constitutive production of basement membrane components: Gene expression profiles of engelbreth-holm-swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem*.

Grapin-Botton, A., y Melton, D. A. (2000). Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16, 124-130.

Harris, T. M., y Childs, G. (2002). Global gene expression patterns during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells into parietal endoderm. *Funct Integr Genomics* 2, 105-119.

- 35 Hogan, B. L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-438.

Hogan, B. L. (1997). Pluripotent embryonic cells and methods of making same (U.S.A., Vanderbilt University).

Howe, C. C., Overton, G. C., Sawicki, J., Solter, D., Stein, P., y Strickland, S. (1988). Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads. *Differentiation* 37, 20-25.

- 40 Hudson, C., Clements, D., Friday, R. V., Stott, D., y Woodland, H. R. (1997). *Xsox17alpha* and *-beta* mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell* 91, 397-405.

Imada, M., Imada, S., Iwasaki, H., Kume, A., Yamaguchi, H., y Moore, E. E. (1987). Fetomodulin: marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP. *Dev Biol* 122, 483-491.

- 45 Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P. P., y Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in *Sox17*-null mutant mice. *Development* 129, 2367-2379.

Katoh, M. (2002). Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* 9, 363-368.

- Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C., Waldron, S., Yelon, D., Thisse, B., y Stainier, D. Y. (2001). casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish. *Genes Dev* 15, 1493-1505.
- 5 Kim, C. H., y Broxmeyer, H. E. (1999). Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 65, 6-15.
- Kimelman, D., y Griffin, K. J. (2000). Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10, 350-356.
- Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G. (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*. 131,1651-62.
- 10 Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A. J., Wolfman, N. M., ten Dijke, P., y Kuehn, M. R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. *J Biol Chem* 276, 656-661.
- Labosky, P. A., Barlow, D. P., y Hogan, B. L. (1994a). Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp* 182, 157-168; discussion 168-178.
- 15 Labosky, P. A., Barlow, D. P., y Hogan, B. L. (1994b). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 120, 3197-3204.
- Lickert, H., Kutsch, S., Kanzler, B., Tamai, Y., Taketo, M. M., y Kemler, R. (2002). Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* 3, 171-181.
- 20 Lu, C. C., Brennan, J., y Robertson, E. J. (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11, 384-392.
- Ma, Q., Jones, D., y Springer, T. A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10, 463-471.
- McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. (1999) Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol*. 213, 442-56.
- 25 Miyazono, K., Kusanagi, K., e Inoue, H. (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187, 265-276.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., y Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.
- 30 Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-148.
- Ogura, H., Aruga, J., y Mikoshiba, K. (2001). Behavioral abnormalities of Zic1 and Zic2 mutant mice: implications as models for human neurological disorders. *Behav Genet* 31, 317-324.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., y Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.
- 35 Rodaway, A., y Patient, R. (2001). Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* 105, 169-172.
- Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C., Patient, R., y Holder, N. (1999). Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* 126, 3067-3078.
- 40 Rohr, K. B., Schulte-Merker, S., y Tautz, D. (1999). Zebrafish zic1 expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling. *Mech Dev* 85, 147-159.
- Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 589-621.
- Schoenwolf, G. C., y Smith, J. L. (2000). Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates. *Methods Mol Biol* 135, 113-125.
- 45 Shambloott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., y Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13726-13731.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., y Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free

immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230-238.

Shapiro, A. M., Ryan, E. A., y Lakey, J. R. (2001a). Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15, 241-264.

- 5 Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Lakey, J., Korbitt, G. S., y Rajotte, R. V. (2001b). Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes? Insulin independence should be dominant force in islet transplantation. *Bmj* 322, 861.

Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y., y Aiso, S. (1996). Cloning and characterization of *Xenopus laevis* xSox7 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1309, 73-76.

Smith, J. (1997). Brachyury and the T-box genes. *Curr Opin Genet Dev* 7, 474-480.

- 10 Smith, J. C., Armes, N. A., Conlon, F. L., Tada, M., Umbhauer, M., y Weston, K. M. (1997). Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 337-346.

- 15 Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M. G., Jay, P., y Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res* 29, 4274-4283.

Taniguchi, K., Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., y Aiso, S. (1999). Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7. *Biochim Biophys Acta* 1445, 225-231.

Technau, U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* 23, 788-794.

- 20 Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., y Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Tremblay, K. D., Hoodless, P. A., Bikoff, E. K., y Robertson, E. J. (2000). Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development* 127, 3079-3090.

- 25 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

Varlet, I., Collignon, J., y Robertson, E. J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development* 124, 1033-1044.

Vincent, S. D., Dunn, N. R., Hayashi, S., Norris, D. P., y Robertson, E. J. (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev* 17, 1646-1662.

- 30 Weiler-Guettler, H., Aird, W. C., Rayburn, H., Husain, M., y Rosenberg, R. D. (1996). Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos. *Development* 122, 2271-2281.

Weiler-Guettler, H., Yu, K., Soff, G., Gudas, L. J., y Rosenberg, R. D. (1992). Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89, 2155-2159.

- 35 Wells, J. M., y Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 393-410.

Wells, J. M., y Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127, 1563-1572.

Willison, K. (1990). The mouse Brachyury gene and mesoderm formation. *Trends Genet* 6, 104-105.

Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56.

- 40 Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L., y Kuehh, M. R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543-547.

Jonsson, J., *et al.*, *Nature*, 606-609, 1994

Offield, MF, *et al.* *Devel.* 983-995, 1996

Stoffers, D.A., *et al.* *Nature Genetics*, 106-110 1997

- 45 Stoffers D.A., *et al.* *Nature Genetics* 138-139, 1997

Stafford *et al.* Genes Evol. 432-441, 2004

Chen *et al.*, Dev. Biol. 144-160, 2004

Martin, M., *et al.* Dev. Biol. 2005

Molotkov, A., *et al.* Dev. Dyn. 950-957, 2005

5 Harrison, K.A., *et al.* Nature Genetics 71-75 1999

Li, H., *et al.* Nature Genetics 67-70, 1999

Kawahira, H., *et al.* Dev. Biology 280, 111-121, 2005

Lista de secuencias

<110> CYTHERA, INC.

10 D'Amour, Kevin Allen

Agulnick, Alan D.

Eliazer, Susan

Baetge, Emmanuel E.

