

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 827**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2005 PCT/US2005/024161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2006 WO06017134**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2005 E 05769491 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 1773986**

54 Título: **Células mesendodérmicas y células de línea pre-primitiva**

30 Prioridad:

09.07.2004 US 586566 P

14.07.2004 US 587942 P

23.12.2004 US 21618

23.06.2005 US 693364 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2019

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;

KROON, EVERT y

BAETGE, EMMANUEL, E.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 827 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

Células mesendodérmicas y células de línea pre-primitiva

Campo de la invención

La presente invención se refiere a las áreas médica y biología celular. En particular, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden células de la línea pre-primitiva.

Antecedentes

Fueron aisladas por primera vez células madre pluripotentes humanas, tales como células madre embrionarias (ES) y células germinales embrionarias (EG) en cultivos sin alimentadores de fibroblastos en 1994 (Bongso et al., 1994) y con alimentadores de fibroblastos (Hogan, 1997). Más tarde, Thomson, Reubinoff y Shambloft establecieron cultivos continuos de células ES y EG humanas usando capas de alimentación en ratones con inactivación mitótica (Reubinoff et al., 2000; Shambloft et al., 1998; Thomson et al., 1998).

Las células humanas ES y EG (hESC) ofrecen oportunidades únicas para investigar las primeras etapas del desarrollo humano, así como para la intervención terapéutica en varios estados patológicos, tal como en la diabetes mellitus y la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, el uso de células β productoras de insulina derivadas de hESC ofrecería una gran mejora respecto a los actuales procedimientos en terapia celular que utilizan células de páncreas de donantes para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, actualmente no se sabe cómo generar células β productoras de insulina a partir de hESC. Como tal, los tratamientos actuales de terapias con células para la diabetes mellitus, que utilizan células de islote de páncreas de donantes, son limitados por la escasez de células de islote de alta calidad necesarias para los trasplantes. La terapia celular para un paciente diabético tipo I solo requiere un trasplante de aproximadamente 8×10^8 células de islote pancreático (Shapiro et al., 2000; Shapiro et al., 2001a; Shapiro et al., 2001b). Por lo tanto, se requieren al menos dos órganos donantes sanos para obtener suficientes células de islote para un trasplante exitoso. Las células madre embrionarias humanas ofrecen una fuente de material de partida desde la cual se desarrollan cantidades sustanciales de células diferenciadas de alta calidad para terapias celulares humanas. Previamente, ha sido descrita la diferenciación de cuerpos embrionarios en ratón al endodermo usando activina A en condiciones libres de suero; Kubo et al., Development 131 (7): 1651-1662.

Dos propiedades que hacen que las hESC sean especialmente adecuados en aplicaciones de terapia celular son la pluripotencia y la capacidad de mantener estas células en cultivo durante períodos prolongados. La pluripotencia se define por la capacidad de las hESC para diferenciar a los derivados de las 3 capas germinales primarias (endodermo, mesodermo, ectodermo) que, a su vez, forman todos los tipos de células somáticas del organismo maduro, además de los tejidos extraembrionarios (p. ej., la placenta) y las células germinales. Aunque la pluripotencia imparte una utilidad extraordinaria sobre las hESC, esta propiedad también plantea desafíos únicos para el estudio y la manipulación de estas células y sus derivados. Debido a la gran variedad de tipos celulares que pueden surgir en la diferenciación de las cultivos hESC, la gran mayoría de los tipos celulares se producen con eficiencias muy bajas. Además, el éxito en la evaluación de la producción de cualquier tipo de célula determinado depende fundamentalmente de la definición de marcadores apropiados. Lograr una diferenciación eficiente y dirigida es de gran importancia para la aplicación terapéutica de las hESC.

Por tanto, además de lograr una diferenciación dirigida eficiente de las hESC, sería beneficioso identificar marcadores que pudieran utilizarse para identificar y/o segregar células en sus primeras etapas de diferenciación previas a las hESC. Además, sería beneficioso identificar factores que promueven la diferenciación de estas células precursoras tempranas derivadas de las hESC a tipos celulares útiles para terapias celulares.

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

1. Un cultivo celular que comprende células humanas, donde al menos el 5% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas.
2. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 10% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
3. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 20% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
4. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 30% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
5. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 40% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
6. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 50% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
7. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 60% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
8. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 70% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.

9. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 80% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
10. El cultivo celular del punto 1, donde al menos el 90% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
11. El cultivo celular del punto 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos el 5% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
12. El cultivo celular del punto 1, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos el 25% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
13. El cultivo celular del punto 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos el 50% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
14. El cultivo celular del punto 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos el 75% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
15. El cultivo celular de cualquiera de los puntos 1 a 14, en el que menos del 5% de dicho cultivo celular son células seleccionadas del grupo consistente en células endodérmicas viscerales, células endodérmicas parietales, células endodérmicas primitivas, células endodérmicas definitivas, células ectodérmicas y células mesodérmicas.
16. El cultivo celular del punto 1 comprende además un medio que comprende menos del 2% (v/v) de suero.
17. El cultivo celular de cualquiera de los elementos 1 a 15 que comprende un medio que comprende menos del 1% (v/v) de suero.
18. El cultivo celular de cualquiera de los elementos 1 a 15 que comprende un medio que comprende menos del 0,5% (v/v) de suero.
19. El cultivo celular de cualquiera de los elementos 1 a 15 que comprende un medio que comprende menos del 0,2% (v/v) de suero.
20. El cultivo celular de cualquiera de los puntos 1 a 15 que comprende además un medio que carece de suero o carece de reemplazo de suero.
21. El cultivo celular de cualquiera de los puntos 1 a 20 que comprende además un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β .
22. El cultivo celular del punto 21, donde el factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β comprende activina A.
23. Una población celular que comprende células, en donde al menos el 90% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas.
24. La población celular del punto 23, donde al menos 95% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas.
25. La población celular del punto 23, donde al menos 98% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas.
26. El cultivo celular del punto 1 o la población celular del punto 23, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas expresan un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo.
27. El cultivo celular del punto 1 o de la población celular del punto 23, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva humanas.
28. El cultivo celular del punto 1 o la población celular del punto 23, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas no expresan sustancialmente ningún marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.
29. El cultivo celular del punto 1 o la población celular del punto 23, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas expresan FGF8 y β -catenina.
30. El cultivo celular o la población celular del punto 29, donde la expresión de FGF8 y β -catenina es mayor que la

expresión de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva humanas.

31. El cultivo celular o la población celular del punto 29, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas no expresan sustancialmente brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.

5 Compendio de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos celulares que comprenden células humanas. En dichos cultivos celulares, por lo menos aproximadamente 5% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva, en donde las células de la línea pre-primitiva son células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas. En otras realizaciones, al menos de aproximadamente 10% a al menos aproximadamente 90% de las células humanas en cultivo son células de la línea pre-primitiva. En ciertas realizaciones descritas en este documento, las células alimentadoras humanas están también presentes en los cultivos celulares. En tales realizaciones, de por lo menos aproximadamente 5% a por lo menos aproximadamente 75% de células humanas, con excepción de las células alimentadoras, son células de la línea pre-primitiva. En algunas realizaciones, las células de la línea pre-primitiva expresan un marcador, tal como FGF8 y/o β -catenina localizada en el núcleo. En ciertas realizaciones, la expresión de uno o ambos de estos marcadores es mayor que la expresión de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. También se describe que los cultivos celulares están sustancialmente libres de células endodérmicas viscerales, de células endodérmicas parietales, de células endodérmicas primitivas, de células endodérmicas definitivas, de células ectodérmicas y/o de células mesodérmicas.

También se describe en el contexto de la presente invención que los cultivos celulares de la línea pre-primitiva comprenden células humanas pluripotentes, tales como células madre embrionarias humanas (hESC).

Como se describe en este documento, de por lo menos aproximadamente 2 a por lo menos aproximadamente 10 células de la línea pre-primitiva pueden estar presentes para aproximadamente cada 1 hESC en los cultivos celulares. También se describe en el contexto de la presente invención que las hESC se derivan de una mórula, de una masa celular embrionaria interna (ICM) o de crestas gonadales embrionarias. En algunas realizaciones, los cultivos celulares que contienen células de la línea pre-primitiva humana comprenden un medio que consta de menos del 2% (v/v) a menos de un 0,2% (v/v) de suero. En las realizaciones preferidas, dichos cultivos celulares comprenden un medio que carece de suero o reemplazo de suero. En otras realizaciones, los cultivos celulares que contienen células de la línea pre-primitiva humanas comprenden un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β . En las realizaciones preferidas, el factor de crecimiento es la activina A.

También se han descrito cultivos celulares que comprenden células mesendodérmicas, en donde las células mesodérmicas son células multipotentes que se pueden diferenciar en células mesodérmicas o endodérmicas definitivas. Según lo descrito en este documento, los cultivos celulares comprenden células humanas, en donde por lo menos aproximadamente 5% de las células humanas son células mesendodérmicas. Según lo descrito en este documento, por lo menos de aproximadamente 10% a por lo menos aproximadamente 90% de las células humanas en los cultivos son células mesendodérmicas. Según lo descrito en este documento, también están presentes células alimentadoras humanas en los cultivos celulares. Según lo descrito en este documento, desde por lo menos aproximadamente 5% a por lo menos aproximadamente 75% de células humanas, con excepción de las células alimentadoras, son células mesendodérmicas. Según lo descrito en este documento, las células mesendodérmicas expresan un marcador, tal como brachyury, FGF4 y/o SNAI1. Como se describe en este documento, la expresión de uno o más de estos marcadores es mayor que la expresión de OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. Según lo descrito en este documento, los cultivos celulares están sustancialmente libres de células endodérmicas viscerales, de células endodérmicas parietales, de células endodérmicas primitivas, de células endodérmicas definitivas, de células ectodérmicas y/o de células mesodérmicas.

Según lo descrito en el contexto de la presente invención, los cultivos celulares mesendodérmicos comprenden células humanas pluripotentes, tales como las células madre embrionarias humanas (hESC). Según lo descrito en este documento, desde por lo menos aproximadamente 2 a por lo menos aproximadamente 10 células mesendodérmicas están presentes para aproximadamente cada 1 hESC en los cultivos celulares. Como se describe en el contexto de la presente invención, las hESC se derivan de una mórula, de la masa celular embrionaria (ICM) o de crestas gonadales embrionarias. Según lo descrito en este documento, los cultivos celulares que contienen las células humanas mesendodérmicas comprenden un medio que abarca de menos de aproximadamente 2% (v/v) a de menos de aproximadamente 0,2% (v/v) de suero. Como se describe en este documento, dichos cultivos celulares comprenden un medio que carece de suero o reemplazo de suero. Como se describe en este documento, los cultivos celulares que contienen células mesendodérmicas humanas comprenden un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β . Como se describe en este documento, el factor de crecimiento es activina A.

Otras realizaciones descritas en este documento se refieren a las poblaciones celulares que comprenden células en las que al menos aproximadamente 90% de las células son células de la línea pre-primitiva humanas. En estas realizaciones, las células de la línea pre-primitiva son células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas. En otras realizaciones, de por lo menos aproximadamente 95% a por lo menos aproximadamente 98% de las células humanas en la población son células de la línea pre-primitiva. En algunas realizaciones, las células

de la línea pre-primitiva expresan un marcador, tal como FGF8 y/o β -catenina localizada en el núcleo. En ciertas realizaciones, la expresión de uno o ambos de estos marcadores es mayor que la expresión de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. En todavía otras realizaciones más descritas en este documento, las poblaciones celulares están sustancialmente libres de células endodérmicas viscerales, de las células endodérmicas parietales, de las células endodérmicas primitivas, de las células endodérmicas definitivas, de las células ectodérmicas y/o de las células mesodérmicas.

También hay poblaciones celulares descritas que comprenden células en donde por lo menos aproximadamente el 90% de las células son células humanas del mesendodérmicas. Según lo descrito en este documento, las células mesendodérmicas son células multipotentes que pueden diferenciarse en células del mesodermo y/o células definitivas del endodermo. Según lo descrito en este documento, de por lo menos aproximadamente el 95% a por lo menos aproximadamente el 98% de las células humanas en la población son células mesendodérmicas. Según lo descrito en este documento, las células mesendodérmicas expresan un marcador, tal como brachyury, FGF4 y/o SNAI1. Como se describe en este documento, la expresión de uno o ambos de estos marcadores es mayor que la expresión de OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. Como se describe en este documento, las poblaciones celulares están sustancialmente libres de células endodérmicas viscerales, de células endodérmicas parietales, de células endodérmicas primitivas, de células endodérmicas definitivas, de células ectodérmicas y/o de células mesodérmicas.

También se describen métodos para producir células de la línea pre-primitiva. En tales métodos, se obtiene una población celular que comprende células humanas pluripotentes, como las hESC. Las células humanas pluripotentes dentro de la población celular se diferencian en un medio que comprende menos de un 2% de suero y al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , donde el factor de crecimiento está presente en el medio en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de por lo menos una porción de dichas células pluripotentes respecto a las células de la línea pre-primitiva, que son multipotentes y pueden diferenciarse en células mesendodérmicas. También se describe que se incluye otro paso que consiste en permitir un tiempo suficiente para que se formen células de la línea pre-primitiva, en donde dicho tiempo suficiente para que se formen células de la línea pre-primitiva se ha determinado mediante la detección de la presencia de células de la línea pre-primitiva en dicha población celular. Como se describe en este documento, el tiempo suficiente es de al menos aproximadamente 6 horas. Como se describe en este documento, detectar la presencia de células de la línea pre-primitiva en la población de células consiste en detectar la expresión de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo y al menos un marcador del grupo constituido por brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en células de la población celular, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva. Según lo descrito en este documento, la detección del marcador puede ser por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), inmunocitoquímica u otro método comparable.

Con respecto a ciertos métodos descritos en este documento, de por lo menos aproximadamente 5% a por lo menos aproximadamente 90% de las células humanas en cultivo se diferencian en células de la línea pre-primitiva. En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, el factor de crecimiento presente en el medio es un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β . El factor de crecimiento puede ser activina A. Como se describe en este documento, el factor de crecimiento está presente en el medio a una concentración que va desde al menos aproximadamente 10 ng/ml a al menos de aproximadamente 1000 ng/ml. Como se describe en este documento, el factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 6 horas, 12 horas o 18 horas. Como se describe en este documento, el medio comprende desde menos de un 1% (v/v) a menos de un 0,2% (v/v) de suero. Como se describe en este documento, el medio es un RPMI pobre en suero. En otras realizaciones más, la población de células se diferencia en ausencia de reemplazo de suero o suero.

Otros métodos descritos en este documento son los métodos para producir células mesendodérmicas. En tales métodos, se obtiene una población celular que comprende células humanas pluripotentes, como las hESC. Las células humanas pluripotentes dentro de la población celular se diferencian en un medio que comprende menos de un 2% de suero y al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , donde el factor de crecimiento está presente en el medio en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de por lo menos una porción de dichas células pluripotentes en células mesendodérmicas que son multipotentes y que pueden diferenciarse en células del mesodermo y/o células del endodermo definitivas. Se puede incluir otro paso que comprenda permitir un tiempo suficiente para que las células mesendodérmicas se formen, en el que el tiempo suficiente para que las células mesendodérmicas se formen se ha determinado mediante la detección de la presencia de células mesendodérmicas en dicha población celular. Como se describe en este documento, el tiempo suficiente puede ser por lo menos aproximadamente 24 horas. Como se describe en este documento, detectar la presencia de mesendodermo en la población celular comprende detectar la expresión de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4 y/o SNAI1 y al menos un marcador del grupo que consiste en OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en las células de la población celular, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4 y/o SNAI1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en dichas células mesendodérmicas. Como se describe en este documento, la detección del marcador puede ser por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), inmunocitoquímica u otro método comparable.

Con respecto a ciertos métodos descritos en este documento, de por lo menos aproximadamente 5% a por lo menos aproximadamente 90% de las células humanas en cultivo se diferencian en células mesendodérmicas. Como se describe en este documento, el factor de crecimiento presente en el medio es un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β . Como se describe en este documento, el factor de crecimiento es activina A.

5 Como se describe en este documento, el factor de crecimiento está presente en el medio a una concentración que va desde al menos aproximadamente 10 ng/ml a al menos aproximadamente 1000 ng/ml. Como se describe en este documento, el factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 24 horas, 36 horas o 48 horas. Como se describe en este documento, el medio comprende desde menos de un 1% (v/v) a menos de un 0,2% (v/v) de suero.

10 Como se describe en este documento, el medio es un RPMI pobre en suero. Según lo descrito en este documento, la población de células se diferencia en ausencia de reemplazo de suero o suero.

También existen métodos descritos para producir una población celular enriquecida en células de la línea pre-primitiva. Estos métodos comprenden los pasos de (a) obtener una población de células pluripotentes, como las hESC, en donde al menos una célula de la población de células pluripotentes comprende una copia de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) o un fragmento biológicamente activo del mismo bajo el control del promotor FGF8, (b) diferenciar células pluripotentes para producir células de la línea pre-primitiva que son células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas, y (c) separar las células de las células de la línea pre-primitiva que no expresan el GFP. Según lo descrito en este documento, la población de células abarca por lo menos de aproximadamente el 95% a por lo menos aproximadamente el 98% de las células de la línea pre-primitiva.

15

Como se describe en este documento, el paso diferenciador de los métodos descritos en este documento comprende proporcionar una población celular pluripotente con al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , tales como activina A. Las concentraciones preferidas de activina A están en el intervalo de al menos aproximadamente 50 ng/ml a al menos aproximadamente 500 ng/ml. La población celular se diferencia en un medio que comprende desde menos de un 1% (v/v) a menos de un 0,1% (v/v) de suero. Como se describe en este documento, el medio es un RPMI pobre en suero. La población celular se diferencia en ausencia de suero o reemplazo de suero.

20

También hay métodos descritos para producir una población celular que se enriquece en células mesendodérmicas. Estos métodos comprenden los pasos de (a) obtener una población de células pluripotentes, como las hESC, en donde al menos una célula de la población de células pluripotentes comprende una copia de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) o un fragmento biológicamente activo del mismo bajo el control del promotor brachyury, FGF4 o SNAI1, (b) diferenciar las células pluripotentes para producir células mesodérmicas que son células multipotentes que pueden diferenciarse en células del mesodermo y/o células del endodermo definitivas, y (c) separar las células mesendodérmicas de las células que no expresan GFP. En algunas realizaciones, la población celular comprende de al menos aproximadamente un 95% a al menos aproximadamente un 98% de células mesendodérmicas. Como se describe en este documento, el paso de diferenciación de los métodos descritos en este documento comprende proporcionar una población celular pluripotente con al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , tales como activina A. Las concentraciones preferidas de activina A están en el intervalo de al menos aproximadamente 50 ng/ml a al menos aproximadamente 500 ng/ml. Como se describe en este documento, la población celular se diferencia en un medio que comprende desde menos de 1% (v/v) a menos de aproximadamente 0,1% (v/v) de suero. Como se describe en este documento, el medio es un RPMI pobre en suero. Según lo descrito en este documento, la población de células se diferencia en ausencia de reemplazo de suero o suero.

25

30

35

40

También se han descrito métodos de cribado para identificar un factor de diferenciación capaz de promover la diferenciación de células de la línea pre-primitiva en una población celular que comprende células humanas. Estos métodos comprenden los pasos de (a) obtener una población celular que comprende células de la línea pre-primitiva humanas, (b) proporcionar un factor de diferenciación candidato a la población celular, (c) determinar la expresión de un marcador en la población celular en un primer punto de tiempo, determinando la expresión del mismo marcador en la población celular en un segundo punto de tiempo, donde el segundo punto de tiempo es posterior al primer punto de tiempo y donde el segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar la población con el factor de diferenciación candidato, y (d) determinar si la expresión del marcador en la población celular en el segundo punto de tiempo se incrementa o disminuye en comparación con la expresión del marcador en la población celular en el primer punto de tiempo, en donde un aumento o disminución en la expresión del marcador en la población celular indica que el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células de la línea pre-primitiva. Como se describe en este documento, el primer punto de tiempo es antes o aproximadamente al mismo tiempo que se proporciona el factor de diferenciación candidato. Como se describe en este documento, el primer punto de tiempo es posterior a proporcionar el factor de diferenciación candidato.

45

50

Se describe que en los métodos de cribado descritos en este documento, las células de la línea pre-primitiva humana se diferencian en células, tales como las células exodérmicas, células mesodérmicas y/o células definitivas endodérmicas, en respuesta al factor de diferenciación candidato. Como se describe en este documento, el mesodermo se indica por la expresión de marcadores, tales como brachyury, FGF4 y/o SNAI1.

55

Como se describe en este documento, el mesodermo se muestra mediante la expresión de marcadores, tales como FOXF1, FLK1, BMP4, MOX1 y SDF1. Como se describe en este documento, el endodermo definitivo se muestra mediante la expresión de marcadores, tales como CXCR4 y/o SOX17.

60

Con respecto a los métodos de cribado descritos en este documento, se describe la provisión de un factor de diferenciación candidato, tal como, por ejemplo, al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , como la activina A. Como se describe en este documento, el factor de diferenciación candidato es una molécula pequeña o un polipéptido. Como se describe en este documento, el factor de diferenciación candidato no es un factor de la superfamilia TGF β . Como se describe en este documento, el factor de diferenciación candidato es un factor que no se sabe si causa la diferenciación de las células de la línea pre-primitiva.

También se han descrito métodos de cribado para identificar factores de diferenciación capaces de promover la diferenciación de las células mesodérmicas en una población celular que comprende células humanas. Tales métodos comprenden los pasos de (a) obtener una población celular que comprenda células mesodérmicas humanas, (b) proporcionar un factor de diferenciación candidato a la población celular, (c) determinar la expresión de un marcador en la población celular en un primer punto de tiempo, determinando la expresión del mismo marcador en la población celular en un segundo punto de tiempo, donde el segundo punto de tiempo es posterior al primer punto de tiempo y donde el segundo punto de tiempo es posterior a proporcionar a la población el factor de diferenciación candidato, y (d) determinar si la expresión del marcador en la población celular en el segundo punto de tiempo incrementa o disminuye en comparación con la expresión del marcador en la población celular en el primer punto de tiempo, en donde un aumento o una disminución de la expresión del marcador en la población celular indica que el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células mesendodérmicas. Como se describe en este documento, el primer punto de tiempo ocurre antes o aproximadamente al mismo tiempo que cuando se proporciona el factor de diferenciación candidato. Como se describe en este documento, el primer punto de tiempo es posterior a la provisión del factor de diferenciación candidato. Se ha mostrado que en los métodos de cribado descritos en este documento, las células mesendodérmicas humanas se diferencian en células, tales como células mesodérmicas y/o las células definitivas del endodermo, como respuesta al factor de diferenciación candidato. Como se describe en este documento, el mesendodermo se muestra mediante la expresión de marcadores, tales como FOXF1, FLK1, BMP4, MOX1 y SDF1. Como se describe en este documento, el endodermo definitivo se muestra mediante la expresión de marcadores, tales como CXCR4 y/o SOX17.

Con respecto a los métodos de cribado descritos en este documento, se describe la provisión de un factor de diferenciación candidato tal como, por ejemplo, al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , como la activina A. También se describe que el factor de diferenciación candidato es una molécula pequeña o un polipéptido. También se describe que el factor de diferenciación candidato no es un factor de la superfamilia TGF β . También se describe que el factor de diferenciación candidato es un factor que no se sabe que causa la diferenciación de las células mesendodérmicas.

También se ha descrito un método para aumentar la expresión del producto genético FGF8 en una célula madre embrionaria humana (hESC) in vitro. El método consiste en obtener un hESC en un medio que comprenda menos de un 2% (v/v) de suero y poner en contacto el hESC con un factor de diferenciación en una cantidad suficiente para que aumente la expresión del producto genético FGF8. Se describe que el factor de diferenciación es al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , como la activina A. También se describe que el medio no comprende el reemplazo de suero.

También se describe un método para aumentar la expresión de un producto genético seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4 y SNAI1 en una célula madre embrionaria humana (hESC) in vitro. El método consiste en obtener un hESC en un medio que comprenda menos de un 2% (v/v) de suero y poner en contacto el hESC con un factor de diferenciación en una cantidad suficiente para aumentar la expresión de un producto genético seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4 y SNAI1. También se describe que el factor de diferenciación es al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , como la activina A. También se describe que el medio no comprende el reemplazo de suero.

También se describe un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC) y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero, en el que las hESC comienzan a diferenciarse en un punto de tiempo de referencia tal que la expresión del ARNm de FGF8 está sustancialmente sobrerregulada en comparación con la expresión basal del ARNm de FGF8 en las hESC en aproximadamente 6 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del polipéptido de β -catenina comienza a localizarse en el núcleo celular en aproximadamente 17 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión de brachyury, FGF4 y/o ARNm de SNAI1 está sustancialmente sobrerregulada en aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de E-cadherina comienza a ser infrarregulada en aproximadamente 12 horas desde el punto de tiempo de referencia. Además, en algunas realizaciones, la expresión de ARNm de SOX17 está sustancialmente sobrerregulada en aproximadamente 48 horas desde el punto de tiempo de referencia y/o la expresión de ARNm de FOXA2 está sustancialmente sobrerregulada en aproximadamente 96 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que en los cultivos celulares descritos en este documento, el medio comprende desde menos de 1% (v/v) a menos de aproximadamente 0,2% (v/v) del suero. También se describe que el medio comprende aproximadamente un 0% (v/v) de suero. También se describe que el medio no comprende el reemplazo de suero.

También se ha descrito el cultivo de las células que comprende las células madre embrionarias humanas, un factor de diferenciación de la superfamilia TGF β y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero, en el que un

primer conjunto de genes marcadores está sobreexpresado o infraexpresado antes, o casi al mismo tiempo que, la sobreexpresión o la expresión máxima de un segundo conjunto y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que el medio no incluye el reemplazo de suero o el suero mismo.

También se han descrito métodos de diferenciación de células en cultivos celulares poniendo en contacto un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas con un medio que comprende menos de un 2% de suero, proporcionando a las hESC un factor diferenciador de la superfamilia TGF β , y permitiendo que ocurra la diferenciación de las hESC. También se describe que tales métodos producen células que tienen un primer conjunto de genes marcadores que están sobreexpresados o infraexpresados antes, o aproximadamente el mismo tiempo, que la sobreexpresión o la expresión máxima de un segundo conjunto y/o un tercer conjunto de genes marcadores. También se describe que el medio no incluye el reemplazo de suero o el suero mismo.

En ciertas realizaciones, no puede haber una definición generalmente aceptada de la expresión "que consiste". Como se utiliza en este documento, la expresión "que consiste" pretende representar un lenguaje "inclusivo" que permita la introducción de cualquier elemento adicional. Con esto en mente, también se ha descrito lo siguiente con referencia a los párrafos numerados a continuación:

1. Un cultivo celular que comprende células humanas en donde al menos aproximadamente el 5% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesodérmicas.

2. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 10% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

3. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 20% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.

4. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 30% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.

5. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 40% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.

6. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 50% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

7. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 60% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

8. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 70% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

9. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 80% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

10. El cultivo celular del párrafo 1, donde al menos aproximadamente el 90% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

11. El cultivo celular del párrafo 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos aproximadamente el 5% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.

12. El cultivo celular del párrafo 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos aproximadamente el 25% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.

13. El cultivo celular del párrafo 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos aproximadamente el 50% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.

14. El cultivo celular del párrafo 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos aproximadamente el 75% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.

15. El cultivo celular del párrafo 1, en el que dichas células de la línea pre-primitiva expresan un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo.

16. El cultivo celular del apartado 15, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste

en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva.

17. El cultivo celular del párrafo 15, en el que dichas células de la línea pre-primitiva no expresan sustancialmente un marcador seleccionado del grupo constituido por brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.

5 18. El cultivo celular del párrafo 1, en donde dichas células de la línea pre-primitiva expresan FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo.

19. El cultivo celular del párrafo 18, donde la expresión de FGF8 y la β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la expresión de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva.

20. El cultivo celular del párrafo 18, en el que dichas células de la línea pre-primitiva no expresan sustancialmente brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.

10 21. El cultivo celular del párrafo 1, en el que dicho cultivo celular está sustancialmente libre de células seleccionadas del grupo consistente en células endodérmicas viscerales, células endodérmicas parietales, células endodérmicas primitivas, células endodérmicas definitivas, células ectodérmicas y células mesodérmicas.

22. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además células madre embrionarias humanas (hESC).

15 23. El cultivo celular del párrafo 22, donde al menos aproximadamente 2 células de la línea pre-primitiva están presentes por cada 1 hESC en dicho cultivo celular.

24. El cultivo celular del párrafo 22, donde al menos aproximadamente 10 células de la línea pre-primitiva están presentes por cada 1 hESC en dicho cultivo celular.

25. El cultivo celular del párrafo 22, en el que dicho hESC se deriva de un tejido seleccionado del grupo que consiste en la mórula, la masa celular interna (ICM) de un embrión y las crestas gonadales de un embrión.