<120> ENDODERMO DE INTESTINO PROXIMAL DORSAL Y VENTRAL QUE EXPRESA PDX1

15 <130> CYTHERA.052VPC

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 1245

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
atgagcagcc cggatgcggg atacgccagt gacgaccaga gccagaccca gagcgcgctg 60
ccgcggtga tggccgggct gggcccctgc ccctgggccc agtcgctgag ccccatcggg 120
gacatgaagg tgaagggcga ggcgccggcg aacagcggag caccggccgg ggccgcgggc 180
cgagccaagg gcgagtcccg tatccggcgg ccgatgaacg ctttcatggt gtgggctaag 240
gacgagcgca agcggctggc gcagcagaat ccagacctgc acaacgccga gttgagcaag 300
atgctgggca agtcgtggaa ggcgctgacg ctggcgagga agcggccctt cgtggaggag 360
gcagagcggc tgcgcgtgca gcacatgcag gaccaccca actacaagta ccggccgcgg 420
cggcgcaagc aggtgaagcg gctgaagcgg gtggaggggc gcttcctgca cggcctggct 480
gagccgcagg cggccgcgct gggccccgag ggcggccgcg tggccatgga cggcctgggc 540
ctccagttcc ccgagcaggg cttccccgcc ggcgcccgcc tgctgcctcc gcacatgggc 600
ggccactacc gcgactgcca gagtctgggc gcgcctccgc tcgacggcta cccgttgccc 660
acgcccagaca cgtccccgct ggacggcgtg gaccccgacc cggctttctt cgccgccccg 720
atgcccgggg actgcccggc ggccggcacc tacagctacg cgcaggctct ggactacgct 780
ggcccccccg agcctcccg cggctcccatg ccccccgac tcggcccaga gcccgcgggt 840
ccctcgattc cgggcctcct ggcgccaccc agcgccttc acgtgtacta cggcgcgatg 900
ggctcgcccc gggcgggcgg cgggcgcggc ttccagatgc agccgcaaca ccagcaccag 960
caccagcacc agcaccacc cccggggccc ggacagccgt cggccccctc ggaggcactg 1020
ccctgcccgg acggcacgga cccagtcag cccgcgcgag tcctcgggga ggtggaccgc 1080
acggaatttg aacagtatct gcacttcgtg tgcaagcctg agatgggcct cccctaccag 1140
gggcatgact ccggtgtgaa tctccccgac agccacgggg ccatttcctc ggtggtgtcc 1200
gacgccagct ccgcggtata ttactgcaac tatcctgacg tgtga 1245
```

<210> 2

25 <211> 414

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Ser Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Ala Ser Asp Asp Gln Ser Gln Thr
 1          5          10          15
Gln Ser Ala Leu Pro Ala Val Met Ala Gly Leu Gly Pro Cys Pro Trp
          20          25          30
Ala Glu Ser Leu Ser Pro Ile Gly Asp Met Lys Val Lys Gly Glu Ala
          35          40          45
Pro Ala Asn Ser Gly Ala Pro Ala Gly Ala Ala Gly Arg Ala Lys Gly
          50          55          60
Glu Ser Arg Ile Arg Arg Pro Met Asn Ala Phe Met Val Trp Ala Lys
65          70          75          80
Asp Glu Arg Lys Arg Leu Ala Gln Gln Asn Pro Asp Leu His Asn Ala
          85          90          95
Glu Leu Ser Lys Met Leu Gly Lys Ser Trp Lys Ala Leu Thr Leu Ala
          100          105          110
  Glu Lys Arg Pro Phe Val Glu Glu Ala Glu Arg Leu Arg Val Gln His
          115          120          125
Met Gln Asp His Pro Asn Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Arg Arg Lys Gln
          130          135          140
Val Lys Arg Leu Lys Arg Val Glu Gly Gly Phe Leu His Gly Leu Ala
145          150          155          160
Glu Pro Gln Ala Ala Ala Leu Gly Pro Glu Gly Gly Arg Val Ala Met
          165          170          175
Asp Gly Leu Gly Leu Gln Phe Pro Glu Gln Gly Phe Pro Ala Gly Pro
          180          185          190
Pro Leu Leu Pro Pro His Met Gly Gly His Tyr Arg Asp Cys Gln Ser
          195          200          205