20 26. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero.

27. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además un medio que comprende menos de un 1% (v/v) de suero.

28. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además un medio que comprende menos de un 0,5% (v/v) de suero.

29. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además un medio que comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.

25 30. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además un medio que carece de suero o carece de reemplazo de suero.

31. El cultivo celular del párrafo 1 que comprende además un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β .

32. El cultivo celular del párrafo 31, donde el factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β comprende activina A.

30 33. Un cultivo celular que comprende células humanas en las que al menos aproximadamente el 5% de dichas células humanas son células mesendodérmicas, dichas células mesendodérmicas son células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesodérmicas o células endodérmicas definitivas.

34. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 10% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.

35 35. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 20% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.

36. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 30% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.

40 37. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 40% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.

38. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 50% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.

39. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 60% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.

45 40. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 70% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.

41. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 80% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.
42. El cultivo celular del párrafo 33, donde al menos aproximadamente el 90% de dichas células humanas son células mesendodérmicas.
- 5 43. El cultivo celular del párrafo 33, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos aproximadamente el 5% de las células humanas que no son células alimentadoras humanas son células mesendodérmicas.
- 10 44. El cultivo celular del párrafo 33, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos aproximadamente el 25% de las células humanas que no son células alimentadoras humanas son células mesendodérmicas.
45. El cultivo celular del párrafo 33, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos aproximadamente el 50% de las células humanas que no son células alimentadoras humanas son células mesendodérmicas.
- 15 46. El cultivo celular del párrafo 33, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos aproximadamente el 75% de las células humanas que no son células alimentadoras humanas son células mesendodérmicas.
47. El cultivo celular del párrafo 33, donde dichas células mesendodérmicas expresan un marcador seleccionado del grupo constituido por brachyury, FGF4 y SNAI1.
- 20 48. El cultivo celular del párrafo 47, en el que la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por brachyury, FGF4 y SNAI1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células mesendodérmicas.
49. El cultivo celular del párrafo 47, en el que dichas células mesendodérmicas no expresan sustancialmente un marcador seleccionado del grupo consistente en OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1.
50. El cultivo celular del párrafo 33, en el que dichas células mesendodérmicas expresan brachyury, FGF4 y SNAI1.
- 25 51. El cultivo celular del párrafo 51, donde que la expresión de brachyury, FGF4 y SNAI1 es mayor que la expresión de OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células mesendodérmicas.
52. El cultivo celular del párrafo 51, en el que dichas células mesendodérmicas no expresan sustancialmente OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1.
- 30 53. El cultivo celular del párrafo 33, donde dicho cultivo celular está sustancialmente libre de células seleccionadas del grupo consistente en células endodérmicas viscerales, células endodérmicas parietales, células endodérmicas primitivas, células endodérmicas definitivas, células ectodérmicas y células mesodérmicas.
54. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además células madre embrionarias humanas (hESC).
55. El cultivo celular del párrafo 54, donde al menos aproximadamente 2 células mesendodérmicas están presentes por cada 1 hESC en dicho cultivo celular.
- 35 56. El cultivo celular del párrafo 54, donde al menos aproximadamente 10 células mesendodérmicas están presentes por cada 1 hESC en dicho cultivo celular.
57. El cultivo celular del párrafo 54, en el que dicho hESC se deriva de un tejido seleccionado del grupo que consiste en la mórula, la masa celular interna (ICM) de un embrión y las crestas gonadales de un embrión.
58. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero.
- 40 59. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además un medio que comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
60. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además un medio que comprende menos de un 0,5% (v/v) de suero.
61. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además un medio que comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
- 45 62. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además un medio que carece de suero o carece de reemplazo de suero.
63. El cultivo celular del párrafo 33 que comprende además un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β .

64. El cultivo celular del párrafo 63, en el que dicho factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β comprende activina A.
- 5 65. Una población celular que comprende células en las que al menos aproximadamente el 90% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas.
66. La población celular del párrafo 65, donde al menos aproximadamente el 95% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas.
67. La población celular del párrafo 65, donde al menos aproximadamente el 98% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas.
- 10 68. La población celular del párrafo 65, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas expresan un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina.
69. La población celular del párrafo 68, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva humanas.
- 15 70. La población celular del párrafo 68, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas no expresan sustancialmente ningún marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.
71. La población celular del párrafo 65, donde dichas células de la línea pre-primitiva humanas expresan FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo.
- 20 72. La población celular del párrafo 71, donde la expresión de FGF8 y β -catenina es mayor que la expresión de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva humanas.
73. La población celular del párrafo 71, donde dichas células de la línea pre-primitiva humanas no expresan sustancialmente brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.
- 25 74. Una población celular que comprende células en las que al menos aproximadamente el 90% de dichas células son células mesendodérmicas humanas, siendo dichas células mesendodérmicas células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesodérmicas o células endodérmicas definitivas.
75. La población celular del párrafo 74, donde al menos aproximadamente el 95% de dichas células son células mesendodérmicas humanas.
76. La población celular del párrafo 74, donde al menos aproximadamente el 98% de dichas células son células mesendodérmicas humanas.
- 30 77. La población celular del párrafo 74, donde dichas células mesendodérmicas humanas expresan un marcador seleccionado del grupo constituido por brachyury, FGF4 y SNAI1.
78. La población celular del párrafo 77, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4 y SNAI1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células humanas mesendodérmicas.
- 35 79. La población celular del párrafo 77, en el que dichas células mesendodérmicas humanas no expresan sustancialmente ningún marcador seleccionado del grupo consistente en OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1.
80. La población celular del párrafo 74, donde dichas células mesendodérmicas humanas expresan brachyury, FGF4 y SNAI1.
- 40 81. La población celular del párrafo 77, donde la expresión de brachyury, FGF4 y SNAI1 es mayor que la expresión de OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células mesendodérmicas humanas.
82. La población celular del párrafo 77, donde dichas células mesendodérmicas humanas no expresan sustancialmente OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1.
- 45 83. Un método de producción de células de la línea pre-primitiva, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células humanas pluripotentes y diferenciar dichas células humanas pluripotentes en un medio que comprende menos de un 2% de suero y, al menos, un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , en el que dicho factor de crecimiento está presente en el medio en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de al menos una parte de dichas células pluripotentes en células de la línea pre-primitiva, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células
- 50

mesendodérmicas.

84. El método del párrafo 83 que comprende además la etapa de permitir un tiempo suficiente para que se formen las células de la línea pre-primitiva, en el que dicho tiempo suficiente para que se formen células de la línea pre-primitiva se determina mediante la detección de la presencia de células de la línea pre-primitiva en dicha población celular.

5 85. El método del párrafo 84, en el que un tiempo suficiente es, al menos, aproximadamente 6 horas.

86. El método del párrafo 84, en el que la detección de la presencia de células de la línea pre-primitiva en dicha población celular comprende la detección de la expresión de al menos un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo y, al menos, un marcador del grupo constituido por brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en células de dicha población celular, donde la expresión de un marcador
10 seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva.

87. El método del párrafo 86, donde la expresión de al menos uno de dichos marcadores está determinada por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

15 88. El método del párrafo 86, en el que la expresión de al menos uno de dichos marcadores está determinada por inmunocitoquímica.

89. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 5% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

20 90. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 10% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

91. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 20% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

92. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 30% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

25 93. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 40% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

94. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 50% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

30 95. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 60% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

96. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 70% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

97. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 80% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

35 98. El método del párrafo 83, en el que al menos aproximadamente el 90% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células de la línea pre-primitiva.

99. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento es del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β .

40 100. El método del párrafo 99, en el que dicho al menos un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β comprende activina A.

101. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml.

102. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 100 ng/ml.

45 103. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 500 ng/ml.

104. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 1000 ng/ml.

105. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 6 horas.
106. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 12 horas.
- 5 107. El método del párrafo 83, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 18 horas.
108. El método del párrafo 83, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
- 10 109. El método del párrafo 83, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,5% (v/v) de suero.
110. El método del párrafo 83, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
111. El método del párrafo 83, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,1% (v/v) de suero.
- 15 112. El método del párrafo 83, donde dicha población celular se diferencia en ausencia de suero o la ausencia de reemplazo de suero.
113. El método del párrafo 83, en el que dicha población celular se diferencia en un medio que comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero en aproximadamente el primer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento, aproximadamente 0,2% (v/v) de suero o menos en aproximadamente el segundo día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento y aproximadamente 2% (v/v) de suero o menos en aproximadamente el tercer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento.
- 20 114. El método del párrafo 83, en el que dicha población celular se diferencia en medio RPMI pobre en suero.
115. El método del párrafo 83, en el que dichas células humanas pluripotentes comprenden células madre embrionarias humanas (hESC).
- 25 116. El método del párrafo 115, en el que dichas células madre embrionarias humanas se derivan de un tejido seleccionado del grupo que consiste en la mórula, la masa celular interna (ICM) de un embrión y las crestas gonadales de un embrión.
117. Una célula de la línea pre-primitiva producida por el método del párrafo 83.
118. Un método de producción de células mesendodérmicas, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células humanas pluripotentes y diferenciar dichas células humanas pluripotentes en un medio que comprende menos de un 2% de suero y al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , en el que dicho factor de crecimiento está presente en el medio en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de al menos una porción de dichas células pluripotentes frente a las células mesendodérmicas, siendo dichas células mesendodérmicas células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas.
- 30 119. El método del párrafo 118 que comprende además la etapa de permitir un tiempo suficiente para que las células mesendodérmicas se formen, donde dicho tiempo suficiente para que las células mesendodérmicas se formen se ha determinado detectando la presencia de células mesendodérmicas en dicha población de células.
120. El método del párrafo 119, en el que el tiempo suficiente es al menos aproximadamente 24 horas.
121. El método del párrafo 118, en el que la detección de la presencia de células mesendodérmicas en dicha población celular comprende la detección de la expresión de al menos un marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4 y SNAI1 y al menos un marcador del grupo constituido por OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1 en las células de dicha población celular, donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4 y SNAI1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células mesendodérmicas.
- 40 122. El método del párrafo 121, donde la expresión de al menos uno de dichos marcadores está determinada por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).
123. El método del párrafo 121, en el que la expresión de al menos uno de dichos marcadores está determinada por inmunocitoquímica.
- 45 124. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 5% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
- 50

125. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 10% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
126. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 20% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
- 5 127. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 30% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
128. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 40% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
- 10 129. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 50% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
130. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 60% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
131. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 70% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
- 15 132. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 80% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
133. El método del párrafo 118, en el que al menos aproximadamente el 90% de dichas células humanas pluripotentes se diferencian en células mesendodérmicas.
- 20 134. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento es del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β .
135. El método del párrafo 134, en el que dicho al menos un factor de crecimiento del subgrupo nodal/activina de la superfamilia TGF β comprende activina A.
136. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml.
- 25 137. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 100 ng/ml.
138. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 500 ng/ml.
- 30 139. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 1000 ng/ml.
140. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 24 horas.
141. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 36 horas.
- 35 142. El método del párrafo 118, en el que dicho al menos un factor de crecimiento se retira después de aproximadamente 48 horas.
143. El método del párrafo 118, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
- 40 144. El método del párrafo 118, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,5% (v/v) de suero.
145. El método del párrafo 118, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
146. El método del párrafo 118, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,1% (v/v) de suero.
- 45 147. El método del párrafo 118, donde dicha población celular se diferencia en ausencia de suero o la ausencia de reemplazo de suero.
148. El método del párrafo 118, en el que dicha población celular se diferencia en un medio que comprende

aproximadamente 0% (v/v) de suero en aproximadamente el primer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento, aproximadamente 0,2% (v/v) de suero o menos en aproximadamente el segundo día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento y aproximadamente 2% (v/v) en suero o menos en aproximadamente el tercer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento.

- 5 149. El método del párrafo 118, en el que dicha población celular se diferencia en medio RPMI pobre en suero.
150. El método del párrafo 118, en el que dichas células humanas pluripotentes comprenden células madre embrionarias humanas (hESC).
151. El método del párrafo 150, en el que dichas células madre embrionarias humanas se derivan de un tejido seleccionado del grupo que consiste en la mórula, la masa celular interna (ICM) de un embrión y las crestas gonadales de un embrión.
- 10 152. Una célula mesendodérmica producida por el método del párrafo 118.
153. Un método para producir una población celular enriquecida en células de la línea pre-primitiva, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población de células pluripotentes, en la que al menos una célula de dicha población de células pluripotentes comprende al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control del promotor FGF8, comprendiendo dicho ácido nucleico una secuencia de codificación de la proteína fluorescente verde (GFP) o un fragmento biológicamente activo de ésta; diferenciándose dichas células pluripotentes para producir células de la línea pre-primitiva, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas, y separando dichas células de la línea pre-primitiva de las células que no expresan GFP.
- 15 154. El método del párrafo 153, en el que dicha población de células enriquecidas comprende al menos aproximadamente 95% de células de la línea pre-primitiva.
155. El método del párrafo 153, en el que dicha población de células enriquecidas comprende al menos aproximadamente 98% de células de la línea pre-primitiva.
156. El método del párrafo 153, en el que la etapa de diferenciación comprende proporcionar dicha población celular pluripotente con al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de dichas células pluripotentes en células de la línea pre-primitiva.
- 25 157. El método del párrafo 156, en el que dicho al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β es la activina A.
158. El método del párrafo 157, en el que dicha activina A se proporciona a una concentración de al menos aproximadamente 50 ng/ml.
- 30 159. El método del párrafo 157, en el que dicha activina A se proporciona a una concentración de al menos aproximadamente 100 ng/ml.
160. El método del párrafo 157, en el que dicha activina A se proporciona a una concentración de al menos aproximadamente 500 ng/ml.
- 35 161. El método del párrafo 153, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
162. El método del párrafo 153, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,5% (v/v) de suero.
163. El método del párrafo 153, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
- 40 164. El método del párrafo 153, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,1% (v/v) de suero.
165. El método del párrafo 153, donde dicha población celular se diferencia en ausencia de suero o la ausencia de reemplazo de suero.
- 45 166. El método del párrafo 153, en el que dicha población celular se diferencia en un medio que comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero en aproximadamente el primer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento, aproximadamente 0,2% (v/v) de suero o menos en aproximadamente el segundo día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento y aproximadamente 2% (v/v) en suero o menos en aproximadamente el tercer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento.
167. El método del párrafo 153, en el que dicha población celular se diferencia en medio RPMI pobre en suero.
- 50 168. Una población enriquecida de células de la línea pre-primitiva producidas por el método del párrafo 153.

169. Un método para producir una población celular enriquecida en células mesendodérmicas, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población de células pluripotentes, en donde 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 seleccionado del grupo que consiste en el promotor de brachyury, el promotor FGF4 y el promotor SNAI1, comprendiendo dicho ácido nucleico una secuencia de codificación de la proteína fluorescente verde (GFP) o un fragmento biológicamente activo de ésta; diferenciar dichas células pluripotentes para producir células mesendodérmicas, siendo dichas células mesendodérmicas células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesodérmicas o células endodérmicas definitivas, y separar dichas células mesendodérmicas de las células que no expresan GFP.
170. El método del párrafo 169, en el que dicha población de células enriquecidas comprende al menos aproximadamente 95% de células mesendodérmicas.
171. El método del párrafo 169, en el que dicha población de células enriquecidas comprende al menos aproximadamente 98% de células mesendodérmicas.
172. El método del párrafo 169, en el que la etapa de diferenciación comprende proporcionar dicha población celular pluripotente con al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de dichas células pluripotentes en dichas células mesendodérmicas.
173. El método del párrafo 172, en el que dicho al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β es la activina A.
174. El método del párrafo 173, en el que dicha activina A se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 50 ng/ml.
175. El método del párrafo 173, en el que dicha activina A se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 100 ng/ml.
176. El método del párrafo 173, en el que dicha activina A se proporciona en una concentración de al menos aproximadamente 500 ng/ml.
177. El método del párrafo 169, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
178. El método del párrafo 169, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,5% (v/v) de suero.
179. El método del párrafo 169, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
180. El método del párrafo 169, donde dicha población celular se diferencia en un medio que comprende menos de un 0,1% (v/v) de suero.
181. El método del párrafo 169, donde dicha población celular se diferencia en ausencia de suero o en ausencia de reemplazo de suero.
182. El método del párrafo 169, en el que dicha población celular se diferencia en un medio que comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero en aproximadamente el primer día después de añadir dicho al menos un factor de crecimiento, aproximadamente 0,2% (v/v) de suero o menos en aproximadamente el segundo día después de añadir dicho por lo menos un factor de crecimiento y aproximadamente 2% (v/v) de suero o menos en aproximadamente el tercer día después de añadir dicho por lo menos un factor de crecimiento.
183. El método del párrafo 169, en el que dicha población celular se diferencia en medio RPMI pobre en suero.
184. Una población enriquecida de células mesendodérmicas producidas por el método del párrafo 169.
185. Un método para identificar un factor de diferenciación capaz de promover la diferenciación de las células de la línea pre-primitiva en una población celular que comprende células humanas, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células de la línea pre-primitiva humana, proporcionando 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 dicha población con dicho factor de diferenciación candidato, y determinar si la expresión del marcador en dicha población celular en dicho segundo punto de tiempo incrementa 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 en la expresión de dicho marcador en dicha población celular indica que dicho factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de dichas células de la línea pre-primitiva.

186. El método del párrafo 185, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas comprenden al menos aproximadamente el 10% de las células humanas en dicha población celular.
- 5 187. El método del párrafo 185, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicha población celular y donde al menos aproximadamente el 10% de las células humanas distintas a las células alimentadoras son células de la línea pre-primitiva.
188. El método del párrafo 185, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas comprenden al menos aproximadamente el 50% de las células humanas en dicha población celular.
- 10 189. El método del párrafo 185, en el que dichas células alimentadoras humanas están presentes en dicha población celular y donde al menos aproximadamente el 50% de las células humanas distintas a las células alimentadoras son células de la línea pre-primitiva.
190. El método del párrafo 185, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas se diferencian en células seleccionadas del grupo que consiste en el mesendodermo, mesodermo y endodermo definitivo en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.
- 15 191. El método del párrafo 185, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas se diferencian en células mesendodérmicas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.
192. El método del párrafo 191, donde dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en brachyury, FGF4 y SNAI1.
193. El método del párrafo 185, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas se diferencian en células mesodérmicas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.
- 20 194. El método del párrafo 193, donde dicho marcador se selecciona del grupo que consta de FOXF1, FLK1, BMP4, MOX1 y SDF1.
195. El método del párrafo 185, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas se diferencian en células de endodermo definitivas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.
196. El método del párrafo 195, donde dicho marcador se selecciona del grupo que consta de CXCR4 y SOX17.
- 25 197. El método del párrafo 185, donde dicho primer punto de tiempo es anterior a proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.
198. El método del párrafo 185, en el que dicho primer punto de tiempo es aproximadamente al mismo tiempo que se proporciona dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.
- 30 199. El método del párrafo 185, donde dicho primer punto de tiempo es posterior a proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.
200. El método del párrafo 185, donde se incrementa la expresión de dicho marcador.
201. El método del párrafo 185, donde se disminuye la expresión de dicho marcador.
202. El método del párrafo 185, donde la expresión de dicho marcador está determinada por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).
- 35 203. El método del párrafo 185, donde la expresión de dicho marcador está determinada por la inmunocitoquímica.
204. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato comprende al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β .
205. El método del párrafo 204, en el que dicho al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β es la activina A.
- 40 206. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato comprende una pequeña molécula.
207. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato comprende un polipéptido.
208. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato no es un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β .
- 45 209. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 0,1 ng/ml y aproximadamente 10 mg/ml.
210. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población

celular a una concentración de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml.

211. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 µg/ml.

5 212. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 10 µg/ml.

213. El método del párrafo 185, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de aproximadamente 1 µg/ml.

10 214. Un método de identificación de un factor de diferenciación capaz de promover la diferenciación de las células mesendodérmicas en una población celular que comprende células humanas, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una población celular que comprende células mesendodérmicas 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 donde 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 dicha población con 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 disminución en la expresión de dicho marcador en dicha población celular indica que dicho factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de dichas células mesendodérmicas.

20 215. El método del párrafo 214, en el que dichas células mesendodérmicas humanas comprenden al menos aproximadamente el 10% de las células humanas en dicha población celular.

216. El método del párrafo 214, en el que las células alimentadoras humanas están presentes en dicha población celular y en donde al menos aproximadamente el 10% de las células humanas distintas de las células alimentadoras son células mesendodérmicas.

25 217. El método del párrafo 214, en el que dichas células mesendodérmicas humanas comprenden al menos aproximadamente el 50% de las células humanas en dicha población celular.

218. El método del párrafo 214, en el que dichas células alimentadoras humanas están presentes en dicha población celular y donde al menos aproximadamente el 50% de las células humanas distintas de las células alimentadoras son células mesendodérmicas.

30 219. El método del párrafo 214, en el que dichas células mesendodérmicas humanas se diferencian en células seleccionadas del grupo consistente en mesodermo y endodermo definitiva en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.

220. El método del párrafo 214, en el que dichas células mesendodérmicas humanas se diferencian en células mesodérmicas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.

35 221. El método del párrafo 220, donde dicho marcador se selecciona del grupo que consta de FOXF1, FLK1, BMP4, MOX1 y SDF1.

222. El método del párrafo 214, en el que dichas células mesendodérmicas humanas se diferencian en células de endodermo definitivas en respuesta a dicho factor de diferenciación candidato.

223. El método del párrafo 222, donde dicho marcador se selecciona del grupo que consta de CXCR4 y SOX17.

40 224. El método del párrafo 214, donde dicho primer punto de tiempo es anterior a proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

225. El método del párrafo 214, en el que dicho primer punto de tiempo ocurre aproximadamente al mismo tiempo que se proporciona dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

45 226. El método del párrafo 214, donde dicho primer punto de tiempo es posterior a proporcionar dicho factor de diferenciación candidato a dicha población celular.

227. El método del párrafo 214, donde se incrementa la expresión de dicho marcador.

228. El método del párrafo 214, donde se disminuye la expresión de dicho marcador.

229. El método del párrafo 214, donde la expresión de dicho marcador está determinada por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

50 230. El método del párrafo 214, donde la expresión de dicho marcador está determinada por la inmunocitoquímica.

231. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato comprende al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β .
232. El método del párrafo 231, en el que dicho al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β es la activina A.
- 5 233. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato comprende una pequeña molécula.
234. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato comprende un polipéptido.
235. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato no es un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β .
- 10 236. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 0,1 ng/ml y aproximadamente 10 mg/ml.
237. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml.
238. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 μ g/ml.
- 15 239. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 10 μ g/ml.
240. El método del párrafo 214, en el que dicho factor de diferenciación candidato se proporciona a dicha población celular a una concentración de aproximadamente 1 μ g/ml.
- 20 241. Un método que consiste en aumentar la expresión del producto genético FGF8 en una célula madre embrionaria humana (hESC) in vitro, comprendiendo dicho método obtener dicho hESC en un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero y poner en contacto dicho hESC con un factor de diferenciación en una cantidad suficiente para aumentar la expresión del producto genético FGF8.
242. El método del párrafo 241, en el que dicho factor de diferenciación comprende al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β .
- 25 243. El método del párrafo 242, en el que dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
244. El método del párrafo 241, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
- 30 245. Un método para aumentar la expresión de un producto genético seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4 y SNAI1 en una célula madre embrionaria humana (hESC) o una célula de la línea pre-primitiva in vitro, comprendiendo dicho método obtener dicho hESC o la célula de la línea pre-primitiva en un medio que comprende menos que el 2% (v/v) de suero y poner en contacto dicho hESC o dicha célula de la línea pre-primitiva con un factor de diferenciación en una cantidad suficiente para aumentar la expresión de un producto genético seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4 y SNAI1.
246. El método del párrafo 245, en el que dicho factor de diferenciación comprende al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β .
- 35 247. El método del párrafo 246, en el que dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
248. El método del párrafo 245, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
- 40 249. Un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC) y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero, en el que dichos hESC comienzan a diferenciarse en un punto de tiempo de referencia tal que la expresión de ARNm de FGF8 está sustancialmente sobreexpresada en comparación con la expresión basal del ARNm de FGF8 en dichos hESC en aproximadamente 6 horas desde dicho punto de referencia.
250. El cultivo celular del párrafo 249, donde la expresión del ARNm de FGF8 está infraregulada después de aproximadamente 24 horas desde dicho punto de referencia.
251. El cultivo celular del párrafo 250, en el que se alcanza una expresión máxima de ARNm de FGF8 en un tiempo entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 24 horas desde dicho punto de referencia.
- 45 252. El cultivo celular del párrafo 249, en el que el polipéptido de β -catenina comienza a localizarse en el núcleo celular en aproximadamente 17 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
253. El cultivo celular del párrafo 249, en el que la expresión del ARNm de brachyury está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.

254. El cultivo celular del párrafo 253, donde la expresión del ARNm de brachyury está sustancialmente infrarregulada por aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
255. El cultivo celular del párrafo 254, donde la máxima expresión del ARNm de brachyury se alcanza en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
- 5 256. El cultivo celular del párrafo 255, en el que el ARNm de brachyury no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas a partir de dicho punto de tiempo de referencia.
257. El cultivo celular del párrafo 249, en el que la expresión del ARNm de FGF4 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
- 10 258. El cultivo celular del párrafo 257, donde la expresión del ARNm de FGF4 está sustancialmente infrarregulada en aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
259. El cultivo celular del párrafo 258, en el que se alcanza una expresión máxima del ARNm de FGF4 en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
260. El cultivo celular del párrafo 259, en el que el ARNm de FGF4 no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas a partir de dicho punto de tiempo de referencia.
- 15 261. El cultivo celular del párrafo 249, en el que la expresión del ARNm de brachyury y FGF4 está sustancialmente sobreexpresada aproximadamente 24 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
262. El cultivo celular del párrafo 261, donde la expresión del ARNm de brachyury y FGF4 está sustancialmente infrarregulada en aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
- 20 263. El cultivo celular del párrafo 262, en el que se alcanza la máxima expresión de ARNm de brachyury y FGF4 en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
264. El cultivo celular del párrafo 263, en el que el ARNm de brachyury y FGF4 no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas desde dicho punto de referencia.
265. El cultivo celular del párrafo 249, en el que la expresión del ARNm de SNAI1 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
- 25 266. El cultivo celular del párrafo 265, donde la expresión del ARNm de SNAI1 está infrarregulada en aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
267. El cultivo celular del párrafo 266, en el que se alcanza una expresión máxima del ARNm de SNAI1 en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
- 30 268. El cultivo celular del párrafo 249, donde la expresión del ARNm de E-cadherina comienza a ser infrarregulada en aproximadamente 12 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
269. El cultivo celular del párrafo 249, donde la expresión del ARNm de E-cadherina está sustancialmente infrarregulada en aproximadamente 48 horas desde dicho punto de referencia.
270. El cultivo celular del párrafo 249, en el que la expresión del ARNm de SOX17 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 48 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
- 35 271. El cultivo celular del párrafo 249, en el que la expresión del ARNm de FOXA2 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 96 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
272. El cultivo celular del párrafo 249, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
273. El cultivo celular del párrafo 249, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
274. El cultivo celular del párrafo 249, en el que dicho medio comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero.
- 40 275. El cultivo celular del párrafo 249, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
276. El cultivo celular del párrafo 249, que comprende además un factor de diferenciación de la superfamilia TGF β .
277. El cultivo celular del párrafo 276, donde dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
278. El cultivo celular del párrafo 277, en el que dicha activina A está presente a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
- 45 279. Un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC), un factor de diferenciación de la

superfamilia TGF β y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero.

- 5 280. El cultivo celular del párrafo 279 donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
281. El cultivo celular del párrafo 280, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la máxima expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
- 10 282. El cultivo celular del párrafo 281, en el que en las células de dicho cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en HEY1, GATA2, BIK e ID1 se infraregula antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un gen marcador seleccionado a partir del grupo constituido por brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
- 15 283. El cultivo celular del párrafo 279, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK e ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consta de SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1.
- 20 284. El cultivo celular del párrafo 283, en el que en las células de dicho cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 se sobreexpresa antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1.
- 25 285. El cultivo celular del párrafo 284, en el que en las células de dicho cultivo celular se alcanza la máxima expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1.
286. El cultivo celular del párrafo 283, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
- 30 287. El cultivo celular del párrafo 279, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
288. El cultivo celular del párrafo 279, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
289. El cultivo celular del párrafo 279, en el que dicho medio comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero.
290. El cultivo celular del párrafo 279, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
- 35 291. El cultivo celular del párrafo 279, en el que dicho factor de diferenciación de la superfamilia TGF β comprende la activina A.
292. El cultivo celular del párrafo 291, en el que dicha activina A está presente en el medio a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
- 40 293. Un método de diferenciación de células en un cultivo celular, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC) con un medio que comprende menos de un 2% de suero, (b) proporcionar dichos hESC con un factor diferenciador de la superfamilia TGF β , y (c) permitir que ocurra la diferenciación de dichos hESC.
- 45 294. El método del párrafo 283, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo compuesto por brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
295. El método del párrafo 294, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
- 50 296. El método del párrafo 295, en el que en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en HEY1, GATA2, BIK e ID1 se infraregula antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1,

Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.