Leu Gly Ala Pro Pro Leu Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Thr Pro Asp Thr
210          215          220
Ser Pro Leu Asp Gly Val Asp Pro Asp Pro Ala Phe Phe Ala Ala Pro
225          230          235          240
Met Pro Gly Asp Cys Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Ala Gln Val
          245          250          255
Ser Asp Tyr Ala Gly Pro Pro Glu Pro Pro Ala Gly Pro Met His Pro
          260          265          270
Arg Leu Gly Pro Glu Pro Ala Gly Pro Ser Ile Pro Gly Leu Leu Ala
          275          280          285
Pro Pro Ser Ala Leu His Val Tyr Tyr Gly Ala Met Gly Ser Pro Gly
          290          295          300
Ala Gly Gly Gly Arg Gly Phe Gln Met Gln Pro Gln His Gln His Gln
305          310          315          320
His Gln His Gln His His Pro Pro Gly Pro Gly Gln Pro Ser Pro Pro
          325          330          335
Pro Glu Ala Leu Pro Cys Arg Asp Gly Thr Asp Pro Ser Gln Pro Ala
          340          345          350
Glu Leu Leu Gly Glu Val Asp Arg Thr Glu Phe Glu Gln Tyr Leu His
          355          360          365
Phe Val Cys Lys Pro Glu Met Gly Leu Pro Tyr Gln Gly His Asp Ser
          370          375          380
Gly Val Asn Leu Pro Asp Ser His Gly Ala Ile Ser Ser Val Val Ser
385          390          395          400
Asp Ala Ser Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Tyr Pro Asp Val
          405          410

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cultivo celular *in vitro* que comprende células humanas, en el que al menos el 10% de dichas células humanas son células de endodermo que expresan un marcador seleccionado del grupo que consiste en ONECUT2, SOX9 y PROX1 y que expresan la proteína factor 1 de homeocaja pancreático-duodenal (PDX1).