297. El método del párrafo 293, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpone antes de la sobreexpone de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo compuesto por SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1.
298. El método del párrafo 297, en el que en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 se sobreexpone antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpone de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1.
299. El método del párrafo 298, en el que en las células de dicho cultivo celular se alcanza la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpone de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1.
300. El método del párrafo 297, donde en las células de dicho cultivo celular la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK e ID1 se sobreexpone antes de la sobreexpone de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo compuesto por brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
301. El método del párrafo 293, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
302. El método del párrafo 293, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
303. El método del párrafo 293, en el que dicho medio comprende aproximadamente un 0% (v/v) de suero.
304. El método del párrafo 293, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
305. El método del párrafo 293, en el que dicho factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ comprende la activina A.
306. El método del párrafo 305, en el que dicha activina A está presente en el medio a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
307. Un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC) y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero, en el que dichos hESC comienzan a diferenciarse en un punto de tiempo de referencia tal que la expresión de un ARNm seleccionado del grupo consistente en FZD10, FGF5 y OCT4 está sustancialmente sobreexpone en comparación con la expresión basal de un ARNm correspondiente seleccionado del grupo que consiste en FZD10, FGF5 y OCT4 en dichos hESC en aproximadamente 2 horas desde dicho punto de referencia.
308. El cultivo celular del párrafo 307, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
309. El cultivo celular del párrafo 307, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
310. El cultivo celular del párrafo 307, en el que dicho medio comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero.
311. El cultivo celular del párrafo 307, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
312. El cultivo celular del párrafo 307 que comprende además un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ.
313. El cultivo celular del párrafo 312, donde dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
314. El cultivo celular del párrafo 313, en el que dicha activina A está presente a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
315. Un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC) y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero, en el que dichos hESC comienzan a diferenciarse en un punto de tiempo de referencia tal que la expresión de un ARNm seleccionado del grupo consistente en GBX2, ZFP42 y SOX2 está sustancialmente infraregula en comparación con la expresión de referencia de un ARNm correspondiente seleccionado del grupo que consiste en GBX2, ZFP42 y SOX2 en dichos hESC en aproximadamente 2 horas desde dicho punto de tiempo de referencia.
316. El cultivo celular del párrafo 315, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
317. El cultivo celular del párrafo 315, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
318. El cultivo celular del párrafo 315, en el que dicho medio comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero.
319. El cultivo celular del párrafo 315, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.

320. El cultivo celular del párrafo 315 que comprende además un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ.
321. El cultivo celular del párrafo 320, donde dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
322. El cultivo celular del párrafo 321, en el que dicha activina A está presente a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
- 5 323. Un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC), un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ y un medio que comprende menos de un 2% (v/v) de suero donde, en las células de dicho cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FZD10, FGF5, Nanog y OCT4 se sobreexpresa o la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en GBX2, ZFP42 y SOX2 se suprime antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1.
- 10 324. El cultivo celular del párrafo 323, en el que la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FZD10, FGF5, Nanog y OCT4 se sobreexpresa o la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en GBX2, ZFP42 y SOX2 se suprime antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
- 15 325. El cultivo celular del párrafo 323, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
326. El cultivo celular del párrafo 323, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
327. El cultivo celular del párrafo 323, en el que dicho medio comprende aproximadamente 0% (v/v) de suero.
328. El cultivo celular del párrafo 323, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
- 20 329. El cultivo celular del párrafo 323 que comprende además un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ.
330. El cultivo celular del párrafo 329, donde dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
331. El cultivo celular del párrafo 330, en el que dicha activina A está presente a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
- 25 332. Un método de diferenciación de células en un cultivo celular, comprendiendo dicho método (A) poner en contacto un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas (hESC) con un medio que comprende menos de un 2% de suero, (b) proporcionar dichos hESC con un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ, y (c) permitir que ocurra la diferenciación de dichos hESC, en donde, en las células de dicho cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FZD10, FGF5, Nanog y OCT4 se sobreexpresa o la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en GBX2, ZFP42 y SOX2 se suprime antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK e ID1.
- 30 333. El método del párrafo 332, en el que la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FZD10, FGF5, Nanog y OCT4 se sobreexpresa o la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en GBX2, ZFP42 y SOX2 se suprime antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.
- 35 334. El método del párrafo 332, en el que dicho medio comprende menos de un 1% (v/v) de suero.
335. El método del párrafo 332, en el que dicho medio comprende menos de un 0,2% (v/v) de suero.
336. El método del párrafo 332, en el que dicho medio comprende aproximadamente un 0% (v/v) de suero.
- 40 337. El método del párrafo 332, donde dicho medio carece de suero o carece de reemplazo de suero.
338. El método del párrafo 332 que comprende además un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ.
339. El método del párrafo 338, en el que dicho factor de diferenciación comprende la activina A.
340. El método del párrafo 339, en el que dicha activina A está presente a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.
- 45 Se entiende que los métodos y las composiciones descritas anteriormente se refieren a las células cultivadas in vitro. Sin embargo, las composiciones celulares diferenciadas in vitro anteriormente descritas pueden utilizarse en aplicaciones de in vivo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que representa la diferenciación de células madre embrionarias (ESC) en presencia de activinas, en presencia de una combinación de BMP4 y SU5402, y en ausencia de factores de diferenciación. También se enumeran algunos genes de marcadores útiles para la identificación y/o detección de cada tipo de célula.

- 5 Las figuras 2A-M son diagramas de barras que muestran los patrones de expresión de los marcadores génicos que se pueden utilizar para identificar células de endodermo definitivas. El análisis de la expresión de los marcadores definitivos del endodermo, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 se muestra en los paneles G-L, respectivamente. El análisis de expresión de los genes de marcado del linaje previamente descrito, 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 hESC marcada indica la expresión génica de las células madre embrionarias humanas purificadas; 2NF indica las células tratadas con FBS al 2%, sin adición de activina; 0.1A100 indica las células tratadas con FBS al 0,1%, 100 ng/ml de activina A; 1A100 indica las células tratadas con FBS al 1%, 100 ng/ml de activina A; y 2A100 indica las células tratadas con FBS al 2%, 100 ng/ml de activina A.
- 10
- 15 Las figuras 3A-L son diagramas de barras que muestran los patrones de expresión de ciertos marcadores génicos expresados en (A) células de la línea pre-primitiva, (B-D) células de la línea primitiva (mesendodermo), células del mesendodermo (E-F) y endodermo definitivas, (G) células de endodermo definitivas, y (H-L) células de trofotodermo y primitivas del endodermo. La expresión del marcador fue determinada por Q-PCR durante el curso de la diferenciación a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la adición de 100 ng/ml de activina A (indicado por "A") o una combinación de 100 ng/ml de BMP4 y SU5402 2,5 μ M (indicado como "B/SU") a los cultivos celulares. Todas las células se cultivaron en medio RPMI que contenía 0% (v/v) de FBS el día 1 (primeras 24 horas), 0,2% (v/v) de FBS el día 2 (24-48 horas) y 2% (v/v) de FBS los días 3 y 4 (48-96 horas). El nombre completo de cada gen marcador se proporciona en la tabla 1.
- 20
- 25 Las figuras 4A-C son diagramas de barras que muestran los patrones de expresión del ARNm de (A) el marcador de Brachyury para el mesendodermo (BRACH), (B) el marcador de la E-cadherina para las hESC, y (C) el marcador SNAI1 para el mesendodermo durante las primeras 48 horas de diferenciación de hESC (indicado por "ESC") en presencia de 100 ng/ml de activina A y FBS al 0,1% (v/v).
- 30 Las figuras 5A y B son diagramas de barras que muestran los patrones de expresión del ARNm del marcador de Brachyury para el mesendodermo (BRACH) y el marcador de la región Y-Box 17 (SOX17) determinante del sexo para el endodermo definitivo, respectivamente, durante las primeras 48 horas de diferenciación de las hESC (indicado por "ES") en presencia de 100 ng/ml de activina A y FBS al 0,1% (v/v).
- 35 Las figuras 6A-D son micrografías que muestran células 48 horas después de la diferenciación de las hESC en presencia de 100 ng/ml de activina A y FBS al 0,1% (v/v). El panel A muestra un campo de celdas teñidas con DAPI. Los paneles B-D muestran el mismo campo de células teñidas con anticuerpos primarios contra Brachyury (B), SOX17 (C), o ambos Brachyury y SOX17 (D).
- 40 La figura 7 es un diagrama que representa la diferenciación de células madre embrionarias (ESC) bajo condiciones séricas pobres en presencia de 100 ng/ml de activina A (A100) o en su ausencia (NF). PS indica células de la línea primitiva (células mesendodérmicas); DE indica las células definitivas del endodermo; y M indica las células del mesodermo.
- 45 Las figuras 8A-F son diagramas de barras que muestran la expresión de los genes de los marcadores del mesodermo, (A) BRACH, (B) FOXF1, (C) FLK1, (D) BMP4, (E) MOX1 y (F) SDF1, en cultivos celulares después de cuatro días de incubación en la presencia continuada de 100 ng/ml de activina A (A100) o después de cuatro días de incubación en los que la activina A se retira después del primer día (NF). La expresión de marcador fue determinada por Q-PCR.
- Las figuras 9A-C son diagramas de barras que muestran la expresión de los genes de los marcadores definitivos del endodermo, (A) GSC, (B) SOX17 y (C) FOXA2, en cultivos celulares después de cuatro días de incubación en la presencia continuada de 100 ng/ml de activina A (A100) o después de cuatro días de incubación en donde la activina A se retira después del primer día (NF). La expresión del marcador fue determinada por Q-PCR.
- 50 Las figuras 10A-I son diagramas de barras que muestran los patrones de expresión de ciertos genes de los marcadores útiles para la identificación y/o detección de células endodérmicas definitivas. La expresión del marcador fue determinada por Q-PCR a partir de cultivos celulares de cinco días de antigüedad que contenían suero bovino fetal (FBS) a una concentración de 0,5%, 2% o 10% y 100 ng/ml de activina A (A100) o ninguna activina A (NF).
- 55 Las figuras 11A y B son diagramas de barras que muestran los patrones de expresión de ARNm de marcadores de endodermo definitivos (A) SOX17 y (B) FOXA2 en cultivos celulares diferenciados en presencia de 100 ng/ml de activina A durante cuatro días. La expresión del marcador fue determinada por Q-PCR durante el curso de la diferenciación a las 0, 6, 24, 30, 48 y 96 horas después de la adición de activina A.
- Las figuras 12A-D muestran la diferenciación in vivo de células definitivas del endodermo que se trasplantan bajo la

cápsula del riñón en ratones inmunodeprimidos. Paneles: tinción de A-hetatoxilina-eosina que muestra las estructuras tipo tubular del intestino; B inmunorreactividad de anticuerpos contra el antígeno específico de hepatocitos (hígado); C-inmunorreactividad de anticuerpos contra la villina (intestino); y D-inmunorreactividad del anticuerpo contra CDX2 (intestino).

5 Descripción detallada

Una etapa crucial en el desarrollo humano temprano, llamada gastrulación, ocurre 2-3 semanas después de la fertilización. La gastrulación es extremadamente significativa porque es, en ese momento, que las tres capas germinales primarias se especializan primero y se organizan (Lu et al., 2001; Schoenwolf y Smith, 2000). El ectodermo es responsable de la formación eventual de las capas exteriores del cuerpo y del sistema nervioso completo, mientras que el corazón, la sangre, los huesos, el músculo esquelético y otros tejidos conectivos se derivan del mesodermo. El endodermo definitivo se define como la capa germinal que es responsable de la formación de todo el tubo intestinal que incluye el esófago, el estómago y los intestinos delgado y grueso, y los órganos que derivan del tubo intestinal como los pulmones, el hígado, el timo, las glándulas paratiroides y tiroidea, la vesícula biliar y el páncreas (Grapin-Botton y Melton, 2000; Kimelman y Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells y Melton, 1999; Wells y Melton, 2000). Se debe hacer una distinción muy importante entre el endodermo definitivo y el linaje completamente separado de células llamado endodermo primitivo. El endodermo primitivo es principalmente responsable de la formación de tejidos extraembrionarios, principalmente las porciones del endodermo parietal y visceral del saco vitelino y el material de la matriz extracelular de la membrana de Reichert.

Durante la gastrulación, el proceso de formación definitiva del endodermo comienza con un evento de migración celular en el que las células mesendodérmicas (células competentes que forman el mesodermo o el endodermo) migran a través de una estructura llamada línea primitiva. Como las células mesendodérmicas penetran a través de la línea primitiva, experimentan una transición de epitelial a mesenquimal (EMT) y se convierten en un mesodermo o endodermo definitivo. El endodermo definitivo se deriva de las células, que migra a través de la porción anterior de la línea y a través del nodo (una estructura especializada en la región más anterior de la línea). A medida que ocurre la migración, el endodermo definitivo rellena primero el tubo intestinal más anterior y acaba con la formación del extremo posterior del tubo intestinal.

Las células precursoras de la línea primitiva (células de la línea pre-primitiva) y las células de la línea primitiva (células mesendodérmicas) son células precursoras de etapa temprana que dan lugar al mesodermo y al endodermo definitivo. De hecho, las células de la línea pre-primitiva y las células mesendodérmicas pueden ser los precursores más tempranos del proceso de desarrollo de la pluripotencia a las células, a los tejidos y/o a los órganos terminalmente diferenciados hechos del mesodermo y de los linajes definitivos del endodermo. Hasta ahora, no se han obtenido ni poblaciones celulares enriquecidas en células de la línea pre-primitiva humanas ni poblaciones celulares enriquecidas en las células mesendodérmicas humanas. Además, las células de tales poblaciones celulares no han sido previamente caracterizadas in vitro.

En vista de lo anterior, algunas realizaciones de la invención descritas en este documento se refieren a cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de la línea pre-primitiva humanas y cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células mesendodérmicas humanas. En tales realizaciones, las células de la línea pre-primitiva y las células mesendodérmicas son capaces de una diferenciación adicional en las células del mesodermo y/o las células definitivas del endodermo así como las células, los tejidos y/o los órganos derivados de estos linajes.

También se han descrito métodos para producir cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de la línea pre-primitiva humanas, así como métodos para producir cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células mesendodérmicas humanas.

También se han descrito métodos de cribado para identificar uno o más factores de diferenciación que sean útiles para diferenciar las células en una población celular que comprenda células de la línea pre-primitiva o células mesendodérmicas. Tales factores son útiles para promover la diferenciación de estos tipos de células a mesodermo y/o células definitivas del endodermo así como las células, los tejidos y/o los órganos derivados de cualquiera de estos linajes celulares.

También se han descrito métodos para aumentar la expresión de ciertos marcadores de células en estadios tempranos. Otros aspectos se refieren a las composiciones celulares que comprenden las células que expresan ciertos marcadores durante el curso de la diferenciación.

Definiciones

Ciertos términos y frases que se utilizan en esta solicitud tienen los significados que se proporcionan de la siguiente manera:

Como se utiliza en el presente documento, "embrionario" se refiere a una serie de etapas de desarrollo de un organismo que comienzan con un solo cigoto y terminan con una estructura multicelular que ya no comprende células pluripotentes o totipotentes que no sean células gaméticas desarrolladas. Además de los embriones derivados de la

fusión de gametos, el término "embrionario" se refiere a los embriones derivados de la transferencia nuclear de células somáticas.

Como se utiliza en este documento, "multipotente" o "célula multipotente" se refiere a un tipo de célula que puede dar lugar a un número limitado de otros tipos de células en particular.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, el término "expresión" se refiere a la producción de un material o sustancia, así como al nivel o la cantidad de producción de un material o sustancia. Por lo tanto, determinar la expresión de un marcador específico se refiere a la detección de la cantidad relativa o absoluta del marcador que se expresa o simplemente detectar la presencia o ausencia del marcador.

- 10 Como se utiliza en el presente documento, "marcador" se refiere a cualquier molécula que pueda observarse o detectarse. Por ejemplo, un marcador puede incluir, entre otros, a un ácido nucleico, tal como una transcripción de un gen específico, un producto polipeptídico de un gen, un polipéptido de un producto no genético, una glucoproteína, un carbohidrato, un glucolípido, un lípido, una lipoproteína o una molécula pequeña (por ejemplo, moléculas que tienen un peso molecular de menos de 10.000 amu)

- 15 Cuando se utiliza en relación con los cultivos celulares y/o las poblaciones celulares, el término "porción" significa cualquier cantidad distinta a cero del cultivo celular o de la población celular, que varía entre una sola célula y la totalidad de la población de células o cultivos celulares.

Con respecto a las células en cultivos celulares o en poblaciones celulares, la frase "sustancialmente libre de" significa que el tipo de célula especificado del cual el cultivo celular o la población celular es libre, está presente en una cantidad de menos del 5% del número total de células presentes en el cultivo celular o en la población celular.

- 20 Con respecto al medio de cultivo celular, como se utiliza en el presente documento, el "RPMI pobre en suero" se refiere a un medio que contiene poco suero, en el que la concentración de suero se incrementa gradualmente durante un período de tiempo definido. Por ejemplo, en una realización, el RPMI pobre en suero comprende una concentración de aproximadamente 0,2% de suero bovino fetal (FBS) en el primer día del crecimiento celular, aproximadamente 0,5% de FBS en el segundo día de crecimiento celular y aproximadamente 2% de FBS en el tercer y quinto día de crecimiento celular. En otra realización, el RPMI pobre en suero comprende una concentración de aproximadamente 0% en el primer día, aproximadamente 0,2% en el segundo día y aproximadamente 2% en el tercero y los días subsiguientes.

Como se utiliza en este documento, "reemplazo de suero" se refiere al sustituto del suero que comprende IGF o insulina.

- 30 Modelo de acontecimientos tempranos en la diferenciación de hESC a las células definitivas del endodermo

- La figura 1 muestra un modelo que resume las transiciones tempranas de las células madre embrionarias humanas (hESC) in vitro. La diferenciación de las hESC a través de un proceso que recapitula de cerca la gastrulación puede ser orquestada por la aplicación de altas dosis de activina A en el contexto de una suplementación pobre en suero. La expresión de FGF8 y la localización nuclear de β -catenina, acontecimientos que ocurren en el epiblasto próximo antes de la formación de la línea primitiva, son evidentes antes de aproximadamente 24 horas (células de la línea pre-primitiva). La expresión de alto nivel de los genes expresados en la línea primitiva (brachyury y FGF4) ocurre durante aproximadamente 24 horas. Si se mantiene una dosis alta de activina A, las células de la línea primitiva (células mesendodérmicas) se convierten eficientemente en endodermo definitivo. En cambio, en ausencia de activinas, estos precursores del mesendodermo se convierten en mesodermo. El tratamiento de las hESC con BMP4 y SU5402 induce la expresión genética asociada al endodermo y al trofodermo primitivos.

Células de la línea pre-primitiva y células y procesos del mesendodermo relacionados con éstas

- Se han descrito nuevos procedimientos definidos para la producción de células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas en cultivo diferenciando células pluripotentes, tales como células madre en células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas. Como se describió anteriormente, las células de la línea pre-primitiva son capaces de diferenciarse en células mesendodérmicas, así como células, tejidos y/o órganos derivados de éstas. Las células del mesodermo son capaces de diferenciarse en células del mesodermo y/o células definitivas del endodermo así como en células, tejidos y/o órganos derivados de cualquiera de estos linajes. Según lo descrito en este documento, las células de la línea pre-primitiva se convierten, a través de un intermedio del mesendodermo, en células terminalmente diferenciadas tanto del mesodermo como de los linajes definitivos del endodermo. Como se describirá más detalladamente a continuación, estos procesos pueden proporcionar la base para una producción eficiente de una variedad de tejidos derivados endodérmicos y mesodérmicos humanos. Por ejemplo, tales procesos pueden proporcionar la base para una producción eficiente de tejidos derivados endodérmicos humanos, tales como páncreas, hígado, pulmones, estómago, intestino, tiroides, timo, faringe, vesícula biliar y vejiga urinaria. De forma destacada, la producción de células de la línea pre-primitiva y/o de las células mesendodérmicas es un paso temprano en la diferenciación de una célula madre a una célula β funcional productora de insulina. Como otro ejemplo, la diferenciación de células de la línea pre-primitiva y/o de células del mesodermo puede proporcionar la base para una producción eficiente de los tejidos derivados mesodérmicos humanos, tales como células sanguíneas, tejidos

cardiovasculares, tejidos esqueléticos así como otros tejidos estructurales y conectivos. Para obtener cantidades útiles de cualquiera de los tipos de células o tejidos descritos anteriormente, es deseable una diferenciación de alta eficiencia para cada una de las etapas de diferenciación que ocurren antes de alcanzar el destino celular diferenciado en último término. Dado que la diferenciación de las células madre respecto a las células de la línea pre-primitiva y/o las células mesendodérmicas representa pasos muy iniciales hacia la producción de las células terminalmente diferenciadas funcionales del mesodermo y de los linajes definitivos de la célula del endodermo (como se muestra en la figura 1), la diferenciación de alta eficacia en este paso es particularmente deseable.

Con vistas a la conveniencia de una diferenciación eficiente de las células pluripotentes en células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas, algunos aspectos de los procesos de diferenciación descritos en este documento se refieren a la metodología *in vitro* que da como resultado aproximadamente un 5-90% de conversión de las células pluripotentes en células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas. Típicamente, tales métodos abarcan la aplicación de condiciones de cultivo y del factor de crecimiento en una manera definida y temporal especificada. El enriquecimiento adicional de la población celular para las células de la línea pre-primitiva y/o las células mesendodérmicas se puede alcanzar por el aislamiento y/o la purificación de las células de la línea pre-primitiva y/o de las células mesendodérmicas de otras células en la población clasificando las células según una expresión del marcador fluorescente diferencial. Por tanto, algunas realizaciones descritas en este documento se refieren a células de la línea pre-primitiva. Además, también existen métodos descritos para producir y aislar y/o purificar dichas células. También se describen células mesendodérmicas así como métodos para producir y aislar y/o purificar tales células.

Para determinar la cantidad de células de la línea pre-primitiva en un cultivo celular o en una población celular, es deseable un método para distinguir este tipo de células de las otras células del cultivo o de la población. En consecuencia, también se han descrito células marcadoras cuya presencia, ausencia y/o niveles de expresión relativos son específicos para las células de la línea pre-primitiva y los métodos para detectar y determinar la expresión de dichos marcadores.

Tal como se describe en el presente documento, la presencia, ausencia y/o nivel de expresión de un marcador puede determinarse mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). Por ejemplo, la cantidad de transcripción producida por ciertos marcadores genéticos, como OCT4, ECAD, FGF8, β -catenina, brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, CXCR4, GSC, MIXL1, FOXA2, SOX7, FOXF1, FLK1, BML4, MOX1, SDF1 y otros marcadores descritos en este documento están determinados por Q-PCR cuantitativa. También se describe que la inmunohistoquímica se utiliza para detectar las proteínas expresadas por los genes anteriormente mencionados. También se describe que la inmunohistoquímica/inmunocitoquímica se utiliza para detectar la localización compartimental de la célula de ciertos marcadores polipeptídicos, tales como la localización nuclear de la β -catenina. También se describe que las técnicas de Q-PCR e inmunohistoquímicas se utilizan para identificar y para determinar la cantidad o las proporciones relativas de tales marcadores.

Mediante el uso de métodos, como los descritos anteriormente, para determinar la expresión de uno o más marcadores apropiados, es posible identificar células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas, así como determinar la proporción de células de la línea pre-primitiva y/o células mesodérmicas en un cultivo celular o en una población celular. Por ejemplo, las células de la línea pre-primitiva, o las poblaciones celulares que se producen, expresan el marcador FGF8 y/o la β -catenina localizada en el núcleo a un nivel de aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor que los tipos de células de líneas no pre-primitivas o poblaciones celulares. También se describe que las células de la línea pre-primitiva o las poblaciones celulares que se producen expresan el marcador FGF8 y/o la β -catenina localizada en el núcleo a un nivel de más de 2 órdenes de magnitud mayor que los tipos de células de la línea no pre-primitiva o las poblaciones celulares. También se describe que las células mesendodérmicas o las poblaciones celulares que se producen expresan los marcadores brachyury, FGF4 y/o SNAI1 a un nivel de aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayores que los tipos de células no mesendodérmicas o las poblaciones celulares. También se describe que las células mesendodérmicas o las poblaciones celulares que se producen expresan los marcadores de brachyury, de FGF4 y/o de SNAI1 en un nivel de más de 2 órdenes de magnitud mayores que los tipos de células no mesendodérmicas o las poblaciones celulares.

También se han descrito composiciones de la línea pre-primitiva y/o del mesendodermo. Por ejemplo, también se han descrito cultivos celulares que comprenden células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas, mientras que otras se relacionan con poblaciones celulares enriquecidas en células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas. También se describen cultivos celulares que comprenden células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas, en donde al menos aproximadamente 5-90% de las células en cultivo son células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas.

También se han descrito cultivos celulares que comprenden células humanas, en donde al menos aproximadamente el 5-90% de las células humanas en cultivo son células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas. Debido a que la eficacia del procedimiento de diferenciación se puede ajustar modificando ciertos parámetros, que incluyen, entre otros, las condiciones del crecimiento de la célula, las concentraciones del factor de crecimiento y el tiempo de las etapas de cultivo, los procedimientos de diferenciación en este documento descritos pueden dar lugar a aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente

70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o más de aproximadamente 95% de la conversión de células pluripotentes a células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas.

- 5 Se describe la conversión de una población celular pluripotente, tal como una población de células madre, a la población de células de la línea pre-primitiva sustancialmente pura y/o a las células mesendodérmicas.

Las composiciones y los métodos descritos en este documento tienen varias características útiles. Por ejemplo, los cultivos celulares y las poblaciones celulares que comprenden las células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas, así como los métodos para producir dichos cultivos celulares y poblaciones celulares, son útiles para modelar las primeras etapas del desarrollo humano. Además, las composiciones y los métodos descritos en este documento también pueden servir para la intervención terapéutica en estados de enfermedad, como la diabetes mellitus. Por ejemplo, puesto que las células de la línea pre-primitiva y/o las células mesendodérmicas sirven como fuente para solamente un número limitado de tejidos, pueden ser utilizadas en el desarrollo de tipos puros de tejidos o de células.

Producción de células de la línea pre-primitiva de células pluripotentes

15 En algunos procedimientos para producir células de la línea pre-primitiva, las células pluripotentes utilizadas como material de partida son células madre. En ciertos procedimientos, los cultivos celulares de la línea pre-primitiva y las poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células de la línea pre-primitiva se producen a partir de células madre embrionarias. Un método que se describe en este documento para derivar las células de la línea pre-primitiva utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida para la producción de la línea celular pre-primitiva. Se describe en el contexto de la presente invención que tales células pluripotentes pueden ser células que se originan de la mórula, de la masa de células internas embrionaria o de las obtenidas de las crestas gonadales embrionarias. Las células madre embrionarias humanas se pueden mantener en cultivo en un estado pluripotente sin diferenciación sustancial utilizando los métodos conocidos en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.453.357, 5.670.372, 5.690.926, 5.843.780, 6.200.806 y 6.251.671.

25 En algunos procedimientos para producir células de la línea pre-primitiva como se describe en este documento, las hESC se mantienen en una capa alimentadora. En tales procedimientos, puede ser utilizado cualquier capa alimentadora que permita que las hESC sean mantenidas en un estado pluripotente. Una capa alimentadora de uso común para el cultivo de células madre embrionarias humanas es una capa de fibroblastos de ratón. Más recientemente, se han desarrollado capas alimentadoras de fibroblasto humano para su uso en cultivos de hESC. Los procesos alternativos para producir las células de la línea pre-primitiva permiten el mantenimiento de hESC pluripotentes sin el uso de una capa alimentadora.

Las células madre embrionarias humanas utilizadas en este documento pueden mantenerse en cultivo, con o sin suero. En algunos procedimientos de mantenimiento de células madre embrionarias, se utiliza el reemplazo de suero. En otros, se utilizan técnicas de cultivo libres de suero.

35 Las células madre se mantienen en cultivo en un estado pluripotente por paso rutinario hasta que se desee que se diferencien en células de la línea pre-primitiva. En algunos procedimientos, la diferenciación en células de la línea pre-primitiva se logra proporcionando al cultivo de células madre un factor de diferenciación, tal como un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , en una cantidad suficiente para promover la diferenciación en células de la línea pre-primitiva. Los factores de crecimiento de la superfamilia TGF β que son útiles para la producción de células de la línea pre-primitiva se seleccionan de los subgrupos de Nodal/activina. En algunos procedimientos de diferenciación preferidos, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en Nodal, activina A y activina B. En ciertos procedimientos de diferenciación, se utiliza el factor de crecimiento de activina A.

Con respecto a algunos de los procedimientos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células de la línea pre-primitiva, los factores de crecimiento antes mencionados se proporcionan a las células para que los factores de crecimiento estén presentes en los cultivos a concentraciones suficiente para promover la diferenciación de al menos una porción de las células madre en células de la línea pre-primitiva. En algunos procedimientos, los factores de crecimiento antes mencionados 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.

55 En ciertos procedimientos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células de la línea pre-primitiva, los factores de crecimiento antes mencionados se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de crecimiento se pueden eliminar en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente 2 horas, en aproximadamente 3 horas, en aproximadamente 4 horas, en aproximadamente 5 horas, en aproximadamente 6 horas, en aproximadamente 7 horas, en aproximadamente 8 horas, en aproximadamente 9 horas, en aproximadamente 10

horas, en aproximadamente 11 horas, en aproximadamente 12 horas, en el plazo de aproximadamente 13 horas, en el plazo de aproximadamente 14 horas, en el plazo de aproximadamente 15 horas, en el plazo de aproximadamente 16 horas, en el plazo de aproximadamente 17 horas, en el plazo de aproximadamente 18 horas, en aproximadamente 19 horas, en aproximadamente horas, en aproximadamente 23 horas, en aproximadamente 24 horas o en más de 24 horas.

Los cultivos de las células de la línea pre-primitiva se pueden cultivar en un medio que contiene poco suero o ningún suero. Bajo ciertas condiciones de cultivo, las concentraciones séricas pueden variar de aproximadamente 0% (v/v) a aproximadamente 10% (v/v). Por ejemplo, en algunos procedimientos de diferenciación, la concentración sérica del medio puede ser inferior a aproximadamente el 0,05% (v/v), menos de aproximadamente el 0,1% (v/v), menos de aproximadamente el 0,2% (v/v), menos de aproximadamente el 0,3% (v/v), menos de aproximadamente el 0,4% (v/v), menos de aproximadamente el 0,5% (v/v), menos de aproximadamente el 0,6% (v/v), menos de aproximadamente el 0,7% (v/v), menos de aproximadamente el 0,8% (v/v), menos de aproximadamente el 0,9% (v/v), menos de aproximadamente el 1% (v/v), menos de aproximadamente el 2% (v/v), menos de aproximadamente el 3% (v/v), menos de aproximadamente el 4% (v/v), menos de aproximadamente el 5% (v/v), menos de aproximadamente el 6% (v/v), menos de aproximadamente el 7% (v/v), menos de aproximadamente el 8% (v/v), menos de aproximadamente el 9% (v/v) o menos de aproximadamente el 10% (v/v). En algunos procedimientos, las células de la línea pre-primitiva se cultivan sin suero o sin el reemplazo del suero.

Monitorización de la diferenciación de células pluripotentes en células de la línea pre-primitiva

La progresión del cultivo hESC en células de la línea pre-primitiva se puede monitorear determinando la expresión temporal de los marcadores característicos de las células de la línea pre-primitiva. En algunos procedimientos, la expresión de ciertos marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de ciertos marcadores puede determinarse midiendo el nivel en el que el marcador está presente en las células del cultivo celular o de la población celular en uno o más puntos de tiempo después de la adición del factor de diferenciación. En tales procedimientos, la medición de la expresión del marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método de cuantificación de la expresión de los marcadores producidos por los marcadores génicos es mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR). Los métodos de realización de la Q-PCR son bien conocidos en la técnica. Otros métodos que se conocen en la técnica también se pueden utilizar para cuantificar la expresión génica del marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto genético marcador se puede detectar mediante el uso de anticuerpos específicos para el producto genético marcador de interés. En ciertos procedimientos, se determina la expresión de los marcadores génicos característicos de las células de la línea pre-primitiva, así como la falta de expresión significativa de los marcadores génicos característicos de las hESC y otros tipos celulares. En otros procedimientos más, se determina el tiempo y la cantidad de expresión de los marcadores génicos característicos de las células de la línea pre-primitiva en uno o más puntos temporales posteriores a la adición del factor de diferenciación.

Como se describe más adelante en los ejemplos de referencia a continuación, los marcadores de células de la línea pre-primitiva son FGF8 y β -catenina. Como tal, las células de la línea pre-primitiva producidas por los procedimientos descritos en este documento expresan los marcadores génicos de FGF8 y β -catenina, produciéndose así los productos del gen marcador de FGF8 y β -catenina. Se describe que el ARNm de FGF8 se expresa sustancialmente en células de la línea pre-primitiva pero no en hESC. Se puede observar una sobreexpresión substancial del ARNm de FGF8, en los niveles máximos cercanos, en un cultivo de hESC diferenciador aproximadamente 6 horas después de poner en contacto las hESC con un factor de diferenciación apropiado, tal como la activina A. En este momento, la expresión de los marcadores indicativos de otros tipos de células, tales como mesendodermo, endodermo primitivo, endodermo definitivo, mesodermo y ectodermo (ver la tabla 1), sigue siendo relativamente baja. Se describe que los marcadores indicativos del mesendodermo, del endodermo primitivo, del endodermo definitivo, del mesodermo y del ectodermo no se expresan sustancialmente aproximadamente 6 horas después de poner en contacto las hESC con el factor de la diferenciación. La expresión de ARNm de FGF8 se mantiene a niveles altos durante al menos aproximadamente 24 horas después de poner en contacto las hESC con el factor de diferenciación, pero comienza a declinar a partir de entonces. Además, a aproximadamente 17 horas después de poner en contacto las hESC con un factor de diferenciación adecuado, tal como la activina A, la localización nuclear del polipéptido de β -catenina (la expresión de la β -catenina localizada en el núcleo) es observada por inmunocitoquímica. En las hESC, el polipéptido de β -catenina está presente en la periferia celular pero no en el núcleo.

Se apreciará que la expresión de FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo se induce en un intervalo de diferentes niveles en células de la línea pre-primitiva dependiendo de las condiciones de diferenciación. Como tal, se describe que la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina en las células de la línea pre-primitiva o las poblaciones celulares es desde al menos aproximadamente 2 veces más alta a por lo menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de estos marcadores en células de la línea no pre-primitiva o poblaciones celulares, durante entre aproximadamente las primeras 6 y 18 horas de diferenciación de las hESC. También se describe que la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina localizada en el núcleo en las células de la línea pre-primitiva o las poblaciones celulares es por lo menos aproximadamente 4 veces más alta, por lo menos aproximadamente 6 veces más alta, por lo menos aproximadamente 8 veces más alta, por lo menos aproximadamente 10 veces más alta, por lo menos aproximadamente 15 veces más alta, por lo menos aproximadamente 20 veces más alta, por lo menos aproximadamente 40 veces más alta, por lo menos aproximadamente 80 veces más alta, por lo

menos aproximadamente 100 veces más alta, por lo menos aproximadamente 150 veces más alta, por lo menos aproximadamente 200 veces más alta, por lo menos aproximadamente 500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 750 veces más alta, por lo menos aproximadamente 1000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 2500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 5000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 7500 veces más alta o por lo menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina localizada en el núcleo en células de la línea no pre-primitiva o poblaciones celulares, durante aproximadamente entre las primeras 6 y 18 horas de diferenciación de las hESC. También se describe que la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina localizada en el núcleo en células de la línea pre-primitiva o poblaciones celulares es infinitamente más alta que la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina localizada en el núcleo en células de la línea no pre-primitiva o poblaciones celulares, durante aproximadamente entre las primeras 6 y 18 horas de diferenciación de las hESC.

Además, se apreciará que hay un intervalo de diferencias entre el nivel de expresión del marcador FGF8 y los niveles de expresión de los marcadores brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en las células de la línea pre-primitiva. Del mismo modo, existe una serie de diferencias entre el nivel de expresión del marcador de β -catenina localizada en el núcleo y los niveles de expresión de los marcadores brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en células de la línea pre-primitiva. Por tanto, se describe que la expresión del marcador FGF8 y/o del marcador de β -catenina localizada en el núcleo es desde por lo menos aproximadamente 2 veces más alta a por lo menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de los marcadores de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. También se describe que la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina localizada en el núcleo es por lo menos aproximadamente 4 veces más alta, por lo menos aproximadamente 6 veces más alta, por lo menos aproximadamente 8 veces más alta, por lo menos aproximadamente 10 veces más alta, por lo menos aproximadamente 15 veces más alta, por lo menos aproximadamente 20 veces más alta, por lo menos aproximadamente 40 veces más alta, por lo menos aproximadamente 80 veces más alta, por lo menos aproximadamente 100 veces más alta, por lo menos aproximadamente 150 veces más alta, por lo menos aproximadamente 200 veces más alta, por lo menos aproximadamente 500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 750 veces más alta, por lo menos aproximadamente 1000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 2500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 5000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 7500 veces más alta o al menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de los marcadores brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. También se describe que los marcadores brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 no se expresan perceptiblemente en las células de la línea pre-primitiva.

Enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células de la línea pre-primitiva

Con respecto a los aspectos adicionales de los procedimientos descritos en este documento, las células de la línea pre-primitiva pueden ser enriquecidas, aisladas y/o purificadas. También se describe que las poblaciones celulares enriquecidas para las células de la línea pre-primitiva se producen aislando tales células de los cultivos celulares.

En los procedimientos descritos en este documento, las células de la línea pre-primitiva pueden estar marcadas con fluorescencia, luego ser aisladas de las células no marcadas mediante el uso de un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). También se describe que se utiliza un ácido nucleico que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) u otro ácido nucleico que codifique un gen marcador fluorescente expresable para marcar las células de la línea pre-primitiva. Por ejemplo, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica la GFP, o su fragmento biológicamente activo, se introduce en una célula pluripotente, preferiblemente una célula madre embrionaria humana, en la parte inferior del promotor FGF8 tal que la expresión del producto genético de GFP o su fragmento biológicamente activo está bajo control del promotor FGF8. También se describe que toda la región codificante del ácido nucleico, que codifica FGF8, se sustituye por un ácido nucleico que codifica la GFP o su fragmento biológicamente activo. También se describe que el ácido nucleico que codifica la GFP o su fragmento biológicamente activo se fusiona en marco con al menos una porción del ácido nucleico que codifica FGF8, generando así una proteína de fusión. También se describe que la proteína de fusión retiene una actividad fluorescente similar a la de GFP.

Las células marcadas con fluorescencia, como las células pluripotentes descritas anteriormente, se diferencian de las células de la línea pre-primitiva, como se describió anteriormente. Porque las células de la línea pre-primitiva expresan el gen marcador fluorescente, mientras que las células de la línea no-pre-primitiva no lo hacen, estos dos tipos de células pueden ser separadas. También se describe que las suspensiones celulares que comprenden una mezcla de células de la línea pre-primitiva marcadas con fluorescencia y células de la línea no pre-primitiva no marcadas se clasifican utilizando un FACS. Las células de la línea pre-primitiva se recogen por separado de las células de la línea no pre-primitiva, lo que da como resultado el aislamiento de dichos tipos de células. Si se desea, las composiciones de células aisladas se pueden purificar aún más mediante rondas adicionales de clasificación utilizando los mismos marcadores, o diferentes, que son específicos para las células de la línea pre-primitiva.

Además de los procedimientos descritos, las células de la línea pre-primitiva también pueden aislarse con otras técnicas para el aislamiento celular. Además, las células de la línea pre-primitiva también pueden ser enriquecidas o aisladas por métodos de subcultivo serial en condiciones de crecimiento que promuevan la supervivencia selectiva o la expansión selectiva de las células de la línea pre-primitiva.

Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos anteriormente pueden utilizarse con dichos cultivos en cualquier etapa de diferenciación.

Utilizando los métodos descritos en este documento, las poblaciones enriquecidas, aisladas y/o purificadas de células de la línea pre-primitiva y/o tejidos pueden ser producidas in vitro a partir de cultivos hESC o poblaciones celulares que hayan sufrido diferenciación entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 24 horas. Como se describe en este documento, las células sufren una diferenciación aleatoria. También se describe que, sin embargo, las células se dirigen a diferenciarse principalmente en células de la línea pre-primitiva. Algunos métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación preferidos se relacionan con la producción de células de la línea pre-primitiva de células madre embrionarias humanas.

Usando los métodos descritos en este documento, las poblaciones celulares o cultivos celulares pueden ser enriquecidos en el contenido de células de la línea pre-primitiva por al menos aproximadamente 2 a aproximadamente 1000 veces en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o no enriquecidas o cultivos celulares. Como se describe en este documento, las células de la línea pre-primitiva se pueden enriquecer entre por lo menos aproximadamente 5 y aproximadamente 500 veces en comparación con las poblaciones celulares o los cultivos celulares sin tratar o no enriquecidos. Como se describe en este documento, las células de la línea pre-primitiva se pueden enriquecer entre por lo menos aproximadamente 10 y aproximadamente 200 veces en comparación con las poblaciones de células no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares. Como se describe en este documento, las células de la línea pre-primitiva se pueden enriquecer entre por lo menos aproximadamente 20 y aproximadamente 100 veces en comparación con las poblaciones celulares o los cultivos celulares sin tratar o no enriquecidos. Como se describe en este documento, las células de la línea pre-primitiva se pueden enriquecer entre por lo menos aproximadamente 40 y aproximadamente 80 veces en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares. Como se describe en este documento, las células de la línea pre-primitiva se pueden enriquecer entre por lo menos aproximadamente 2 y aproximadamente 20 veces en comparación con las poblaciones de células no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares.

Composiciones compuestas de células de la línea pre-primitiva

Las composiciones celulares producidas por los métodos descritos anteriormente incluyen cultivos celulares que comprenden células de la línea pre-primitiva y poblaciones celulares enriquecidas en células de la línea pre-primitiva. Por ejemplo, se pueden producir cultivos celulares que comprendan células de la línea pre-primitiva, en donde al menos aproximadamente 5-90% de las células en cultivo son células de la línea pre-primitiva. Debido a que la eficiencia del procedimiento de diferenciación se puede ajustar modificando ciertos parámetros, que incluyen entre otros, las condiciones de crecimiento de la célula, las concentraciones del factor de crecimiento y el tiempo de las etapas de cultivo, los procedimientos de diferenciación descritos en este documento pueden dar lugar a aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o más que aproximadamente 95% de la conversión de células pluripotentes en células de la línea pre-primitiva. En los procedimientos en los que se emplea el aislamiento de las células de la línea pre-primitiva, se puede recuperar una población de células de la línea pre-primitiva sustancialmente pura.

Algunas de las realizaciones descritas en este documento se refieren a composiciones, como las poblaciones celulares y los cultivos celulares, que comprenden células pluripotentes, como las células madre y las células de la línea pre-primitiva. Por ejemplo, utilizando los métodos descritos en este documento, se pueden producir composiciones que comprenden mezclas de hESC y células de la línea pre-primitiva. En algunas realizaciones, se producen composiciones que comprenden al menos aproximadamente 5 células de la línea pre-primitiva por cada 95 células pluripotentes. En otras realizaciones, se producen composiciones que comprenden al menos aproximadamente 95 células de la línea pre-primitiva por cada 5 células pluripotentes. Además, se describen composiciones que comprenden otras proporciones de células de la línea pre-primitiva en células pluripotentes. Por ejemplo, se contemplan composiciones que comprenden al menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 millón de células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 100.000 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 10.000 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1000 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 500 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 100 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 10 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 5 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 2 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 2 células de la línea pre-primitiva por cada célula pluripotente, al menos aproximadamente 5 células de la línea pre-primitiva por cada célula pluripotente, al menos aproximadamente 10 células de la línea pre-primitiva por cada célula pluripotente, al menos aproximadamente 20 líneas pre-primitivas células por cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 50 células de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 100 células de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 1000

células de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 10.000 células de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 100.000 células de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 célula pluripotente y por lo menos aproximadamente 1 millón células de la línea pre-primitiva por aproximadamente cada 1 célula pluripotente.

5 Las células pluripotentes son células madre pluripotentes humanas. También se describe en el contexto de la presente invención que las células madre se derivan de una mórula, la masa celular interna de un embrión o las crestas gonadales de un embrión. También se describe en el contexto de la presente invención que las células pluripotentes se derivan de los tejidos gonadales o germinales de una estructura multicelular que se ha desarrollado más allá de la etapa embrionaria.

10 Algunas de las realizaciones descritas en este documento se refieren a cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden desde al menos aproximadamente un 5% de células de la línea pre-primitiva a al menos aproximadamente 99% de células de la línea pre-primitiva. Según lo descrito en este documento, los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células de mamíferos. Los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células humanas. Por ejemplo, ciertas realizaciones específicas se refieren a cultivos celulares que

15 comprenden células humanas, en donde desde al menos aproximadamente 5% a al menos aproximadamente 99% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva. Otras realizaciones se refieren a cultivos celulares que comprenden células humanas, en donde al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos

20 aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o más del 99% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva. En las realizaciones en las que los cultivos celulares o las

25 poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o en las poblaciones celulares.

Otras realizaciones descritas en este documento se refieren a composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, tales como células de la línea pre-primitiva humanas, en donde la expresión del marcador FGF8 y/o el marcador de β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la

30 expresión de los marcadores brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en al menos aproximadamente 5% de las células humanas. En otras realizaciones, la expresión del marcador FGF8 y/o del marcador de β -catenina localizada en el núcleo es mayor que la expresión del marcador brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en al menos aproximadamente 10% de las células humanas, en al menos

35 aproximadamente 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente 60%

40 de las células humanas, en al menos aproximadamente 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente 95% de las células humanas, en al menos aproximadamente 98% de las células humanas, en al menos aproximadamente 99% de las células humanas o en más del 99% de las células humanas. En las realizaciones en las que los cultivos celulares o las

45 poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta a las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o en las poblaciones celulares.

También hay composiciones descritas, como los cultivos celulares o las poblaciones celulares, que comprenden hESC humanas y células de la línea pre-primitiva humanas, en donde la sobreexpresión sustancial de la expresión del ARNm de FGF8 ocurre en las células del cultivo celular o de la población celular en aproximadamente 1 hora, en

50 aproximadamente 2 horas, en aproximadamente 3 horas, en aproximadamente 4 horas, en aproximadamente 5 horas, en aproximadamente 6 horas, en aproximadamente 7 horas, en aproximadamente 8 horas, en aproximadamente 9 horas, en aproximadamente 10 horas, en aproximadamente 11 horas, en aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, en aproximadamente 15 horas, en aproximadamente 16 horas, en aproximadamente 17 horas, en aproximadamente 18 horas, en aproximadamente 19 horas, en

55 aproximadamente 20 horas, en aproximadamente 21 horas, en aproximadamente 22 horas, en aproximadamente 23 horas, en aproximadamente 24 horas, o en más de 24 horas después de poner en contacto las hESC en el cultivo con un factor de diferenciación adecuado, tales como la activina A. La sobreexpresión sustancial de la expresión del ARNm de FGF8 puede ocurrir por lo menos en aproximadamente 5% de las células humanas, por lo menos

60 aproximadamente 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente 55%

de las células humanas, en al menos aproximadamente 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente 95% de las células humanas, en al menos aproximadamente 98% de las células humanas, en al menos aproximadamente 99% de las células humanas o en más del 99% de las células humanas. Cuando los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o en las poblaciones celulares.

También se han descrito composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden hESC humanas y células de la línea pre-primitiva humana, en donde la localización nuclear sustancial del polipéptido de β -catenina (expresión del marcador de β -catenina localizada en el núcleo) ocurre en las células del cultivo celular o de la población celular en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente 2 horas, en aproximadamente 3 horas, en aproximadamente 4 horas, en aproximadamente 5 horas, en aproximadamente 6 horas, en aproximadamente 7 horas, en aproximadamente 8 horas, en aproximadamente 9 horas, en aproximadamente 10 horas, en aproximadamente 11 horas, en aproximadamente 12 horas, en aproximadamente 13 horas, en aproximadamente 14 horas, en aproximadamente 15 horas, en aproximadamente 16 horas, en aproximadamente 17 horas, en aproximadamente 18 horas, en aproximadamente 19 horas, en aproximadamente 20 horas, en aproximadamente 21 horas, en aproximadamente 22 horas, en aproximadamente 23 horas, en aproximadamente 24 horas, o en más de 24 horas después de poner en contacto las hESC en el cultivo con un factor de diferenciación adecuado, tal como la activina A. La expresión de la β -catenina localizada en el núcleo puede ocurrir en al menos aproximadamente 5% de las células humanas, al menos aproximadamente 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente 95% de las células humanas, en al menos aproximadamente 98% de las células humanas, en al menos aproximadamente 99% de las células humanas o en más del 99% de las células humanas. Cuando los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o las poblaciones celulares.

Utilizando los métodos descritos en este documento, se pueden producir composiciones que comprenden células de la línea pre-primitiva sustancialmente libres de otros tipos de células. También se describe que las poblaciones celulares de líneas pre-primitivas o cultivos celulares producidos por los métodos descritos en este documento están sustancialmente libres de células que expresan significativamente los genes de los marcadores de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y/o SOX1.

También se describe que una descripción de una célula de la línea pre-primitiva basada en la expresión de los genes de los marcadores es, FGF8 alta, β -catenina localizada en el núcleo alta, brachyury baja, FGF4 baja, SNAI1 baja, SOX17 baja, FOXA2 baja, SOX7 baja y SOX1 baja.

Producción de células mesodérmicas de células pluripotentes

En algunos procedimientos para la producción de células mesendodérmicas como se describen en este documento las células pluripotentes utilizadas como material de partida son células madre. En ciertos procedimientos, los cultivos celulares de mesendodermo y las poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células mesendodérmicas se producen a partir de células madre embrionarias. Un método preferido para derivar las células mesendodérmicas según lo descrito en el contexto de la presente invención utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida para la producción de células del mesendodermo. Tal como se describe en el contexto de la presente invención, estas células pluripotentes pueden ser células que provienen de la mórula, masa celular embrionaria interna o las obtenidas a partir de las crestas gonadales embrionarias. Las células madre embrionarias humanas se pueden mantener en cultivo en un estado pluripotente sin una diferenciación sustancial utilizando métodos que se conocen en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.453.357, 5.670.372, 5.690.926, 5.843.780, 6.200.806 y 6.251.671.

En algunos procedimientos para la producción de células mesendodérmicas, como se describe en este documento, se mantienen las hESC en una capa alimentadora. En tales procedimientos, puede ser utilizada cualquier capa alimentadora que permita que las hESC sean mantenidas en un estado pluripotente. Una capa alimentadora comúnmente utilizada para el cultivo de células madre embrionarias humanas es una capa de fibroblastos de ratón. Más recientemente, se han desarrollado capas alimentadoras de fibroblasto humano para su uso en cultivos de hESC. Algunos procedimientos alternativos para la producción de células mesendodérmicas permiten el mantenimiento de

hESC pluripotentes sin el uso de una capa alimentadora.

Las células madre embrionarias humanas utilizadas en este documento pueden mantenerse en cultivo con o sin suero. En algunos procedimientos de mantenimiento de células madre embrionarias, se utiliza el reemplazo de suero. En otros, se utilizan técnicas de cultivo sin suero.

- 5 Las células madre se mantienen en cultivo en un estado pluripotente mediante el paso rutinario hasta que se desee que se diferencien en células mesendodérmicas. En algunos procedimientos, la diferenciación a células mesendodérmicas se logra proporcionando al cultivo de células madre un factor de diferenciación, tal como un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β , en una cantidad suficiente para promover la diferenciación en células mesendodérmicas. Factores de crecimiento de la superfamilia TGF β que son útiles para la producción de las células mesendodérmicas se seleccionan de los subgrupos Nodal/activina A. En algunos procedimientos de diferenciación preferidos como se describe en este documento, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en Nodal, activina a, y activina B. En ciertos procedimientos de diferenciación, se utiliza el factor de crecimiento activina A.

- 15 Con respecto a algunos de los procedimientos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células mesendodérmicas como se describe en este documento, se proporcionan los factores de crecimiento antes mencionados a las células para que los factores de crecimiento estén presentes en los cultivos a las concentraciones suficientes para que se promueva la diferenciación de al menos una porción de las células madre en células mesendodérmicas. En algunos procedimientos, como se describe en este documento, los factores de crecimiento antes mencionados están presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, por lo menos aproximadamente 10 ng/ml, por lo menos aproximadamente 25 ng/ml, por lo menos aproximadamente 50 ng/ml, por lo menos aproximadamente 75 ng/ml, por lo menos aproximadamente 100 ng/ml, por lo menos aproximadamente 200 ng/ml, por lo menos aproximadamente 300 ng/ml, por lo menos aproximadamente 400 ng/ml, por lo menos aproximadamente 500 ng/ml, por lo menos aproximadamente 1000 ng/ml, por lo menos aproximadamente 2000 ng/ml, por lo 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 ciertos procedimientos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células mesendodérmicas, como se describe en este documento, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de crecimiento se pueden eliminar en aproximadamente 18 horas, en aproximadamente 19 horas, en aproximadamente 20 horas, en aproximadamente 21 horas, en aproximadamente 22 horas, en aproximadamente 23 horas, en aproximadamente 24 horas, en aproximadamente 25 horas, en aproximadamente 26 horas, en aproximadamente 27 horas, en aproximadamente 28 horas, en aproximadamente 29 horas, en aproximadamente 30 horas, en aproximadamente 31 horas, en aproximadamente 32 horas, en aproximadamente 33 horas, en aproximadamente 34 horas, en aproximadamente 35 horas, en aproximadamente 36 horas, en aproximadamente 37 horas, en aproximadamente 38 horas, en aproximadamente 39 horas, en aproximadamente 40 horas, en aproximadamente 41 horas, en aproximadamente 42 horas, en aproximadamente 43 horas, en aproximadamente 44 horas, en aproximadamente 45 horas, en aproximadamente 46 horas, en aproximadamente 47 horas, en aproximadamente 48 horas.

- Los cultivos de las células mesendodérmicas se pueden cultivar en un medio que contiene poco suero o ningún suero. Bajo ciertas condiciones de cultivo, las concentraciones séricas pueden variar de aproximadamente 0% (v/v) a aproximadamente 10% (v/v). Por ejemplo, en algunos procedimientos de diferenciación, la concentración sérica del medio puede ser inferior a aproximadamente el 0,05% (v/v), menos de aproximadamente el 0,1% (v/v), menos de aproximadamente el 0,2% (v/v), menos de aproximadamente el 0,3% (v/v), menos de aproximadamente el 0,4% (v/v), menos de aproximadamente el 0,5% (v/v), menos de aproximadamente el 0,6% (v/v), menos de aproximadamente el 0,7% (v/v), menos de aproximadamente el 0,8% (v/v), menos de aproximadamente el 0,9% (v/v), menos de aproximadamente el 1% (v/v), menos de aproximadamente el 2% (v/v), menos de aproximadamente el 3% (v/v), menos de aproximadamente el 4% (v/v), menos de aproximadamente el 5% (v/v), menos de aproximadamente el 6% (v/v), menos de aproximadamente el 7% (v/v), menos de aproximadamente el 8% (v/v), menos de aproximadamente el 9% (v/v) o menos de aproximadamente el 10% (v/v). En algunos procedimientos, como se describe en este documento, las células mesendodérmicas se cultivan sin suero o sin reemplazo de suero. En otros procedimientos, las células mesendodérmicas se cultivan en presencia de B27. En tales procedimientos, la concentración del suplemento B27 puede variar de aproximadamente 0,1% (v/v) a aproximadamente 20% (v/v).

Monitorización de la diferenciación de células pluripotentes en células mesendodérmicas

- La progresión del cultivo hESC a células mesendodérmicas se puede monitorear determinando la expresión temporal de los marcadores característicos de las células mesendodérmicas. En algunos procedimientos, como se describe en este documento, la expresión de ciertos marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de ciertos marcadores puede determinarse midiendo el nivel en el que el marcador está presente en las células del cultivo celular o de la población celular en uno o más puntos de tiempo después de la adición del factor de diferenciación. En tales procedimientos, la medición del marcador de expresión puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método para cuantificar la expresión de los marcadores producidos por los marcadores génicos es mediante el uso de Q-PCR. Otros métodos que se conocen en la técnica también se pueden utilizar para

cuantificar la expresión génica del marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto genético marcador se puede detectar mediante el uso de anticuerpos específicos para el producto genético marcador de interés. En ciertos procedimientos, se determina la expresión de los marcadores génicos característicos de las células mesendodérmicas, así como la falta de expresión significativa de los marcadores génicos característicos de las hESC y otros tipos celulares. En otros procedimientos más, se determina el tiempo y la cantidad de expresión de los marcadores génicos característicos de las células mesendodérmicas en uno o más puntos temporales posteriores a la adición del factor de diferenciación.