2. Cultivo celular según la reivindicación 1, que comprende además un retinoide.
3. Cultivo celular según la reivindicación 2, en el que dicho retinoide comprende ácido retinoico (RA).
- 10 4. Cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho cultivo celular está sustancialmente libre de células seleccionadas del grupo que consiste en células de endodermo visceral, células de endodermo parietal y células neurales.
5. Cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células de endodermo son células multipotentes que pueden diferenciarse adicionalmente en células derivadas del intestino proximal.
- 15 6. Método de producción de células de endodermo positivas para PDX1, comprendiendo dicho método:
 - (a) cultivar una población obtenida de células que comprende células pluripotentes humanas en presencia de un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β exógeno, produciendo de ese modo una población celular que comprende células de endodermo definitivo negativas para PDX1;
 - 20 (b) cultivar las células de la etapa (a) en presencia de un factor de crecimiento de la familia de FGF exógeno seleccionado del grupo que consiste en FGF10 y FGF7, produciendo de ese modo células de endodermo de intestino proximal; y
 - (c) cultivar las células de la etapa (b) en presencia de un retinoide, produciendo de ese modo células de endodermo positivas para PDX1 multipotentes.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en el que el factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β comprende activina A, en el que el factor de crecimiento de la familia de FGF comprende FGF-7 o en el que el retinoide comprende ácido retinoico (RA).
8. Método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β exógeno se retira antes de la etapa (b).
- 30 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en dichas células de endodermo positivas para PDX1 tal como se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o mediante inmunocitoquímica.

Diferenciación de células β por etapas

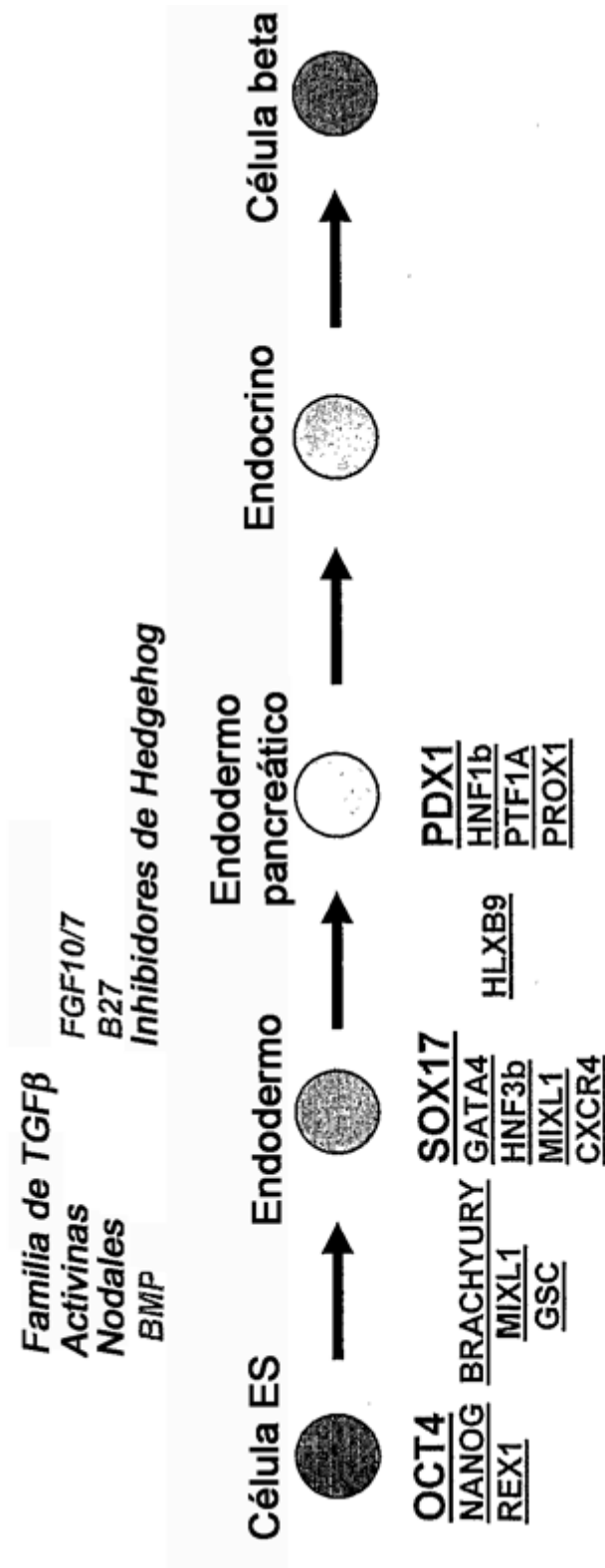


Figura 1

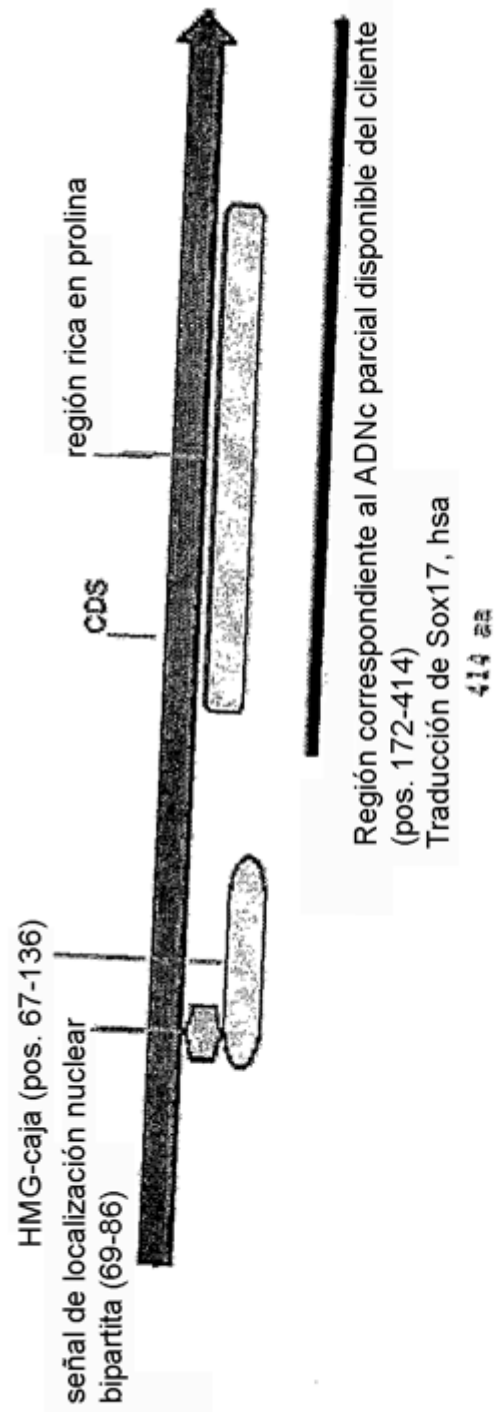


Figura 2

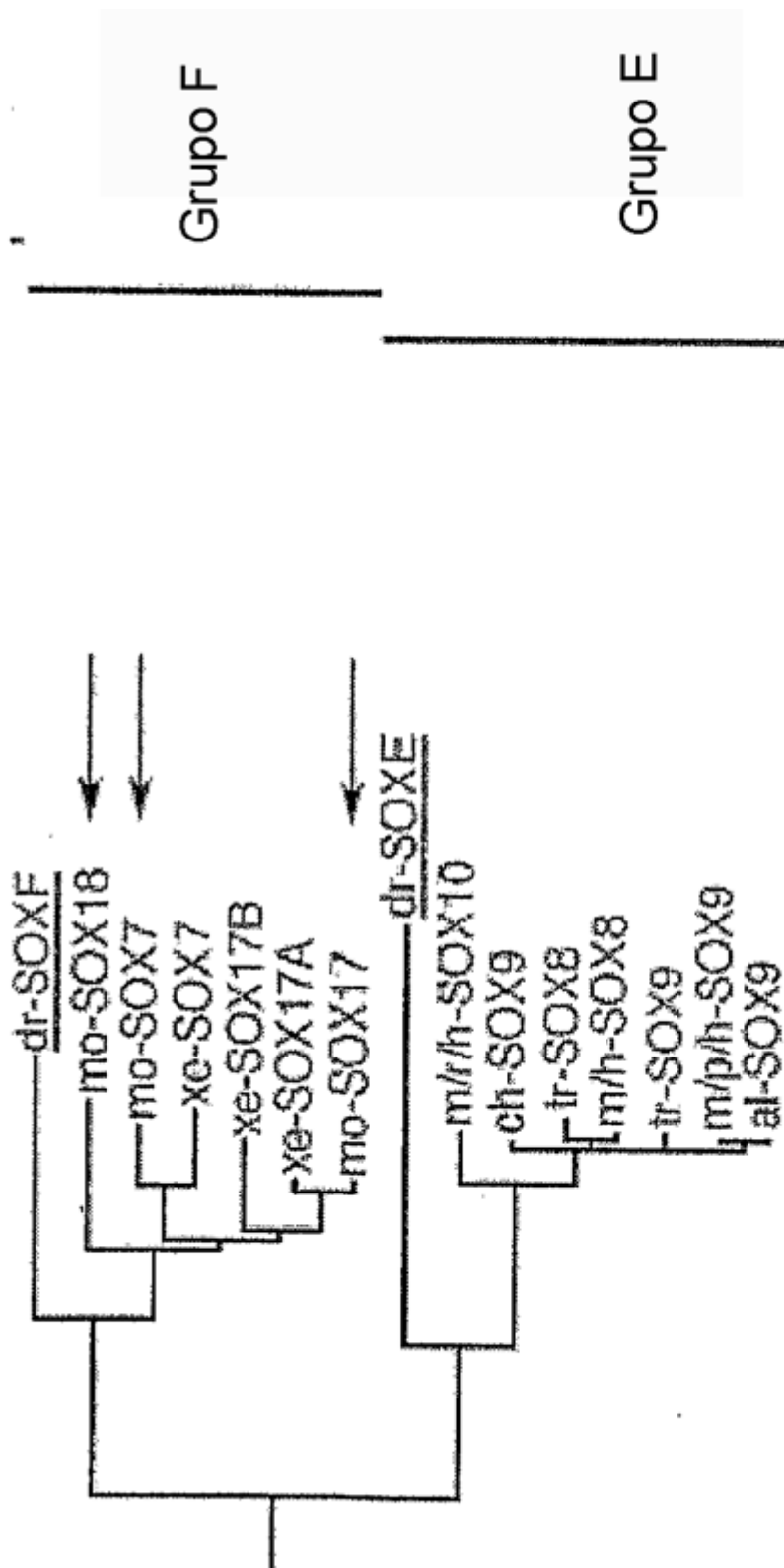


Figura 3

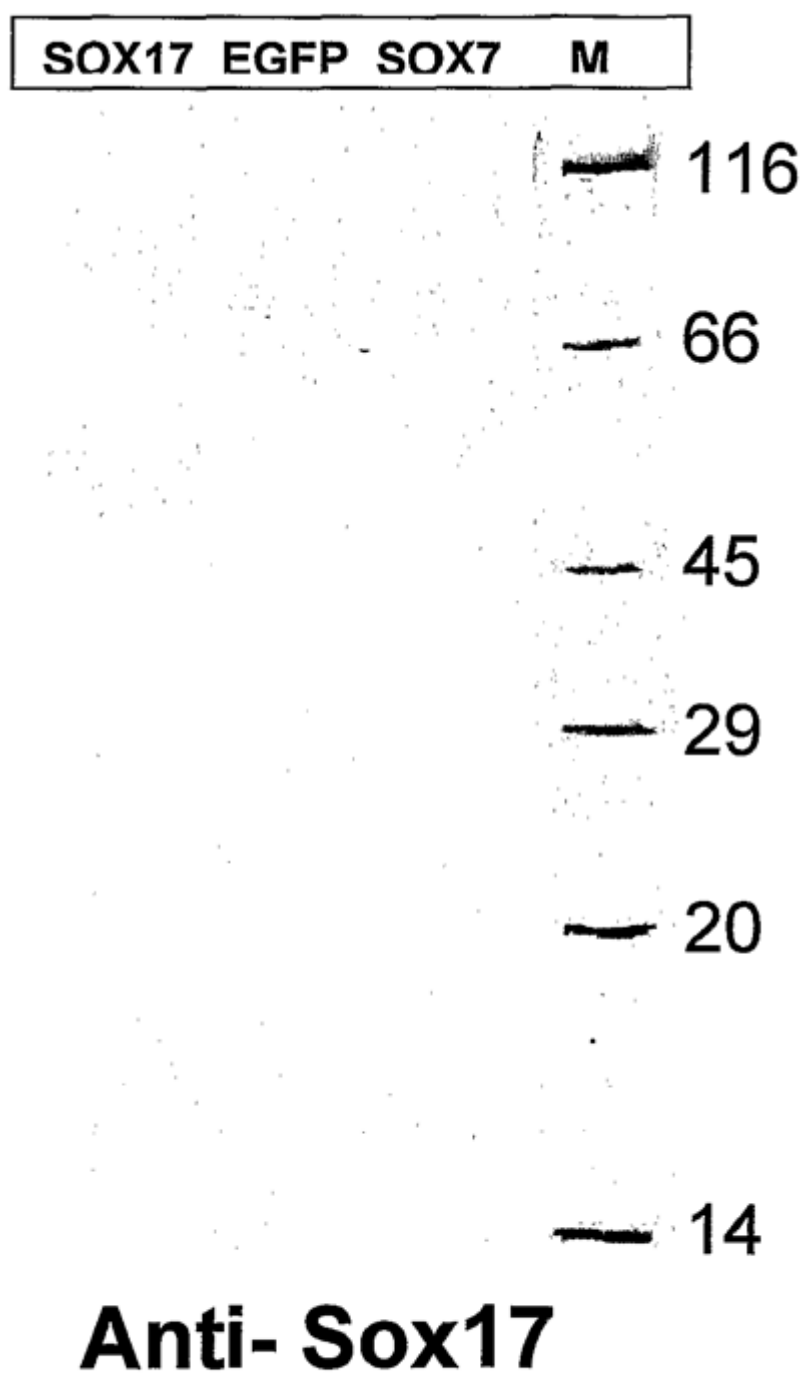


Figura 4

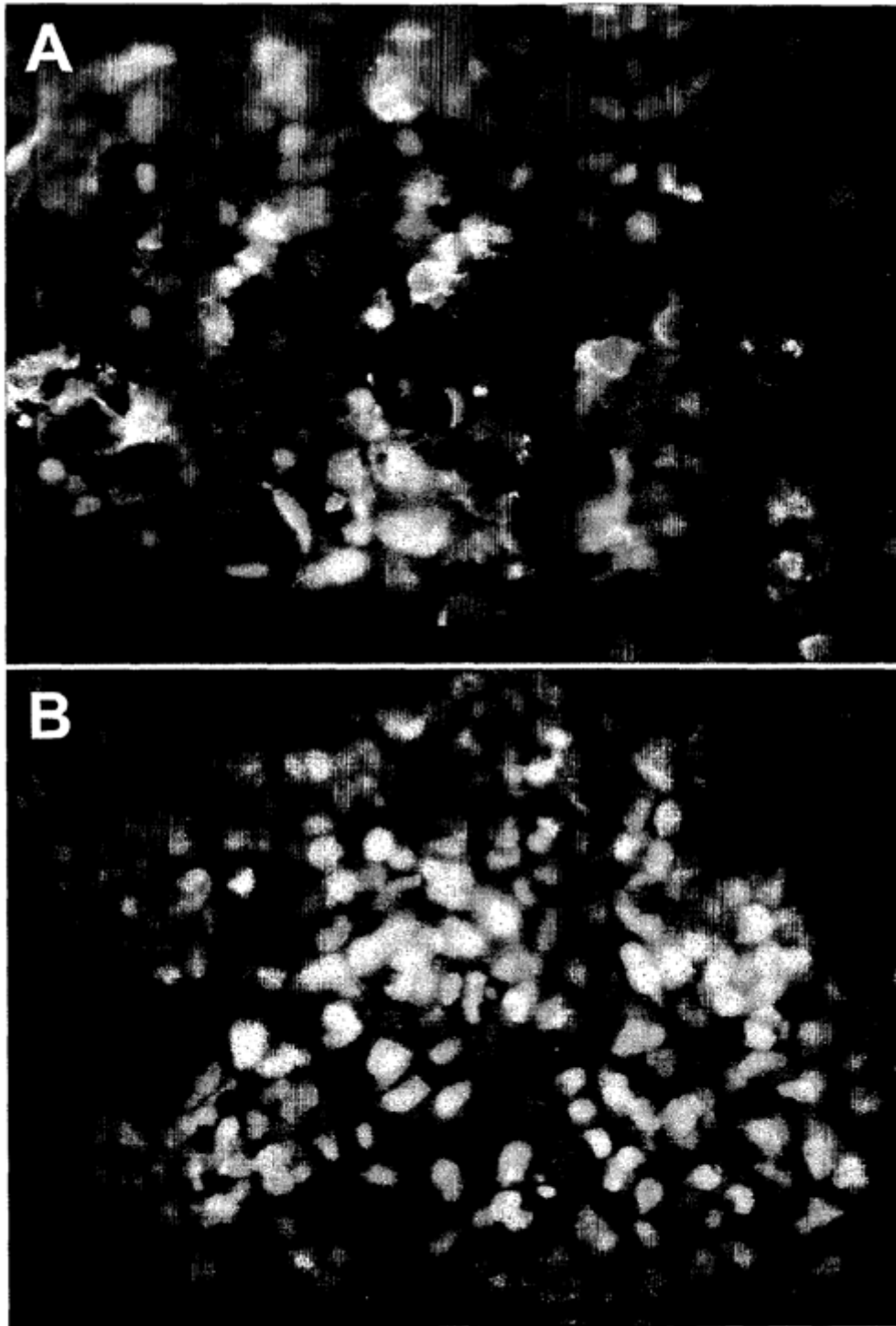


Figura 5

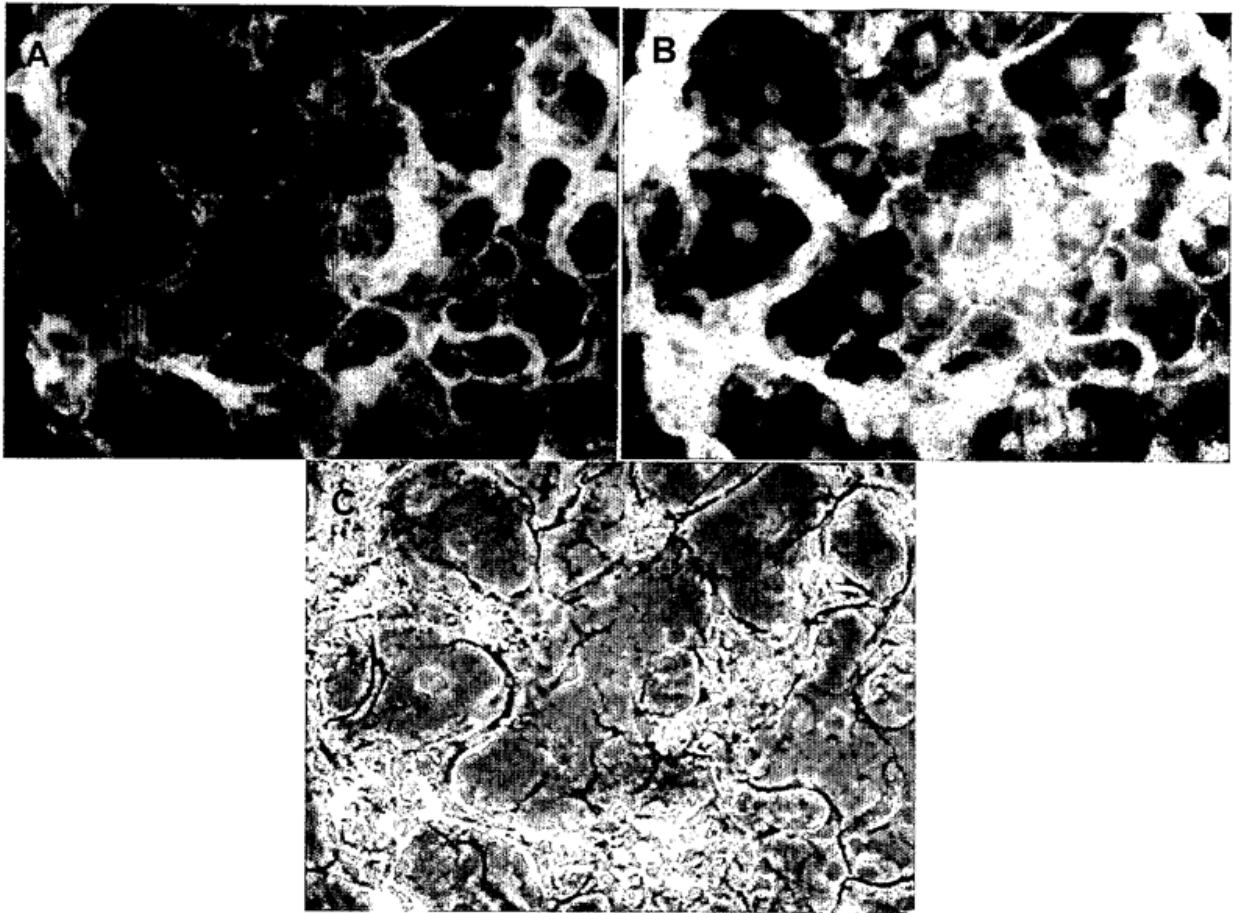
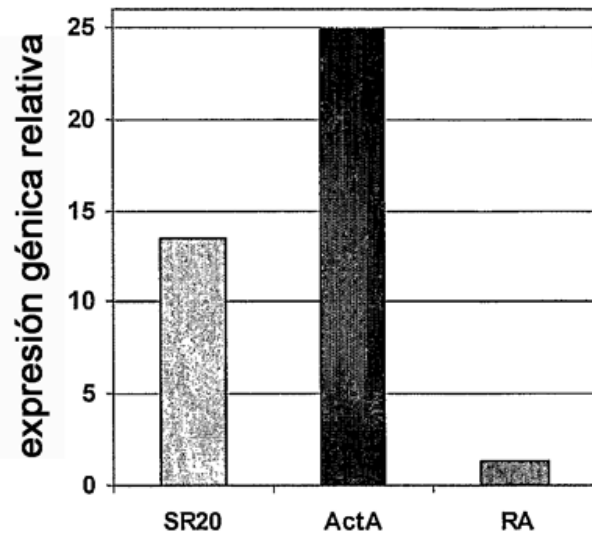


Figura 6

A Expresión génica de Sox17



B Células positivas anti-Sox17

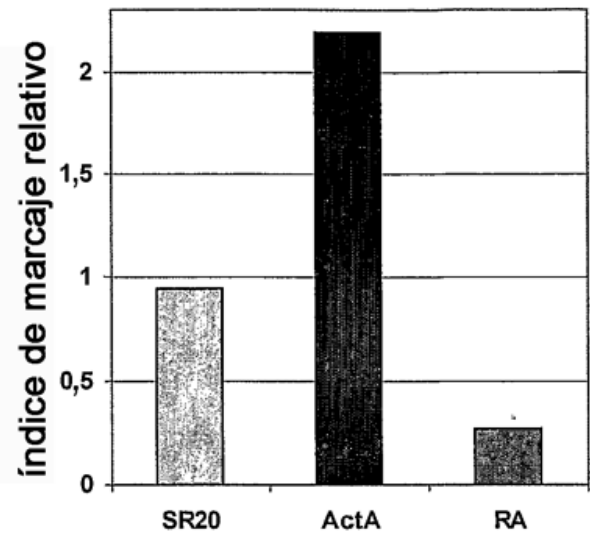


Figura 7

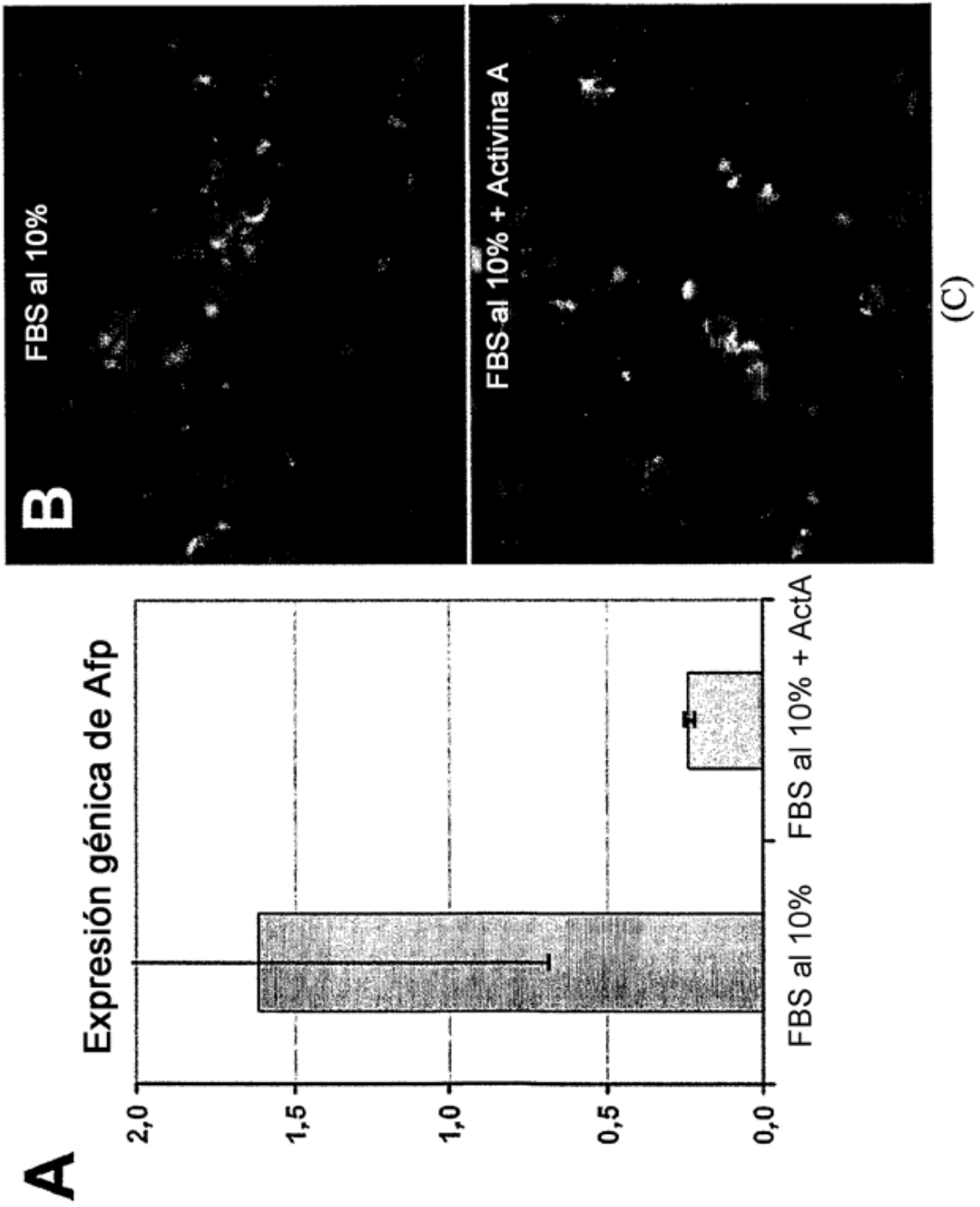
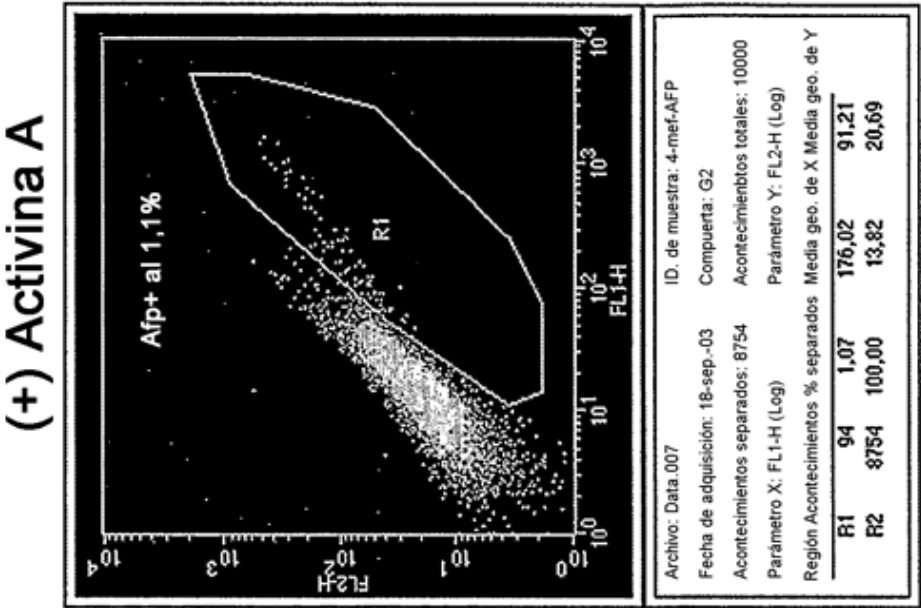
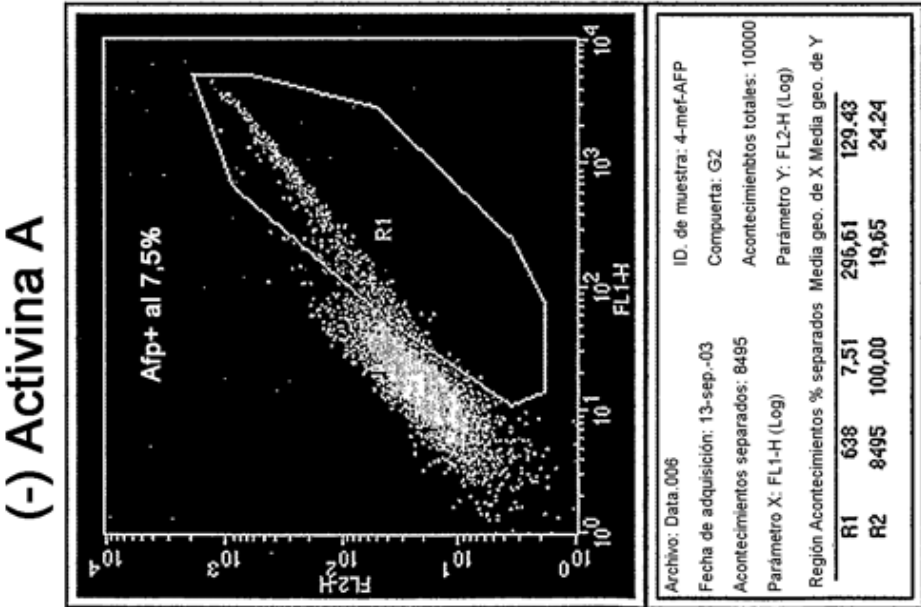


Figura 8



(B)



(A)

diferencia de
6,8 veces

Figura 9

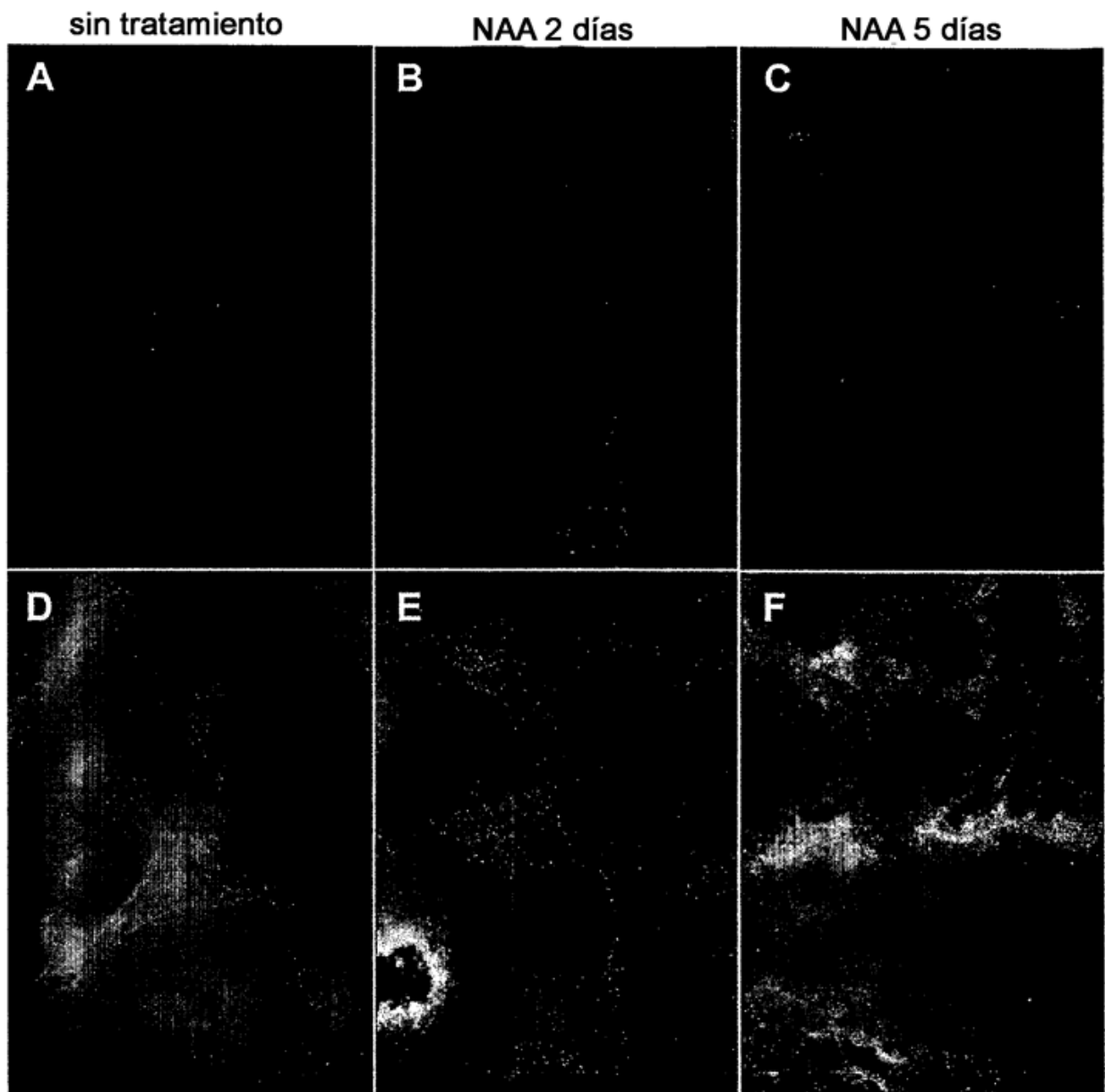


Figura 10

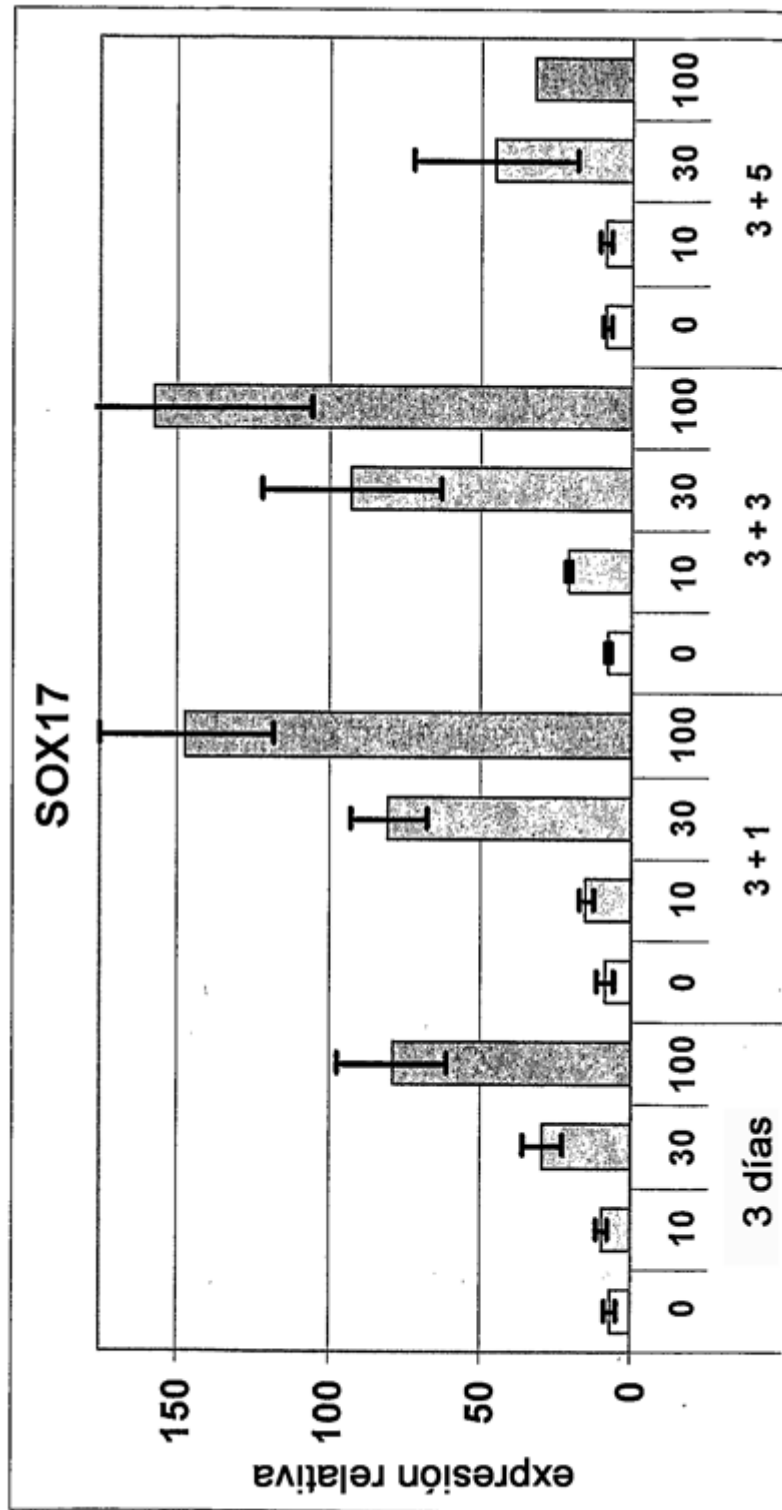
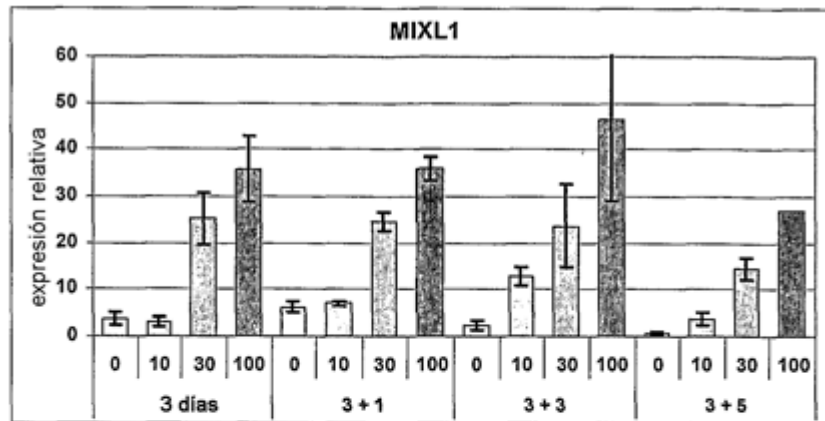
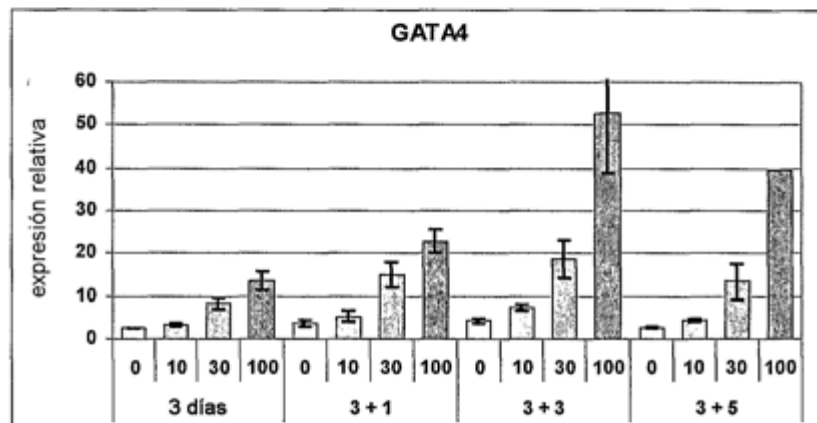


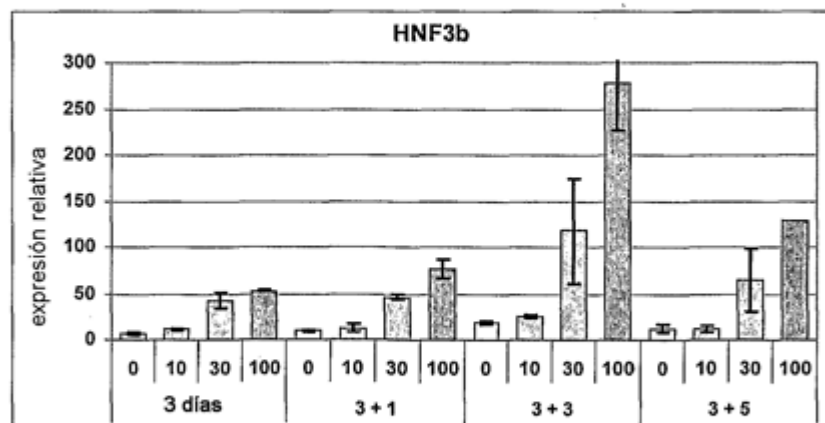
Figura 11



(A)

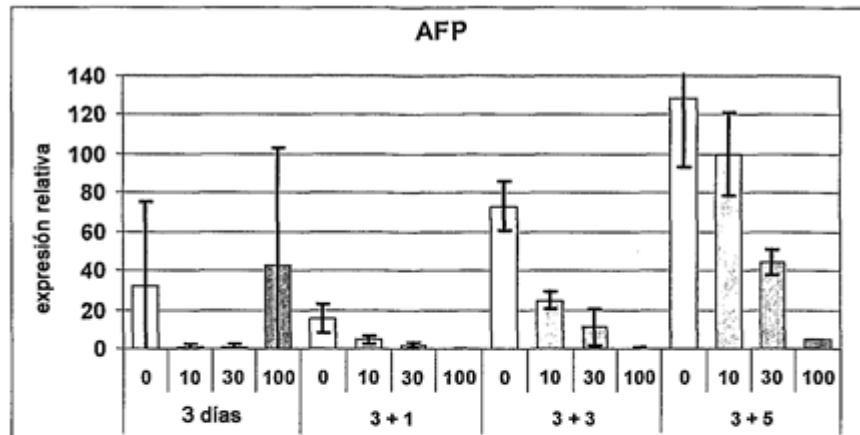


(B)

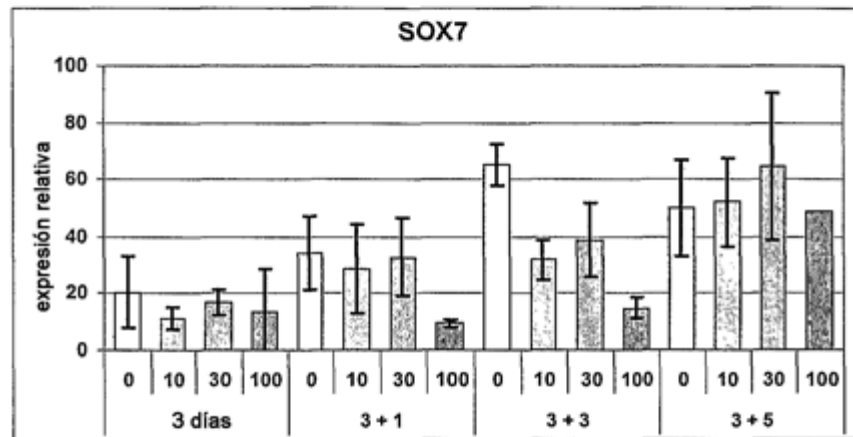