Como se describe más adelante en los Ejemplos de referencia de más abajo, el marcador de las células mesendodérmicas es brachyury, FGF4 y SNAI1. Por lo tanto, las células mesendodérmicas producidas por los procedimientos descritos en este documento expresan los genes de los marcadores brachyury, FGF4 y SNAI1, produciendo de tal modo los productos génicos de los marcadores brachyury, FGF4 y SNAI1. Según lo descrito en este documento, el ARNm de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 se expresa sustancialmente en células mesendodérmicas pero no en hESC. La sobreexpresión sustancial del ARNm de brachyury, FGF4 y/o SNAI1, a casi los niveles máximos, se puede observar en un cultivo de diferenciación de hESC durante 24 horas después de entrar en contacto las hESC con un factor de diferenciación apropiado, tal como la activina A. En este momento, la expresión de ciertos marcadores indicativos de otros tipos de células, como el endodermo primitivo, el endodermo definitivo, el mesodermo y el ectodermo (ver tabla 1), sigue siendo relativamente baja. Según lo descrito en este documento, ciertos marcadores indicativos del endodermo primitivo, del endodermo definitivo, del mesodermo y del ectodermo no se expresan sustancialmente en 24 horas después de entrar en contacto las hESC con el factor de diferenciación. En algunas realizaciones, la expresión del ARNm de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 comienza a declinar después de aproximadamente 24 horas una vez entran en contacto las hESC con el factor de diferenciación. Según lo descrito en este documento, la expresión del ARNm de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 comienza a declinar después de aproximadamente 30 horas, después de aproximadamente 36 horas, después de aproximadamente 42 horas, después de aproximadamente 48 horas o después de más de aproximadamente 48 horas subsecuentes a entrar en contacto las hESC con el factor de diferenciación.

Se apreciará que la expresión de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 se induce sobre una gama de diferentes niveles en las células mesodérmicas dependiendo de las condiciones de diferenciación. Por lo tanto, como se describe en este documento, la expresión del marcador de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 en células mesendodérmicas o poblaciones celulares es por lo menos aproximadamente 2 veces mayor a por lo menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de estos marcadores en células no mesendodérmicas o poblaciones de células, después de aproximadamente 24 horas de diferenciación de las hESC.

La expresión del marcador brachyury, FGF4 y/o SNAI1 en células mesendodérmicas o en las poblaciones celulares es por lo menos aproximadamente 4 veces mayor, al menos aproximadamente 6 veces más alta, por lo menos aproximadamente 8 veces más alta, por lo menos aproximadamente 10 veces más alta, por lo menos aproximadamente 15 veces más alta, por lo menos aproximadamente 20 veces más alta, por lo menos aproximadamente 40 veces más alta, por lo menos aproximadamente 80 veces más alta, por lo menos aproximadamente 100 veces más alta, por lo menos aproximadamente 150 veces más alta, por lo menos aproximadamente 200 veces más alta, por lo menos aproximadamente 500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 750 veces más alta, por lo menos aproximadamente 1000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 2500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 5000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 7500 veces más alta o por lo menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 en células no mesendodérmicas o poblaciones de células, aproximadamente después de 24 horas de diferenciación de las hESC. También se describe que la expresión del marcador brachyury, FGF4 y/o SNAI1 en células mesendodérmicas o poblaciones celulares es infinitamente más alta que la expresión del marcador brachyury, FGF4 y/o SNAI1 en células no mesendodérmicas o poblaciones celulares, después de aproximadamente 24 horas de diferenciación de las hESC.

Además, se apreciará que hay un intervalo de diferencias entre el nivel de expresión de los marcadores brachyury, FGF4 y/o SNAI1 y los niveles de expresión de los marcadores OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en las células mesendodérmicas. Por lo tanto, en algunas realizaciones descritas en este documento, la expresión de los marcadores brachyury, FGF4 y/o SNAI1 es por lo menos desde aproximadamente 2 veces más alta a al menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de los marcadores OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. También se describe que la expresión del marcador brachyury, FGF4 y/o SNAI1 es por lo menos aproximadamente 4 veces más alta, por lo menos aproximadamente 6 veces más alta, por lo menos aproximadamente 8 veces más alta, por lo menos aproximadamente 10 veces más alta, por lo menos aproximadamente 15 veces más alta, por lo menos aproximadamente 20 veces más alta, por lo menos aproximadamente 40 veces más alta, por lo menos aproximadamente 80 veces más alta, por lo menos aproximadamente 100 veces más alta, por lo menos aproximadamente 150 veces más alta, por lo menos aproximadamente 200 veces más alta, por lo menos aproximadamente 500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 750 veces más alta, al menos aproximadamente 1000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 2500 veces más alta, por lo menos aproximadamente 5000 veces más alta, por lo menos aproximadamente 7500 veces más alta o por lo menos aproximadamente 10.000 veces más alta que la expresión de los marcadores OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1. También se describe que los marcadores OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 no se expresan perceptiblemente en células mesendodérmicas.

Enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células mesendodérmicas

Con respecto a los aspectos adicionales de los procedimientos descritos en este documento, las células mesendodérmicas pueden ser enriquecidas, aisladas y/o purificadas. Según lo descrito en este documento, las poblaciones celulares enriquecidas para las células mesendodérmicas se producen aislando tales células de cultivos celulares.

En el procedimiento descrito en este documento, las células mesendodérmicas pueden marcarse por fluorescencia, después aislarlas de las células no marcadas usando un FACS. También se describe que un ácido nucleico que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) u otro ácido nucleico que codifique un gen fluorescente expresable del marcador se utiliza para marcar las células mesendodérmicas. Por ejemplo, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica la GFP o un fragmento biológicamente activo se introduce en una célula pluripotente, preferiblemente una célula madre embrionaria humana, en la parte posterior del promotor brachyury, FGF4 o SNAI1 tal que la expresión del producto genético GFP o su fragmento biológicamente activo está bajo el control del promotor brachyury, FGF4 o SNAI1. También se describe que toda la región codificante del ácido nucleico, que codifica brachyury, FGF4 o SNAI1, se sustituye por un ácido nucleico que codifica GFP o su fragmento biológicamente activo. También se describe que el ácido nucleico que codifica GFP o su fragmento biológicamente activo se fusiona en marco con al menos una porción del ácido nucleico que codifica brachyury, FGF4 o SNAI1, generando así una proteína de fusión. También se describe que la proteína de fusión retiene una actividad fluorescente similar a la de GFP.

Las células marcadas con fluorescencia, tales como las células pluripotentes anteriormente descritas, se diferencian en células mesendodérmicas según lo descrito previamente más arriba. Debido a que las células mesendodérmicas expresan el gen del marcador fluorescente, mientras que las células no mesendodérmicas no lo hacen, estos dos tipos de células pueden ser separadas. También se describe que las suspensiones de células que comprenden una mezcla de células marcadas con fluorescencia mesendodérmicas y las células no mesendodérmicas no marcadas se clasifican usando un FACS. Las células del mesodermo se recogen por separado de las células no mesendodérmicas, dando, así, como resultado un aislamiento de tales tipos de célula. Si se desea, las composiciones celulares aisladas se pueden purificar aún más por rondas adicionales de clasificación utilizando los mismos marcadores, o diferentes, que son específicos para las células mesendodérmicas.

Además de los procedimientos descritos, las células mesendodérmicas también pueden aislarse con otras técnicas para el aislamiento celular. Además, las células mesendodérmicas se pueden también enriquecer o aislar por los métodos de subcultivo en serie en las condiciones de crecimiento que promueven la supervivencia selectiva o la expansión selectiva de las células mesendodérmicas.

Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos anteriormente pueden utilizarse con dichos cultivos en cualquier etapa de diferenciación.

Utilizando los métodos descritos en este documento, las poblaciones enriquecidas, aisladas y/o purificadas de las células mesendodérmicas y/o los tejidos pueden ser producidos in vitro a partir de cultivos hESC o poblaciones celulares que han sufrido diferenciación desde aproximadamente 18 horas hasta aproximadamente 48 horas. Se describe que las células pueden someterse a diferenciación aleatoria. Sin embargo, también se describe que las células se dirigen para diferenciarse sobre todo en células mesendodérmicas. Algunos métodos preferidos del enriquecimiento, aislamiento y/o purificación se refieren a la producción in vitro de células mesendodérmicas a partir de células madre embrionarias humanas.

Usando los métodos descritos en este documento, las poblaciones celulares o cultivos celulares pueden ser enriquecidos en el contenido de células mesendodérmicas por al menos aproximadamente 2 a aproximadamente 1000 veces en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares. También se describe que las células mesendodérmicas se pueden enriquecer entre al menos aproximadamente 5 y aproximadamente 500 veces en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares. También se describe que las células mesendodérmicas se pueden enriquecer entre al menos aproximadamente 10 y aproximadamente 200 en comparación con las poblaciones celulares o los cultivos celulares sin tratar o no enriquecidos. También se describe que las células mesendodérmicas se pueden enriquecer entre al menos aproximadamente 20 y aproximadamente 100 veces en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares. También se describe que las células mesendodérmicas se pueden enriquecer entre al menos aproximadamente 40 y aproximadamente 80 veces en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o no enriquecidas o los cultivos celulares. También se describe que las células mesendodérmicas se pueden enriquecer entre al menos aproximadamente 2 y aproximadamente 20 veces en comparación con las poblaciones celulares o los cultivos celulares sin tratar o no enriquecidos.

Composiciones compuestas de células del mesodermo

Las composiciones celulares producidas por los métodos descritos anteriormente incluyen cultivos celulares que comprenden células mesendodérmicas y poblaciones celulares enriquecidas en células mesendodérmicas. Por ejemplo, se pueden producir cultivos celulares que comprenden células mesendodérmicas, donde al menos aproximadamente 5-90% de las células en cultivo son células mesendodérmicas. Debido a que la eficiencia del

procedimiento de diferenciación se puede ajustar modificando ciertos parámetros que incluyen, entre otros, las condiciones de crecimiento de las células, las concentraciones del factor de crecimiento y el tiempo de las etapas del cultivo, los procedimientos de diferenciación descritos en este documento pueden dar lugar a aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o más que aproximadamente el 95% de la conversión de células pluripotentes en células mesendodérmicas. En los procedimientos en los cuales se emplea el aislamiento de las células mesendodérmicas, puede ser recuperada una población sustancialmente pura de las células mesendodérmicas.

También hay composiciones descritas, como las poblaciones celulares y los cultivos celulares, que comprenden células pluripotentes, como células madre y células mesendodérmicas. Por ejemplo, utilizando los métodos descritos en este documento se pueden producir composiciones que comprenden mezclas de hESC y células mesendodérmicas. También se describe que se producen composiciones que comprenden al menos aproximadamente 5 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 95 células pluripotentes. También se describe que se producen composiciones que comprenden al menos aproximadamente 95 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 5 células pluripotentes. Además, se describen composiciones que comprenden otras proporciones de células mesodérmicas en células pluripotentes, por ejemplo, se contemplan composiciones que comprenden al menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 1 millón de células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 100.000 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 10.000 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 1000 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 500 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 100 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 10 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 5 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 1 célula mesendodérmica por aproximadamente cada 2 células pluripotentes, por lo menos aproximadamente 2 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 5 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 10 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 20 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 50 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 100 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 1000 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, por lo menos aproximadamente 10.000 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente, al menos aproximadamente 100.000 células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente y al menos aproximadamente 1 millón de células mesendodérmicas por aproximadamente cada 1 célula pluripotente. Como se describe en el contexto de la presente invención, las células pluripotentes son células madre pluripotentes humanas. También se describe en el contexto de la presente invención que las células madre se derivan de una mórula, la masa celular interna de un embrión o las crestas gonadales de un embrión. También se describe en el contexto de la presente invención que las células pluripotentes se derivan de los tejidos gonadales o germinales de una estructura multicelular que se ha desarrollado más allá de la etapa embrionaria.

También se han descrito cultivos celulares o poblaciones celulares que comprenden desde al menos aproximadamente 5% de células mesendodérmicas a al menos aproximadamente 99% de células mesendodérmicas. Según lo descrito en este documento, los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células de mamíferos. Según lo descrito en este documento, los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células humanas. Por ejemplo, ciertas realizaciones específicas se refieren a cultivos celulares que comprenden células humanas, en donde desde al menos aproximadamente 5% a al menos aproximadamente 99% de las células humanas son células mesendodérmicas. También se han descrito cultivos celulares que comprenden células humanas, en donde al menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o más del 99% de las células humanas son células mesendodérmicas. Cuando los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o las poblaciones celulares.

Existen también composiciones descritas, como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, como las células mesendodérmicas humanas, en las que la expresión de los marcadores brachyury, FGF4 y/o SNAI1 es mayor que la expresión de los marcadores de OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en al menos aproximadamente 5% de las células humanas. También se describe que la expresión del marcador brachyury,

FGF4 y/o SNAI1 es mayor que la expresión del marcador OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1 en al menos aproximadamente 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente 95% de las células humanas, en al menos aproximadamente 98% de las células humanas, en al menos aproximadamente 99% de las células humanas o en más del 99% de las células humanas. Cuando los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o las poblaciones celulares.

También se han descrito composiciones, como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden hESC humanas y células mesendodérmicas humanas, en donde la sobreexpresión sustancial de la expresión del ARNm de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 ocurre en las células del cultivo celular o la población celular en aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, aproximadamente 48 horas o en más que aproximadamente 48 horas después de entrar en contacto las hESC en el cultivo con un factor de diferenciación apropiado, tal como la activina A.

Como se describe en este documento, la sobreexpresión sustancial de la expresión del ARNm de brachyury, FGF4 y/o SNAI1 se produce en al menos aproximadamente 5% de las células humanas, al menos aproximadamente 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente 95% de las células humanas, en al menos aproximadamente 98% de las células humanas, en al menos aproximadamente 99% de las células humanas o en más del 99% de las células humanas. Cuando los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares o las poblaciones celulares.

Utilizando los métodos descritos en este documento, se pueden producir composiciones que comprenden células mesendodérmicas sustancialmente libres de otros tipos celulares. Como se describe en este documento, las poblaciones celulares mesendodérmicas o cultivos celulares producidos por los métodos descritos en este documento están sustancialmente libres de células que expresan significativamente los marcadores génicos OCT4, SOX17, CXCR4, FOXA2, SOX7 y/o SOX1.

Como se describe en este documento, una descripción de una célula del mesendodermo basada en la expresión de genes marcadores es, brachyury alto, FGF4 alto, SNAI1 alto, SOX17 bajo, CXCR4 bajo, FOXA2 bajo, SOX7 bajo y SOX1 bajo.

Producción de células endodérmicas definitivas

Los procedimientos de diferenciación de las células pluripotentes para producir cultivos celulares y poblaciones celulares enriquecidas que comprenden el endodermo definitivo se describen brevemente a continuación y en detalle en la patente estadounidense no. 11/021618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004.

En algunos de estos procedimientos, las células pluripotentes utilizadas como material de partida son células madre. En ciertos procedimientos, los cultivos celulares definitivos de endodermo y las poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células endodérmicas definitivas se producen a partir de células madre embrionarias. Un método preferido para derivar las células definitivas del endodermo utiliza las células madre embrionarias humanas como el material de partida para la producción definitiva del endodermo. Tal como se describe en el contexto de la presente invención, estas células pluripotentes pueden ser originarias de la mórula, la masa celular embrionaria interna o las

obtenidas de crestas gonadales embrionarias. Las células madre embrionarias humanas se pueden mantener en el cultivo en un estado pluripotente sin diferenciación sustancial utilizando métodos que se conocen en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos nos. 5.453.357, 5.670.372, 5.690.926, 5.843.780, 6.200.806 y 6.251.671.

- 5 En algunos procedimientos para producir células endodérmicas definitivas, las hESC se mantienen en una capa alimentadora. En tales procedimientos, puede ser utilizada cualquier capa alimentadora que permita que las hESC sean mantenidas en un estado pluripotente. Una capa alimentadora comúnmente utilizada para el cultivo de células madre embrionarias humanas es una capa de fibroblastos de ratón. Más recientemente, se han desarrollado capas alimentadoras de fibroblasto humano para su uso en cultivos de hESC (véase la solicitud de patente de EE.UU.). Los
10 procedimientos alternativos para producir el endodermo definitivo permiten el mantenimiento de hESC pluripotente sin el uso de una capa alimentadora.

Las células madre embrionarias humanas utilizadas en este documento pueden mantenerse en cultivo con o sin suero. En algunos procedimientos de mantenimiento de células madre embrionarias, se utiliza el reemplazo de suero. En otros, se utilizan técnicas de cultivo sin suero.

- 15 Las células madre se mantienen en el cultivo en un estado pluripotente mediante paso rutinario hasta que se desee que se diferencien en el endodermo definitivo. En algunos procedimientos, como se describe en este documento, la diferenciación en el endodermo definitivo se logra proporcionando al cultivo de células madre un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β en una cantidad suficiente para promover la diferenciación en el endodermo definitivo. Factores de crecimiento del TGF β que son útiles para la producción del endodermo definitivo se seleccionan de los
20 subgrupos Nodal/Activina. En algunos procedimientos de diferenciación preferidos, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en Nodal, Activina A y Activina B. En ciertos procedimientos de diferenciación, tal como se describen en este documento, se pueden utilizar 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 endodérmicas definitivas, los factores de crecimiento antes mencionados se suministran a las células para que los factores de crecimiento estén presentes en los cultivos a concentraciones suficiente para promover la diferenciación de al menos una porción de las células madre en las células de endodermo definitivas. En algunos procedimientos, como se describe en este documento, los factores de crecimiento antes mencionados están presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, por lo menos aproximadamente 10 ng/ml, por lo
30 menos aproximadamente 25 ng/ml, por lo menos aproximadamente 50 ng/ml, por lo menos aproximadamente 75 ng/ml, por lo menos aproximadamente 100 ng/ml, por lo menos aproximadamente 200 ng/ml, por lo menos aproximadamente 300 ng/ml, por lo menos aproximadamente 400 ng/ml, por lo menos aproximadamente 500 ng/ml, por lo menos aproximadamente 1000 ng/ml, por lo menos aproximadamente 2000 ng/ml, por lo menos aproximadamente 3000 ng/ml, por lo menos aproximadamente 4000 ng/ml, por lo menos aproximadamente 5000 ng/ml o más de aproximadamente 5000 ng/ml.
35

- En ciertos procedimientos para la diferenciación de las células madre pluripotentes a las células de endodermo definitivas como se describe en este documento, los factores de crecimiento antes mencionados se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de crecimiento se pueden eliminar en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco
40 días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición. En los procedimientos preferidos como se describe en este documento, los factores de crecimiento se eliminan aproximadamente cuatro días después de su adición.

- Los cultivos de las células endodérmicas definitivas pueden cultivarse en un medio que contenga menos suero o sin suero. Bajo ciertas condiciones de cultivo, las concentraciones séricas pueden oscilar entre aproximadamente 0,05% v/v y aproximadamente 20% v/v. Por ejemplo, en algunos procedimientos de diferenciación, la concentración sérica del medio puede ser inferior a aproximadamente el 0,05% (v/v), menos de aproximadamente el 0,1% (v/v), menos de aproximadamente 0,2% (v/v), menos de aproximadamente 0,3% (v/v), menos de aproximadamente el 0,4% (v/v), menos de aproximadamente el 0,5% (v/v), menos de aproximadamente 0,6% (v/v), menos de aproximadamente el 0,7% (v/v), menos de aproximadamente el 0,8% (v/v), menos de aproximadamente el 0,9% (v/v), menos de
50 aproximadamente 1% (v/v), menos de aproximadamente el 2% (v/v), menos de aproximadamente 3% (v/v), menos de aproximadamente 4% (v/v), menos de aproximadamente 5% (v/v), menos de aproximadamente 6% (v/v), menos de aproximadamente 7% (v/v), menos de aproximadamente 8% (v/v), menos de aproximadamente 9% (v/v), menos de aproximadamente 10% (v/v), menos de aproximadamente 15% (v/v) o menos de aproximadamente 20% (v/v). En algunos procedimientos según lo descrito en este documento, las células definitivas del endodermo se cultivan sin suero o sin el reemplazo del suero. En algunas realizaciones, las células definitivas del endodermo se cultivan con el reemplazo de suero. En otros procedimientos, las células de endodermo definitivas se cultivan en presencia de B27. En este procedimiento, la concentración del suplemento B27 puede variar de aproximadamente 0,1% v/v a aproximadamente 20% v/v.
55

Monitorización de la diferenciación de células pluripotentes en células endodérmicas definitivas

La progresión del cultivo hESC a endodermo definitivo puede controlarse determinando la expresión de marcadores característicos del endodermo definitivo. En algunos procedimientos, como se describe en este documento, la expresión de ciertos marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de ciertos marcadores puede determinarse midiendo el nivel en el cual el marcador está presente en las células del cultivo celular o de la población celular. En tales procedimientos, la medición de la expresión de marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método para cuantificar la expresión de los marcadores producidos por los marcadores génicos es mediante el uso de Q-PCR. Otros métodos que se conocen en la técnica también se pueden utilizar para cuantificar la expresión génica del marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto genético marcador se puede detectar mediante el uso de anticuerpos específicos para el producto genético marcador de interés. En ciertos procedimientos, como se describe en este documento, se determina la expresión de los marcadores génicos característicos del endodermo definitivo, así como la falta de expresión significativa de los marcadores génicos característicos de las hESC y otros tipos celulares.

Como se describe más adelante con referencia a los ejemplos siguientes, un marcador fiable de endodermo definitivo es el gen SOX17. Por lo tanto, las células definitivas del endodermo producidas por los procedimientos descritos en este documento expresan el gen marcador SOX17, produciendo de tal modo el producto genético SOX17. Otros marcadores de endodermo definitivo son MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1. Puesto que las células definitivas del endodermo expresan el gen marcador SOX17 en un nivel más alto que el del gen marcador SOX7, que es característico del endodermo primitivo y visceral, en algunos procedimientos, la expresión de SOX17 y de SOX7 se supervisa. En otros procedimientos según lo descrito en este documento, la expresión del gen marcador del SOX17 y del gen marcador OCT4, que es característico de hESC, se supervisa. Además, debido a que las células de endodermo definitivas expresan el gen marcador SOX17 a un nivel superior al de los genes del marcador AFP, SPARC o trombomodulina (TM), la expresión de estos genes también puede ser monitoreada.

Otro marcador de endodermo definitivo es el gen CXCR4. El gen CXCR4 codifica un receptor de la quimiocina de la superficie de la célula cuyo ligando es el quimioatrayente SDF-1. Se cree que las funciones principales de las células portantes del receptor CXCR4 en adultos son la migración de células hematopoyéticas a la médula ósea, el tráfico de linfocitos y la diferenciación de varios linajes de células sanguíneas de células B y macrófagos [Kim, C. y Broxmeyer, H. J. *Leukocyte Biol.* 65, 6-15 (1999)]. El receptor CXCR4 también funciona como un co-receptor para la entrada del HIV-1 en células T [Feng, Y., et al. *Science*, 272, 872-877 (1996)]. En una extensa serie de estudios llevados a cabo [McGrath, K.E. et al. *Dev. Biology* 213, 442-456 (1999)], la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 y su ligando único, SDF-1 [Kim, C., y Broxmeyer, H., *J. Leukocyte Biol.* 65, 6-15 (1999)], fueron delineados durante el desarrollo temprano y la vida adulta en ratón. La interacción CXCR4/SDF1 en el desarrollo se hizo evidente cuando se demostraba que cualquiera de los genes era bloqueado en ratones transgénicos [Nagasawa et al. *Nature*, 382, 635-638 (1996)], Ma, Q., et al., *Immunity*, 10, 463-471 (1999)], esto daba como resultado una mortalidad embrionaria tardía. McGrath et al. demostraron que CXCR4 es el ARN mensajero del receptor de la quimiocina más abundante detectado durante los embriones iniciales en gastrulación (E 7.5) usando una combinación de la protección de la RNasa y metodologías de hibridación in situ. En el embrión en gastrulación, la señalización de CXCR4/SDF-1 parece estar implicada principalmente en inducir la migración de las células de la capa germinal de la línea primitiva y se expresa en el endodermo definitivo, el mesodermo y el mesodermo extraembrionarios presentes en ese tiempo. En embriones de ratón E7.2-7.8, CXCR4 y alfa-fetoproteína son mutuamente excluyentes, indicando una carencia de la expresión en el endodermo visceral [McGrath, K.E. et al. *Dev. Biology* 213, 442-456 (1999)].

Dado que las células de endodermo definitivas producidas por diferenciar células pluripotentes expresan el gen marcador CXCR4, se puede monitorizar la expresión de CXCR4 con el fin de rastrear la producción de células endodérmicas definitivas. Además, las células de endodermo definitivas producidas por los métodos descritos en este documento expresan otros marcadores del endodermo definitivo incluyendo, entre otros, SOX17, MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1. Puesto que las células definitivas del endodermo expresan el gen marcador CXCR4 a un nivel más alto que las del gen marcador SOX7, la expresión de CXCR4 y de SOX7 puede ser monitoreada. En otros procedimientos, se supervisa la expresión del gen marcador CXCR4 y del gen marcador OCT4. Además, debido a que las células de endodermo definitivas expresan el gen marcador CXCR4 a un nivel superior al de los genes de los marcadores AFP, SPARC o trombomodulina (TM), la expresión de estos genes también puede ser monitoreada.

Se apreciará que la expresión de CXCR4 en las células endodérmicas no excluye la expresión de SOX17. Por lo tanto, las células definitivas del endodermo producidas por los procedimientos descritos en este documento expresarán sustancialmente SOX17 y CXCR4, pero no expresarán sustancialmente AFP, TM, SPARC o PDX1.

Enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de células endodérmicas definitivas

Las células de endodermo definitivas producidas por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente pueden enriquecerse, aislarse y/o purificarse utilizando un marcador de afinidad específico para dichas células. Ejemplos de marcadores de afinidad específicos para las células de endodermo definitivas son los anticuerpos, ligandos u otros agentes aglutinantes que son específicos de una molécula marcadora, tal como un polipéptido, que esté presente en

la superficie celular de las células de endodermo definitivas, pero que no esté sustancialmente presente en otros tipos de células que se encontrarían en un cultivo celular producido por los métodos descritos en este documento. En algunos procedimientos, como se describe en este documento, un anticuerpo que se une a CXCR4 se utiliza como marcador de afinidad para el enriquecimiento, aislamiento o purificación de células endodérmicas definitivas. En otros procedimientos, como se describe en este documento, la quimiocina SDF-1 u otras moléculas basadas en SDF-1 también se pueden utilizar como marcadores de afinidad. Tales moléculas incluyen, entre otros, fragmentos SDF-1, fusiones SDF-1 o miméticos SDF-1.

Los métodos para fabricar anticuerpos y utilizarlos para el aislamiento celular se conocen en la técnica y estos métodos se pueden implementar para su uso con los anticuerpos y las células definitivas del endodermo descritas en este documento. En un procedimiento, un anticuerpo que se une a CXCR4 se une, a su vez, a una perla magnética y después se permite que se una a las células definitivas del endodermo en un cultivo celular que se ha tratado enzimáticamente para reducir la adherencia intercelular y del sustrato. Los complejos célula/anticuerpo/perla se exponen entonces a un campo magnético móvil que se utiliza para separar las células definitivas del endodermo unidas a las perlas de las células sin unir. Una vez que las células del endodermo definitivo están físicamente separadas de otras células en el cultivo, la unión del anticuerpo se bloquea y las células se vuelven a poner en placas en un medio de cultivo apropiado de tejidos.

También se pueden utilizar métodos adicionales para obtener cultivos o poblaciones de células endodérmicas definitivas enriquecidas, aisladas o purificadas. Por ejemplo, el anticuerpo CXCR4 es incubado con un cultivo celular definitivo que contiene endodermo que ha sido tratado para reducir la adherencia intercelular y del sustrato. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden. La suspensión de la célula es entonces incubada con un anticuerpo secundario, tal como un anticuerpo FITC-conjugado capaz de unirse al anticuerpo primario. A continuación, las células se lavan, centrifugan y resuspenden en tampón. La suspensión celular se analiza después y se separa utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). Las células CXCR4-positivas se recogen por separado de las células CXCR4-negativas, dando, así, como resultado el aislamiento de tales tipos de célula. Si se desea, las composiciones celulares aisladas se pueden purificar aún más mediante el uso de un método alternativo basado en la afinidad o por rondas adicionales de clasificación utilizando los mismos o diferentes marcadores específicos para el endodermo definitivo.

En otros procedimientos, como se describe en este documento, las células de endodermo definitivas son enriquecidas, aisladas y/o purificadas usando un ligando u otra molécula que se una a CXCR4. En algunos procedimientos, la molécula es SDF-1 o su fragmento, fusión o agente mimético.

En los procedimientos preferidos, como se describe en este documento, las células definitivas del endodermo se enriquecen, se aíslan y/o se purifican de otras células no definitivas del endodermo después de que los cultivos de células madre sean inducidos para diferenciarse hasta un linaje definitivo del endodermo. Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos anteriormente pueden utilizarse con dichos cultivos en cualquier etapa de diferenciación.

Además de los procedimientos descritos, las células endodérmicas definitivas también pueden aislarse con otras técnicas destinadas al aislamiento celular. Además, las células de endodermo definitivas también pueden ser enriquecidas o aisladas por métodos de subcultivo en serie en condiciones de crecimiento que promuevan la supervivencia selectiva o la expansión selectiva de células endodérmicas definitivas.

Usando los métodos descritos en este documento, pueden ser producidas in vitro poblaciones enriquecidas, aisladas y/o purificadas de las células endodérmicas definitivas, o de los tejidos, a partir de cultivos celulares pluripotentes o poblaciones celulares, tales como cultivos de células madre o poblaciones, que han sufrido al menos alguna diferenciación. En algunos métodos, como se describe en este documento, las células sufren una diferenciación aleatoria. En un método preferido, según lo descrito en este documento, sin embargo, las células se dirigen para diferenciarse sobre todo en endodermo definitivo. Algunos métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación preferidos se refieren a la producción de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas. Utilizando los métodos descritos en este documento, pueden ser enriquecidas poblaciones celulares o cultivos celulares en el contenido definitivo de endodermo entre al menos aproximadamente 2 y aproximadamente 1000 veces, en comparación con las poblaciones celulares no tratadas o los cultivos celulares.

Composiciones que comprenden células endodérmicas definitivas

Las composiciones celulares producidas por los métodos descritos anteriormente, como se describen en este documento, incluyen cultivos celulares que comprenden el endodermo definitivo y poblaciones celulares enriquecidas en el endodermo definitivo. Por ejemplo, pueden ser producidos cultivos celulares que comprendan células endodérmicas definitivas, en donde al menos aproximadamente 50-99% de las células en el cultivo celular o la población celular son células del endodermo definitivas. Debido a que la eficiencia del procedimiento de diferenciación se puede ajustar modificando ciertos parámetros que incluyen, entre otros, las condiciones del crecimiento de las células, las concentraciones del factor de crecimiento y el tiempo de las etapas de cultivo, los procedimientos de diferenciación descritos en este documento pueden dar lugar a aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente

35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más de aproximadamente 99% de la conversión de las células pluripotentes en endodermo definitivo. En los procedimientos en los que se emplea el aislamiento de células endodérmicas definitivas, por ejemplo, mediante el uso de un reactivo de afinidad que se une al receptor CXCR4, se puede recuperar una población de células endodérmicas definitivas sustancialmente puras.

Cuando los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas de los cultivos celulares o de las poblaciones celulares.

Identificación de factores capaces de promover la diferenciación de la línea pre-primitiva y/o del mesodermo

Ciertos métodos de cribado descritos en este documento se refieren a métodos para identificar al menos un factor de diferenciación que sea capaz de promover la diferenciación de las células de la línea pre-primitiva y/o mesendodérmicas. En estos métodos, según lo descrito en este documento, se obtiene una población de células que comprende las células de la línea pre-primitiva y/o mesendodérmicas, tales como la línea pre-primitiva humana y/o las células mesendodérmicas. La población celular se proporciona entonces con un factor de diferenciación candidato. En un primer punto de tiempo, que se proporciona anterior o aproximadamente al mismo tiempo que el factor de diferenciación candidato, se determina la expresión de un marcador. Alternativamente, la expresión del marcador se puede determinar después de proporcionar el factor de diferenciación candidato. En un segundo punto de tiempo, que es posterior al primer punto de tiempo y subsecuente al paso de proporcionar el factor de diferenciación candidato a la población de las células, la expresión del mismo marcador se determina otra vez. Que el factor de diferenciación candidato sea capaz de promover la diferenciación de las células definitivas del endodermo se determina comparando la expresión del marcador en el primer punto de tiempo con la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo. Si incrementa o disminuye la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo en comparación con la expresión del marcador en el primer punto de tiempo, entonces el factor de diferenciación candidato será capaz de promover la diferenciación de las células del endodermo definitivas.

Los métodos de cribado descritos en este documento pueden utilizar poblaciones o cultivos celulares que comprendan células de la línea pre-primitiva humana y/o mesendodérmicas. Por ejemplo, la población de células puede ser una población sustancialmente purificada de la línea pre-primitiva humana y/o de las células mesendodérmicas. Alternativamente, la población celular puede ser una población enriquecida de la línea pre-primitiva humana y/o de las células mesodérmicas, en donde por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 91%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 93%, por lo menos aproximadamente 94%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% o más que por lo menos aproximadamente 99% de las células humanas en la población de células son células de la línea pre-primitiva humana y/o mesendodérmicas. En otras realizaciones descritas en este documento, la población celular comprende células humanas en las que al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85% o más que al menos aproximadamente 85% de las células humanas son las células de la línea pre-primitiva humana y/o mesendodérmicas. También se describe que la población celular incluye células no humanas como células alimentadoras no humanas. También se describe que la población celular incluye células alimentadoras humanas. Como se describe en este documento, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o mayor que al menos aproximadamente el 95% de las células humanas, aparte de las células alimentadoras, son células de la línea pre-primitiva humana o mesendodérmicas.

En los métodos de cribado descritos en este documento, la población celular puede ser puesta en contacto o provista de otro modo con un factor de diferenciación candidato (prueba). El factor de diferenciación candidato puede abarcar cualquier molécula que pueda tener el potencial de promover la diferenciación de la línea pre-primitiva humana y/o de las células mesendodérmicas. Como se describe en este documento, el factor de diferenciación candidato puede comprender una molécula que se sabe que es un factor de diferenciación para uno o más tipos de células. Por el contrario, el factor de diferenciación candidato puede comprender una molécula que no es conocida que promueva la diferenciación celular. También se describe que el factor de diferenciación candidato comprende una molécula que no es conocida que promueva la diferenciación de las células de la línea pre-primitiva humana y/o mesendodérmicas.

En los métodos de cribado descritos en este documento, el factor de diferenciación candidato puede abarcar una molécula pequeña. También se describe que una molécula pequeña es una molécula que tiene una masa molecular de aproximadamente 10.000 amu o menos. También se describe que la molécula pequeña es un retinoide, tal como el ácido retinoico.

- 5 También se describe que el factor de diferenciación candidato comprende un polipéptido. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido incluyendo, entre otros, una glicoproteína, una lipoproteína, una proteína de la matriz extracelular, una citoquina, una quimiocina, una hormona peptídica, una interleucina o un factor de crecimiento. Los polipéptidos preferidos incluyen factores de crecimiento.

- 10 También se describe que los factores de diferenciación candidato comprenden uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en FGF10, FGF4, FGF2 y Wnt3B.

- En los métodos de cribado descritos en este documento, los factores de diferenciación candidatos pueden abarcar uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo formado por anfiregulina, estimulador de linfocitos B, IL-16, timopoyetina, TRAIL/Apo-2, factor potenciador de la colonia de células pre B, factor 1 relacionado con la diferenciación endotelial (EDF1), polipéptido de activación de monocitos endoteliales II, factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF), factor potenciador de células asesinas naturales (NKEFA), proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 8 (proteína osteogénica 2), proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), proteína CGI-149 (factor de diferenciación neuroendocrino), citoquina A3 (proteína inflamatoria 1-alfa de macrófagos), proteína relacionada con la diferenciación celular de glioblastoma (GBDR1), factor de crecimiento derivado de hepatomas, precursor de neuromedina U-25, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B), precursor específico de células T RANTES, factor tímico 1 derivado de células dendríticas, 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 macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina, trombopoyetina, vitamina D₃, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro, factor inhibitorio de la leucemia, hormona de tiroides, factor de crecimiento básico del fibroblasto (bFGF), aFGF, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor BB de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento del nervio beta, activina A, factor de crecimiento transformador beta 1 (TGF-β1), interferón α, interferón β, interferón γ, factor de necrosis tumoral α, factor de necrosis tumoral β, actividad promotora desdencadenante (BPA), actividad promotora de eritroides (EPA), PGE₂, factor de crecimiento de la insulina 1 (IGF-1), IGF-II, factor de crecimiento de neutrofina (NGF), neutrofina-3, neutrofina 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, tirotropina, hormona del crecimiento, prolactina, hormona luteinizante, gonadotropina coriónica humana, hormona estimulante del folículo, factor de liberación de la corticotropina, factor de liberación de la gonadotropina, factor de liberación de la prolactina, factor inhibidor de la prolactina, factor liberador de la hormona del crecimiento, somatostatina, factor de liberación de la tirotropina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, hormona paratiroidea, péptido tipo glucagón 1, polipéptido insulínico dependiente de glucosa, gastrina, secretina, colecistoquinina, motilina, péptido intestinal vasoactivo, sustancia P, polipéptido pancreático, péptido tirosina, neuropéptido tirosina, 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, androstien, 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 los métodos de cribado descritos en este documento, el factor de diferenciación candidato puede proporcionarse a la población celular en una o más concentraciones. También se describe que el factor de diferenciación candidato se proporciona a la población celular de modo que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células alcance de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 10 mg/ml. También se describe que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea las células varíe de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1 mg/ml. También se describe que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células varíe de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 µg/ml. También se describe que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células varíe de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml. También se describe que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células puede ser aproximadamente 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 que aproximadamente 1000 µg/ml.

En los métodos de cribado descritos en este documento, se puede proporcionar a la población celular un factor de diferenciación candidato que comprende cualquier molécula que no sea el factor de diferenciación del tracto digestivo superior. Por ejemplo, la población celular está provista de un factor de diferenciación candidato que comprende cualquier molécula que no sea un retinoide, un miembro de la superfamilia TGFβ de factores de crecimiento, FGF10 o FGF4. También se describe que la población celular se proporciona con un factor de diferenciación candidato que comprende cualquier molécula con excepción del ácido retinoico.

También se describe que las etapas de los métodos de cribado descritos en este documento comprenden determinar la expresión de al menos un marcador en un primer punto de tiempo y un segundo punto de tiempo. También se describe que el primer punto de tiempo puede ser antes o aproximadamente al mismo tiempo que proporcionar 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. La expresión de una pluralidad de marcadores se determina en un primer punto de tiempo.

Además de determinar la expresión de al menos un marcador en un primer punto de tiempo, algunas realizaciones de los métodos de cribado descritos en este 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. También se describe que la expresión del mismo marcador se determina en los puntos de primer y segundo tiempo. También se describe que la expresión de una pluralidad de marcadores se determina tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. También se describe que la expresión de la misma pluralidad de marcadores se determina tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. También se describe que la expresión del marcador se determina en una pluralidad de puntos de tiempo, cada uno de los cuales es posterior al primer punto de tiempo, y cada uno de los cuales es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. También se describe que la expresión del marcador es determinada por Q-PCR. En otras realizaciones, la expresión del marcador es determinada por inmunocitoquímica.

En los métodos de cribado descritos en este documento, el marcador que tiene su expresión puede determinarse en los puntos de primer y segundo tiempo y es un marcador que se asocia con la diferenciación de células de la línea pre-primitiva humanas y/o células mesendodérmicas a las células que son las precursoras de las células que componen los tejidos y/o órganos que se derivan del tracto digestivo. También se describe que los tejidos y/o los órganos que se derivan del tracto digestivo comprenden células terminalmente diferenciadas. También se describe que el marcador es indicativo de células pancreáticas o células precursoras pancreáticas. También se describe que el marcador es el factor homeobox duodenal pancreático 1 (PDX1). También se describe que el marcador es homeobox A13 (HOXA13) u homeobox C6 (HOXC6). Además, el marcador es indicativo de células hepáticas o células precursoras hepáticas. También se describe que el marcador es albúmina, antígeno específico de hepatocitos (HSA) o homeobox 1 (PROX1) relacionado con prospero. También se describe que el marcador es indicativo de células pulmonares o precursoras pulmonares. También se describe que el marcador es el factor de transcripción de la tiroides 1 (TITF1). También se describe que el marcador es indicativo de células intestinales o precursoras intestinales. También se describe que el marcador es vilina o factor de transcripción homeobox tipo caudal 2 (CDx2). También se describe que el marcador es indicativo de células del estómago o precursoras del estómago.

También se describe que el marcador es VCAM1, VWF o CXCR4. También se describe que el marcador es indicativo de células de tiroides o precursoras de tiroides. También se describe que el marcador es TITF1. También se describe que el marcador es indicativo de las células del timo o de precursoras del timo.

En los métodos de cribado descritos en este documento, se permite pasar suficiente tiempo entre proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato y determinar la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo. El tiempo suficiente entre proporcionar la población celular con el factor de diferenciación candidato y determinar la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo puede ser tan pequeño como de aproximadamente 1 hora a tanto como aproximadamente 10 días. En algunas realizaciones, la expresión de al menos un marcador se determina varias veces después de proporcionar a la población celular el factor de diferenciación

candidato. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente es por lo menos aproximadamente 1 hora, por lo menos aproximadamente 6 horas, por lo menos aproximadamente 12 horas, por lo menos aproximadamente 18 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 30 horas, por lo menos aproximadamente 36 horas, por lo menos aproximadamente 42 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 54 horas, por lo menos aproximadamente 60 horas, por lo menos aproximadamente 66 horas, por lo menos aproximadamente 72 horas, por lo menos aproximadamente 78 horas, por lo menos aproximadamente 84 horas, por lo menos aproximadamente 90 horas, por lo menos aproximadamente 96 horas, por lo menos aproximadamente 102 horas, al menos aproximadamente 108 horas, al menos aproximadamente 114 horas, por lo menos aproximadamente 120 horas, por lo menos aproximadamente 126 horas, por lo menos aproximadamente 132 horas, por lo menos aproximadamente 138 horas, por lo menos aproximadamente 144 horas, por lo menos aproximadamente 150 horas, por lo menos aproximadamente 156 horas, por lo menos aproximadamente 162 horas, al menos aproximadamente 168 horas, al menos aproximadamente 174 horas, por lo menos aproximadamente 180 horas, por lo menos aproximadamente 186 horas, por lo menos aproximadamente 192 horas, por lo menos aproximadamente 198 horas, por lo menos aproximadamente 204 horas, por lo menos aproximadamente 210 horas, por lo menos aproximadamente 216 horas, por lo menos aproximadamente 222 horas, al menos aproximadamente 228 horas, al menos aproximadamente 234 horas o al menos aproximadamente 240 horas.

En los métodos descritos en este documento, puede determinarse 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 en la expresión de al menos un marcador indica que el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células definitivas del endodermo. Del mismo modo, 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 disminución en la expresión del marcador 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 primer y segundo tiempo. Dicha determinación puede ser relativa a otros marcadores, por ejemplo, la expresión génica de limpieza o absoluta.

Cuando la expresión del marcador se incrementa en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo, la cantidad de aumento es por lo menos aproximadamente 2 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que por lo menos aproximadamente 100 veces. La cantidad de aumento puede ser menos de 2 veces. Cuando la expresión del marcador disminuye en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo, la cantidad de la disminución es al menos aproximadamente 2 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que por lo menos aproximadamente 100 veces. En algunas realizaciones, la cantidad de disminución es menos de 2 veces.

En los métodos de cribado descritos en este documento, después de proporcionar a la población celular un factor de diferenciación candidato, la línea pre-primitiva humana y/o las células mesendodérmicas se diferencian en uno o más tipos celulares del linaje definitivo del endodermo. Después de proporcionar a la población celular un factor de diferenciación candidato, la línea pre-primitiva humana y/o las células mesendodérmicas pueden diferenciarse en células que se derivan del tracto digestivo. Estas células incluyen, entre otras, las células del páncreas, el hígado, los pulmones, el estómago, el intestino, la tiroides, el timo, la faringe, la vesícula biliar y la vejiga urinaria, así como los precursores de dichas células. Además, estas células pueden desarrollarse aún más en estructuras de orden superior como tejidos y/o órganos.

En los métodos de cribado descritos en este documento, después de proporcionar a la población celular un factor de diferenciación candidato, las células de la línea pre-primitiva humana y/o mesendodérmicas pueden diferenciarse en uno o más tipos celulares del linaje mesodermo. Después de proporcionar a la población celular un factor de diferenciación candidato, las células de la línea pre-primitiva humana y/o mesendodérmicas pueden diferenciarse en células que incluyen, entre otras, células sanguíneas, células del sistema cardiovascular, tejidos esqueléticos y otros tejidos estructurales y conectivos, así como precursores de cada uno de los tipos de células antes mencionados. Además, estas células pueden desarrollarse aún más en estructuras de orden superior como tejidos y/o órganos.

Métodos para aumentar la expresión del producto genético FGF8

También se ha descrito un método para aumentar la expresión del producto genético FGF8 en células madre embrionarias humanas in vitro. Tales métodos comprenden la etapa de la obtención de dicho hESC en un medio que comprende menos de aproximadamente 2% (v/v) de suero. Por ejemplo, el medio puede abarcar suero a una concentración de aproximadamente 0% (v/v), aproximadamente 0,05% (v/v), aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,2% (v/v), aproximadamente 0,3% (v/v), aproximadamente 0,4% (v/v), aproximadamente 0,5%

(v/v), aproximadamente 0,6% (v/v), aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,2% (v/v), aproximadamente 0,3% (v/v), aproximadamente 0,4% (v/v), aproximadamente 0,5% (v/v), aproximadamente 0,6% (v/v), aproximadamente 0,7% (v/v), aproximadamente 0,8% (v/v), aproximadamente 0,9% (v/v), aproximadamente 1% (v/v), aproximadamente 1,1% (v/v), aproximadamente 1,2% (v/v), aproximadamente 1,3%, aproximadamente 1,4% (v/v), aproximadamente 1,5% (v/v), aproximadamente 1,6% (v/v), aproximadamente 1,7% (v/v), aproximadamente 1,8% (v/v) o aproximadamente 1,9% (v/v). También se describe que el medio no comprende el reemplazo de suero. Los hESC se ponen en contacto con un factor de diferenciación en una cantidad suficiente para aumentar la expresión del producto genético FGF8. También se describe que el factor de diferenciación es al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β . También se describe que el factor de crecimiento de la superfamilia TGF β es la activina A. La concentración del factor de diferenciación que se utiliza para poner en contacto las hESC oscila entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml. Por ejemplo, las hESC pueden ser puestas en contacto con un factor de diferenciación a una concentración de 1 ng/ml, aproximadamente 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 μ g/ml, aproximadamente 2 μ g/ml, aproximadamente 3 μ g/ml, aproximadamente 4 μ g/ml, aproximadamente 5 μ g/ml, aproximadamente 6 μ g/ml, aproximadamente 7 μ g/ml, aproximadamente 8 μ g/ml, aproximadamente 9 μ g/ml, aproximadamente 10 μ g/ml, aproximadamente 11 μ g/ml, aproximadamente 12 μ g/ml, aproximadamente 13 μ g/ml, aproximadamente 14 μ g/ml, aproximadamente 15 μ g/ml, aproximadamente 16 μ g/ml, aproximadamente 17 μ g/ml, aproximadamente 18 μ g/ml, aproximadamente 19 μ g/ml, aproximadamente 20 μ g/ml, aproximadamente 25 μ g/ml, aproximadamente 50 μ g/ml, aproximadamente 75 μ g/ml, aproximadamente 100 μ g/ml, aproximadamente 125 μ g/ml, aproximadamente 150 μ g/ml, aproximadamente 175 μ g/ml, aproximadamente 200 μ g/ml, aproximadamente 250 μ g/ml, aproximadamente 300 μ g/ml, aproximadamente 350 μ g/ml, aproximadamente 400 μ g/ml, aproximadamente 450 μ g/ml, aproximadamente 500 μ g/ml, aproximadamente 550 μ g/ml, aproximadamente 600 μ g/ml, aproximadamente 650 μ g/ml, aproximadamente 700 μ g/ml, aproximadamente 750 μ g/ml, aproximadamente 800 μ g/ml, aproximadamente 850 μ g/ml, aproximadamente 900 μ g/ml, aproximadamente 950 μ g/ml, aproximadamente 1000 μ g/ml o mayor que aproximadamente 1000 μ g/ml.

Métodos para aumentar la expresión del producto genético de Brachyury, FGF4 y/o SNAI1

También se ha descrito un método para aumentar la expresión del producto del gen brachyury, FGF4 y/o SNAI1 en una célula madre embrionaria humana in vitro. Tales métodos comprenden la etapa de obtener dicho hESC en un medio que comprenda menos de aproximadamente 2% (v/v) en suero. Por ejemplo, el medio puede abarcar suero a una concentración de aproximadamente 0% (v/v), aproximadamente 0,05% (v/v), aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,2% (v/v), aproximadamente 0,3% (v/v), aproximadamente 0,4% (v/v), aproximadamente 0,5% (v/v), aproximadamente 0,6% (v/v), aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,2% (v/v), aproximadamente 0,3% (v/v), aproximadamente 0,4% (v/v), aproximadamente 0,5% (v/v), aproximadamente 0,6% (v/v), aproximadamente 0,7% (v/v), aproximadamente 0,8% (v/v), aproximadamente 0,9% (v/v), aproximadamente 1% (v/v), aproximadamente 1,1% (v/v), aproximadamente 1,2% (v/v), aproximadamente 1,3% (v/v), aproximadamente 1,4% (v/v), aproximadamente 1,5% (v/v), aproximadamente 1,6% (v/v), aproximadamente 1,7% (v/v), aproximadamente 1,8% (v/v) o aproximadamente 1,9% (v/v). También se describe que el medio no comprende el reemplazo de suero. Las hESC se ponen en contacto con un factor de diferenciación en una cantidad suficiente para aumentar la expresión del producto genético de brachyury, de FGF4 y/o de SNAI1. También se describe que el factor de diferenciación es al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGF β . En las realizaciones preferidas, el factor de crecimiento de la superfamilia TGF β es la activina A. La concentración del factor de diferenciación que se utiliza para poner en contacto las hESC varía entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml. Por ejemplo, las hESC pueden ser puestas en contacto con un factor de diferenciación a una concentración de 1 ng/ml, aproximadamente 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 μ g/ml, aproximadamente 2 μ g/ml, aproximadamente 3 μ g/ml, aproximadamente 4 μ g/ml, aproximadamente 5 μ g/ml, aproximadamente 6 μ g/ml, aproximadamente 7 μ g/ml, aproximadamente 8 μ g/ml, aproximadamente 9 μ g/ml, aproximadamente 10 μ g/ml, aproximadamente 11 μ g/ml, aproximadamente 12 μ g/ml, aproximadamente 13 μ g/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 que aproximadamente 1000 µg/ml.

10 Expresión temporal de productos génicos en cultivos celulares

También se han descrito cultivos celulares que tienen ciertos patrones temporales de expresión génica. También se describe que el cultivo celular comprende células madre embrionarias humanas (hESC) y un medio que comprende menos del 2% (v/v) de suero. Por ejemplo, el medio puede abarcar suero a una concentración de aproximadamente 0% (v/v), aproximadamente 0,05% (v/v), aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,2% (v/v), aproximadamente 0,3% (v/v), aproximadamente 0,4% (v/v), aproximadamente 0,5% (v/v), aproximadamente 0,6% (v/v), aproximadamente 0,1% (v/v), aproximadamente 0,2% (v/v), aproximadamente 0,3% (v/v), aproximadamente 0,4% (v/v), aproximadamente 0,5% (v/v), aproximadamente 0,6% (v/v), aproximadamente 0,7% (v/v), aproximadamente 0,8% (v/v), aproximadamente 0,9% (v/v), aproximadamente 1% (v/v), aproximadamente 1,1% (v/v), aproximadamente 1,2% (v/v), aproximadamente 1,3% (v/v), aproximadamente 1,4% (v/v), aproximadamente 1,5% (v/v), aproximadamente 1,6% (v/v), aproximadamente 1,7% (v/v), aproximadamente 1,8% (v/v) o aproximadamente 1,9% (v/v). También se describe que el medio no comprende el reemplazo de suero. En algunas realizaciones, el medio es un RPMI pobre en suero.

Como se describe en este documento, las hESC en el cultivo pueden comenzar diferenciando en un punto de tiempo de referencia. El punto de tiempo de referencia es el punto en el que se proporciona un factor de diferenciación a las células. También se describe que el factor de diferenciación es al menos un factor de crecimiento de la superfamilia TGFβ. También se describe que el factor de crecimiento de la superfamilia TGFβ es la activina A. La concentración del factor de diferenciación que se proporciona a las hESC varía entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml. Por ejemplo, las hESC pueden ser puestas en contacto con un factor de diferenciación a una concentración de 1 ng/ml, aproximadamente 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 que aproximadamente 1000 µg/ml.

Después de proporcionar el factor de diferenciación a las hESC, la expresión del ARNm de FGF8 está sustancialmente sobreexpresada en comparación con la expresión basal del ARNm de FGF8 en las hESC. La expresión basal de FGF8 en las hESC es la expresión del producto genético FGF8, tal como el ARNm, presente en un cultivo de células de hESC que se mantiene en su estado no diferenciado. También se describe que la expresión del ARNm de FGF8 se sobreexpresa sustancialmente en aproximadamente 6 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de FGF8 se infraregula después de aproximadamente 24 horas desde el punto de referencia de tiempo. También se describe que la expresión máxima del ARNm de FGF8 se alcanza en un tiempo entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión máxima de FGF8 se puede alcanzar en un tiempo menor que aproximadamente 6 horas desde el punto de tiempo de referencia.

También se han descrito cultivos celulares que exhiben una mayor localización nuclear del polipéptido de β-catenina. También se describe que el polipéptido de β-catenina comienza a localizarse en el núcleo celular en aproximadamente

17 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que el polipéptido de β -catenina comienza a localizarse en el núcleo celular en menos de 17 horas desde el punto de referencia. También se describe que el polipéptido de β -catenina se localiza predominantemente en el núcleo celular en aproximadamente 17 horas desde el punto de tiempo de referencia.

- 5 También se han descrito cultivos celulares que tienen una mayor expresión del ARNm de brachyury. En dichos cultivos celulares, la expresión del ARNm de brachyury está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia.

También se describe que la expresión del ARNm de brachyury está sustancialmente sobreexpresada antes de aproximadamente 24 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de brachyury se infraregula sustancialmente en aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión máxima del ARNm de brachyury se alcanza en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que el ARNm de brachyury no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que el ARNm de brachyury está sustancialmente sobreexpresado en aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia y no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas desde el punto de tiempo de referencia.

También se han descrito cultivos celulares que han aumentado la expresión del ARNm de FGF4. En dichos cultivos celulares, la expresión del ARNm de FGF4 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de FGF4 se sobreexpresa sustancialmente antes de aproximadamente 24 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de FGF4 está sustancialmente regulada en aproximadamente 48 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión máxima del ARNm de FGF4 es alcanzada en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que el ARNm de FGF4 no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que el ARNm de FGF4 está sustancialmente sobreexpresado en aproximadamente 24 horas desde el punto de tiempo de referencia y no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas desde el punto de tiempo de referencia.

También se han descrito cultivos celulares que tienen una mayor expresión de ARNm de brachyury y FGF4. En dichos cultivos celulares, la expresión del ARNm de brachyury y FGF4 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de brachyury y FGF4 se sobreexpresa sustancialmente antes de aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de brachyury y FGF4 está sustancialmente regulada en aproximadamente 48 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión máxima del ARNm de brachyury y FGF4 se alcanza en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que el ARNm de brachyury y FGF4 no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que el ARNm de brachyury y FGF4 se sobreexpresa sustancialmente en aproximadamente 24 horas a partir del punto de tiempo de referencia y no se expresa sustancialmente en aproximadamente 72 horas a partir del punto de tiempo de referencia.

40 También se han descrito cultivos celulares que tienen una mayor expresión del ARNm de SNAI1. En dichos cultivos celulares, la expresión del ARNm de SNAI1 está sustancialmente sobreexpresada en aproximadamente 24 horas desde el punto de tiempo de referencia. En algunas realizaciones, la expresión del ARNm de SNAI1 se sobreexpresa sustancialmente antes de aproximadamente 24 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de SNAI1 está infraregulada en aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión máxima del ARNm de SNAI1 se alcanza en un tiempo entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia.

También se han descrito cultivos celulares que tienen una expresión temporal específica del producto genético de la E-cadherina (ECAD). También se describe que la expresión del ARNm de E-cadherina comienza a ser infraregulada en aproximadamente 12 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de E-cadherina puede ser infraregulada en menos de 12 horas desde el punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de E-cadherina está sustancialmente infraregulada en aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia.

También se han descrito cultivos celulares que expresan el marcador SOX17 y/o FOXA2. También se describe que la expresión del ARNm de SOX17 se sobreexpresa sustancialmente en aproximadamente 48 horas a partir del punto de tiempo de referencia. También se describe que la expresión del ARNm de FOXA2 se sobreexpresa sustancialmente en aproximadamente 96 horas a partir del punto de tiempo de referencia.

También se han descrito cultivos celulares que comprenden células que tienen ciertos patrones específicos de expresión génica. También se describe que los cultivos celulares comprenden hESC, un factor de diferenciación, tal como un factor de diferenciación de la superfamilia TGF β , y un medio que comprende menos de aproximadamente

2% (v/v) de suero. También se describe que el medio comprende más del 2% (v/v) de suero. También se describe que el medio carece de reemplazo de suero.