(C)

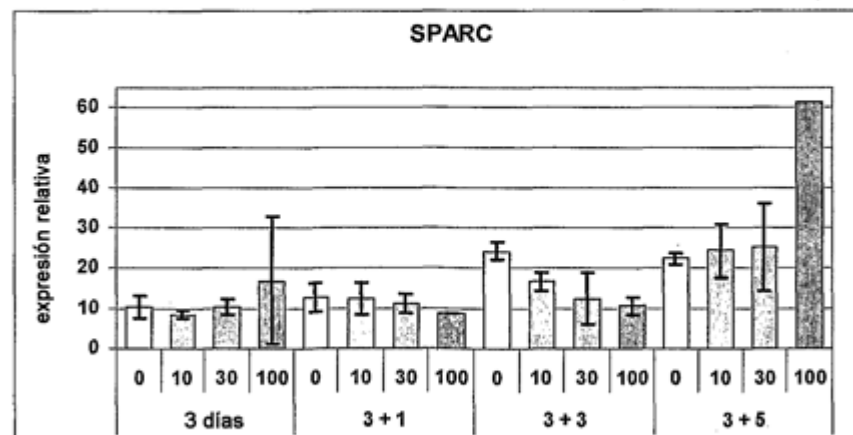
Figura 12



(A)

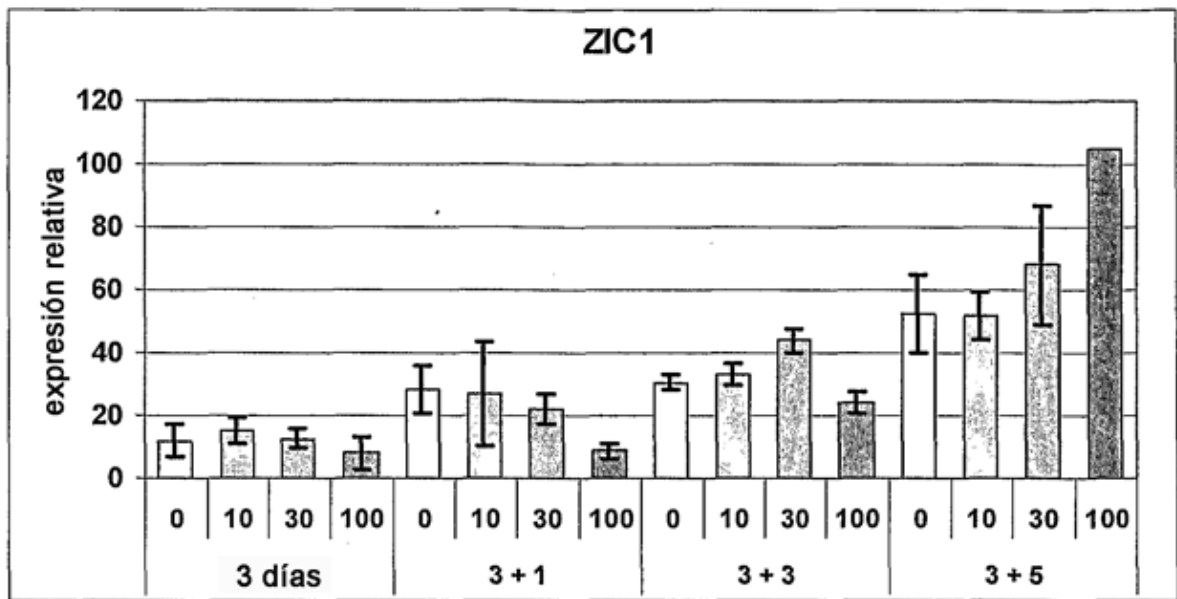


(B)

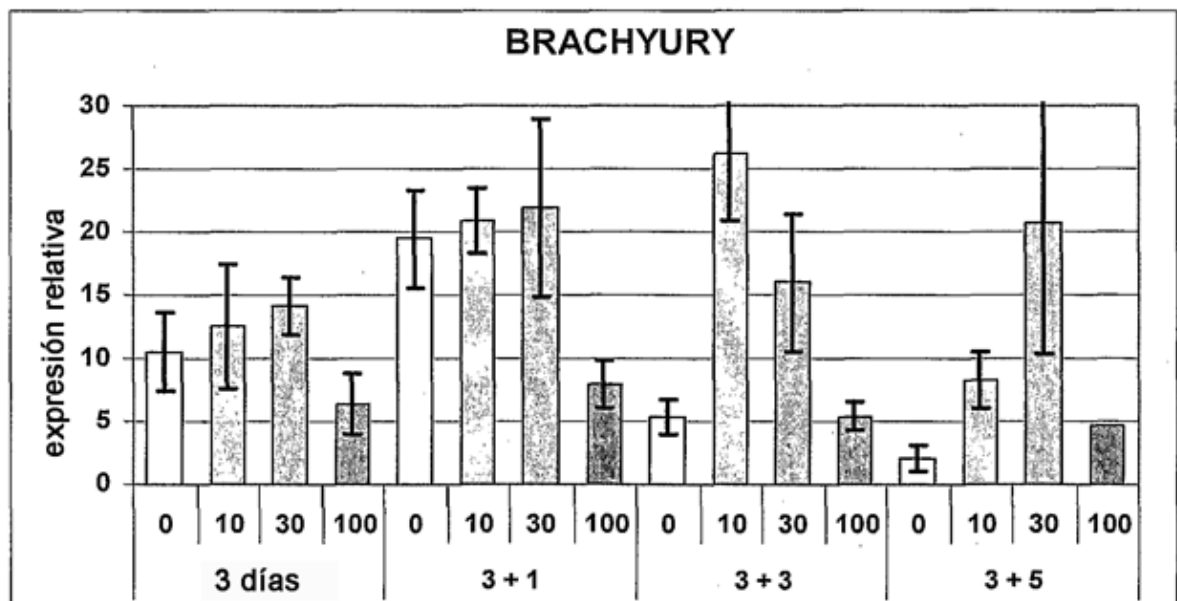


(C)

Figura 13



(A)



(B)

Figura 14

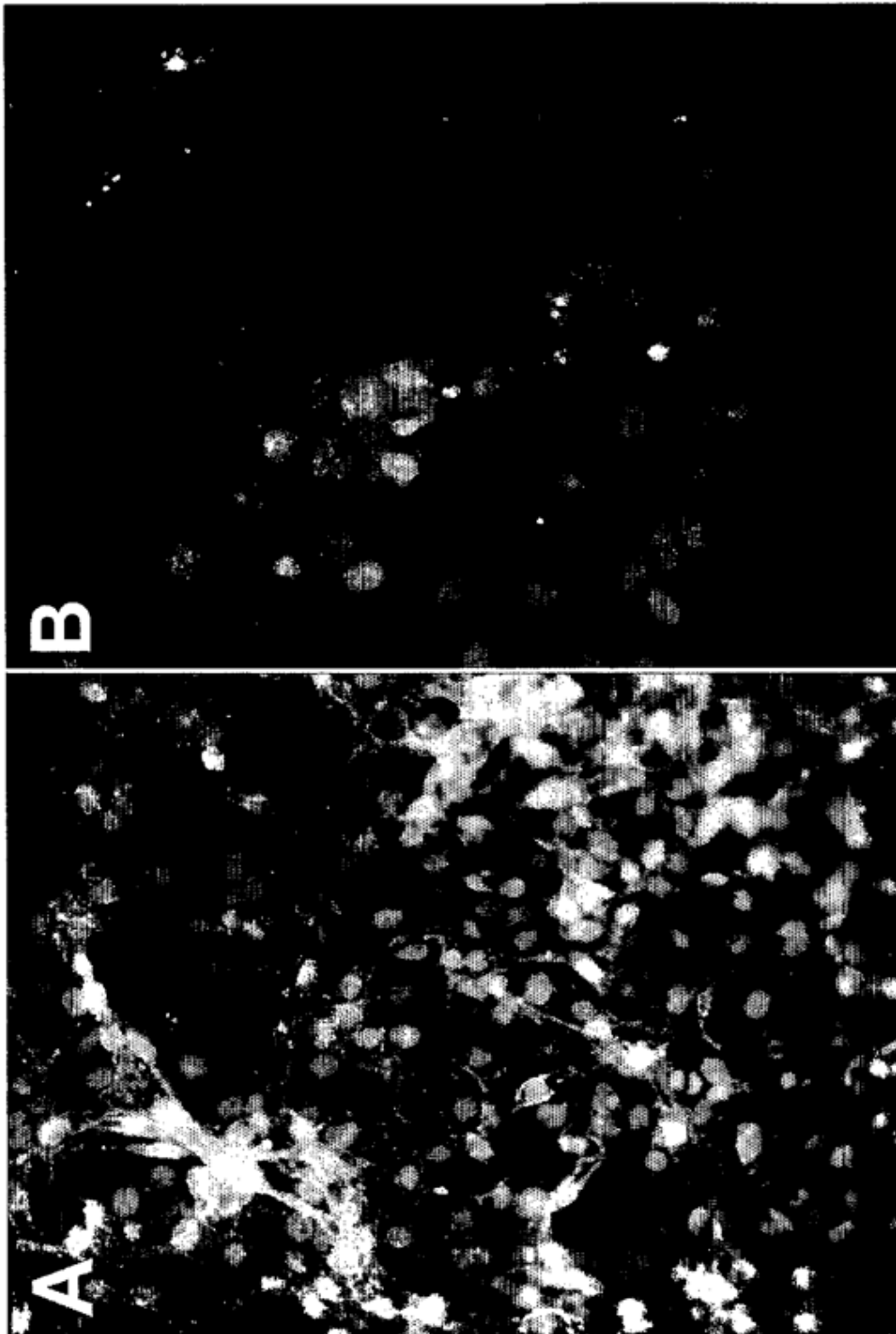


Figura 15

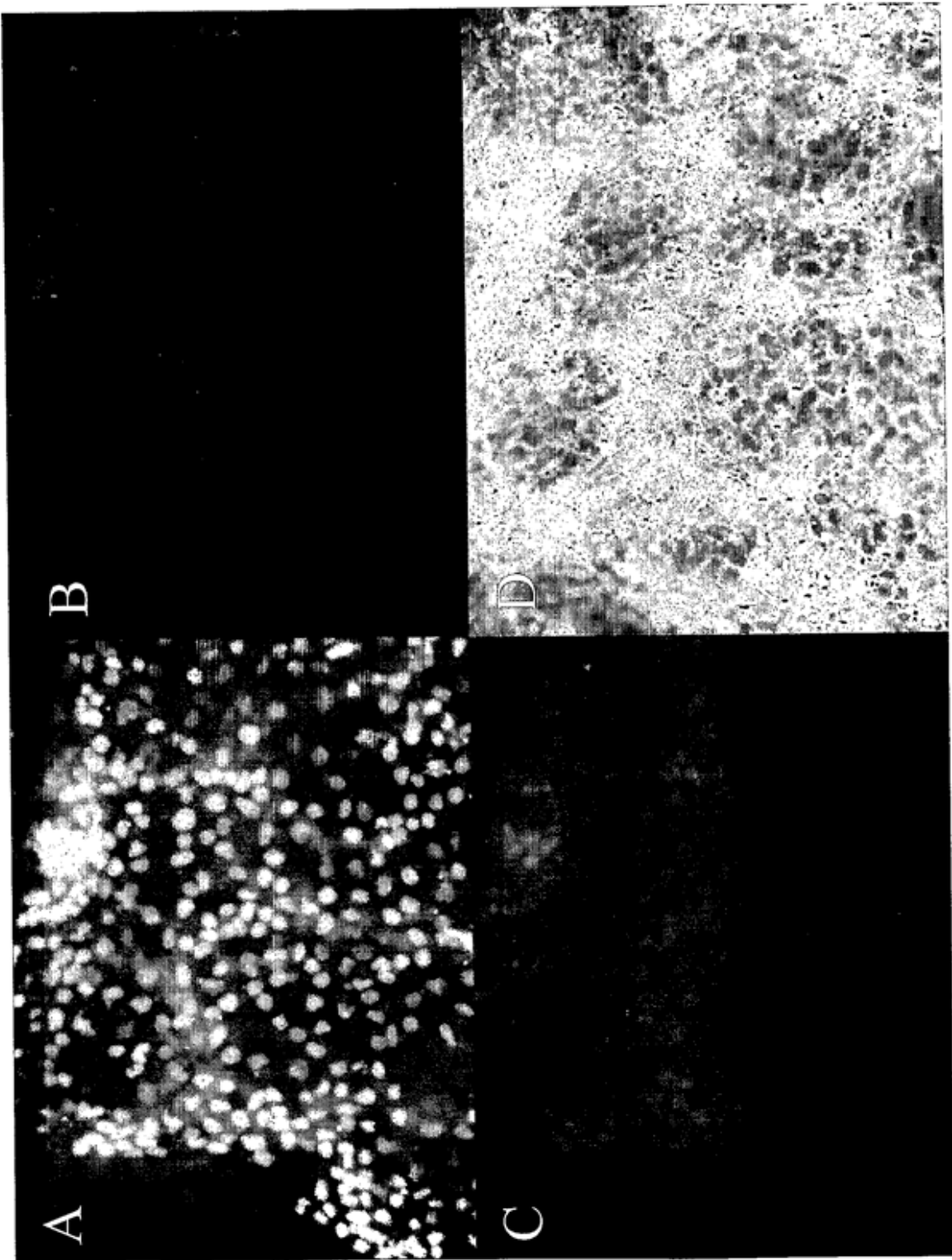


Figura 16

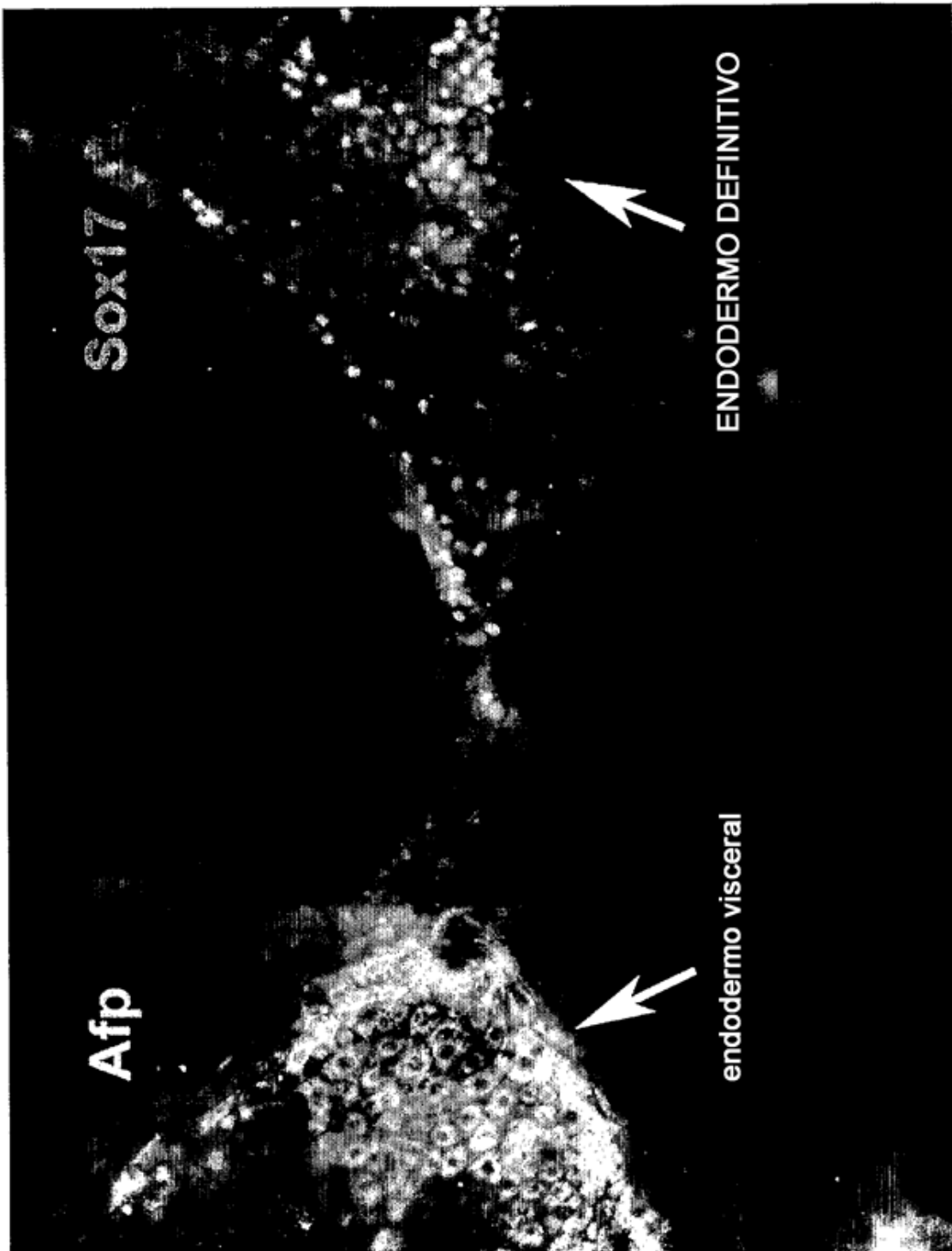


Figura 17

Moléculas de la familia de TGF β

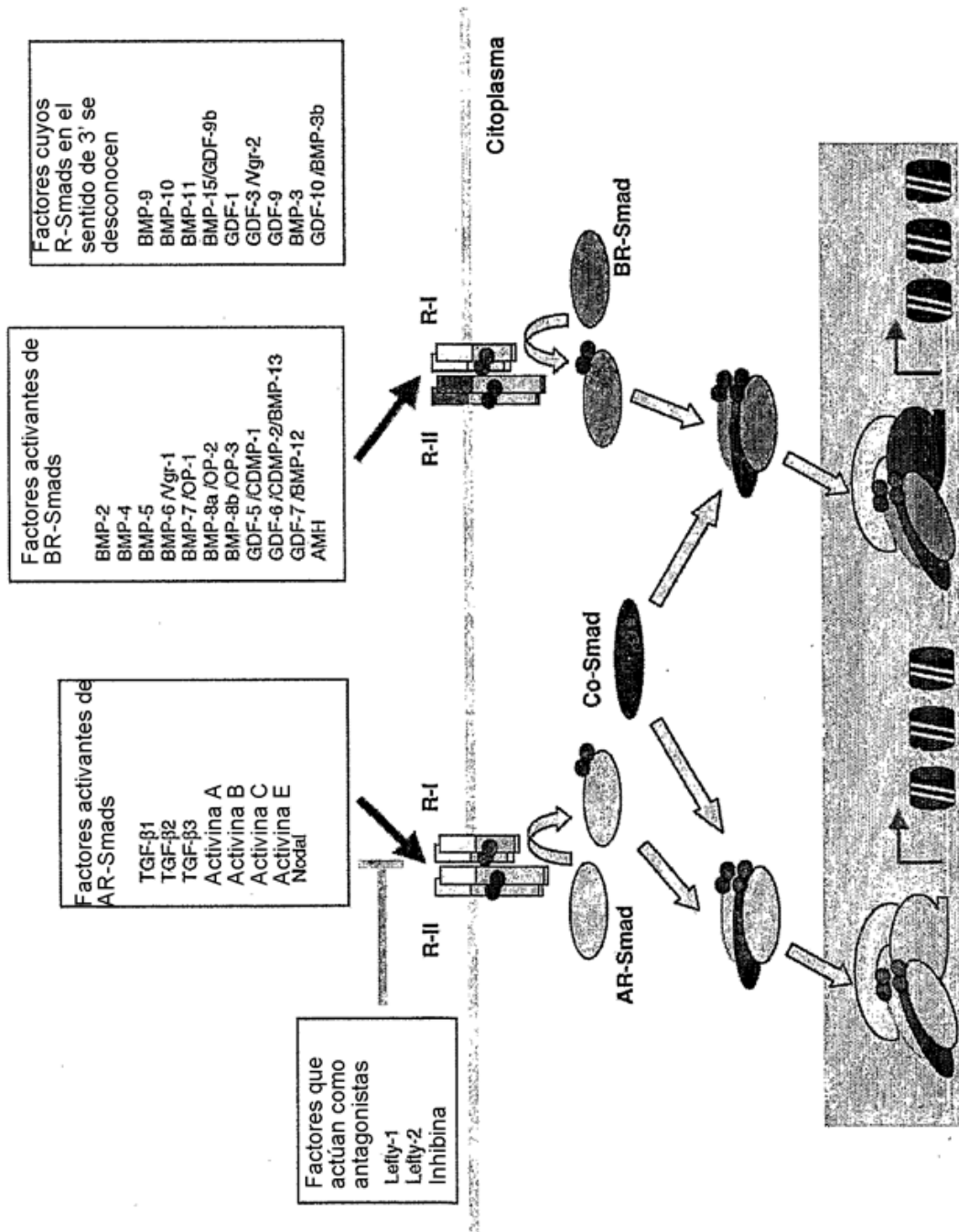


Figura 18

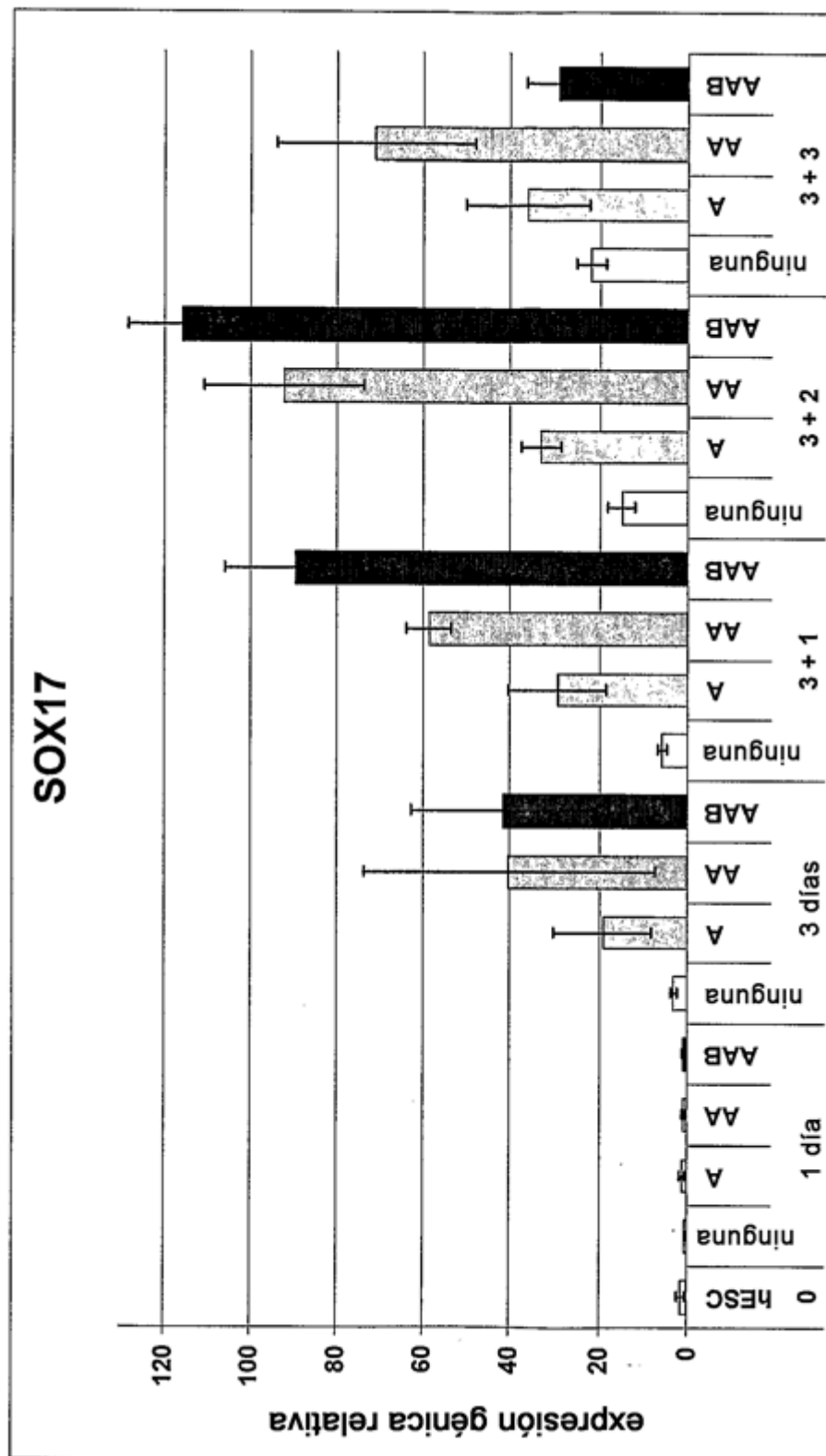


Figura 19

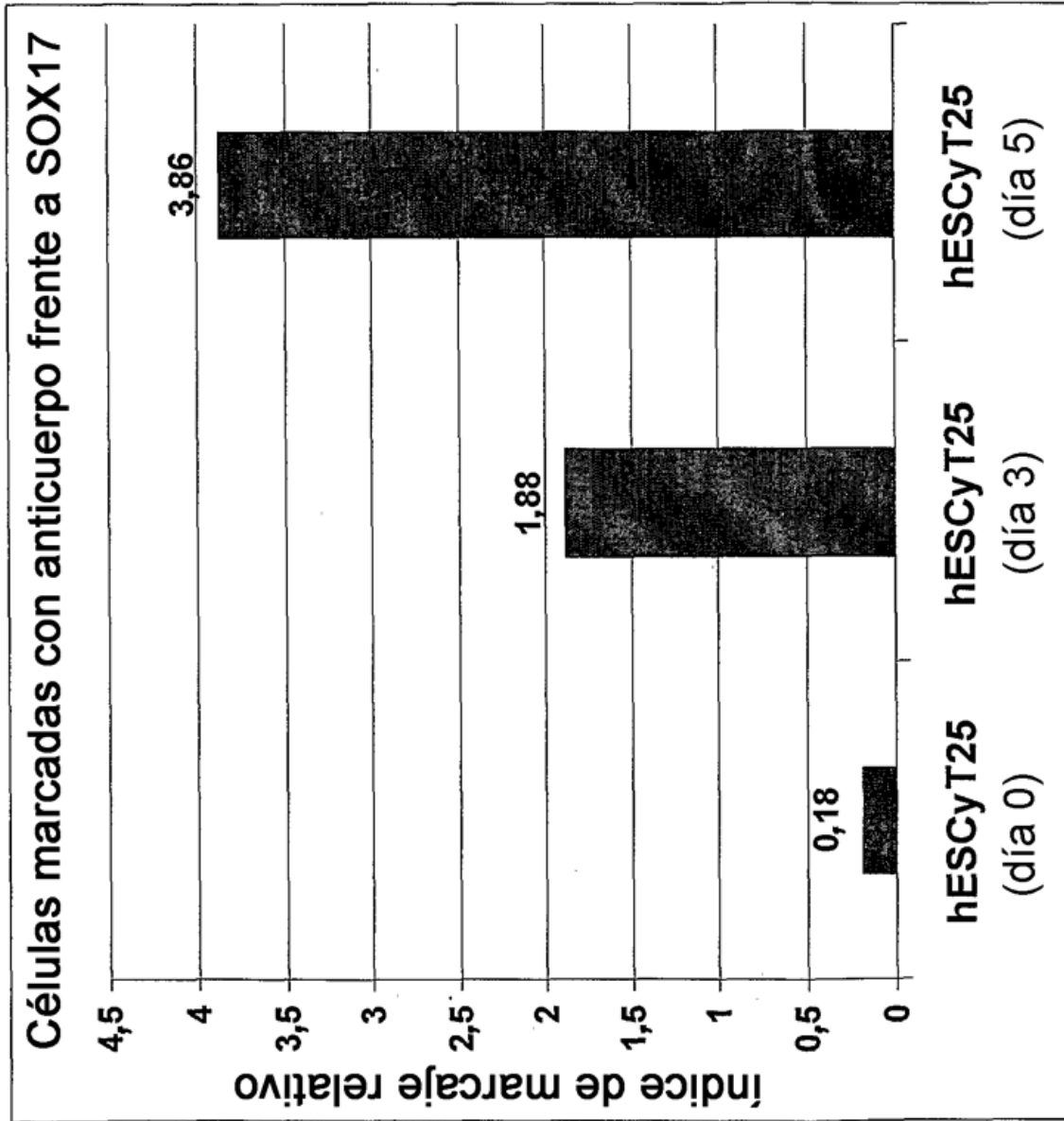


Figura 20

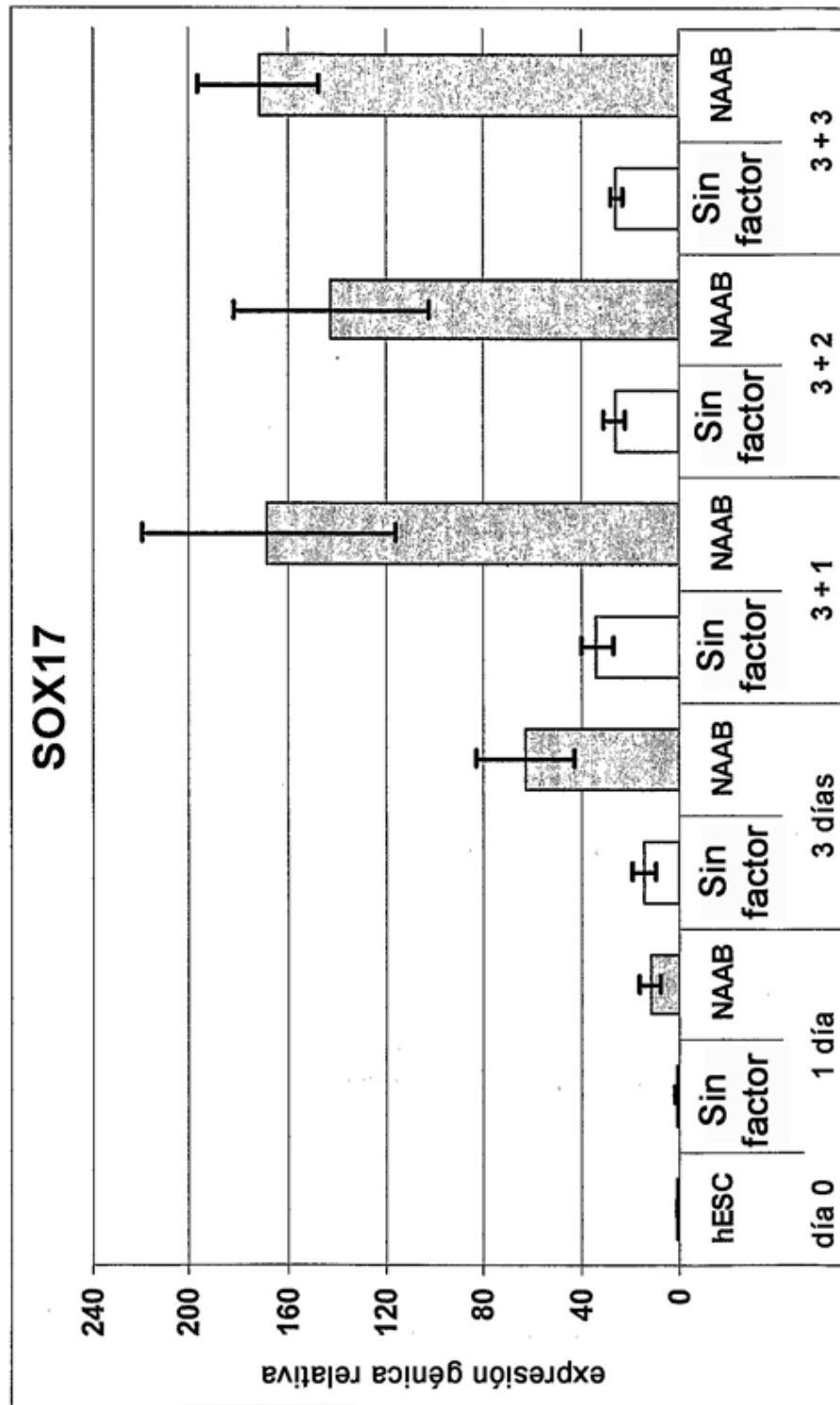


Figura 21

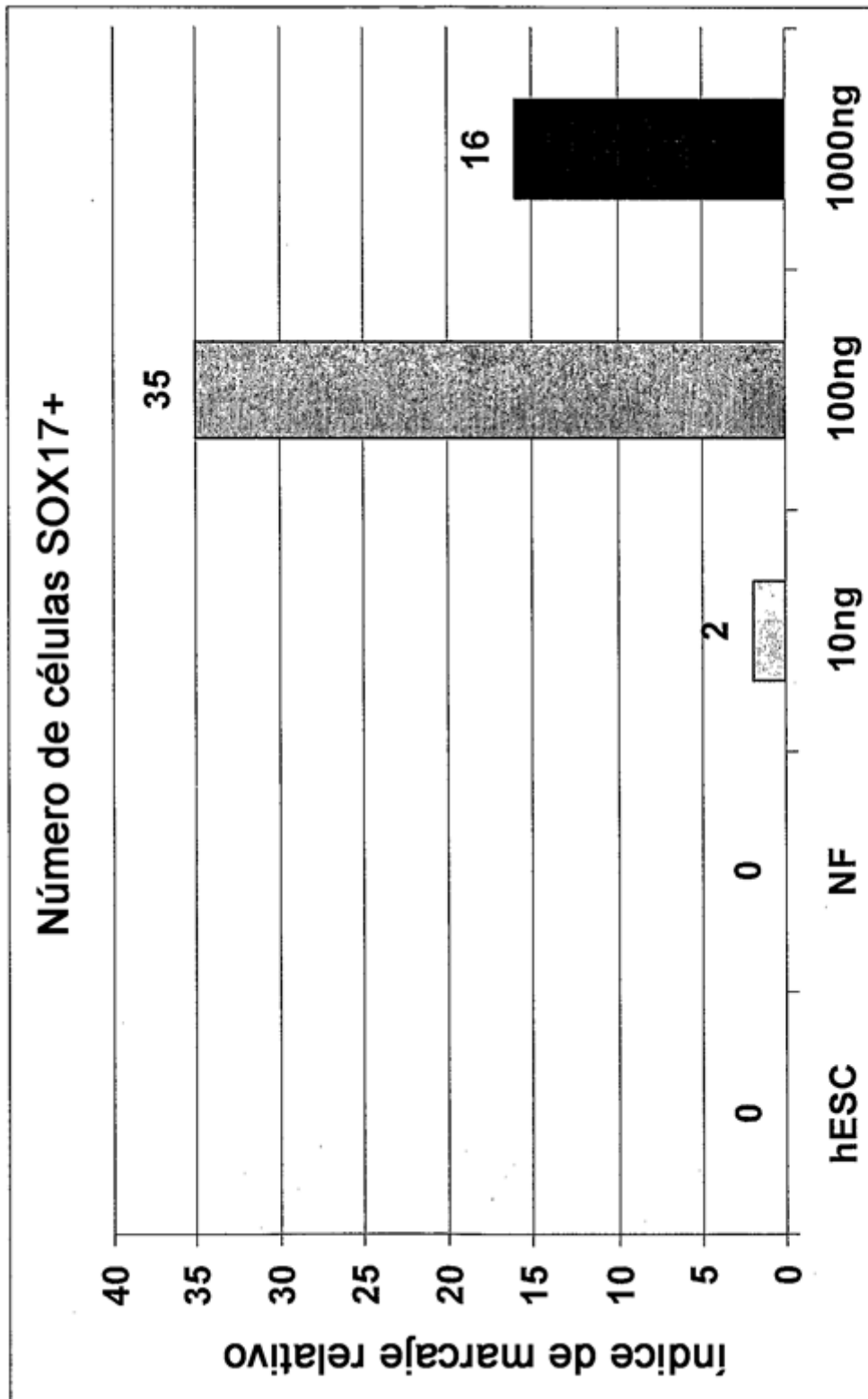


Figura 22

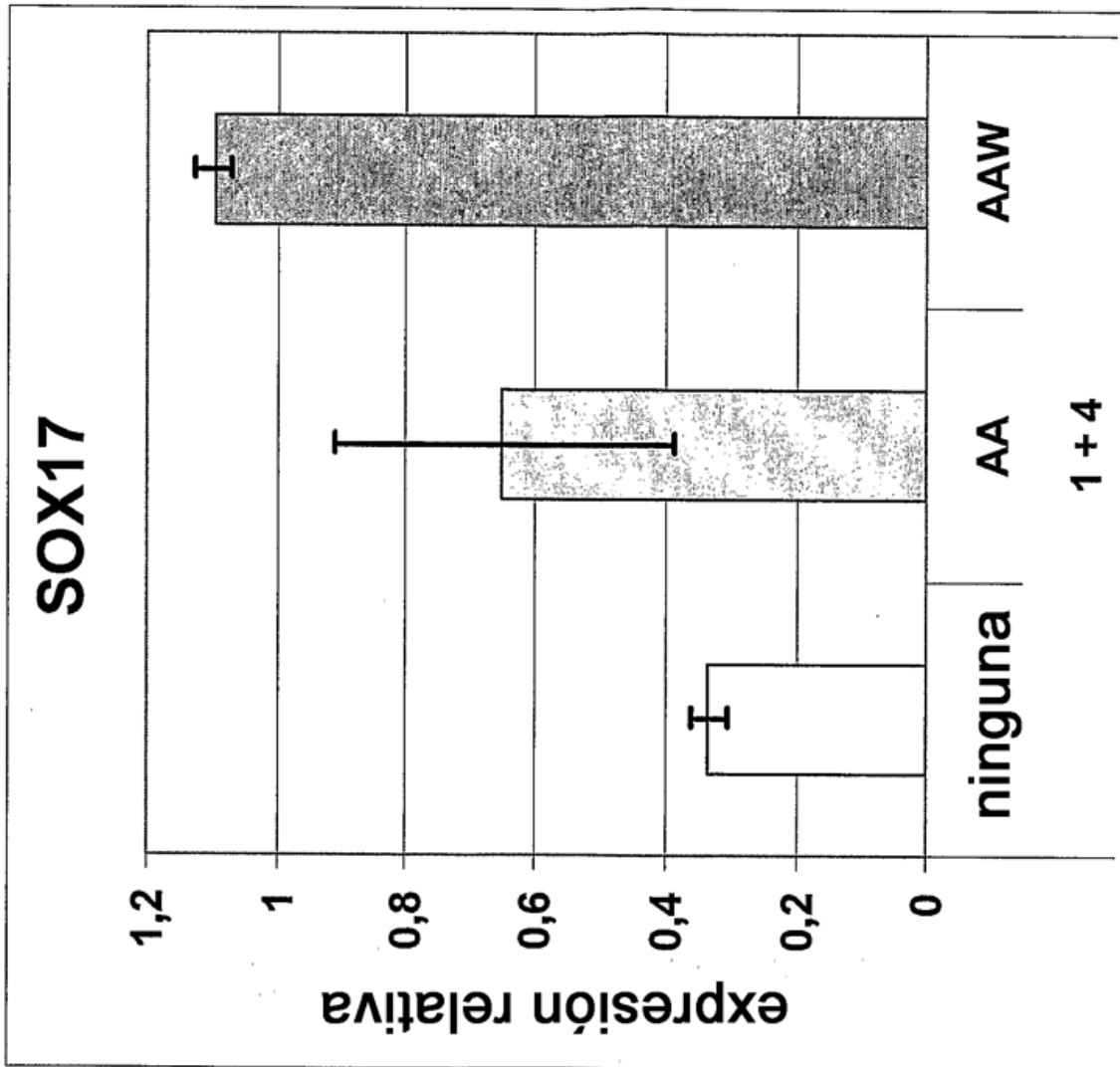
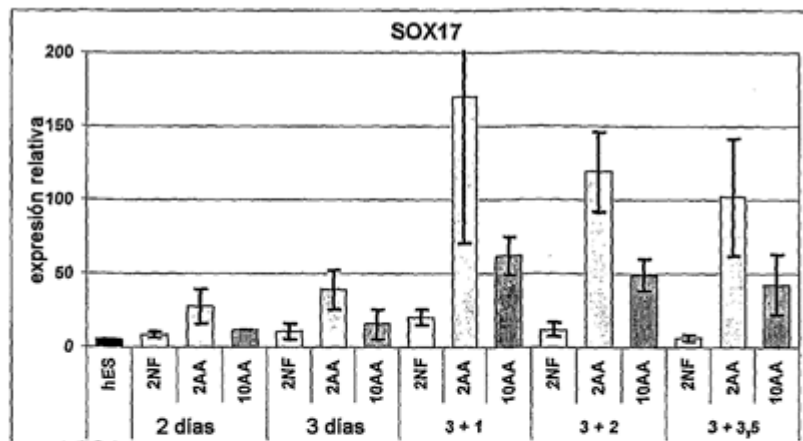
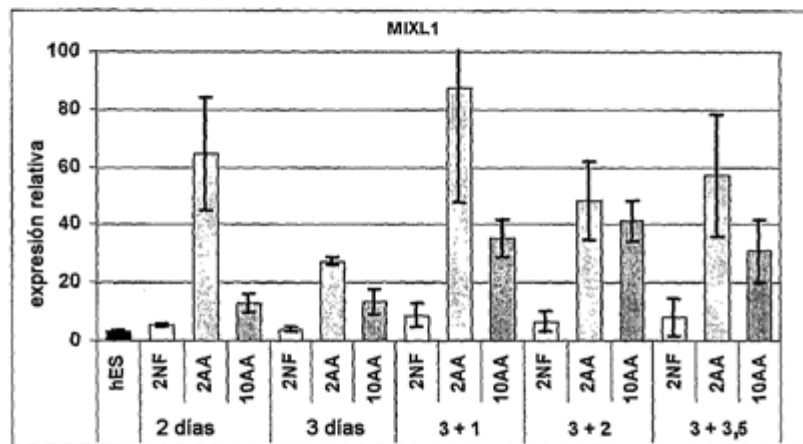


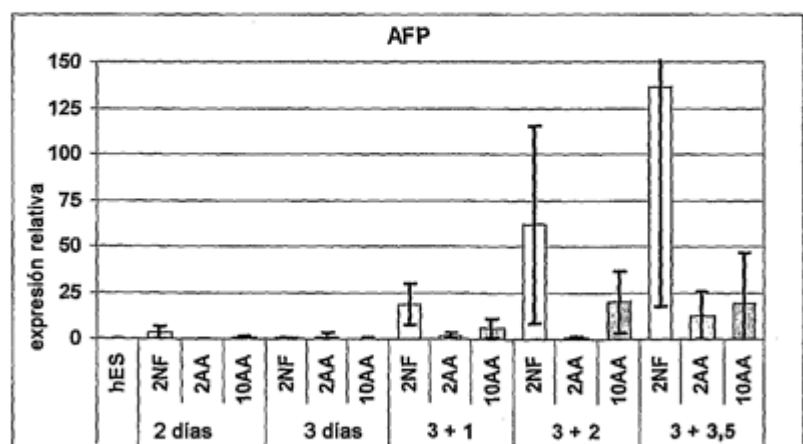
Figura 23



(A)



(B)



(C)

Figura 24

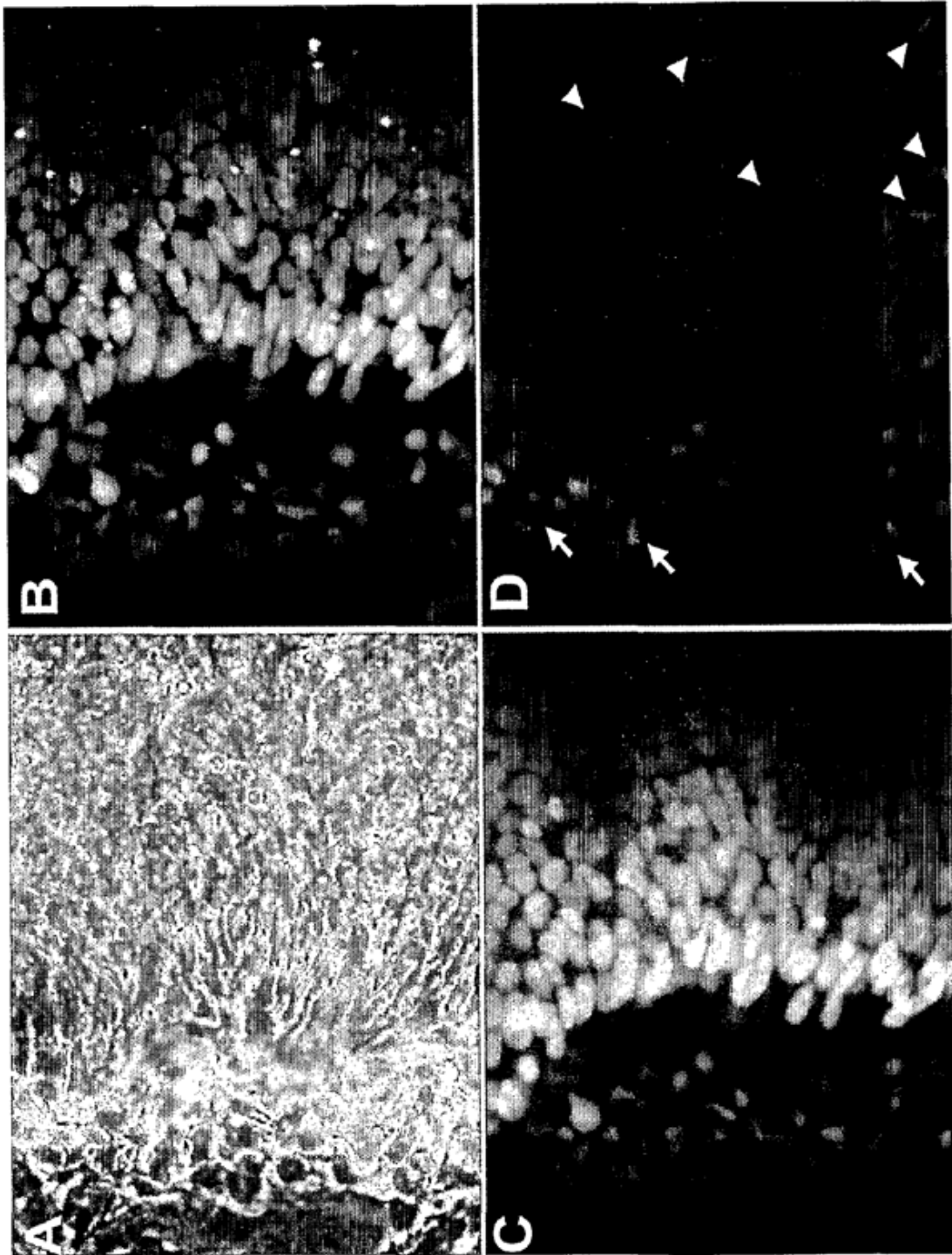


Figura 25

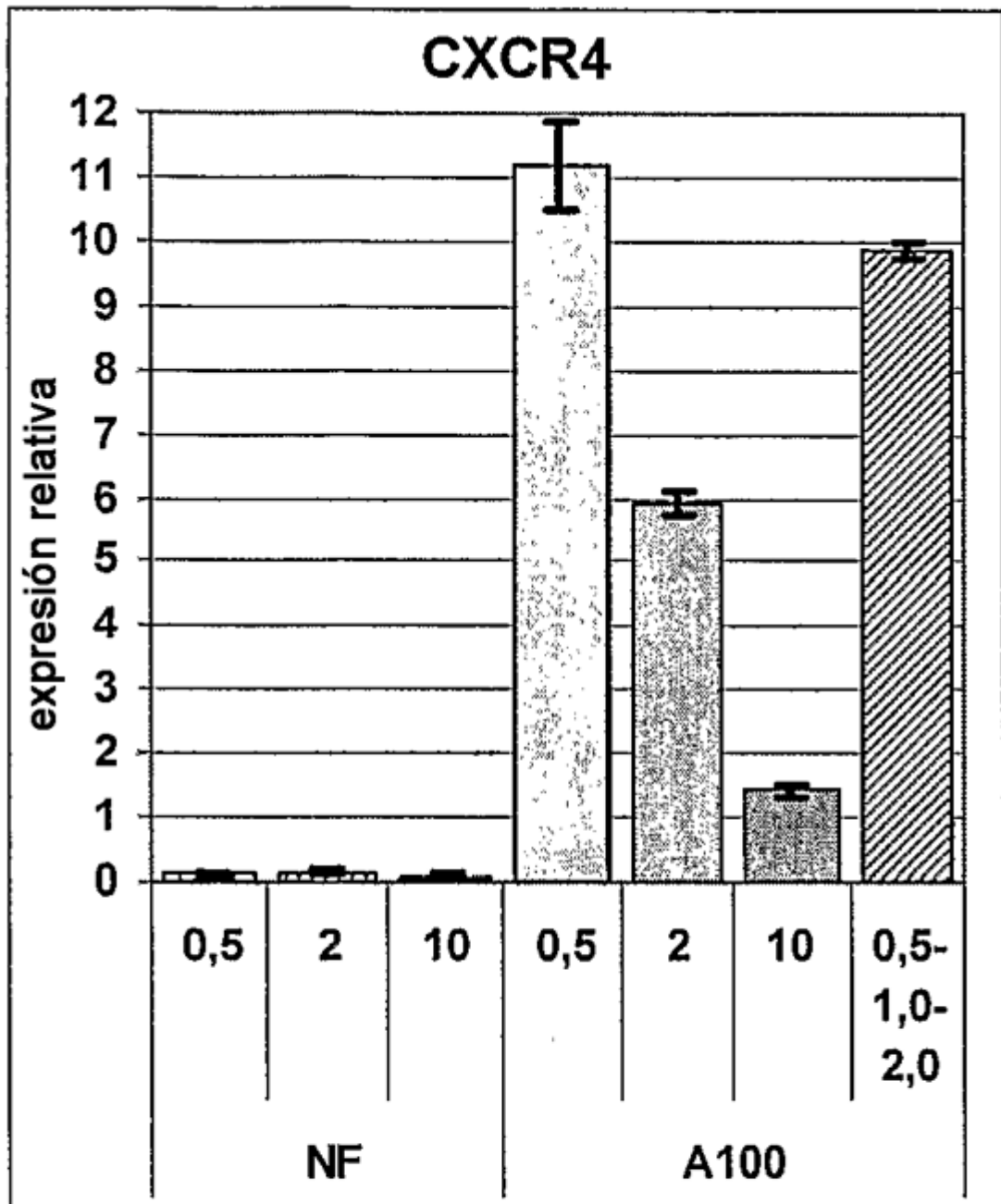


Figura 26

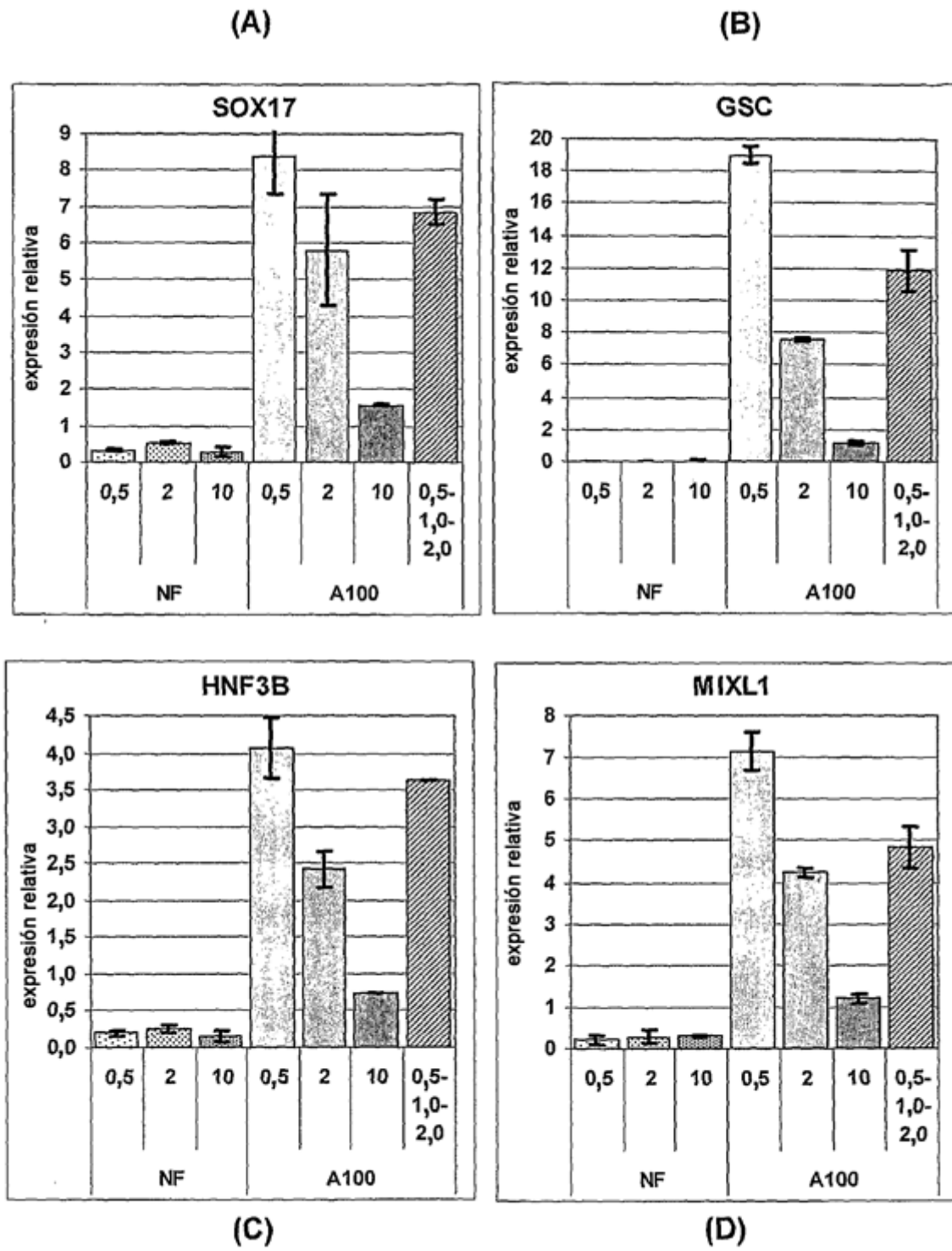


Figura 27

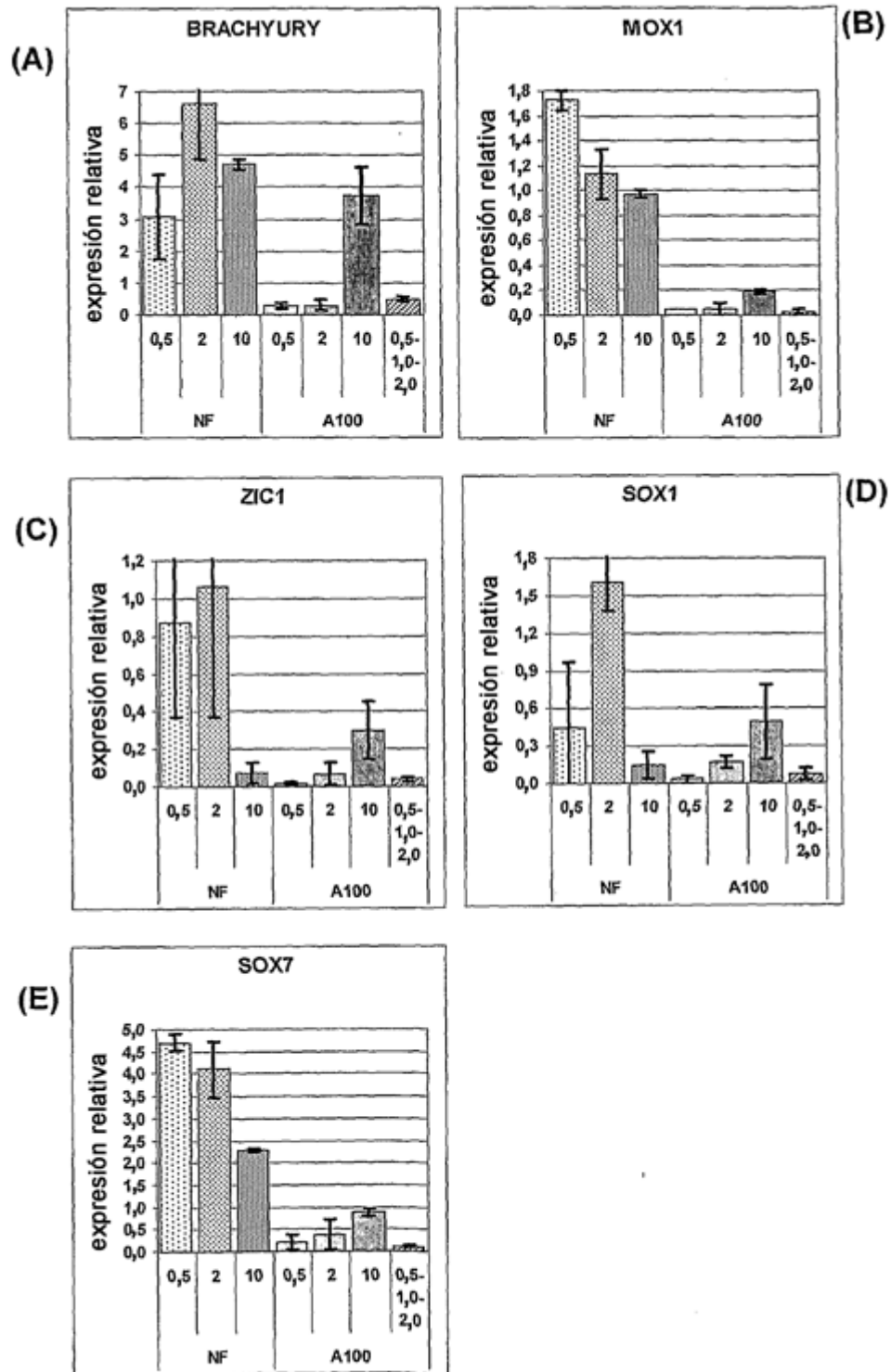


Figura 28

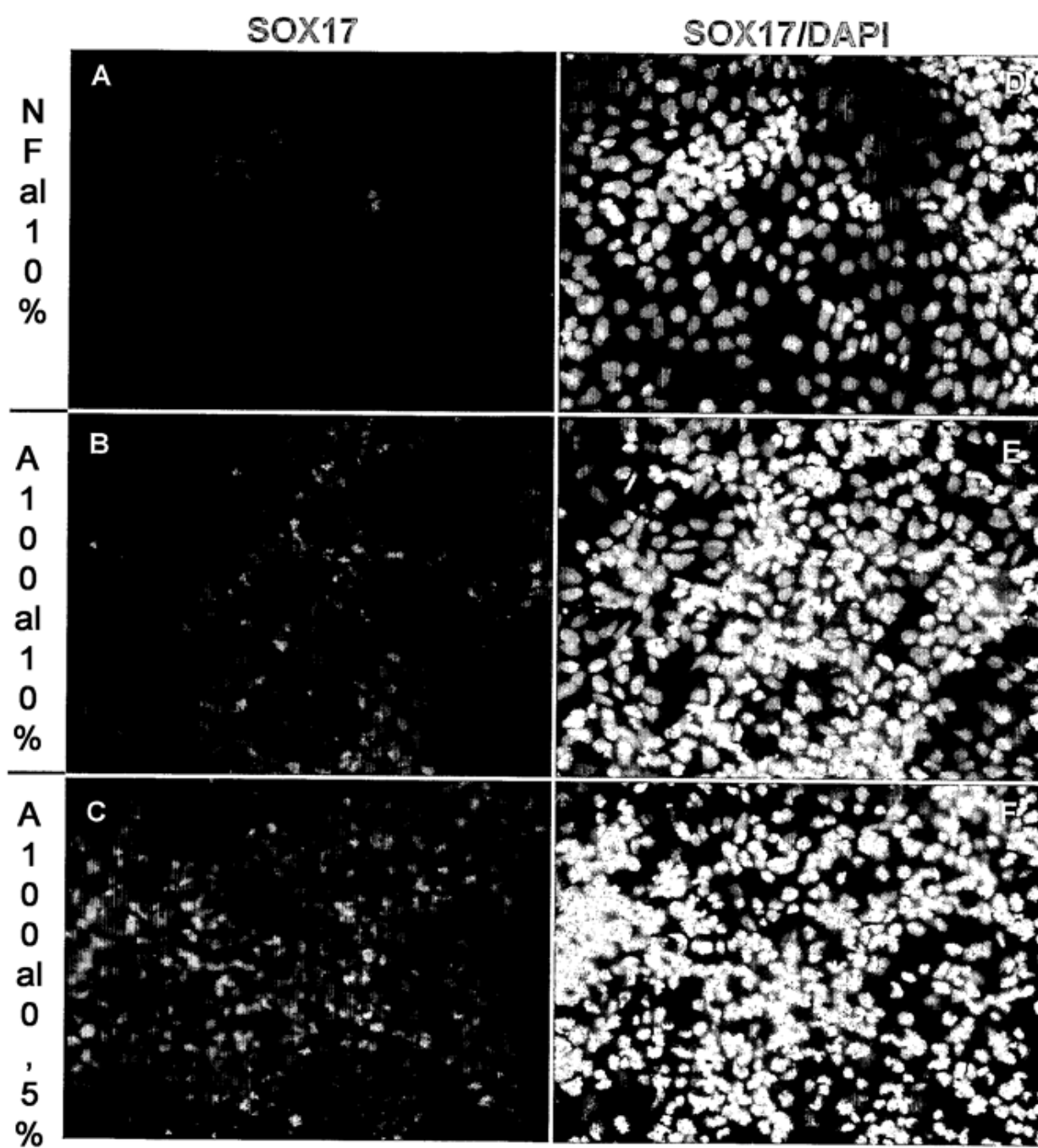


Figura 29

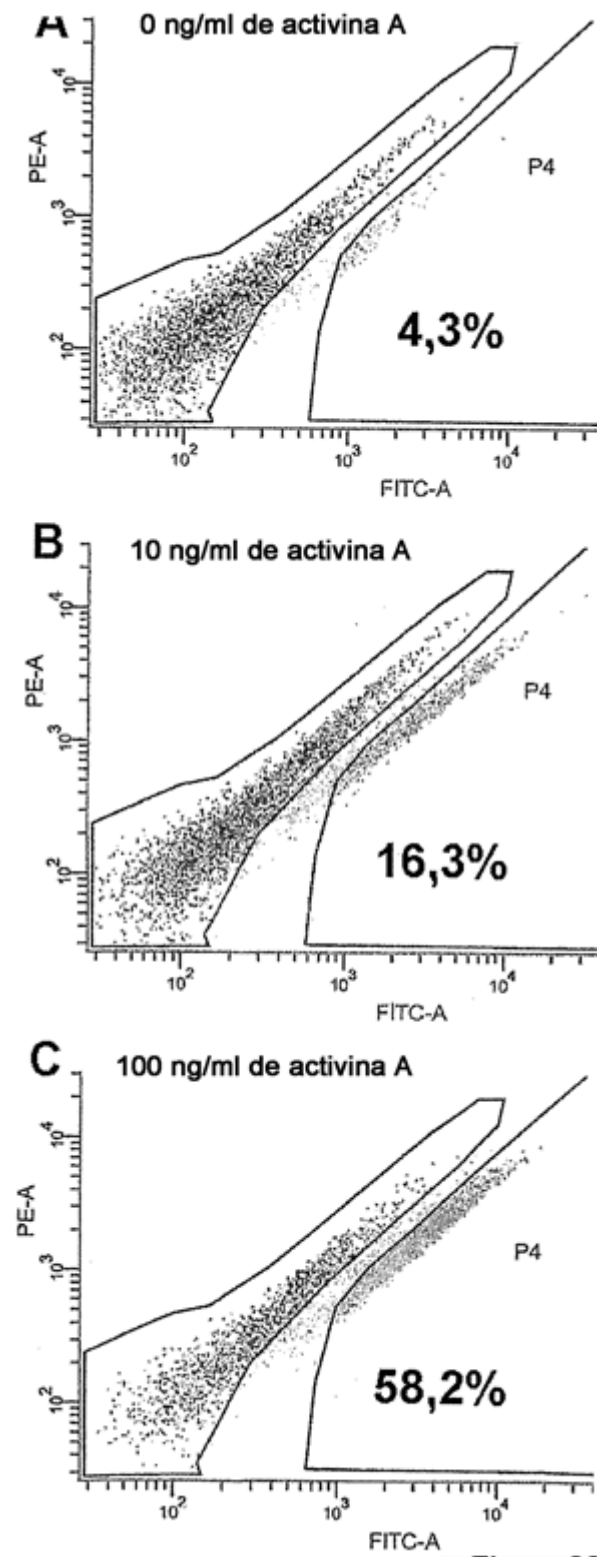


Figura 30

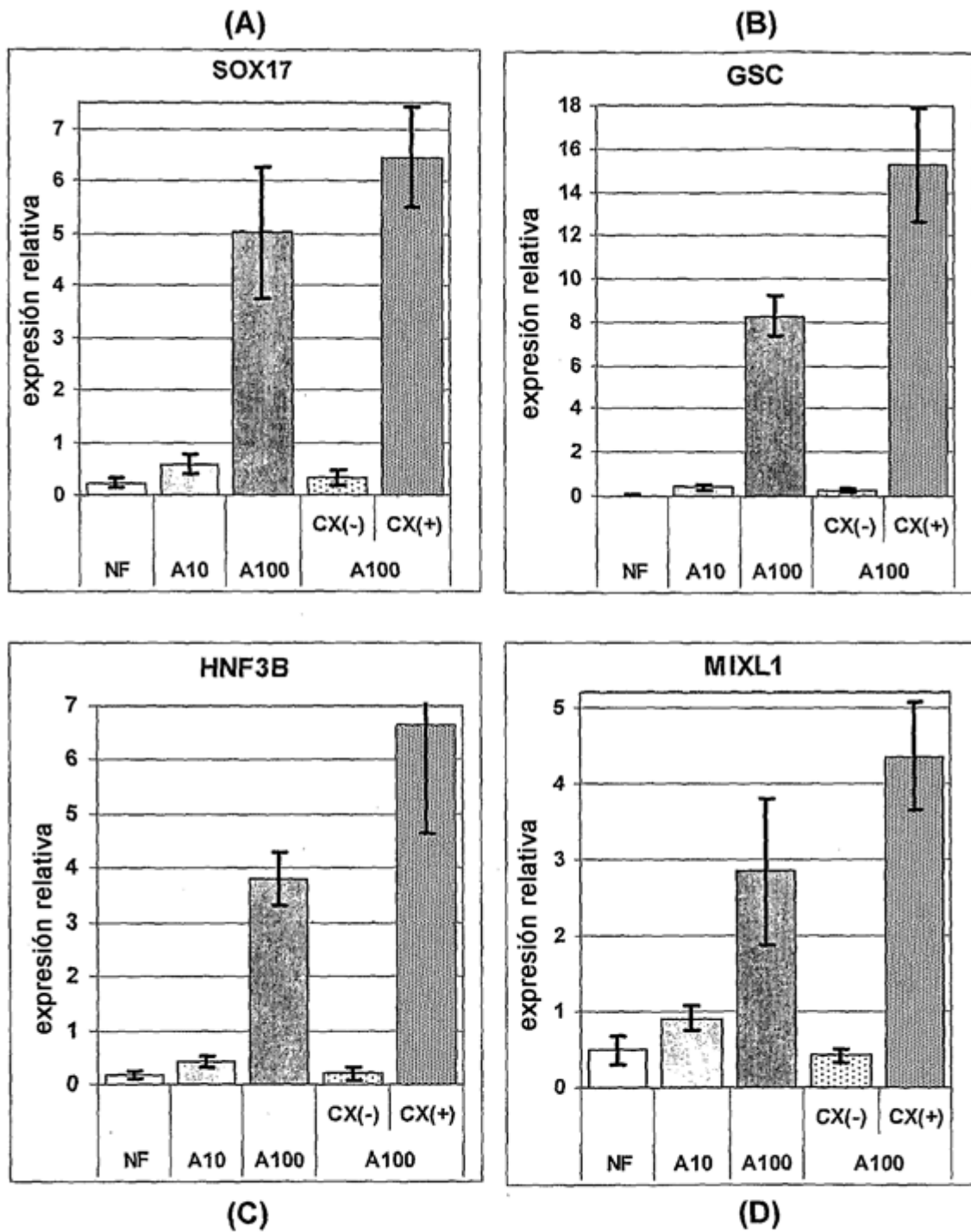


Figura 31

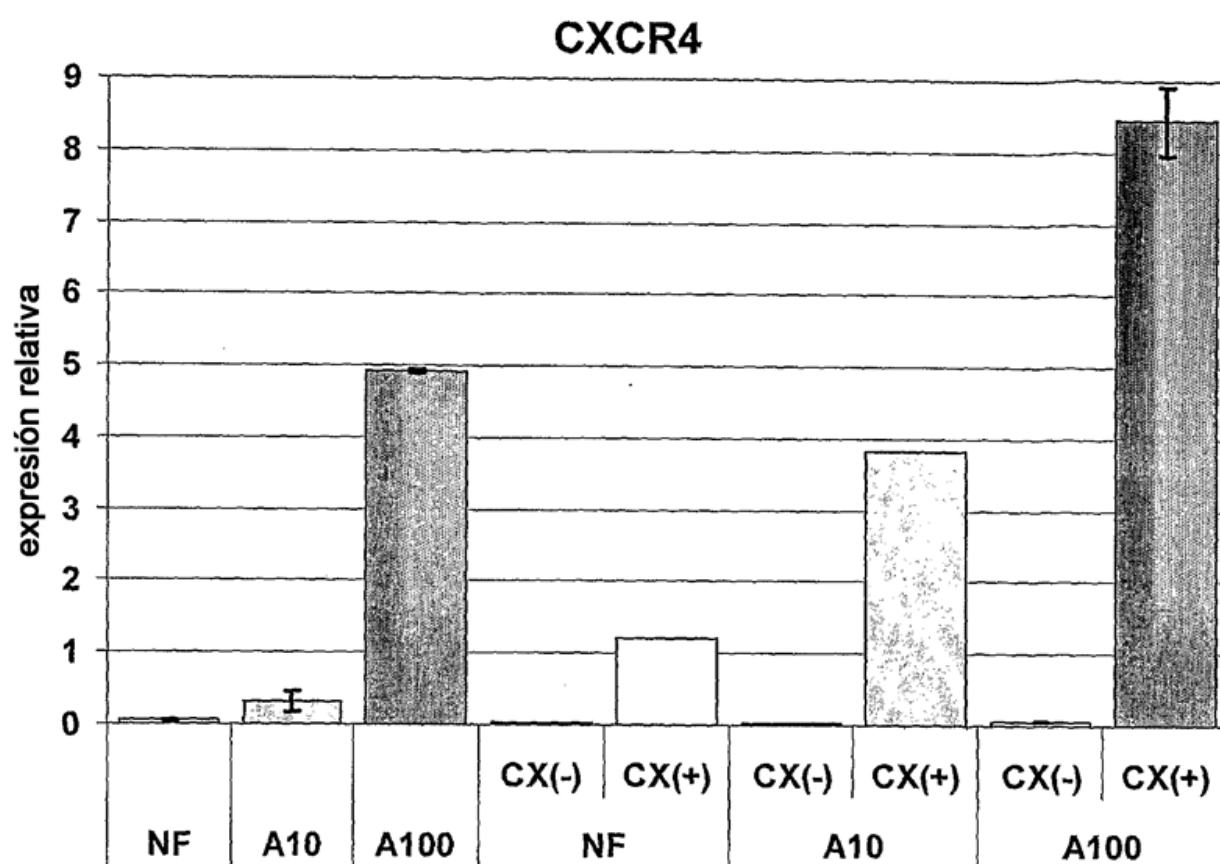


Figura 32

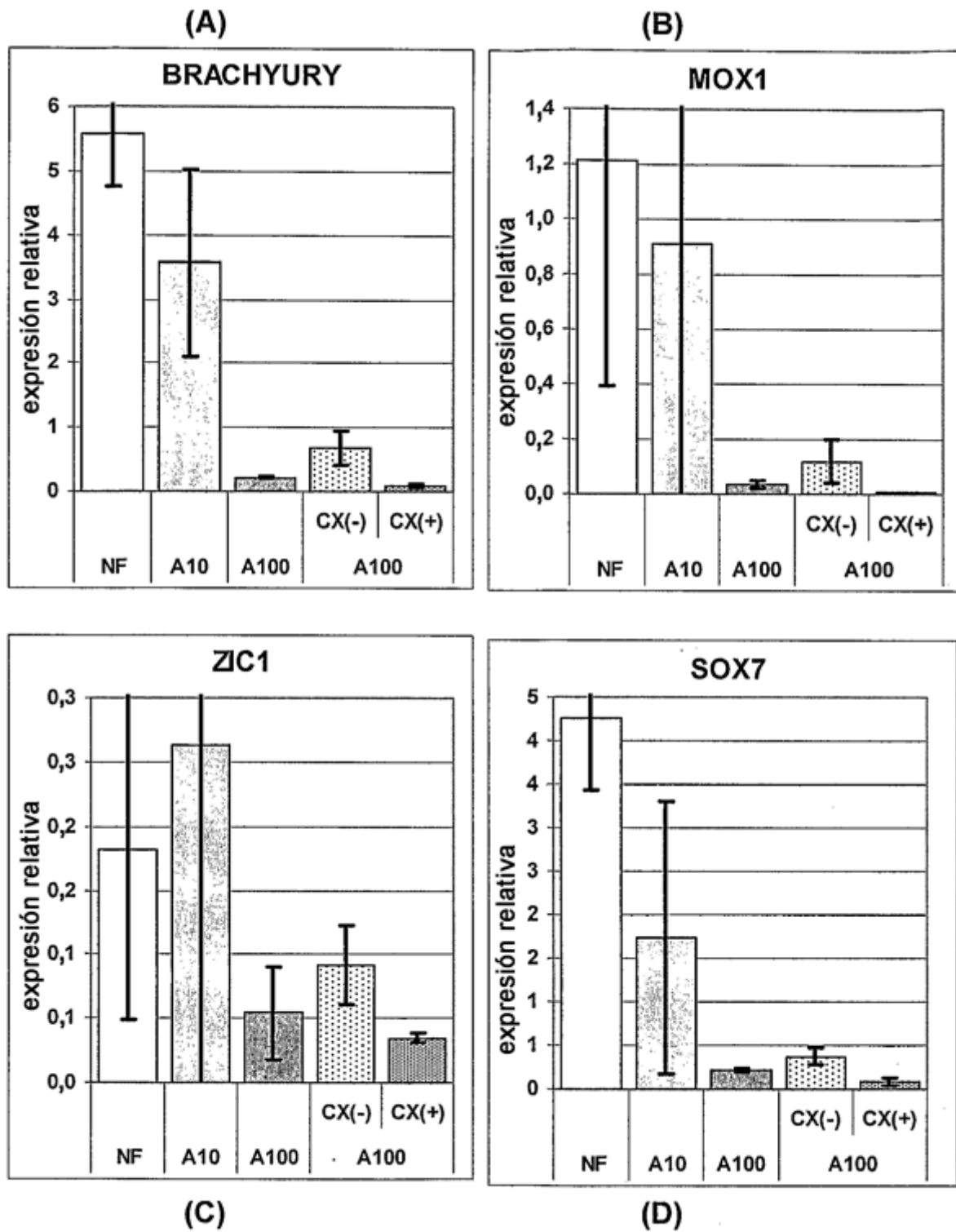


Figura 33

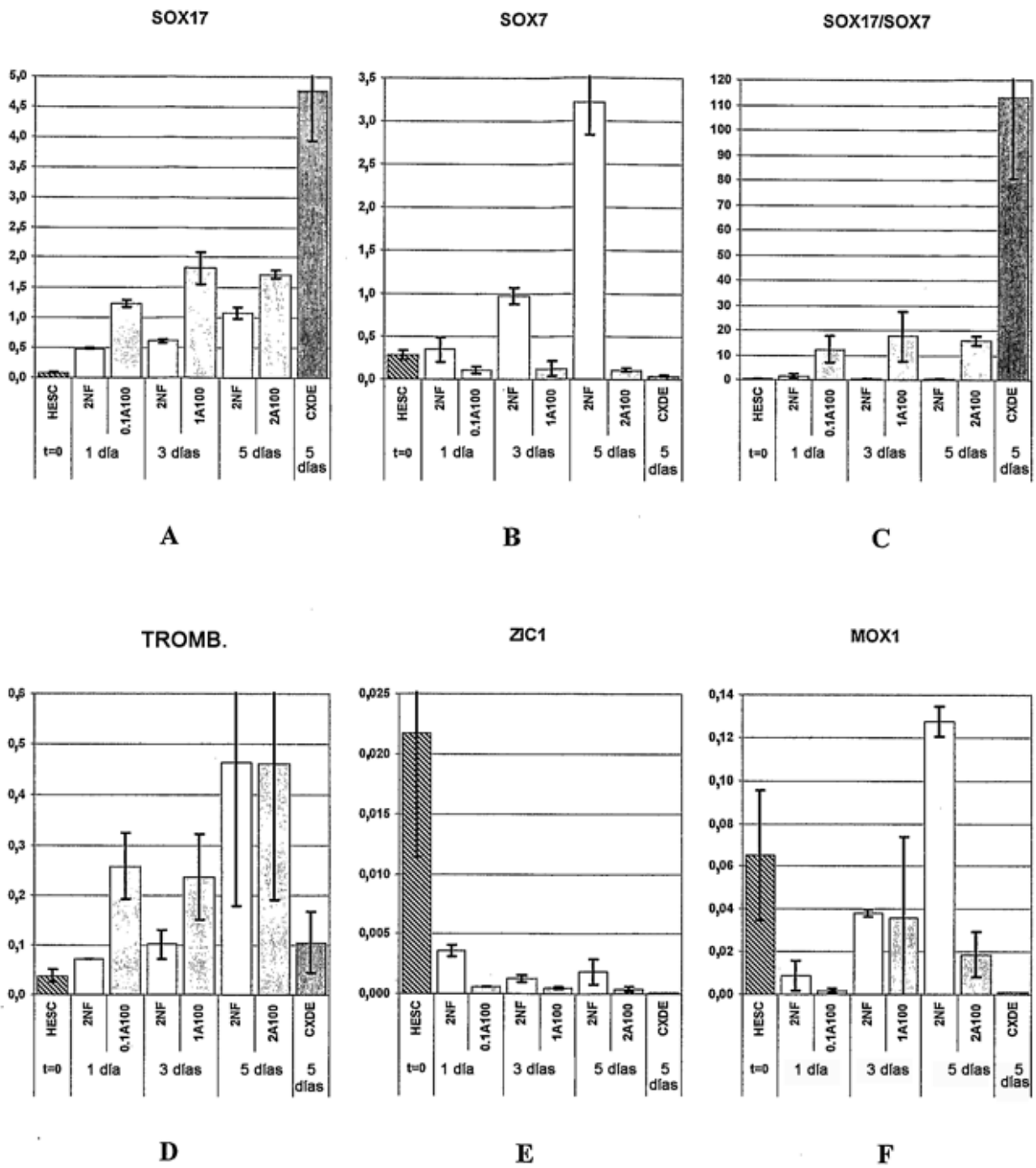


Figura 34

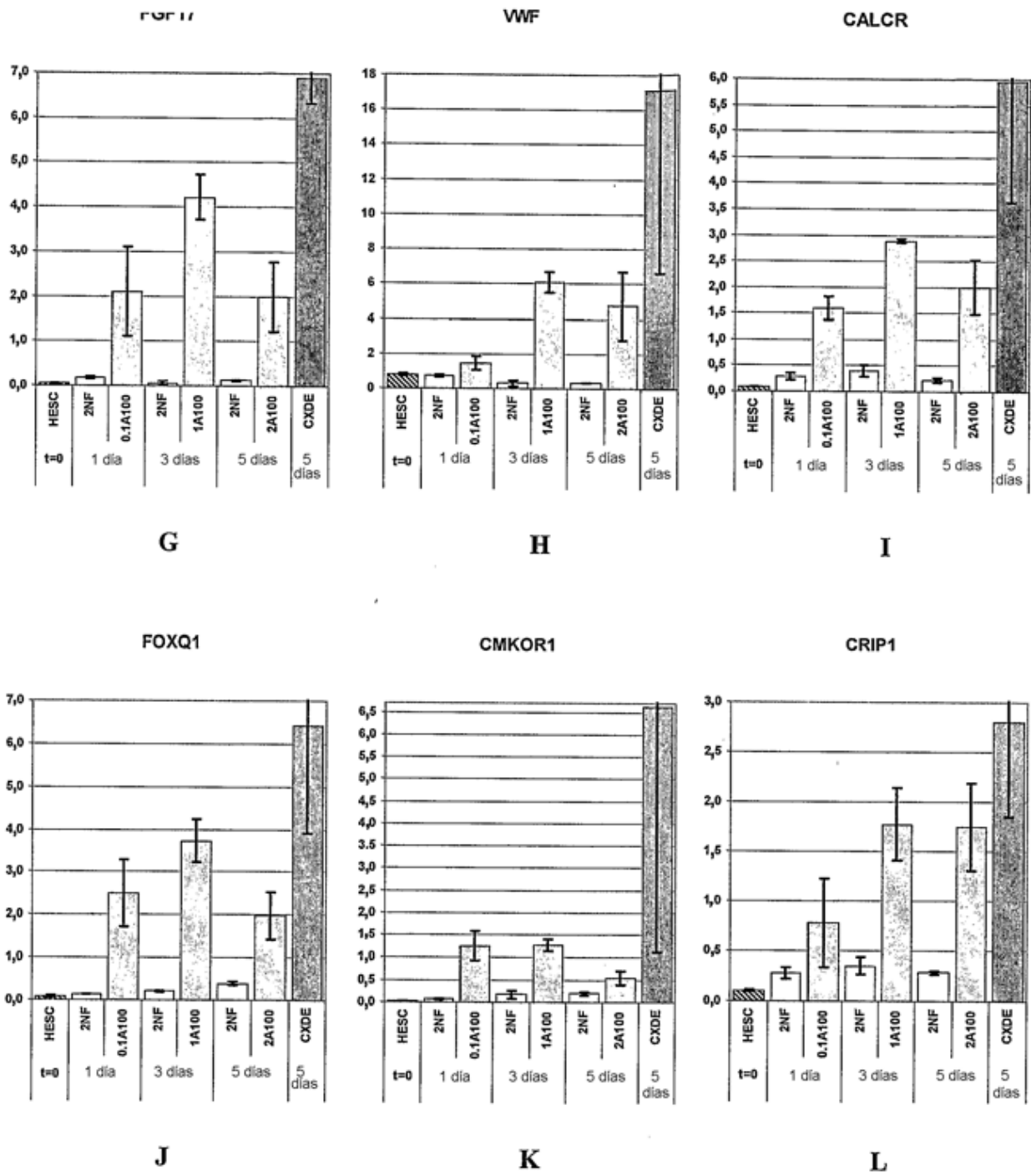
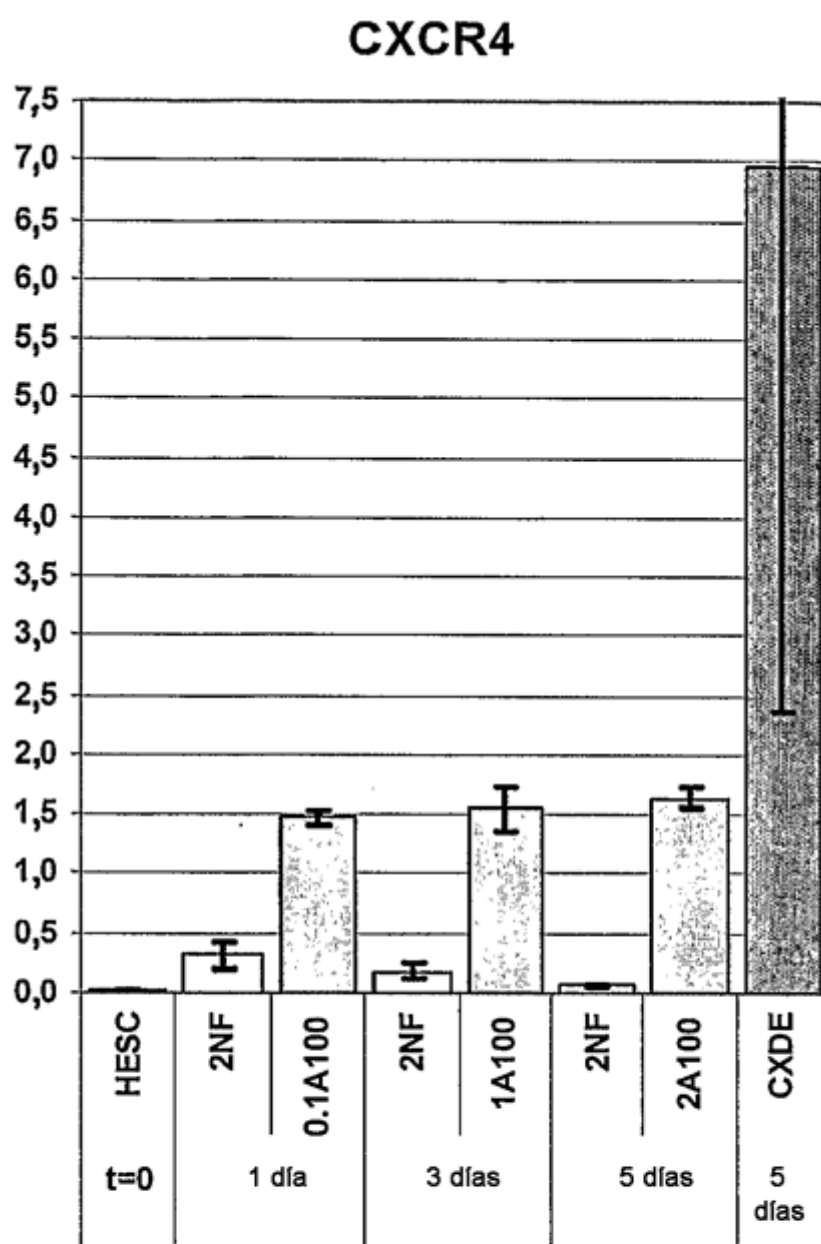


Figura 34



M

Figura 34

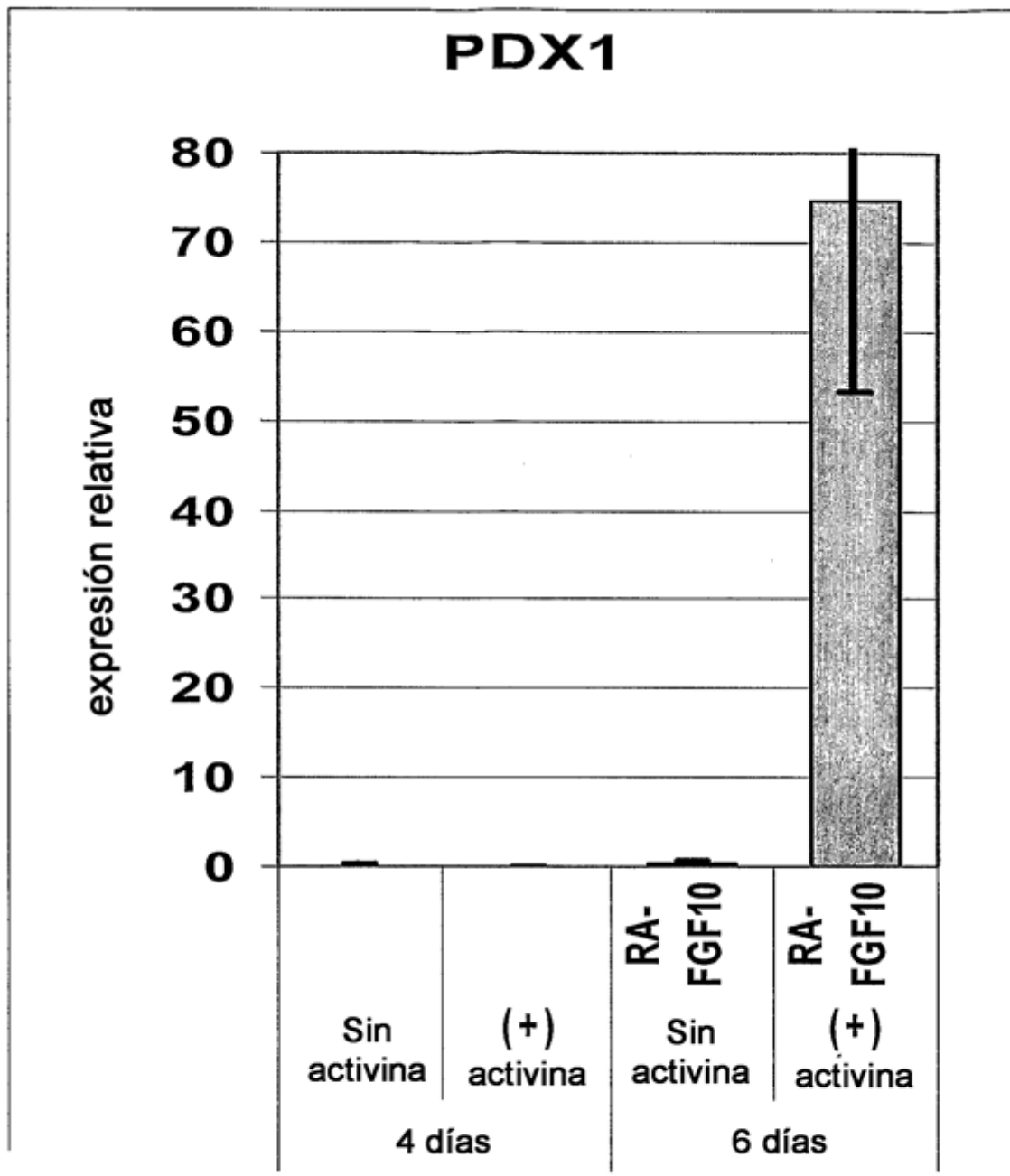