También se describe que en el momento en que el cultivo celular se suministra con el factor de diferenciación, el cultivo celular comprende todas o predominantemente todas las hESC. Durante el curso de la diferenciación, por lo menos una porción de las hESC se diferencia en otros tipos de células según lo indicado por la expresión de los productos (ARNm y/o polipéptidos) de ciertos genes de los marcadores.

En los cultivos celulares descritos en este documento, la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos puede ser sobreexpresada antes de la sobreexpresión de un segundo y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que cada conjunto de marcadores génicos puede incluir uno o más marcadores génicos. La sobreexpresión de la expresión del gen puede variar de leve a sustancial. Por ejemplo, la expresión de un gen marcador se puede sobreexpresar en al menos aproximadamente un 10% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión de un gen marcador se puede sobreexpresar en al menos aproximadamente un 20%, por lo menos aproximadamente el 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, o más de por lo menos aproximadamente 90% comparado con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión del gen marcador se puede sobreexpresar en al menos 2 veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 6 veces, por lo menos aproximadamente 7 veces, por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 9 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas.

En los cultivos celulares descritos en este documento, la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos puede infraexpresarse antes de la sobreexpresión de segundo y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que cada conjunto de marcadores génicos puede incluir uno o más marcadores génicos. Como con la sobreexpresión de la expresión de los genes, la infraexpresión puede variar de leve a sustancial. Por ejemplo, la expresión de un gen marcador puede ser infraexpresada en al menos un 10% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión de un gen marcador puede ser infraexpresada en al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o más que al menos aproximadamente el 90% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. La expresión génica del marcador puede ser infraexpresada en al menos dos veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 6 veces, por lo menos aproximadamente 7 veces, por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 9 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas.

En los cultivos celulares descritos en este documento, la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos puede ser sobreexpresada antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un segundo conjunto y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que cada conjunto de marcadores génicos puede abarcar uno o más marcadores génicos. También se describe que la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos se infraexpresa antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un segundo conjunto y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. Como se describió anteriormente, cada conjunto de marcadores génicos puede abarcar uno o más marcadores génicos. Además, en lo anteriormente descrito, la sobreexpresión y la infraexpresión de la expresión del gene pueden variar de leve a sustancial. Por ejemplo, la expresión de un gen marcador puede ser sobreexpresada o infraexpresada en al menos aproximadamente 10% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión de un gen marcador puede ser sobreexpresada o infraexpresada en al menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90% o más que por lo menos aproximadamente 90% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión del gen marcador puede ser sobreexpresada o infraexpresada en al menos 2 veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 6 veces, por lo menos aproximadamente 7 veces, por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 9 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente

20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas.

Como se describe en este documento, en al menos algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo compuesto por brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK e ID1 se sobreexpresa antes de la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en HEY1, GATA2, BIK y ID1 es infraregular antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 se sobreexpresa antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 se alcanza antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresión de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.

Algunos de los cultivos celulares que tienen uno o más de los patrones de expresión génica temporal descritos anteriormente incluyen un medio que comprende menos de aproximadamente 2% (v/v) de suero. También se describe que el medio no incluye suero. También se describe que el medio carece de reemplazo de suero. Algunos de los medios utilizados en los cultivos celulares descritos en este documento incluyen suero a una concentración de menos de aproximadamente 1,9% (v/v), menos de aproximadamente 1,8% (v/v), menos de aproximadamente 1,7% (v/v), menos de aproximadamente 1,6% (v/v), menos de aproximadamente 1,5% (v/v), menos de aproximadamente 1,4% (v/v), menos de aproximadamente 1,3% (v/v), menos de aproximadamente 1,2% (v/v), menos de aproximadamente 1,1% (v/v), menos de aproximadamente 1% (v/v), menos de aproximadamente 0,9% (v/v), menos de aproximadamente 0,8% (v/v), menos de aproximadamente 0,7% (v/v), menos de aproximadamente 0,6% (v/v), menos de aproximadamente 0,5% (v/v), menos de aproximadamente 0,4% (v/v), menos de aproximadamente 0,3% (v/v), menos de aproximadamente 0,2% (v/v), menos de aproximadamente 0,1% (v/v) o menos de aproximadamente 0,05% (v/v).

Algunos de los cultivos celulares que tienen uno o más de los patrones de expresión génica temporal descritos anteriormente comprenden al menos un factor de diferenciación de la superfamilia TGF β . También se describe que el factor de crecimiento es Nodal, activina A y/o activina B. También se describe que el factor de diferenciación es la activina A. También se describe que la activina A está presente en el medio a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.

Sin embargo, se apreciará que el factor de diferenciación de la superfamilia TGF β se puede suministrar al cultivo celular a concentraciones que van desde aproximadamente 1 ng/ml hasta aproximadamente 1 mg/ml. También se describe que el factor de diferenciación de la superfamilia TGF β se suministra al cultivo celular en aproximadamente 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 μ g/ml, aproximadamente 2 μ g/ml, aproximadamente 3 μ g/ml, aproximadamente 4 μ g/ml, aproximadamente 5 μ g/ml, aproximadamente 6 μ g/ml, aproximadamente 7 μ g/ml, aproximadamente 8 μ g/ml, aproximadamente 9 μ g/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 más de aproximadamente 1000 µg/ml.

Los métodos de diferenciación de las hESC para producir células que tienen ciertos patrones de expresión génica de marcadores temporales también se contemplan en este documento. Por ejemplo, se describe un método de diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESC) que pone en contacto las hESC con un medio que comprende menos de aproximadamente 2% de suero, proporcionando a las hESC un factor de diferenciación de la superfamilia TGFβ, y luego permitiendo que ocurra la diferenciación de las hESC.

En los métodos descritos anteriormente para diferenciar las hESC, la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos puede ser sobreexpresada antes de la sobreexpresión de un segundo y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que cada conjunto de marcadores génicos pueda incluir uno o más marcadores génicos. La sobreexpresión de la expresión de los genes puede variar de leve a substancial. Por ejemplo, la expresión de un gen marcador puede ser sobreexpresada por lo menos en aproximadamente 10% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión de un gen marcador se puede sobreexpresar en al menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, más que por lo menos aproximadamente 90% cuando se compara con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión del gen marcador se puede sobreexpresar en al menos 2 veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 6 veces, por lo menos aproximadamente 7 veces, por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 9 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que por lo menos aproximadamente 100 veces en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas.

En otros métodos de diferenciación de las hESC descritas en este documento, la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos puede infraexpresarse antes de la sobreexpresión de un segundo y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que cada conjunto de marcadores génicos pueda incluir uno o más marcadores génicos. Como con la sobreexpresión de la expresión genética, la infraexpresión puede variar de leve a substancial. Por ejemplo, la expresión de un gen marcador puede ser regulada en al menos un 10% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión de un gen marcador puede ser infraexpresada en al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o mayor que al menos aproximadamente el 90% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe que la expresión génica del marcador puede ser infraexpresada en al menos dos veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 6 veces, por lo menos aproximadamente 7 veces, por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 9 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas.

En otros métodos más de diferenciación de las hESC descritas en este documento, la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos puede ser sobreexpresada antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un segundo conjunto y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. También se describe que cada conjunto de marcadores génicos puede abarcar uno o más marcadores génicos. También se describe que la expresión de un primer conjunto de marcadores génicos se infraexpresa antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un segundo conjunto y/o un tercer conjunto de marcadores génicos. Como se describió anteriormente, cada conjunto de marcadores génicos puede abarcar uno o más marcadores génicos. Además, en lo anteriormente descrito, la sobreexpresión y la infraexpresión de la expresión genética pueden variar de leve a substancial. Por ejemplo, la expresión de un gen marcador puede ser sobreexpresada o infraexpresada en al menos aproximadamente 10% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. También se describe

que la expresión de un gen marcador puede ser sobreexpresada o infraexpresada en al menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90% o más que por lo menos aproximadamente 90% en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas. La expresión génica del marcador puede ser sobreexpresada o infraexpresada por al menos 2 veces, por lo menos aproximadamente 3 veces, por lo menos aproximadamente 4 veces, por lo menos aproximadamente 5 veces, por lo menos aproximadamente 6 veces, por lo menos aproximadamente 7 veces, por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 9 veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 15 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 30 veces, por lo menos aproximadamente 40 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 60 veces, por lo menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, por lo menos aproximadamente 90 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces en comparación con la expresión del mismo gen marcador en las hESC no diferenciadas.

Como se describe en este documento, en al menos algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo consistente en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 puede ser sobreexpresada antes de la sobreexpresación de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo compuesto por brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en HEY1, GATA2, BIK y ID1 es infraexpresada antes o aproximadamente al mismo tiempo que la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 se sobreexpresa antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpresación de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1. También se describe que en, por lo menos, algunas células del cultivo celular, la expresión máxima de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4 se alcanza antes o aproximadamente al mismo tiempo que la sobreexpresación de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en SOX17, FOXA2, CXCR4 y MIXL1. En realizaciones adicionales, en por lo menos algunas células del cultivo celular, la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en FGF8, Nodal, HEG, HEY1, GATA2, BIK y ID1 se sobreexpresa antes de la sobreexpresación de la expresión de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, Wnt3, MIXL1, DKK4, NETO1, T, DACT1, FLJ22662, SLIT2, GAD1 y GRM4.

En los métodos de diferenciación descritos en este documento, las células del cultivo celular pueden ser puestas en contacto o proporcionadas de otro modo con un medio que comprenda menos de aproximadamente 2% (v/v) de suero. También se describe que el medio no incluya suero. También se describe que el medio carezca de reemplazo de suero. Algunos de los medios utilizados en los métodos descritos en este documento incluyen suero a una concentración de menos de aproximadamente 1,9% (v/v), menos de aproximadamente 1,8% (v/v), menos de aproximadamente 1,7% (v/v), menos de aproximadamente 1,6% (v/v), menos de aproximadamente 1,5% (v/v), menos de aproximadamente 1,4% (v/v), menos de aproximadamente 1,3% (v/v), menos de aproximadamente 1,2% (v/v), menos de aproximadamente 1,1% (v/v), menos de aproximadamente 1% (v/v), menos de aproximadamente 0,9% (v/v), menos de aproximadamente 0,8% (v/v), menos de aproximadamente 0,7% (v/v), menos de aproximadamente 0,6% (v/v), menos de aproximadamente 0,5% (v/v), menos de aproximadamente 0,4% (v/v), menos de aproximadamente 0,3% (v/v), menos de aproximadamente 0,2% (v/v), menos de aproximadamente 0,1% (v/v) o menos de aproximadamente 0,05% (v/v).

Algunos de los métodos para diferenciar las hESC para producir los patrones temporales descritos anteriormente de expresión génica incluyen proporcionar células en cultivo, tales como las hESC, con al menos un factor de diferenciación de la superfamilia TGF β . También se describe que el factor de crecimiento es Nodal, activina A y/o activina B. También se describe que el factor de diferenciación es la activina A. También se describe que la activina A está presente en el medio a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.

Sin embargo, se apreciará que el factor de diferenciación de la superfamilia TGF β se puede suministrar al cultivo celular a concentraciones que van desde aproximadamente 1 ng/ml hasta aproximadamente 1 mg/ml. También se describe que el factor de diferenciación de la superfamilia TGF β se suministra al cultivo celular en aproximadamente 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 superior a aproximadamente 1000 µg/ml.
- 20 En términos generales, una vez descrita esta invención, se puede obtener una comprensión más detallada haciendo referencia a algunos ejemplos de referencia específicos que se proporcionan en este documento con fines ilustrativos solamente, sin que sean limitantes.

Ejemplos

- 25 Muchos de los ejemplos de referencia siguientes describen el uso de células humanas pluripotentes. Los métodos de producción de células humanas pluripotentes son muy conocidos en la técnica y se han descrito numerosas publicaciones científicas, incluyendo las patentes U.S. nos. 5.453.357, 5.670.372, 5.690.926, 6.090.622, 6.200.806 y 6.251.671.

Ejemplo de referencia 1

Células ES humanas

- 30 Para los estudios de los inventores sobre el desarrollo temprano se emplearon células madre embrionarias humanas, que son pluripotentes y que pueden dividirse aparentemente indefinidamente en cultivo manteniendo un cariotipo normal. Las células ES se derivaron a partir de la masa de células internas embrionarias de 5 días de edad utilizando métodos inmunológicos o mecánicos para su aislamiento. En particular, la línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 se derivó de un embrión congelado supernumerario a partir de un ciclo de fertilización in vitro,
- 35 una vez obtenido el consentimiento informado del paciente. Una vez descongelado el blastocisto eclosionado, se colocó en placas sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), en medio ES (DMEM, FBS al 20%, aminoácidos no esenciales, beta-mercaptoetanol, suplemento ITS). El embrión adherido a la placa de cultivo y, después de aproximadamente dos semanas, las regiones de las hESC no diferenciadas fueron transferidas a nuevas placas con MEF. La transferencia fue lograda con el corte mecánico y una breve digestión con dispasa, seguida por la extracción mecánica de grupos de células, lavando y volviendo a colocar en placas. Desde la derivación, hescyt-25 ha sido pasado en serie aproximadamente 100 veces. Se empleó la línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 como el material de partida de los inventores para la producción de endodermo definitivo.
- 40

- 45 Será apreciado por los expertos en la técnica que también se pueden utilizar células madre u otras células pluripotentes como material de partida para los procedimientos de diferenciación descritos en este documento. Por ejemplo, las células obtenidas a partir de crestas gonadales embrionarias, que pueden ser aisladas por los métodos conocidos en la técnica, se pueden utilizar como material de partida celular pluripotente.

Ejemplo de referencia 2

Caracterización de hESCyt-25

- 50 La línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 ha mantenido una morfología, cariotipo, crecimiento y propiedades de autorrenovación normales durante 18 meses en cultivo. Esta línea celular muestra una fuerte inmunorreactividad para los antígenos OCT4, SSEA-4 y TRA-1-60, todos los cuales son característicos de las hESC no diferenciadas y muestran actividad de fosfatasa alcalina, así como una morfología idéntica con otras líneas hESC establecidas. Además, la línea de células madre humanas hESCyt-25 también forma fácilmente cuerpos embrioides (EB) cuando se cultivan en suspensión. Como demostración de su naturaleza pluripotente, hESCyt-25 se diferencia
- 55 en varios tipos celulares que representan las tres capas germinales principales. Se demostró la producción de ectodermo por Q-PCR para ZIC1, así como la inmunocitoquímica (ICC) para nestina y más marcadores neuronales maduros. Se observó tinción inmunocitoquímica para tubulina β-III en grupos de células alargadas, característicos de las neuronas primigenias. Anteriormente, se trataron EB en suspensión con ácido retinoico para inducir la

diferenciación de células madre pluripotentes en endodermo visceral (VE), un linaje extraembrionario. Las células tratadas expresaron altos niveles de α -fetoproteína (AFP) y SOX7, dos marcadores de VE, en 54 horas de tratamiento. Las células diferenciadas en la monocapa expresaron AFP en parches esporádicos, según se demuestra mediante la tinción inmunocitoquímica. Como se describe a continuación, la línea de células hESCyT-25 también fue capaz de formar un endodermo definitivo, como se demuestra por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) e inmunocitoquímica para SOX17, en ausencia de la expresión de AFP. Para demostrar la diferenciación en mesodermo, fueron analizados los EB que se diferenciaban para determinar la expresión genética de Brachyury en varios puntos de tiempo. La expresión de Brachyury aumentó progresivamente en el transcurso del experimento. En vista de lo anterior, la línea hESCyT-25 es pluripotente, como se demuestra por la capacidad de formar células que representan las tres capas germinales.

Ejemplo de referencia 3

Células endodérmicas definitivas

La solicitud de patente estadounidense en tramitación con la presente y en copropiedad N°. 11/021618 titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004, describe cultivos celulares y poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células endodérmicas definitivas humanas. También se describen en éstas métodos para producir endodermo definitivo a partir de hESC por diferenciación en presencia de un factor de diferenciación así como métodos para enriquecer, aislar y/o purificar estas células endodérmicas definitivas a partir de cultivos celulares mixtos y/o poblaciones celulares. Se describen más detalladamente en la misma, marcadores que son útiles para la identificación y/o detección de células endodérmicas definitivas, así como un marcador útil en la purificación de dichas células. La solicitud de patente de EE.UU. descrita No. 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004, se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Este ejemplo de referencia, que describe un marcador útil para la detección y/o identificación de células endodérmicas definitivas, se reproduce a partir de la mencionada solicitud de patente en tramitación con la presente.

En el experimento siguiente, el ARN se aisló del endodermo definitivo purificado y de las poblaciones de células madre embrionarias humanas. La expresión genética entonces fue analizada por el análisis de chip genéticos del ARN de cada población purificada. También se realizó la Q-PCR para investigar aún más el potencial de los genes expresados en el endodermo definitivo, pero no en las células madre embrionarias, como un marcador para el endodermo definitivo.

Las células madre embrionarias humanas (hESC) se mantuvieron en medio DMEM/F12 suplementado con un 20% de reemplazo de suero KnockOut, 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico humano recombinante (bFGF), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomicina. Se diferenciaron hESC en endodermo definitivo cultivando durante 5 días en medio RPMI suplementado con 100 ng/ml de activina A humana recombinante, suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina. La concentración de FBS fue variada cada día de la siguiente manera: 0,1% (primer día), 0,2% (segundo día), 2% (días 3-5).

Las células fueron aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) con el fin de obtener poblaciones purificadas de hESC y endodermo definitivo para realizar el análisis de expresión génica. La inmunopurificación fue alcanzada para las hESC usando el antígeno SSEA4 (R&D Systems, número de catálogo FAB1435P) y para el endodermo definitivo usando CXCR4 (R&D Systems, número de catálogo FAB170P). Las células se disociaron usando tripsina/EDTA (Invitrogen, número de catálogo 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% en hielo durante 10 minutos para bloquear la unión no específica. La tinción se realizó durante 30 minutos en hielo añadiendo 200 μ L de anticuerpo conjugado con ficoeritrina a 5×10^6 células en 800 μ L de suero humano. Las células se lavaron dos veces con 8 ml de tampón PBS y se resuspendieron en 1 ml del mismo. El aislamiento FACS fue realizado en las instalaciones principales del Instituto de Investigación Scripps usando un FACS Vantage (BD Biosciences). Las células fueron recogidas directamente en tampón de lisis RLT y el ARN fue aislado por RNeasy según las instrucciones de los fabricantes (Qiagen).

El ARN purificado fue sometido por duplicado al análisis de expresión (Durham, NC) para conseguir la generación de los datos del perfil de expresión utilizando la plataforma Affymetrix y matrices de oligonucleótidos de alta densidad U133 Plus 2.0. Los datos presentados son una comparación en grupo que identifica genes que se expresan de manera diferente entre las dos poblaciones, las hESC y el endodermo definitivo. Los genes que exhibieron un fuerte cambio ascendente en el nivel de expresión respecto al que se encontró en las hESC fueron seleccionados como nuevos marcadores candidatos altamente característicos del endodermo definitivo. Los genes selectos fueron analizados por Q-PCR, según lo descrito más arriba, para verificar los cambios de expresión genética encontrados en el chip genético y también para investigar el patrón de expresión de estos genes durante el transcurso de tiempo de diferenciación de hESC.

Las figuras 2A-M muestran los resultados de la expresión génica para ciertos marcadores. Los resultados se muestran para cultivos celulares analizados 1, 3 y 5 días después de la adición de 100 ng/ml de activina A, células definitivas del endodermo que expresan CXCR4 purificadas al final del procedimiento de diferenciación de cinco días (CXDE), y

en las hESC purificadas. Una comparación de las figuras 2C y G-M demuestra que los seis genes marcadores, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1, exhibieron patrones de expresión casi idénticos entre sí y también idénticos al patrón de expresión de CXCR4 y a la relación de SOX17/SOX7. Según lo descrito previamente, SOX17 fue expresado tanto en endodermo definitivo como en endodermo extra-embriónico que expresaba SOX7. Puesto que SOX7 no se expresaba en el endodermo definitivo, la relación de SOX17/SOX7 proporcionaba una estimación fiable de la contribución definitiva del endodermo a la expresión SOX17, atestiguada en la población en su totalidad. La similitud de los paneles G-L y M con el panel C indica que FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 son marcadores del endodermo definitivo y que no se expresan significativamente en células endodérmicas extraembrionarias.

Se apreciará que los resultados de Q-PCR descritos en este documento pueden ser confirmados además por ICC.

Ejemplo de referencia 4

Secuencia temporal de expresión génica en células precursoras de endodermo definitivo

Para evaluar la dinámica de la expresión génica que se produce durante la diferenciación al endodermo definitivo, la expresión de numerosos genes fue monitoreada en cultivos celulares de diferenciación en varios puntos de tiempo durante dos protocolos diferentes de diferenciación de cuatro días.

Concretamente, se cultivaron hESC en ausencia de FBS durante las primeras 24 horas, en FBS al 0,2% (v/v) durante las segundas 24 horas y en FBS al 2% (v/v) los días 3 y 4, con una exposición continua a 100 ng/ml de activina A para inducir la diferenciación a endodermo definitivo o 100 ng/ml de BMP4 y 2,5 μ M del inhibidor de FGFR1, SU5402, para inducir la diferenciación en una población celular mezclada de trofotodermo (TE) y endodermo primitivo (PrE). La dinámica de la expresión génica en dichos cultivos se determinó midiendo la expresión génica en varios puntos de tiempo durante el procedimiento de diferenciación. En particular, la expresión génica fue determinada por Q-PCR en el momento de la adición de los factores de diferenciación, así como 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas después de la adición de estos factores. Los perfiles de la expresión genética sobre este curso del tiempo para varios diversos genes de los marcadores se visualizan en las figuras 3A-L.

La Figura 3A muestra que la expresión de FGF8 aumentó a aproximadamente su nivel máximo 6 horas después del tratamiento con activina A. La expresión de FGF8 continuó siendo alta durante aproximadamente 24 horas y después comenzó a declinar después a partir de ese momento. El tratamiento con BMP4/SU5402 causó muy poco cambio en el nivel de expresión de FGF8 (Figura 3A). Estos resultados demuestran que la activina A media una transición rápida de hESC a células que expresan FGF8. Como la expresión de FGF8 es uno de los primeros indicadores de la formación posterior del patrón en el epiblasto, una sobre-regulación rápida de FGF8 en las hESC de diferenciación indica que estas células en la etapa inicial se han diferenciado respecto al tipo de células hESC para formar una población celular de "pre-línea" (línea pre-primitiva).

Como se muestra en las figuras 3B-F, la inducción de ciertos marcadores de la línea primitiva (mesendodermo), tales como brachyury, FGF4, SNAI1, MIXL1 y GSC, comenzó aproximadamente 6 horas después del tratamiento con activina A. Sin embargo, en contraste con la inducción de FGF8, la expresión de estos marcadores continuó aumentando y alcanzó niveles máximos en aproximadamente 24 horas, o en algunos casos 48 horas, después de la adición de activina A. Se observó de poca a ninguna expresión creciente en cualquiera de los marcadores primitivos de la línea en los cultivos tratados con BMP4/SU5402 (Figuras 3B-F). Además, los niveles de expresión de brachyury y FGF4, que no se expresan en las células definitivas del endodermo, se regularon a la baja extremadamente rápido a niveles de hESC a las 48-72 horas después del tratamiento con activina A, o por debajo de estos (Figuras 3B-C). Por el contrario, SNAI1, MIXL1, y GSC continuaron siendo significativamente expresados a las 48-96 horas (figuras 3D-F).

Aproximadamente 72 horas después del tratamiento con activina A, SOX17 mostró una fuerte sobre-regulación, lo cual es consistente con una transición a partir de un intermedio de la línea primitiva (mesendodermo) a un destino definitivo de células del endodermo (Figura 3G). No se produjo tal sobre-regulación de la expresión de SOX17 en los cultivos celulares tratados con BMP4/SU5402 (Figura 3G).

Esta secuencia temporal de expresión génica descrita para los cultivos de células in vitro tratados con activina A imita eventos que ocurren en la gastrulación inicial en vertebrados, y por lo tanto, sugiere que las hESC se encuentran en transición a través de intermedios similares durante este procedimiento de diferenciación.

Además de la secuencia anterior de los acontecimientos que conducen al endodermo definitivo, las Figuras 3H-L muestran que, en aproximadamente 24 a 48 horas, comenzó una fuerte sobre-regulación del trofotodermo y de los marcadores primitivos del endodermo, tales como HCG, DAB2, SOX7, CHRD y E-cadherina (ECAD), en células tratadas con BMP4/SU5402. La sobre-regulación de estos marcadores continuó a través de 72 y 96 horas. Por el contrario, no ocurrió ninguna sobre-regulación de HCG, DAB2, SOX7, CHRD o E-cadherina en los cultivos celulares expuestos a 100 ng/ml de activina A (Figuras 3H-L). Estos resultados indican que las hESC tienen el potencial de diferenciarse en trofotodermo y en endodermo primitivo bajo las condiciones apropiadas, sin embargo, la diferenciación a estos linajes no ocurrió en un grado significativo en los cultivos tratados con activina.

Ejemplo de referencia 5

Transición epitelial a mesenquimal en células madre embrionarias humanas

Durante la gastrulación de los vertebrados, las células epiblastas sometidas a la transición epitelial mesenquimal (EMT) en la línea primitiva alteran el patrón de expresión de la proteína E-cadherina en la superficie celular. Las acciones combinadas de la señalización de FGF y TGF β sirven para inducir el factor de la transcripción de cinc-dedo SNAI1, que es un represor transcripcional directo de la E-cadherina. Este ejemplo de referencia demuestra que la transcripción de E-cadherina es reprimida durante las primeras etapas de diferenciación de cultivos de hESC expuestos a activina in vitro, justo como en la EMT que ocurre in vivo durante la gastrulación.

Los cultivos de células madre embrionarias humanas se diferenciaron durante dos días en presencia de 100 ng/ml de activina A en un medio RPMI que contenía FBS al 0,1% (v/v). La expresión de ciertos genes marcadores fue determinada usando Q-PCR y/o inmunocitoquímica. Las Figuras 4A-C muestran la expresión determinada por Q-PCR del el ARNm de brachyury, E-cadherina y SNAI1, respectivamente. La inmunocitoquímica fue utilizada para determinar la expresión de brachyury, de E-cadherina y B-catenina activada (no fosforilada).

Como se describió anteriormente, las células de la línea pre-primitiva expuestas a activina en cultivo se diferenciaron en células de la línea pre-primitiva (mesendodermo) después de aproximadamente 24 horas de exposición a activina (Ejemplo de referencia 4 y Figura 7). Una comparación de la Figura 4A con 4C muestra que los niveles del ARNm de brachyury y SNAI1 alcanzaron aproximadamente 24 horas. Se observó un pico similar en la expresión para el ARNm de FGF4 (Figura 3C). En relación con la expresión de brachyury durante este período de tiempo, la expresión del ARNm de E-cadherina estaba disminuyendo y continuó disminuyendo más de 3 veces durante 48 horas después de la iniciación del tratamiento de activina A (Figura 4B). A las 12 horas después de la exposición de activina, cuando los niveles del ARNm de E-cadherina cayeron en aproximadamente el 33% de sus niveles originales en el cultivo celular diferenciador, ocurrió una desaparición simultánea de la inmunolocalización superficial de la célula apical característica de E-cadherina (implicada probablemente en uniones adherentes) en células positivas en brachyury en la periferia de las colonias. Después de 24 horas, cuando el número de células que expresaban brachyury aumentó, la pérdida de E-cadherina asociada a la unión en células positivas a brachyury fue más fuerte. Además, la morfología de las células apareció menos uniforme según lo evidenciado por las diferencias en la morfología del DAPI y de los núcleos teñidos con brachyury a las 12 y 24 horas, apoyando aún más la aparición de un EMT.

Además de la expresión génica anterior, la localización intracelular de β -catenina se determinó como hESC diferenciadas en endodermo definitivo. Usando un anticuerpo que reconocía solamente la forma sin fosforilar (Ser37 y Thr41) de β -catenina, fue encontrado que esta proteína era localizada solamente en la superficie citoplásmica en las hESC no diferenciadas. A las 17 horas después del tratamiento con activina, fueron detectadas tanto la β -catenina nuclear como la unida a la membrana en células brachyury-negativas y que expresaban brachyury. Además, los análisis de transferencia Western confirmaron la presencia de β -catenina en fracciones proteicas solubles, excluidas de la membrana, de células diferenciadoras, pero no diferenciadas. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la localización nuclear de β -catenina se produce antes de la expresión de la proteína brachyury. Además, tomados en conjunto, los datos anteriores sugieren que en cultivos celulares expuestos a activina, cuando se desarrolla el estado de la línea primitiva, se produce un EMT clásico en el que la β -catenina activada se traslada al núcleo antes de la expresión de la proteína brachyury y coincide con el desmontaje de las uniones adherentes en las fronteras epiteliales entre las células.