Figura 35

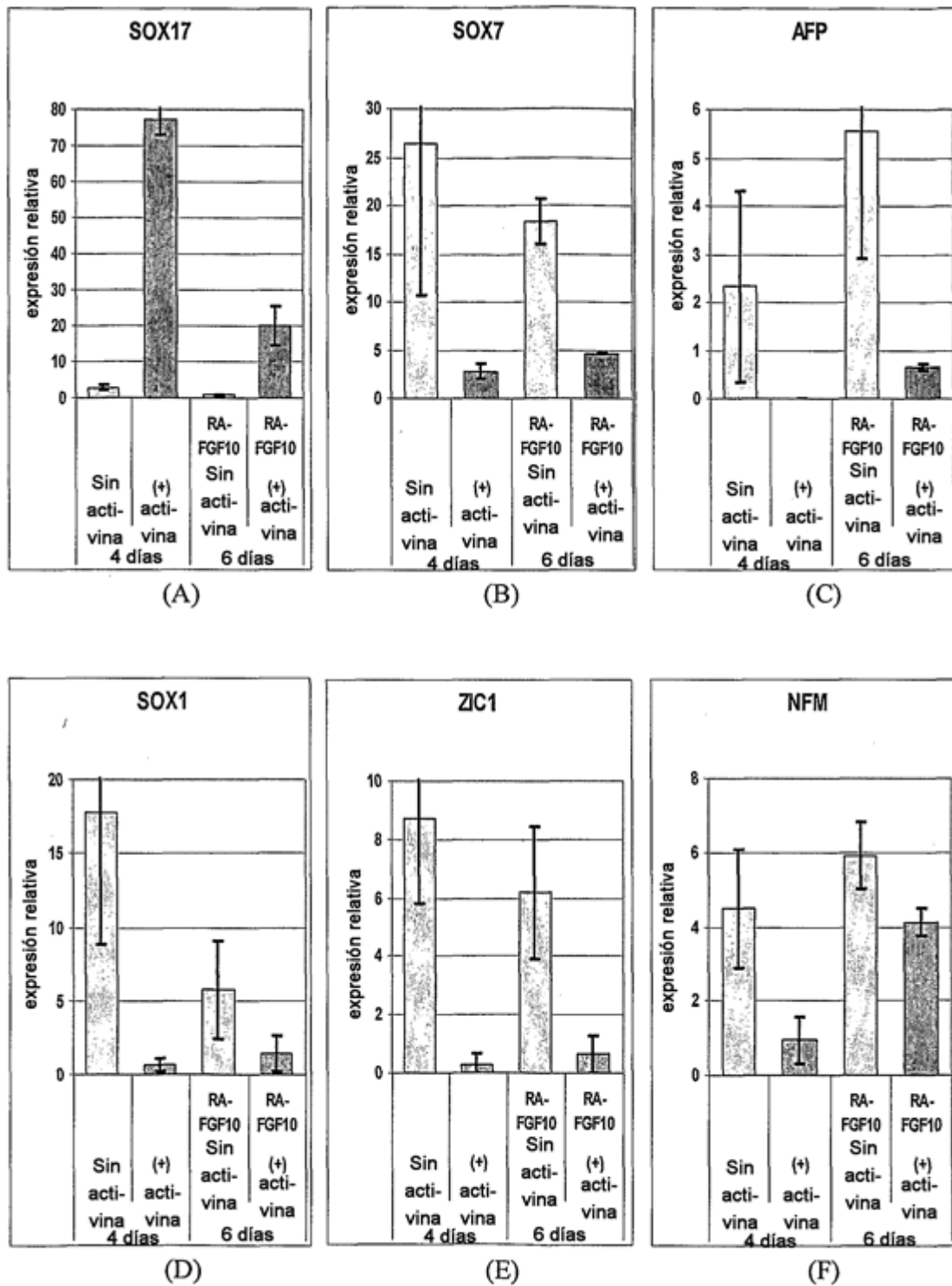


Figura 36

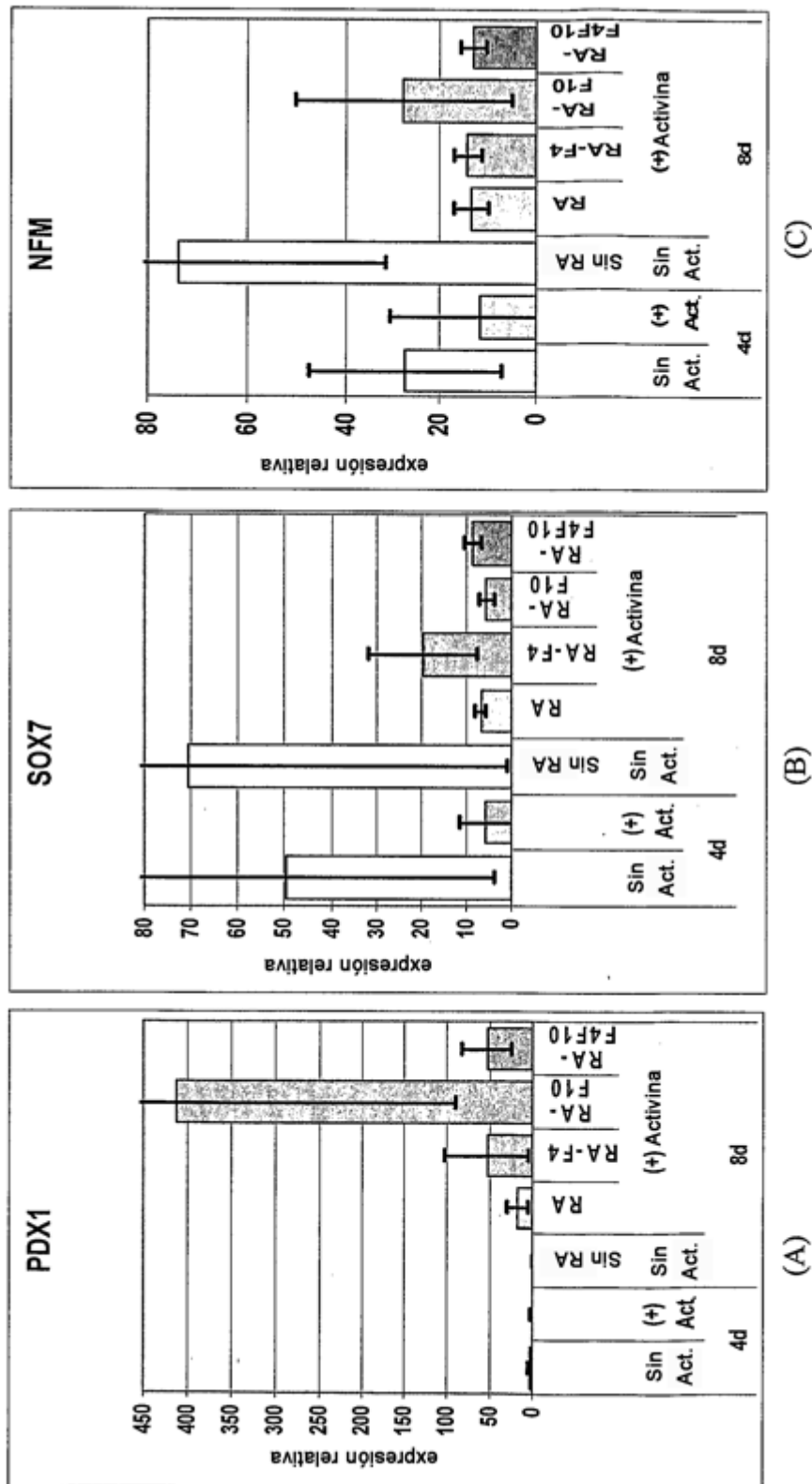
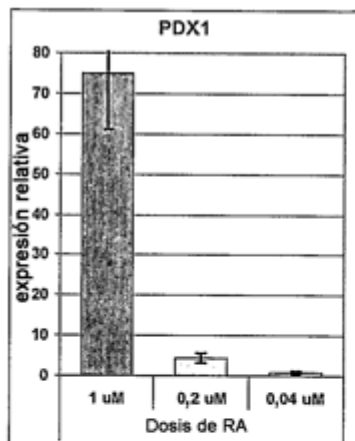
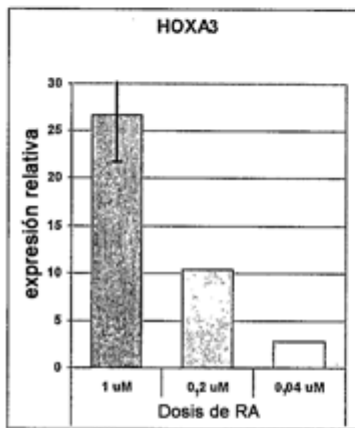


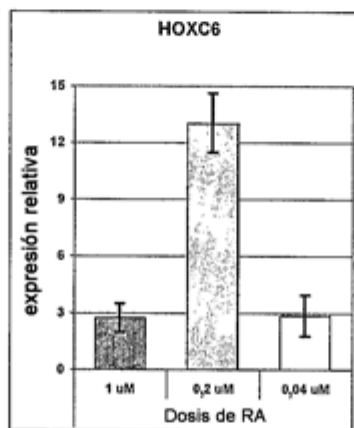
Figura 37



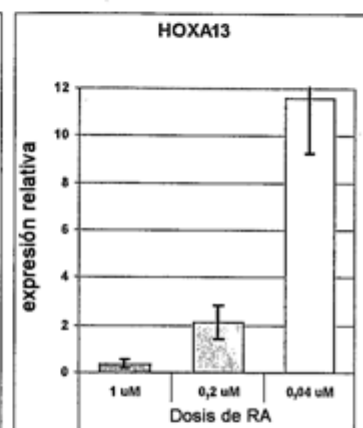
(A)



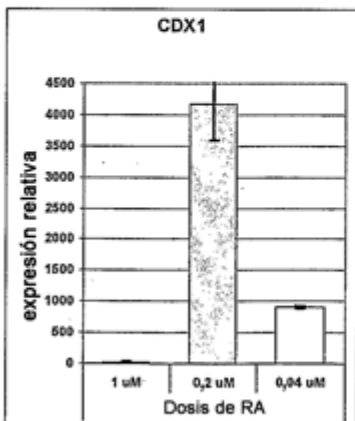
(B)



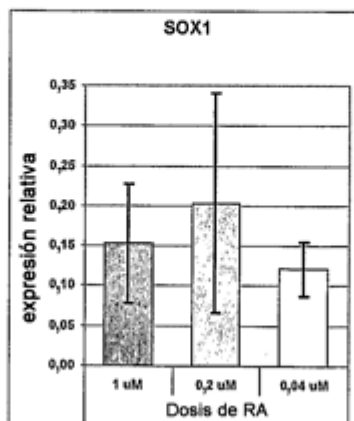
(C)



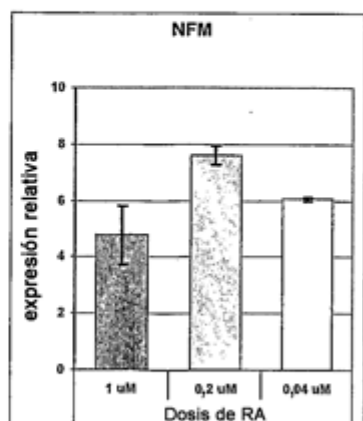
(D)



(E)



(F)



(G)

Figura 38

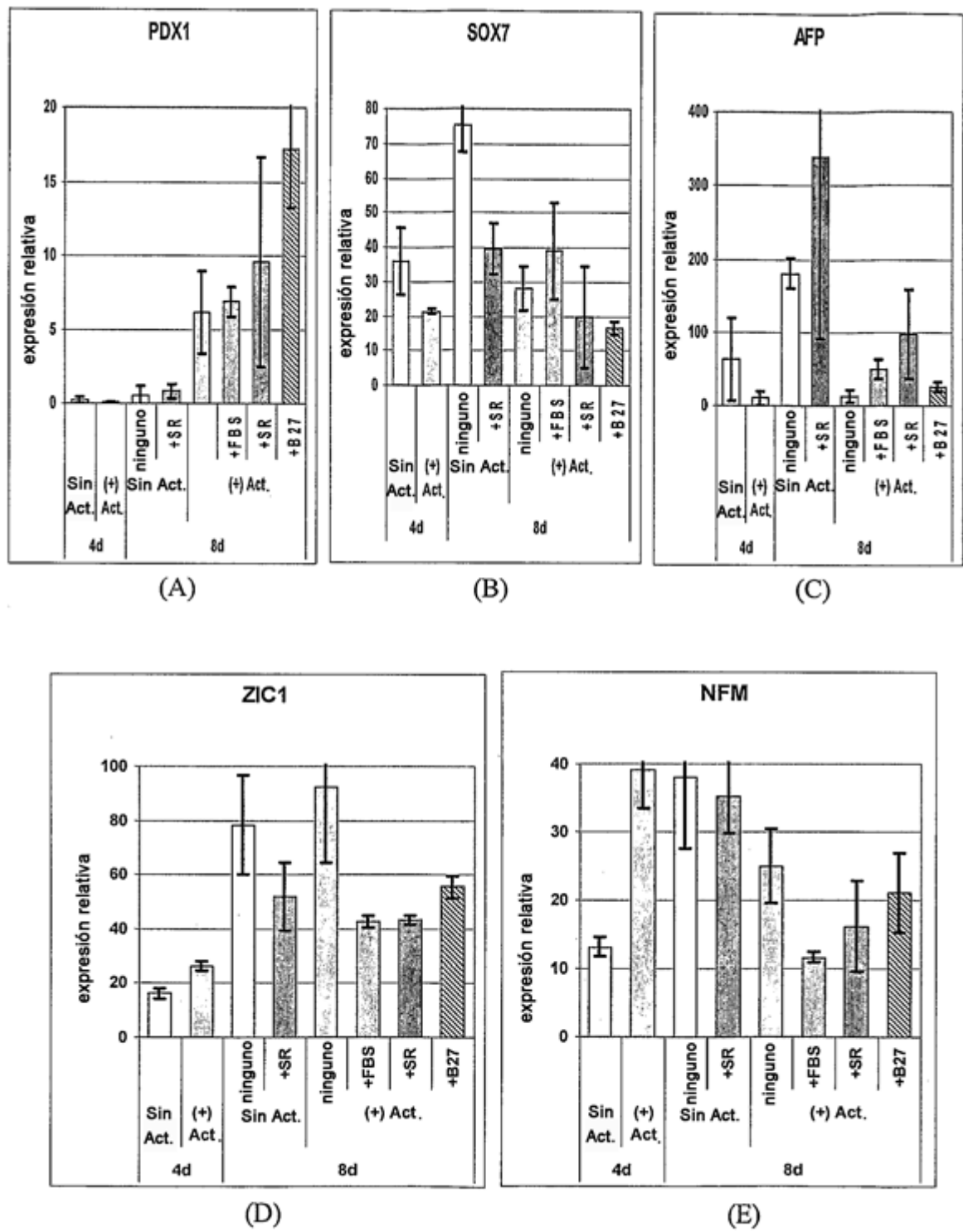
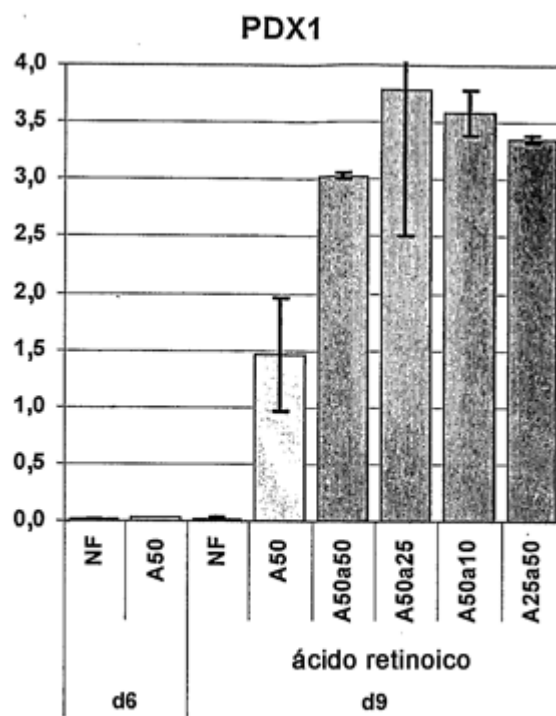
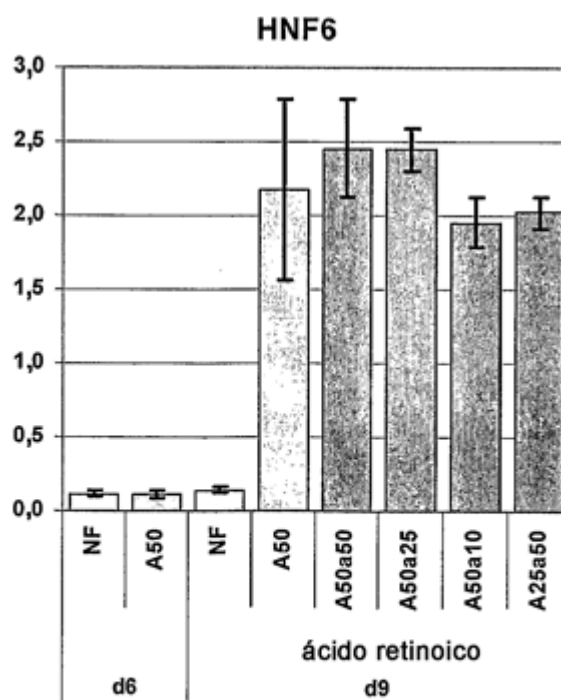


Figura 39



(A)



(B)

Figura 40

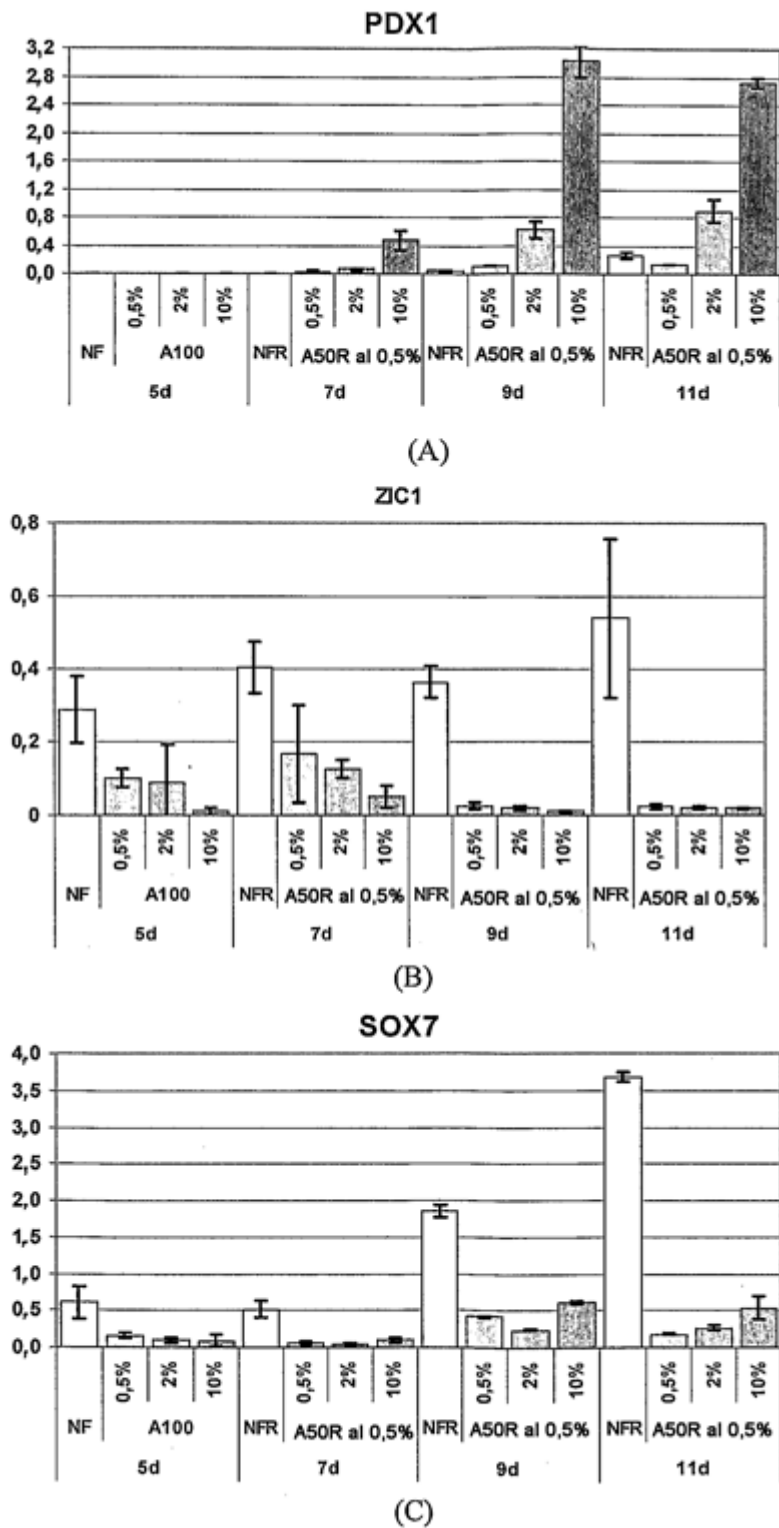
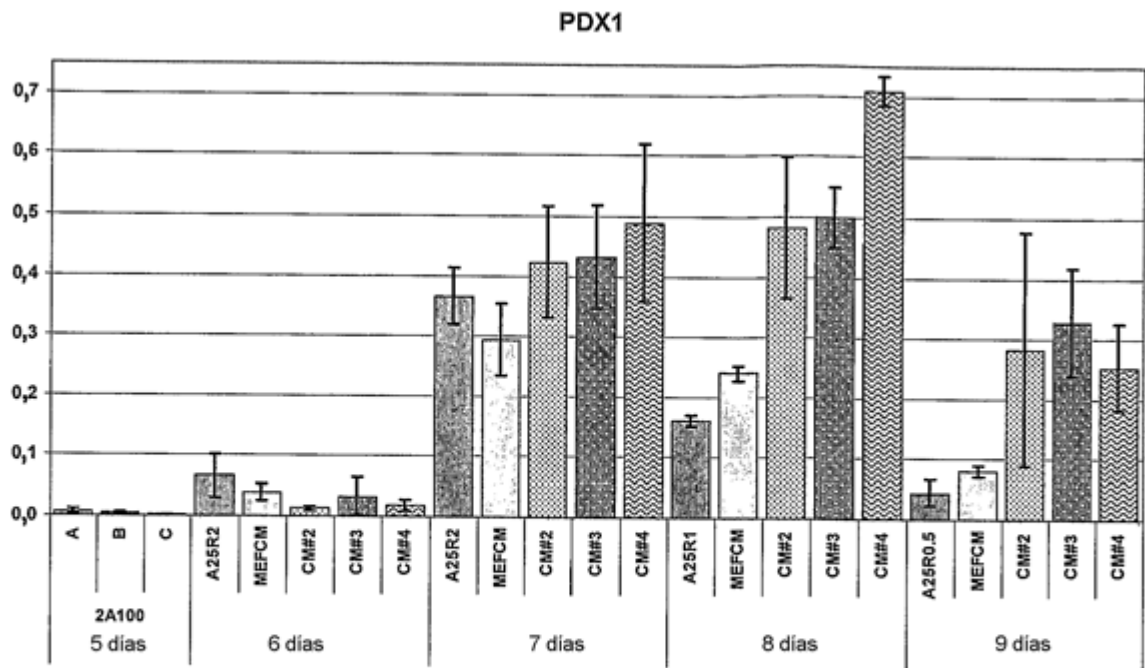
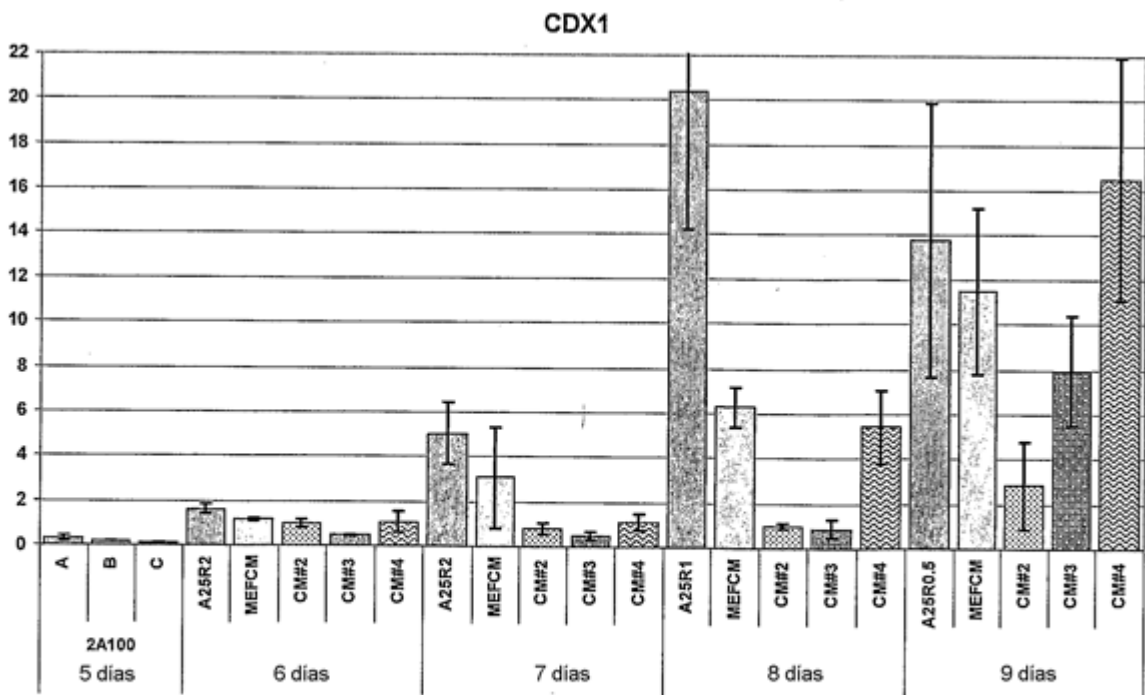


Figura 41



(A)



(B)

Figura 42

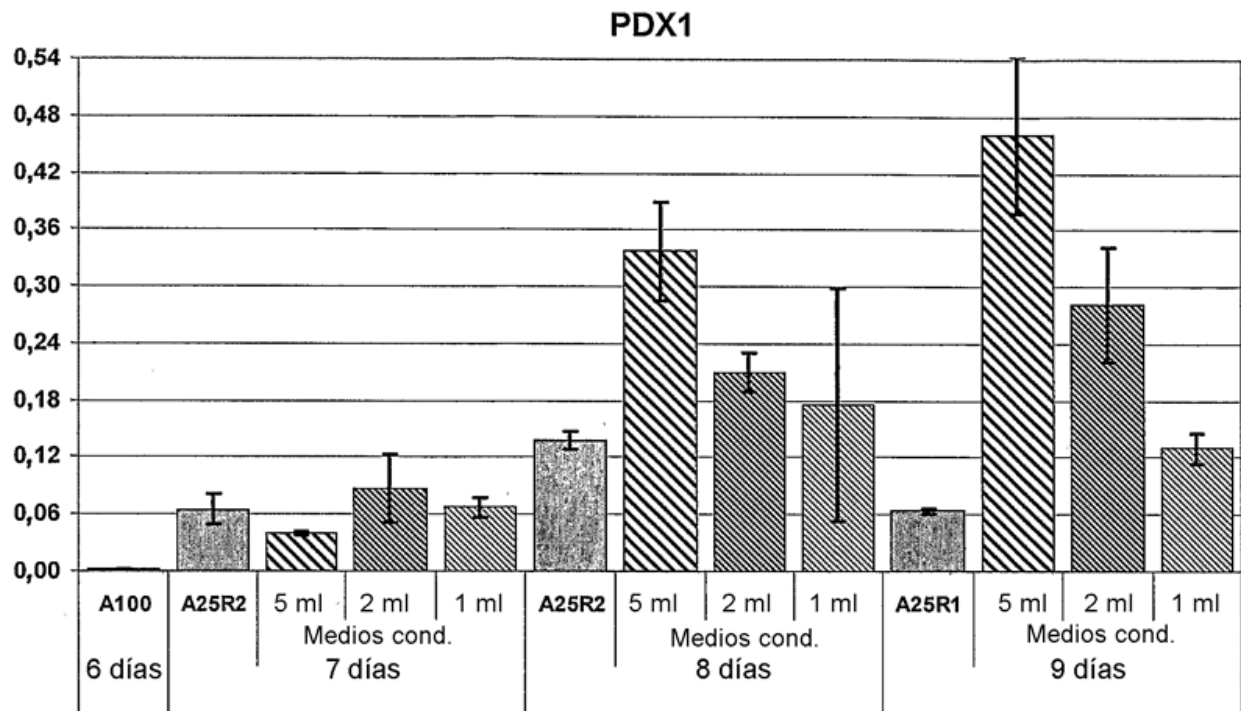


Figura 43

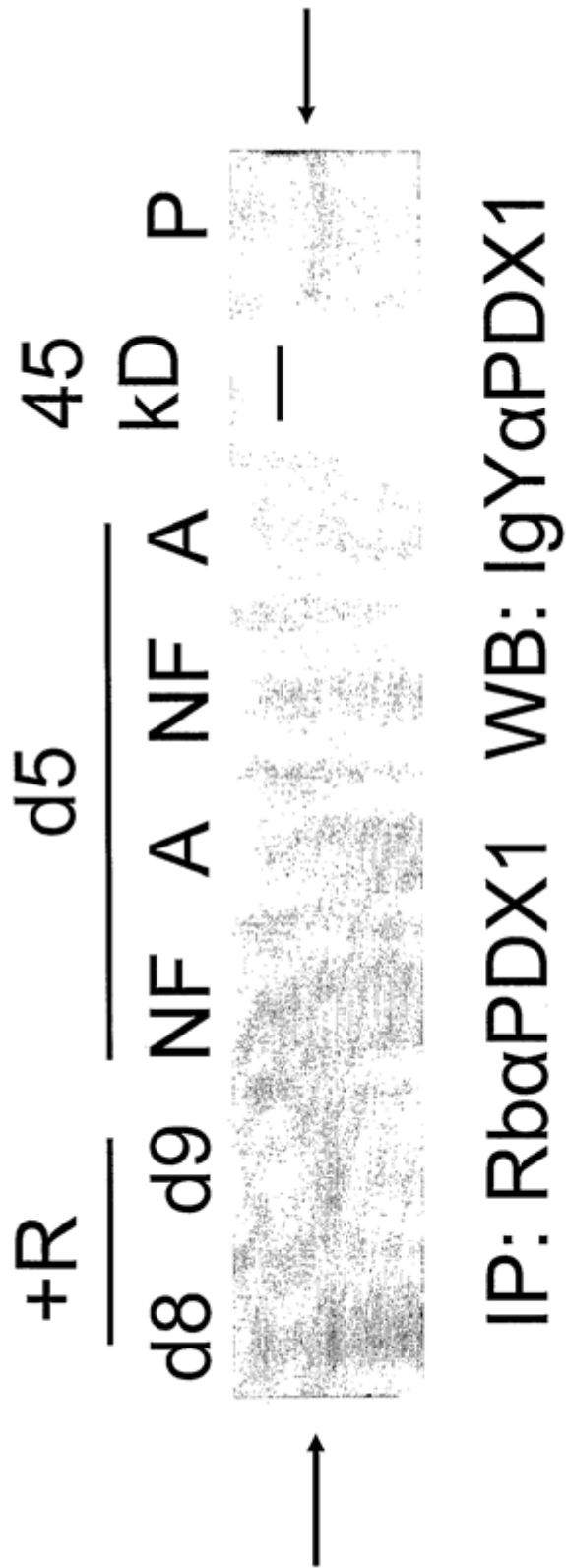


Figura 44

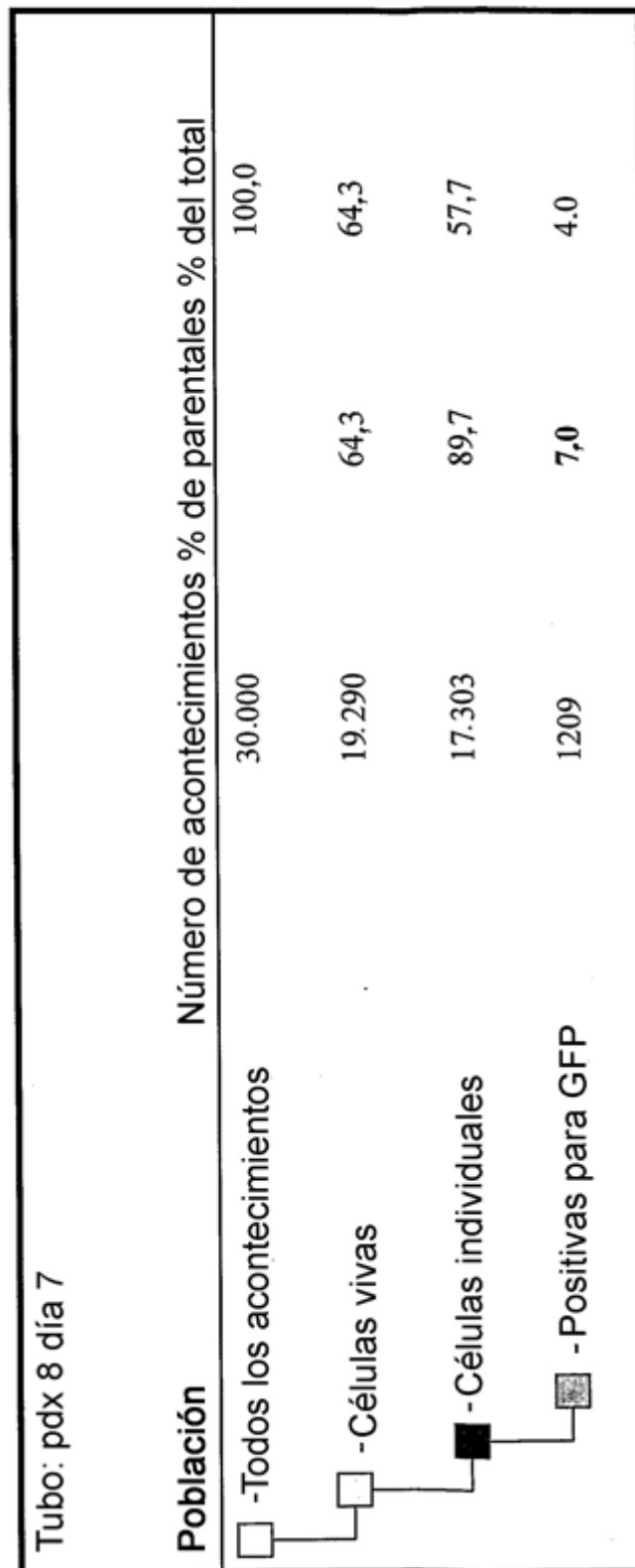


Figura 45

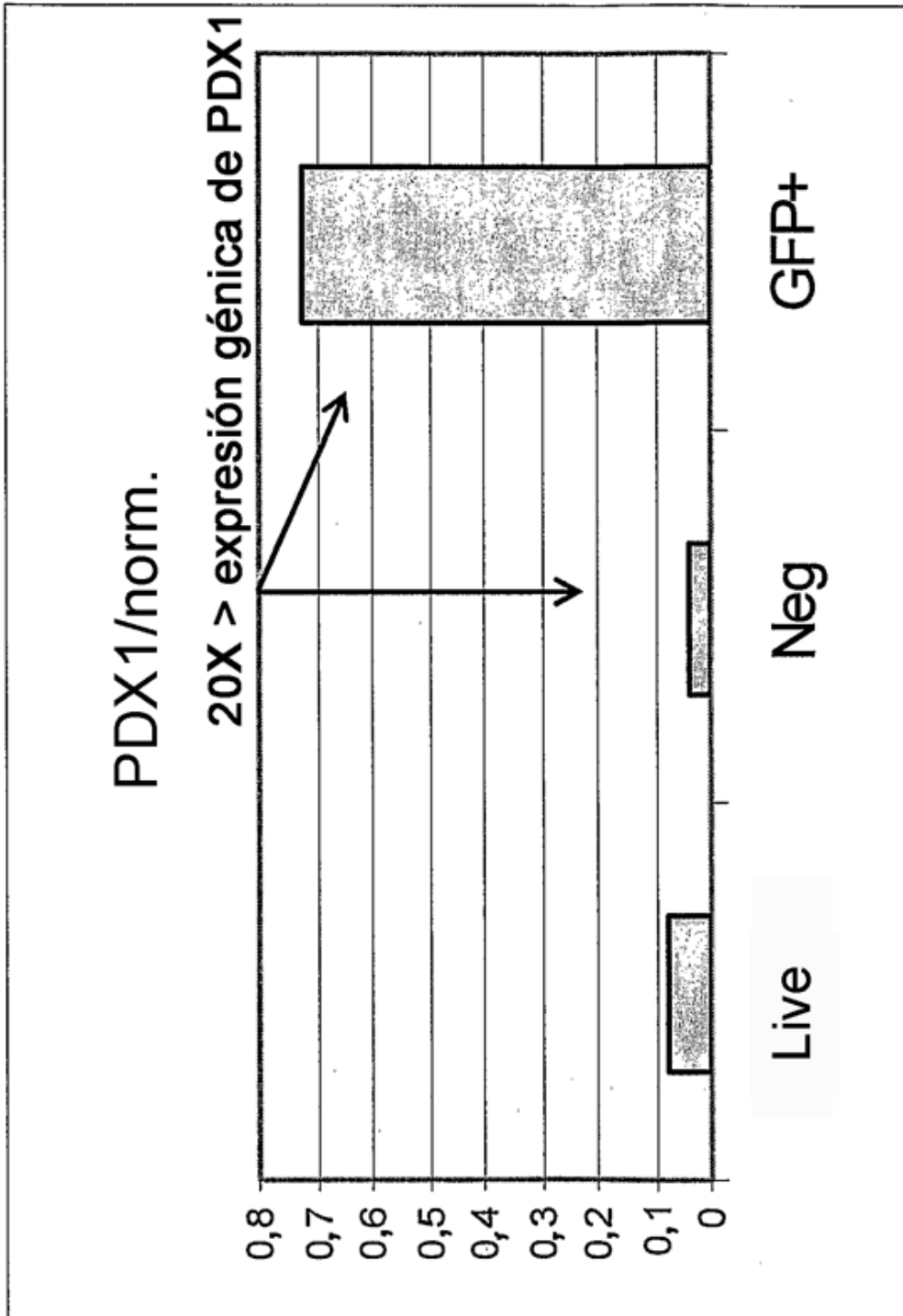


Figura 46

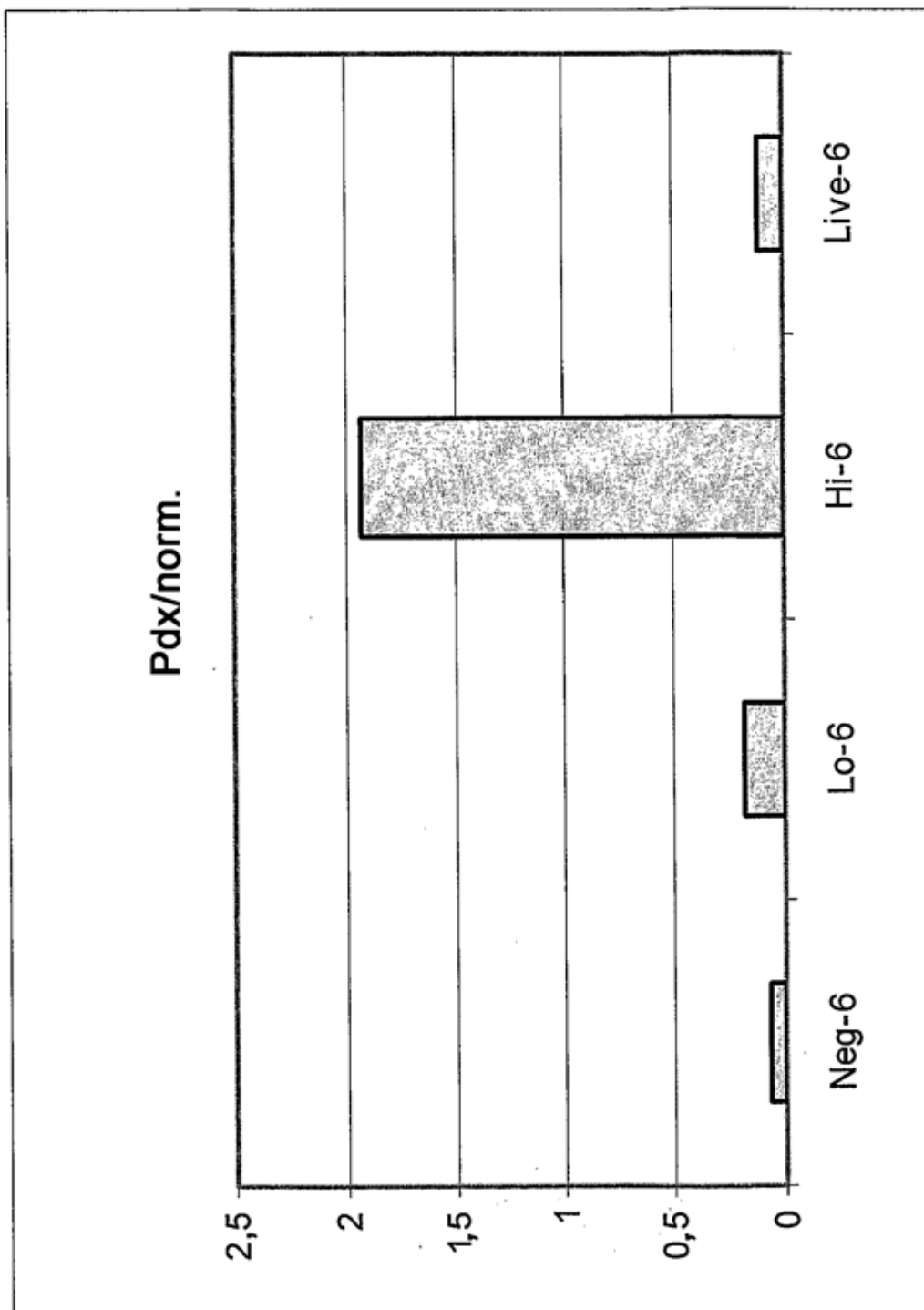


Figura 47



Figura 48

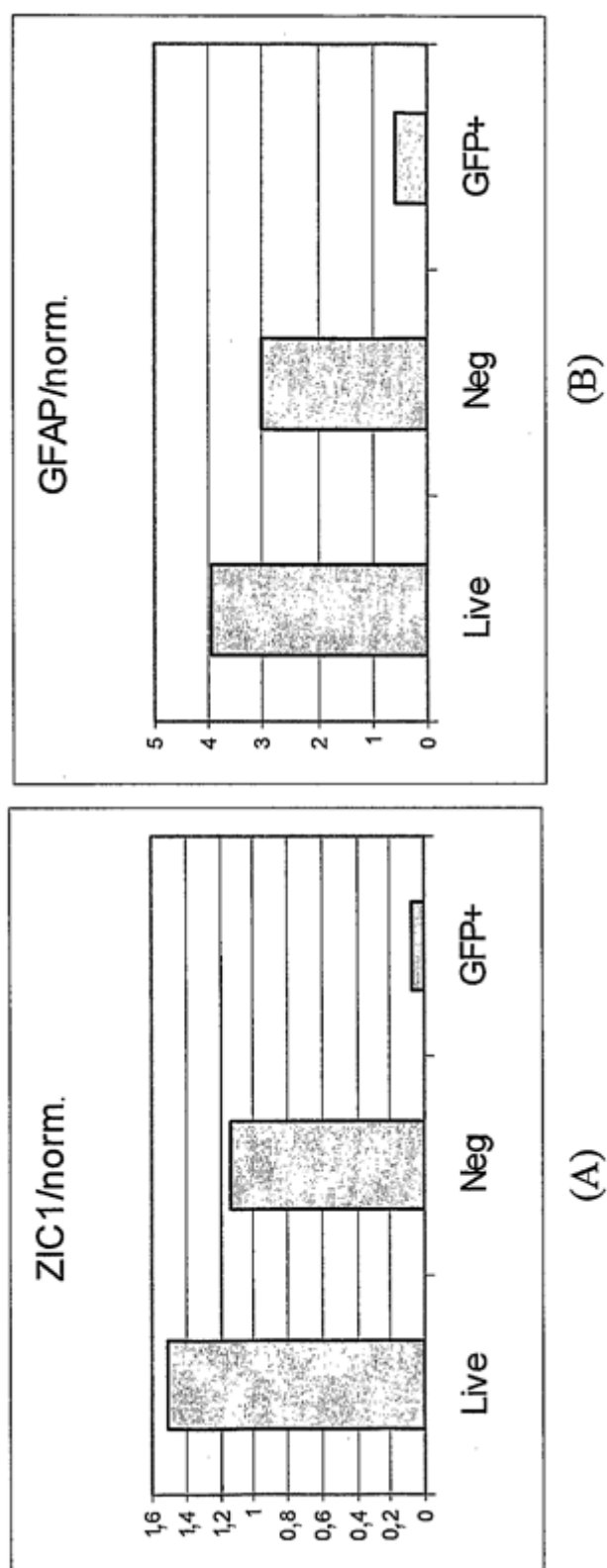


Figura 49

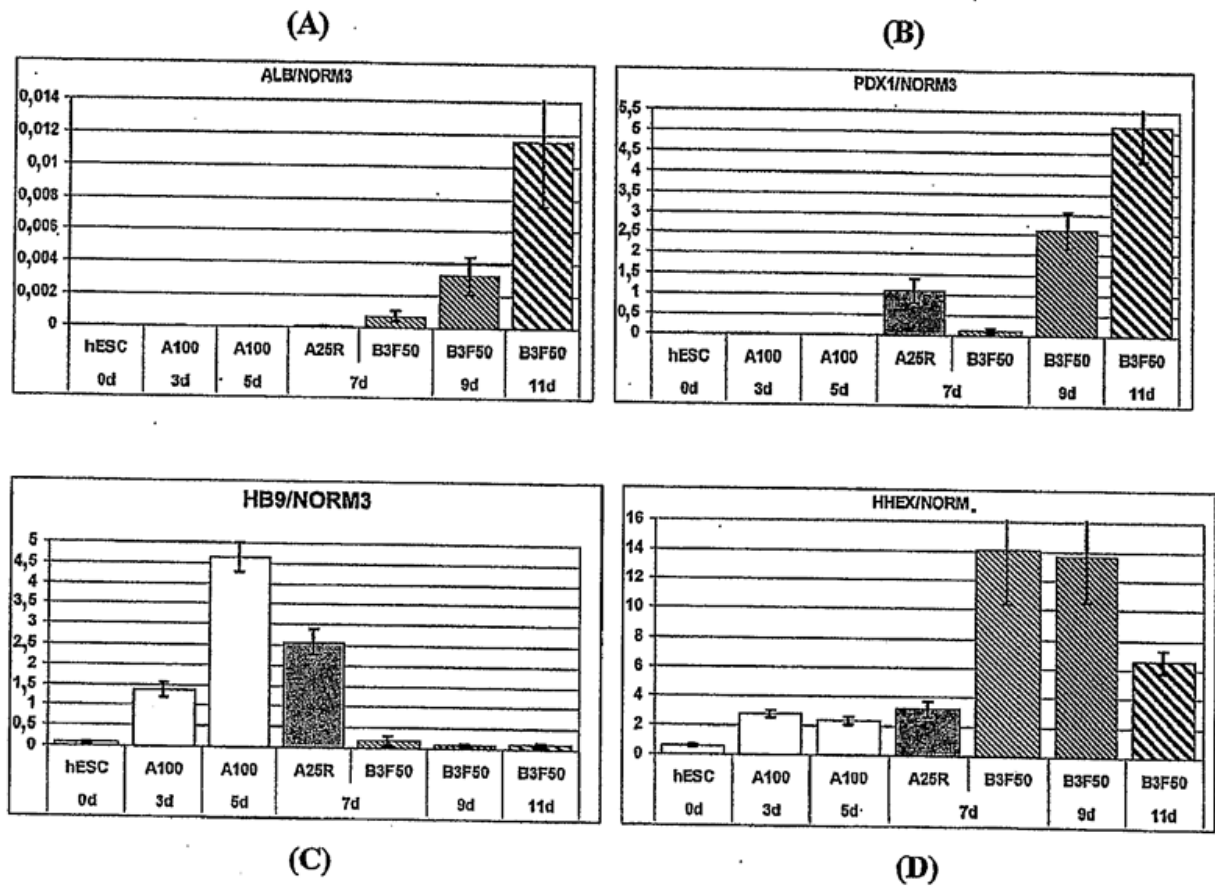
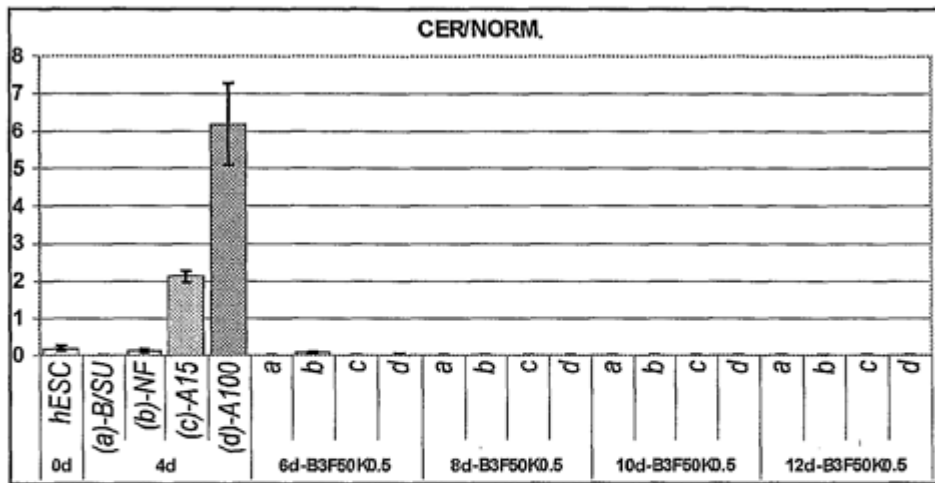


Figura 50

(A)



(B)

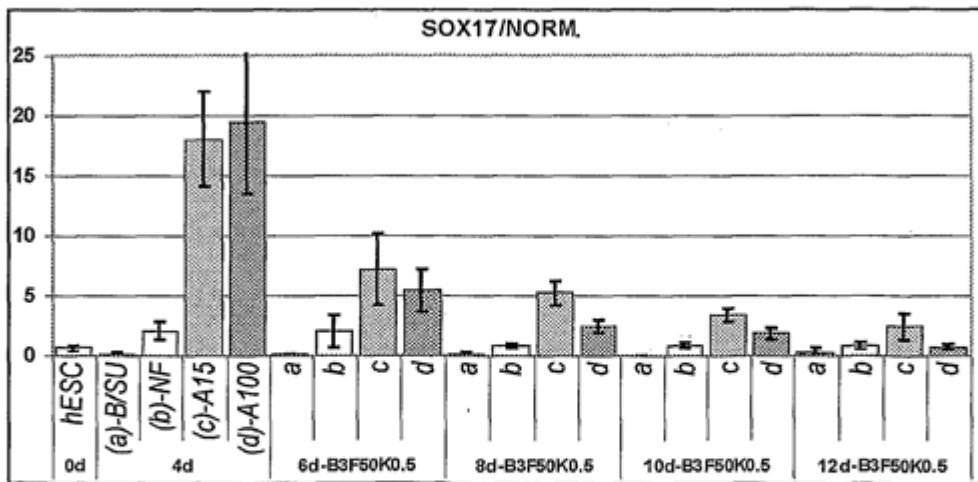
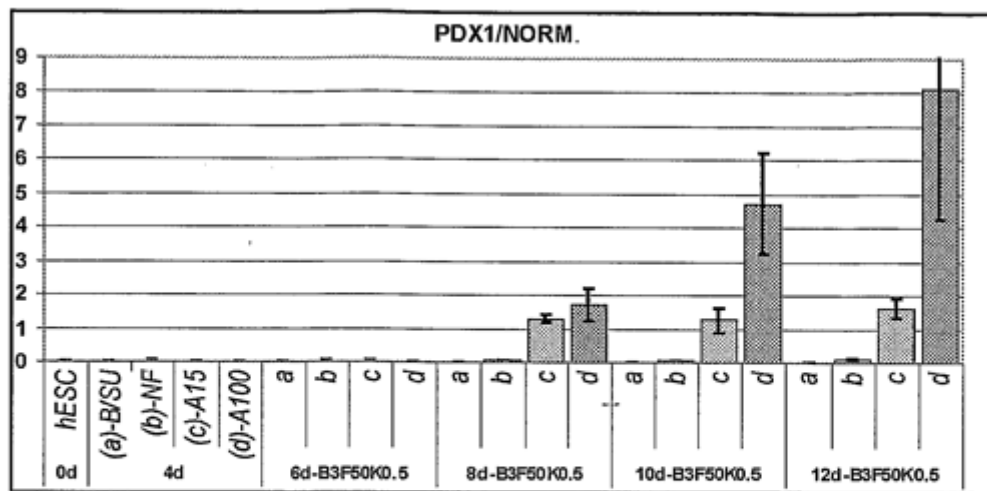


Figura 51

(C)



(D)

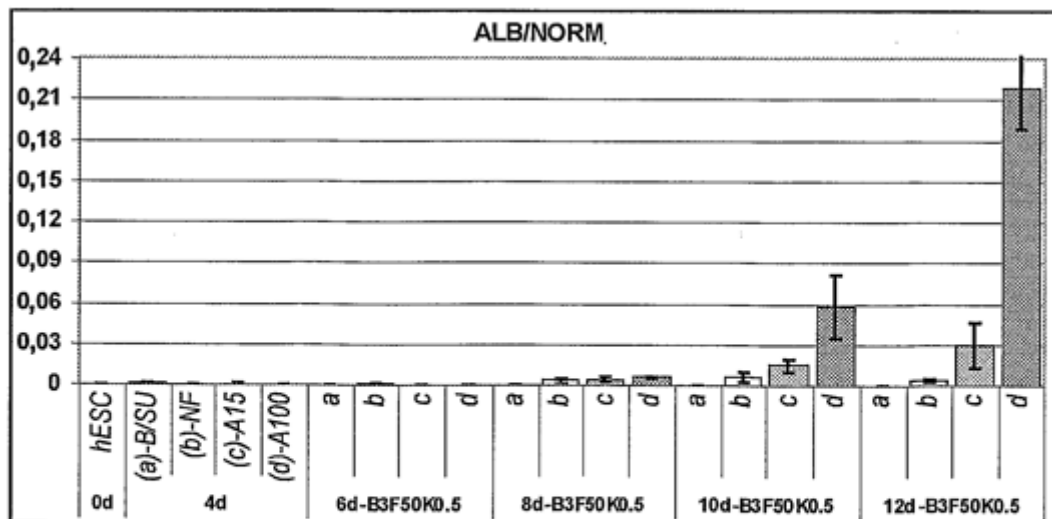


Figura 51
(Continuación)

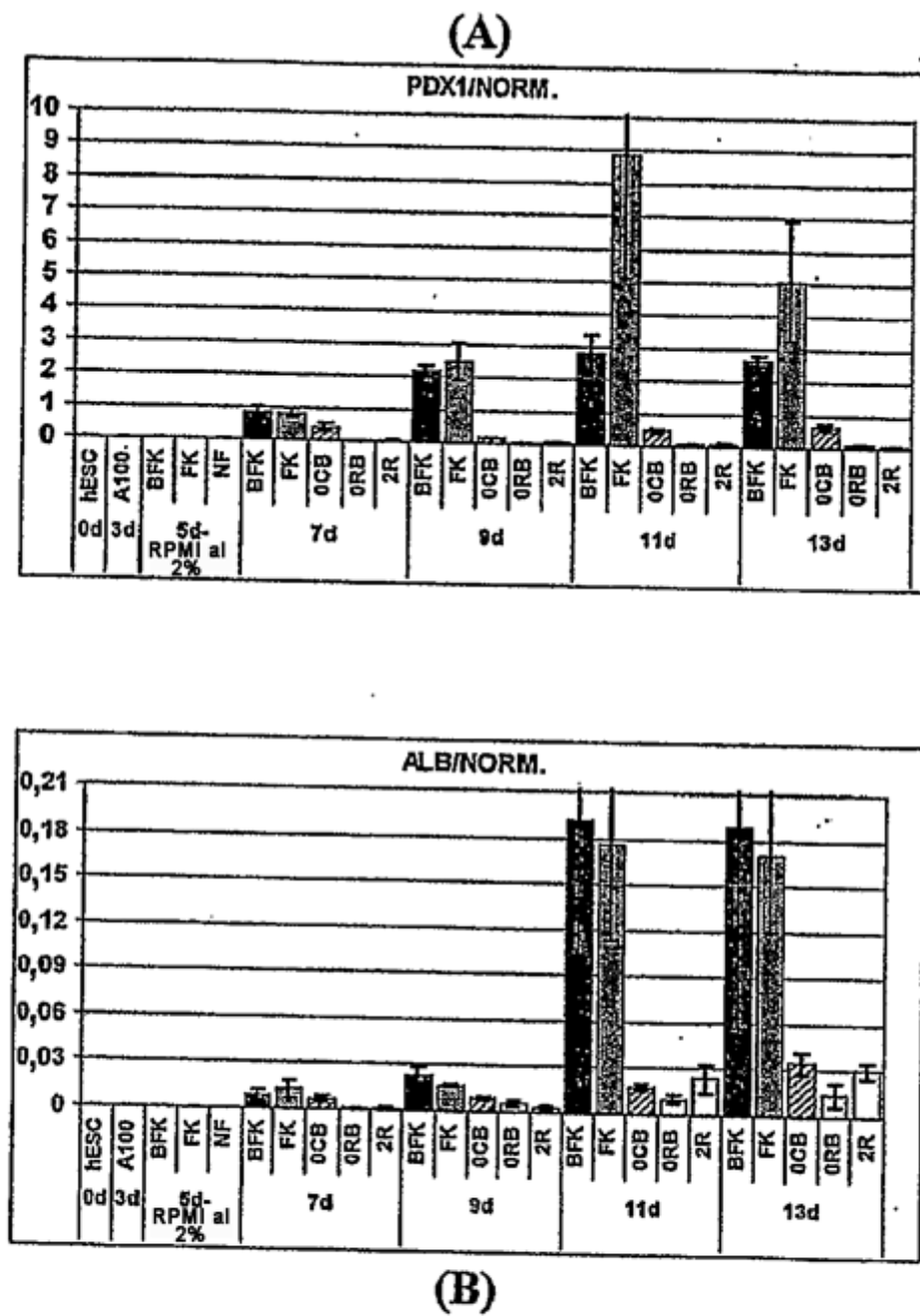


Figura 52

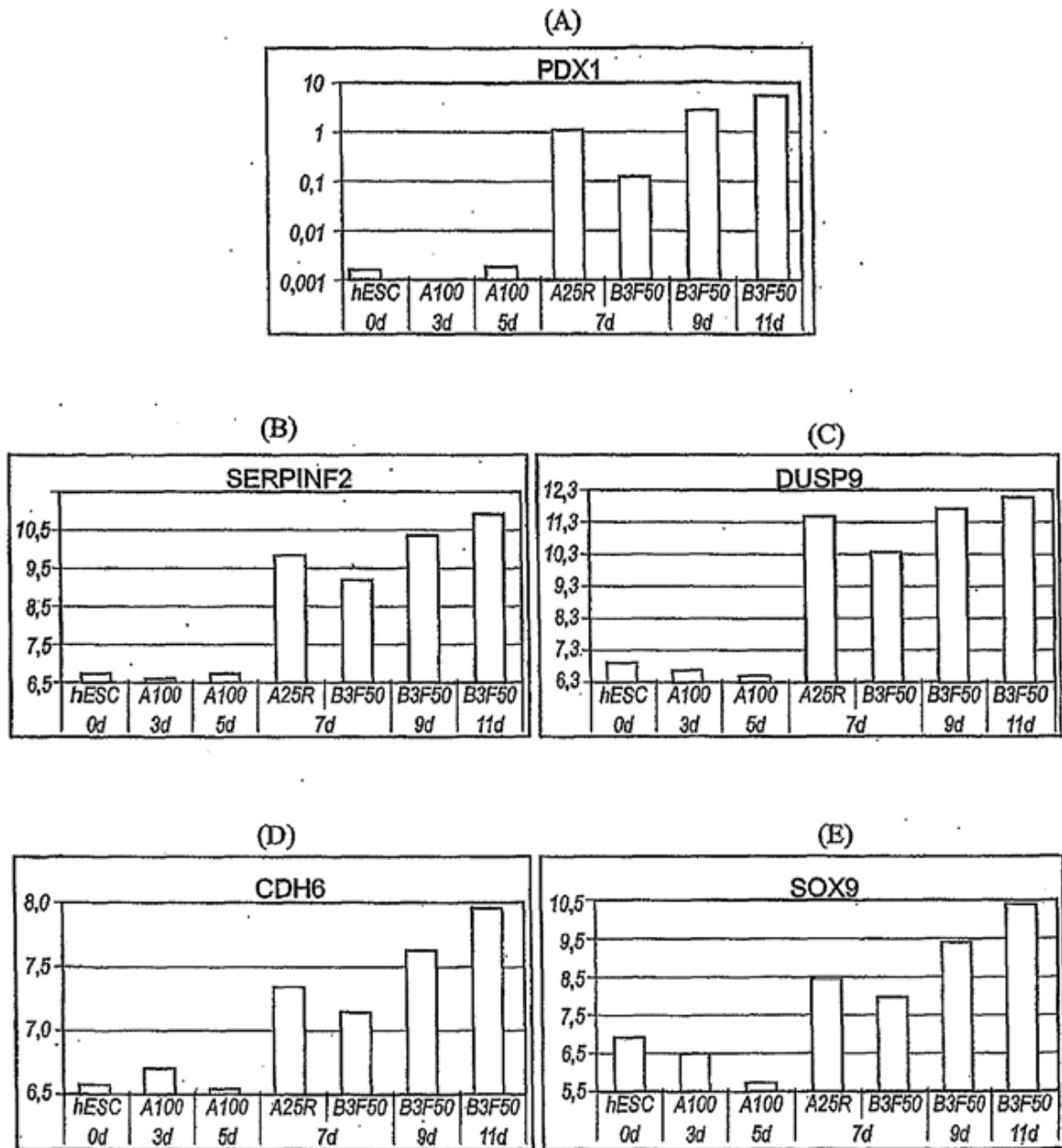


Figura 53

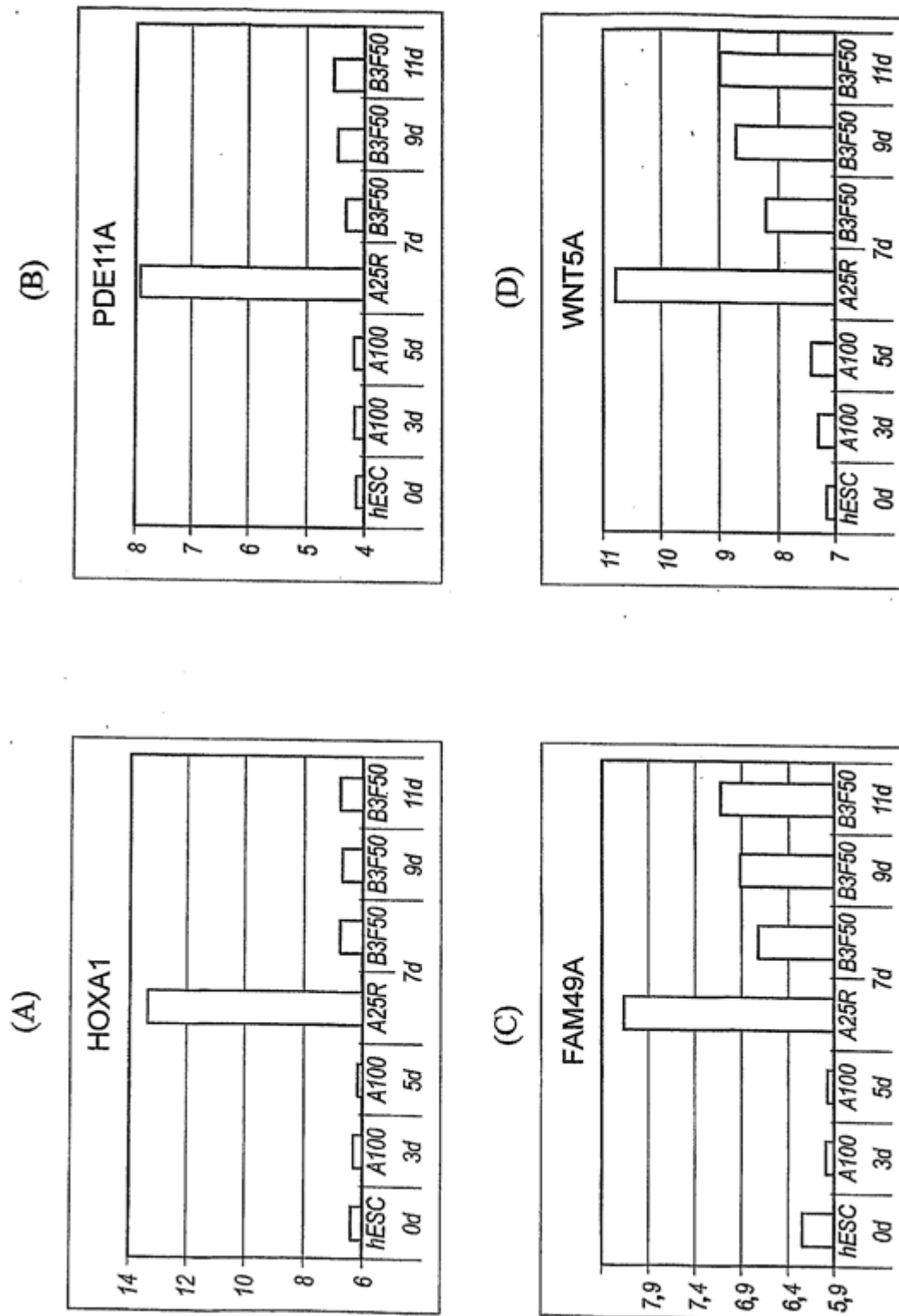


Figura 54