Ejemplo de referencia 6

Diferenciación del mesodermo en endodermo definitivo

Este ejemplo de referencia demuestra la competencia de las células precursoras del mesendodermo para diferenciarse en endodermo definitivo.

Fueron incubados cultivos de células madre embrionarias humanas durante dos días en presencia de 100 ng/ml de activina A en medio RPMI con una concentración sérica de 0,1% (v/v) de FBS. Como se muestra en la figura 5A, la expresión del ARNm de brachyury alcanzó un máximo a las 24 horas. Al mismo tiempo, la expresión del gen de SOX17 comenzó a aumentar (Figura 5B). Aproximadamente a las 48 horas, la expresión del ARNm de brachyury había vuelto a los niveles de la línea de fondo (Figura 5A) y SOX17 fue expresado en aproximadamente 18 veces por encima de la línea de fondo (Figura 5B). Estos resultados, que han sido verificados en más de siete experimentos independientes, son consistentes con la hipótesis de que las células mesendodérmicas que expresan brachyury comienzan una conversión a endodermo definitivo que expresa SOX17 aproximadamente 36-48 horas después del tratamiento con activina.

Para demostrar la validez de la hipótesis antedicha, fue realizado un análisis inmunocitoquímico de los marcadores de brachyury y de SOX17. El curso de tiempo para la expresión de la proteína de brachyury demuestra la aparición de células inmunorreactivas que comenzaron en la periferia de la mayoría de las colonias grandes a las 12 horas y su diseminación rápida al interior de las colonias en 36-48 horas. En esos momentos posteriores, la mayoría de las células en el cultivo eran positivas respecto a la proteína brachyury. Por lo tanto, el patrón de expresión de la proteína brachyury fue retrasado en 12-24 horas en lo referente al pico de expresión del ARNm de brachyury mostrado en la

Figura 5A. Después de 48 horas de diferenciación, cuando el ARNm de SOX17 y la expresión de la proteína estaban aumentando rápidamente y la expresión de brachyury estaba disminuyendo rápidamente, la mayor parte de las células positivas SOX17 expresaron de forma conjunta brachyury (Figuras 6A-D). Estos datos muestran claramente que, en presencia de 100 ng/ml de activina y poco suero, la mayoría de las células positivas a SOX17 fueron derivadas de células del mesendodermo positivas en brachyury. Además, este hallazgo es muy sugerente en cuanto a la existencia de un intermedio de mesendodermo en el desarrollo humano. Además, puesto que la expresión de brachyury no ocurre en las células de los linajes primitivos del endodermo en cualquier momento durante el desarrollo, estos resultados prueban de forma concluyente la naturaleza definitiva del endodermo producido por activina.

Ejemplo de referencia 7

Formación de mesodermo y endodermo definitivo a partir de células del mesendodermo

Además del ejemplo anterior de referencia, fueron llevados a cabo experimentos para demostrar que los intermedios de mesendodermo descritos en este documento pueden experimentar una diferenciación a mesodermo o a células definitivas del endodermo.

La figura 7 muestra las condiciones experimentales de diseño y cultivo utilizadas en este ejemplo de referencia. Concretamente, se cultivaron dos hESC paralelos durante cuatro días en medio RPMI. Como en el ejemplo 4 de referencia, la concentración de suero de este medio fue ajustada tal que contenía FBS al 0% (v/v) en el primer día, FBS al 0,2% (v/v) en el segundo día y FBS al 2% (v/v) en el tercer y cuarto días. En cada uno de los cultivos paralelos, se suministró activina A en el medio de cultivo a una concentración de 100 ng/ml durante las primeras 24 horas. Al final de este período de tiempo, la activina A fue eliminada de uno de los cultivos paralelos (NF) y mantenida en el otro (A100).

Las figuras 8A-F demuestran que había una carencia de expresión para los marcadores del mesodermo brachyury, MOX1, FOXF1, FLK1, BMP4, y SDF1 bajo condiciones de mucha activina y poco FBS. Estos resultados demuestran que las células mesendodérmicas que expresaban brachyury/FGF4/MIXL1 fueron modeladas hacia la producción del endodermo definitivo, en vez de a mesodermo bajo altas condiciones de activina A. Esto también fue demostrado por la fuerte expresión de los marcadores definitivos del endodermo, GSC, SOX17 y FOXA2 en el cultivo tratado con activina durante un período entero de cuatro días (Figuras 9A-C). En contraste, la eliminación de activina A en 24 horas, que simula la señalización más baja de Nodal/activina, dio lugar a una pérdida drástica de la expresión génica de endodermo definitivo (Figuras 9A-C) simultáneamente con una ganancia drástica del carácter del mesodermo (Figuras 8A-F).

Ejemplo de referencia 8

Producción definitiva de endodermo en medio que contenía suero al 0,5%

Para demostrar además el efecto de la reducción de suero en la producción de células de endodermo definitivo, fueron diferenciadas hESC en medio de células de endodermo definitivo que contenía varias concentraciones de suero.

Se cultivaron células madre embrionarias humanas durante cinco días en medio RPMI que contenía 100 ng/ml de activina A en presencia de FBS al 10% (v/v), FBS al 2% (v/v) o FBS al 0,5% (v/v). También se establecieron cultivos celulares de control que no contenían activina A en cada uno de los tres niveles séricos de prueba. Para cada uno de estos cultivos, la expresión de varios marcadores génicos fue determinada por Q-PCR (Figuras 10A-I). Además, la cantidad de proteína SOX17 producida por las células en estos cultivos fue determinada por inmunocitoquímica usando los anticuerpos frente a SOX17 que se han descrito previamente en este documento.

Las figuras 10A-I muestran la expresión de ciertos genes del marcador de endodermo definitivo a concentraciones diversas de FBS. En particular, las Figuras 10A-D muestran que la disminución de la concentración sérica en los cultivos celulares tratados con activina A dio lugar a aumentos sustanciales en la producción del ARNm correspondiente a los marcadores positivos del endodermo definitivo, SOX17, GSC, MIXL1 y FOXA2. En el caso de los marcadores para los cuales la expresión del ARNm fue disminuida en respuesta a la activina A (marcadores de tipos de células endodérmicas no definitivas, incluyendo Brachyury, MOX1, SOX7, SOX1 y ZIC1), la disminución de las concentraciones séricas dio como resultado disminuciones sustanciales en la producción del ARNm correspondiente a estos marcadores (Figuras 10E-I).

La proporción relativa de hESC convertidas en células de endodermo definitivo en cada una de las concentraciones séricas fue determinada por inmunocitoquímica usando anticuerpos frente a SOX17. Después de 5 días de diferenciación en 100 ng/ml de activina A en FBS al 0,5%, la proporción de células positivas a SOX17 fue mayor que 80% (> 3 experimentos separados) y no hubo inmunorreactividad detectable para la alfa-fetoproteína (AFP) o trombosmodulina (THBD), marcadores de VE/PE y trofectodermo (TE), respectivamente. La correlación entre el aumento de la expresión de ARNm de SOX17 y el número creciente de células inmunorreactivas con SOX17 a través de estas condiciones indica que la medida relativa de la expresión genética es también una medida razonable del número de células SOX17-positivas dentro la población.

Ejemplo de referencia 9

La sobreexpresión de la expresión de SOX17 precede la sobreexpresión de la expresión de FOXA2

Este ejemplo de referencia demuestra que en la diferenciación mediada por activina de hESC en endodermo definitivo, la expresión del ARNm de SOX17 se sobreexpresa antes de la expresión del ARNm de FOXA2.

- 5 Se cultivaron células madre embrionarias humanas en medio RPMI durante cuatro días en presencia de activina A y poco suero, como se describió anteriormente en el ejemplo de referencia 4. La expresión del ARNm de SOX17 y FOXA2 fue determinada por Q-PCR.

10 Como se muestra en la Figura 11A, el ARNm de SOX17 incrementó sustancialmente comenzando aproximadamente 48 horas después de la adición de activina A. Un aumento sustancial similar en la expresión para el ARNm de FOXA2 no fue observado hasta aproximadamente 96 horas después de la adición de activina. Estos resultados son consistentes con la producción de endodermo definitivo y mesodermo no axial (ver también las Figuras 9A-C). Estos resultados, sin embargo, contrastan con la expresión temporal de SOX17 y FOXA2 en cuerpos embrionarios de ratón incubados con activinas donde la expresión de FOXA2 precede a la de SOX17. Por lo tanto, es probable que los sistemas del cuerpo embrionario en ratón estén optimizados para la producción de mesodermo axial, en vez de endodermo definitivo.

Ejemplo de referencia 10

Producción de endodermo definitivo en ocho diferentes líneas hESC

Este ejemplo de referencia muestra que se pueden producir células de endodermo definitivo a partir de ocho líneas hESC derivadas independientemente utilizando los métodos descritos en este documento.

- 20 Se cultivaron por separado ocho líneas diferentes hESC (CyT25, CyT-DM3, BG01, BG02, BG03, H7, H9 y HUES7) durante cinco días en presencia de 100 ng/ml de activina A en medio de RPMI pobre en suero. Específicamente, el medio RPMI contenía FBS al 0% (v/v) el día 1, FBS al 0,2% (v/v) el día 2 y FBS al 2% (v/v) en los días 3-5.

Cada una de las ocho líneas celulares se diferenciaron en células de endodermo definitivo SOX17/CXCR4-positivas.

Ejemplo de referencia 11

- 25 Trasplante de células de endodermo definitivo humanas bajo cápsula de riñón en ratón

Para demostrar que las células de endodermo definitivo humanas producidas utilizando los métodos descritos en este documento eran capaces de responder a factores de diferenciación para producir células derivadas del tracto digestivo, fueron sometidas dichas células de endodermo definitivo humanas a un protocolo de diferenciación in vivo.

- 30 Se produjeron células de endodermo definitivo humanas como se describe en los ejemplos de referencia anteriores. Estas células se recogieron y trasplantaron debajo de la cápsula del riñón en ratones inmunodeprimidos usando procedimientos estándares. Después de tres semanas, los ratones fueron sacrificados y el tejido trasplantado fue retirado, seccionado y sometido a análisis histológico e inmunocitoquímica.

35 Las figuras 12A-D muestran que, después de tres semanas después del trasplante, las células humanas del endodermo definitivo se diferenciaron en células y estructuras celulares derivaron del tracto intestinal. En particular, la Figura 12A muestra las secciones teñidas con hematoxilina y eosina del tejido del endodermo definitivo humano trasplantado que se ha diferenciado en estructuras del tipo tracto intestinal. La Figura 12B muestra una sección de endodermo definitivo humano trasplantado inmunoteñida con anticuerpos contra el antígeno específico de hepatocitos (HSA). Este resultado indica que las células humanas del endodermo definitivo son capaces de diferenciarse en células hepáticas o precursoras del hígado. Las figuras 12C y 12D muestran una sección de endodermo humano definitivo trasplantado inmunoteñido con anticuerpos frente a vilina y anticuerpos frente al factor de transcripción 2 homeobox tipo caudal (Cdx2), respectivamente. Estos resultados indican que las células humanas del endodermo definitivo son capaces de diferenciarse en células intestinales o en precursores de células intestinales.

Ejemplo de referencia 12

- 45 Generación de líneas de células madre embrionarias transgénicas humanas de promotor FGF8-EGFP y promotor Brachyury-EGFP

50 Con el fin de utilizar los marcadores FGF8 y brachyury para el aislamiento celular, se construyeron hESC con promotores de genes de FGF8 o brachyury fusionados con un gen indicador expresable. En particular, este ejemplo de referencia describe la construcción de un vector que comprendía un casete indicador que comprendía un gen indicador bajo el control de la región reguladora de FGF8. Además, se describe la construcción de un vector que comprendía un casete indicador que comprendía un gen indicador bajo el control de la región reguladora de brachyury. Este ejemplo de referencia también describe la preparación de una célula, tal como una célula madre embrionaria humana, transfectada con uno o más de estos vectores así como una célula con uno o ambos de estos casetes

indicadores integrados en su genoma.

Se construyeron líneas celulares de la línea pre-primitiva que expresaban FGF8 y líneas celulares mesendodérmicas de expresión de brachyury genéticamente marcadas con un gen indicador colocando un gen indicador de GFP bajo el control de la región reguladora (promotor) del gen FGF8 o el gen brachyury, respectivamente. En primer lugar, una construcción de plásmidos en la que la expresión de EGFP era impulsada por el promotor del gen FGF8 humano o brachyury se generó reemplazando el promotor CMV del vector pEGFP-nl (Clontech) con la región de control humana de FGF8 o brachyury. Estas regiones de control contenían los elementos reguladores caracterizados de tanto el gen de FGF8 como de brachyury, y fueron suficientes para conferir el patrón normal de expresión de estos genes en ratones transgénicos. En el vector resultante, la expresión de EGFP es impulsada por el promotor FGF8 o el promotor de brachyury. En algunos experimentos, este vector puede ser transfectado en hESC.

El casete del promotor FGF8/EGFP o el casete del promotor brachyury/EGFP se suprimieron del vector anterior, y luego se subclonaron en un vector de selección que contenía el gen de la neomicina fosfotransferasa bajo control del promotor de fosfoglicerol quinasa-1. El casete de selección está flanqueado por sitios de reconocimiento de la recombinasa flp para permitir la extracción del casete. Este vector de selección se linealiza y luego se introduce en las hESC utilizando métodos de lipofección estándar. Después de 10-14 días de selección en G418, los clones transgénicos no diferenciados de hESC se aíslan y se expanden.

Se apreciará que también se pueden construir vectores que contengan GFP o genes indicadores de EGFP bajo el control del promotor FGF4 o SNAI1. Además, se apreciará que los genes indicadores que no sean GFP o EGFP pueden ser utilizados en cualquiera de las construcciones descritas anteriormente, siempre que el indicador permita la separación celular por FACS.

Ejemplo de referencia 13

Producción de poblaciones celulares enriquecidas en células de la línea pre-primitiva

El ejemplo de referencia siguiente demuestra que las hESC que comprendían un casete del promotor FGF8/EGFP pueden diferenciarse en células de la línea pre-primitiva y posteriormente aislarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Se diferenciaron hESC transgénicas del promotor FGF8/EGFP durante aproximadamente 6, 12 y 18 horas en medio de crecimiento que contenía 100 ng/ml de activina A y ningún suero. Las células diferenciadas se cultivaron entonces mediante la digestión con tripsina y se clasificaron en un Becton Dickinson FACS Diva directamente en tampón de lisis de ARN o PBS. Una muestra de células vivas individuales se toma sin la activación para EGFP y las células vivas solas se bloquean en las poblaciones EGFP positivas y GFP negativas. En un experimento separado, la fracción positiva de EGFP se separa en dos poblaciones de igual tamaño según la intensidad de la fluorescencia (alta y baja).

Después de clasificar, las poblaciones celulares son analizadas tanto por Q-PCR como por inmunocitoquímica. Para el análisis de Q-PCR, el RNA se prepara usando las columnas de QIAGEN RNeasy y después se convierte en ADNc. La Q-PCR se lleva a cabo como se describió anteriormente. Para el análisis de la inmunocitoquímica, las células se clasifican en PBS, se fijan durante 10 minutos en paraformaldehído al 4%, y se adhieren a portaobjetos de vidrio usando una centrifugadora Cytospin. El anticuerpo primario es la β -catenina. Se utiliza un anticuerpo secundario apropiado conjugado con FITC (verde) o Rodamina (rojo) para detectar la unión del anticuerpo primario.

Las células clasificadas se someten a análisis Q-PCR. Las células diferenciadas muestran una correlación de fluorescencia con EGFP con expresión génica de FGF8 endógena. En comparación con las células no fluorescentes, las células positivas con EGFP muestran un aumento mayor de 2 veces en los niveles de expresión de FGF8. La separación de las células de intensidad de EGFP alta y baja indica que el nivel de expresión de EGFP se correlaciona con el nivel de expresión de FGF8. Además del análisis del marcador de FGF8, las células clasificadas se someten a análisis por inmunocitoquímica de β -catenina (β -catenina nuclear). La localización nuclear de este marcador se enriquece en la fracción positiva de EGFP. Por el contrario, se observa una pequeña localización nuclear de β -catenina en la fracción negativa de EGFP.

Dados estos resultados, al menos aproximadamente el 5% de las células presentes en los cultivos celulares diferenciados antes de la clasificación son células positivas a FGF8/ β -catenina nuclear. Al menos aproximadamente el 90% de las células de las poblaciones de células clasificadas son células de la línea pre-primitiva positivas a FGF8/ β -catenina nuclear.

Ejemplo de referencia 14

Producción de poblaciones celulares enriquecidas en células mesendodérmicas

El ejemplo de referencia siguiente demuestra que las hESC que comprendían un casete del promotor de brachyury/EGFP se pueden diferenciar en células de la línea primitiva (mesendodermo) y después aislarse posteriormente mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Las hESC transgénicas del promotor Brachyury/EGFP se diferencian durante aproximadamente 24 horas en medio de crecimiento con 100 ng/ml de activina A y sin ningún suero o 100 ng/ml de activina A y FBS al 0,1% (v/v). Las células diferenciadas son entonces recogidas por digestión con tripsina y clasificadas en un Becton Dickinson FACS Diva directamente en tampón de lisis de ARN o PBS. Una muestra de células vivas individuales se toma sin la activación para EGFP y las células vivas individuales se bloquean en poblaciones negativas de EGFP positivas y GFP negativas. En un experimento separado, la fracción positiva de EGFP se separa en dos poblaciones de igual tamaño según la intensidad de la fluorescencia (alta y baja).

Después de clasificar, las poblaciones celulares son analizadas tanto por Q-PCR como por inmunocitoquímica. Para el análisis por Q-PCR, el RNA se prepara usando columnas de QIAGEN RNeasy y después se convierte en ADNc. La Q-PCR se lleva a cabo como se describió anteriormente. Para el análisis por inmunocitoquímica, las células se clasifican en PBS, se fijan durante 10 minutos en paraformaldehído al 4%, y se adhieren a los portaobjetos de vidrio usando una centrifugadora Cytospin. Los anticuerpos primarios actúan frente a FGF4 y SNAI1. Se utilizan anticuerpos secundarios apropiados conjugados con FITC (verde) o Rodamina (rojo) para detectar la unión de los anticuerpos primarios.

Las células clasificadas se someten a análisis Q-PCR. Las células diferenciadas muestran una correlación de la fluorescencia de EGFP con la expresión endógena del gen de brachyury. En comparación con las células no fluorescentes, las células positivas a EGFP muestran un aumento mayor de 2 veces en los niveles de expresión de brachyury. La separación de las células de intensidad de EGFP alta y baja indica que el nivel de expresión de EGFP se correlaciona con el nivel de expresión de brachyury. Además del análisis del marcador de brachyury, las células clasificadas se someten al análisis por inmunocitoquímica de FGF4 y de SNAI1. Cada uno de estos marcadores se enriquece en la fracción positiva de EGFP. Por el contrario, se observa poco FGF4 y/o SNAI1 en la fracción negativa de EGFP.

Dados estos resultados, por lo menos aproximadamente el 5% de las células presentes en los cultivos celulares diferenciados antes de clasificar son células positivas con brachyury/FGF4/SNAI1. Por lo menos aproximadamente el 90% de las células en las poblaciones de células clasificadas son células de mesendodermo positivas con brachyury/FGF4/SNAI1.

Se apreciará que, como alternativa a los vectores que comprenden una construcción de EGFP/brachyury, los vectores que comprenden un gen indicador de GFP o EGFP bajo el control del promotor FGF4 o SNAI1 pueden utilizarse en los métodos de enriquecimiento del mesendodermo descritos en este Ejemplo.

Ejemplo de referencia 15

Identificación de factores de diferenciación capaces de promover la diferenciación de células humanas in vitro de la línea pre-primitiva y/o del mesendodermo

Para ejemplificar los métodos de cribado de factores de diferenciación descritos en este documento, se proporcionan poblaciones de células de la línea pre-primitiva humana y mesendodérmicas producidas utilizando los métodos descritos en este documento por separado con varios factores de diferenciación candidatos a la vez que se determinan los niveles de expresión normalizados de ciertos productos genéticos marcadores en varios puntos de tiempo.

Se producen cultivos celulares de la línea pre-primitiva humana y mesendodérmicos como se describe en los ejemplos de referencia anteriores. En resumen, se cultivan células de hESC en presencia de 100 ng/ml de activina A en medio RPMI sin suero durante 12 horas (línea pre-primitiva) o 24 horas (mesendodermo). Después de la formación de las células de la línea pre-primitiva y las células mesendodérmicas, las poblaciones celulares se mantienen en placas individuales en RPMI conteniendo FBS al 0,2% y se tratan con uno de: Wnt3B a 20 ng/ml, FGF2 a 5 ng/ml o FGF2 a 100 ng/ml. La expresión de los productos genéticos marcadores para albúmina, PROX1 y TITF1 se cuantifican mediante Q-PCR.

La incubación de las células de la línea pre-primitiva y las células mesendodérmicas con las moléculas antedichas se espera que origine que las células de la línea pre-primitiva y las células mesendodérmicas se diferencien en células derivadas del linaje definitivo del endodermo.

Ejemplo de referencia 16

Resumen de la expresión de marcadores en tipos de células embrionarias iniciales

Este ejemplo de referencia proporciona una tabla que resume la expresión de los marcadores génicos útiles en la identificación y/o detección de los tipos de células obtenidos durante la diferenciación inicial de las hESC. En la Tabla 1 más abajo, se proporciona el nombre completo y la abreviatura de cada marcador en las dos primeras columnas. Cada una de las siguientes columnas describe si el gen se expresa en un tipo de tejido específico. Se utilizan las abreviaturas siguientes para cada tipo de célula: ICM/ESC se refiere a hESC; PS se refiere a las células de la línea primitiva (mesendodermo); Ecto se refiere a las células del ectodermo; Meso se refiere a las células del mesodermo; DE se refiere a las células del endodermo definitivo; PrE se refiere al endodermo primitivo; VE hace referencia al endodermo visceral; y PE se refiere al endodermo parietal.

Tabla 1

Nombre genético	Abb. Gen	Dominios de expresión – etapa de gastrulación						
		ICM/ESC	PS	Ecto	Meso	DE	PrE/VE/PE	TE
factor de crecimiento del fibroblasto 8	FGF8	-	+	-	+	+	+	-
brachyury	BRACH	-	+	-	+	-	-	-
factor de crecimiento del fibroblasto 4	FGF4	+	+	-	+	-	-	-
homólogo snail 1 (Drosophila)	SNAIL1	-	+	-	+	+	+	+
Mix1 homeobox (Xenopus laevis)-tipo 1	MIXL1	-	+	-	+	+	+	-
goosecoid	GSC	-	+	-	+	+	+	-
SRY (región Y determinante del sexo)-box 17	SOX17	-	-	-	-	+	-	
receptor 4 de quimioquina (motivo C-X-C)	CXCR4	-	-	-	+	+	-	-
factor 3 nuclear de hepatocito, beta	FOXA2	-	+	-	+	+	+	-
homólogo deshabilitado 2	DAB2	-	-	-	-	-	+	-
SRY (región Y determinante del sexo)-box 7	SOX7	-	-	-	-	-	+	-
cordina	CHRD	-	+	-	+	+	+	-
E-cadherina (epitelial)	ECAD	+	-	+	-	+/-	+	+
SRY (región Y determinante del sexo)-box 1	SOX1	-	-	+	-	-	-	-
proteína del dedo de cinc del cerebelo 1	ZIC1	-	-	+/-	+/-	-	-	-
dominio POU, clase 5, factor de transcripción 1	OCT4	+	-	-	-	-	+	-
forkhead box F1	FOXF1	-	-	-	+	-	-	-
homeo Box 1 de mesénquima	MOX1	-	-	-	+	-	-	-
VEGFR, receptor del dominio del inserto de quinasa	FLK1	-	-	-	+	-	-	-
proteína morfogenética ósea 4	BMP4	-	-	-	+	-	-	+
factor derivado de células estromales 1	SDF1	unk	-	-	+	-	+	+
gonadotropina coriónica, polipéptido beta 5	HCG	-	-	-	-	-	-+	

Ejemplo de referencia 17

Otros marcadores útiles para identificar y/o detectar células de la línea pre-primitiva y células mesendodérmicas

- 5 Este ejemplo de referencia describe otros marcadores que son útiles para identificar y/o detectar las células de la línea pre-primitiva y/o mesendodérmicas. Se apreciará que los marcadores de la línea pre-primitiva descritos en este ejemplo de referencia se pueden utilizar en lugar de los marcadores descritos anteriormente, o además de cualquiera de estos, para las células de la línea pre-primitiva. También se apreciará que los marcadores del mesendodermo descritos en este ejemplo de referencia se pueden utilizar en lugar de los marcadores previamente descritos para las células mesodérmicas o además de cualquiera de estos.

10 Para investigar el procedimiento de diferenciación de hESC en la línea pre-primitiva, mesendodermo y, posteriormente, al endodermo y al mesodermo, se realizó el perfil global de expresión para cultivos de diferenciación de hESC en incrementos de tiempo cortos con poco suero ($\leq$ FBS al 2% (v/v)) y mucha activina A (100 ng/ml), con o sin la adición del inhibidor del receptor de FGF, SU5402, después de las primeras 24 horas de diferenciación. La adición de SU5402 a la activina A las 24 horas dio lugar a una disminución drástica en la expresión de los genes característicos del endodermo definitivo y aumentó significativamente la expresión de los marcadores del mesodermo.

15 Para mediar la diferenciación celular, se cultivaron hESC en medio RPMI pobre en suero en presencia de 100 ng/ml de activina A durante 4 días. La suplementación con suero fue de 0% (v/v) durante las primeras 24 horas, 0,2% (v/v) durante las segundas 24 horas y 2% (v/v) para los días 3 y 4 de diferenciación. Después de las primeras 24 horas de diferenciación, el mesodermo fue inducido en un conjunto de cultivos por la aplicación de SU5402 en 5 μ M además de la activina A. El otro conjunto de cultivos permaneció en activina A solo y produjo así el endodermo definitivo con alta eficacia. Las muestras se tomaron por duplicado a las 0, 2, 6, 24, 30, 48 y 96 horas en puntos de tiempo. Los

puntos de hora 48 y 96 fueron endodermo definitivo (Activina A solo) o mesodermo (Activina A con SU5402). El ARN total fue extraído y sometido a análisis de expresión (Durham, NC) para el perfilado de la expresión global utilizando las matrices de oligonucleótidos de alta densidad de Affymetrix (U133 plus 2.0).

5 Fueron estudiados patrones de expresión genética respecto al curso de tiempo de la diferenciación de hESC usando análisis jerárquicos de agrupación en clústeres así como análisis comparativos entre los grupos de muestras emparejadas en los diversos puntos de tiempo. Se identificaron genes que mostraron un patrón de expresión caracterizado por un fuerte aumento de la expresión durante las primeras 6 horas seguido por el mantenimiento o las disminuciones en la expresión en los momentos posteriores como genes implicados en la diferenciación de las hESC en células de la línea pre-primitiva. Los genes que mostraron picos en la expresión en los puntos de tiempo de 24-30
10 horas se identificaron como genes implicados en la diferenciación del mesendodermo.

La Tabla 2 a continuación describe los marcadores génicos que se expresaron en niveles altamente elevados 6 horas después de poner en contacto las hESC con activina A. Estos genes son indicativos de células de la línea pre-primitiva. La Tabla 3, a continuación, describe los marcadores génicos que se expresaron en los niveles máximos en aproximadamente 24 a aproximadamente 30 horas después de poner en contacto las hESC con activina A. Estos
15 genes son indicativos de células mesendodérmicas. En cada una de estas tablas, la primera columna enumera el número de identificación del conjunto de sondas y la segunda columna proporciona el número de identificación de Unigene. La base de datos de Unigene está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para cualquiera de los genes marcadores descritos en estas tablas pueden obtenerse mediante una consulta para determinar el número de
20 identificación de Unigene apropiado en el sitio web de NCBI. La base de datos de Unigene se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. La columna tres de cada tabla proporciona el símbolo del gen comúnmente conocido para cada uno de los marcadores. El resto de las columnas proporcionan los niveles relativos de la expresión génica en los puntos de tiempo 0, 2, 6, 24, 30, 48 y 96 horas. Como se utiliza en estas tablas, "DE" se refiere al endodermo definitivo y "M" se refiere al mesodermo.

Tabla 2

Id conjunto de sonda	Id Unigen	Denominación del gen	0 h	2 h	6 h	24 h	30 h	48 h-DE	48 h-M	96 h-DE	96 h-M
208449_s_at	HS. 57710	FGF8	47	212	534	741	513	390	939	701	93
230916_at	HS. 370414	NODAL	2799	4147	9451	9789	12388	6368	8090	8202	1921
213069_at	HS. 477420	HEG	76	160	720	567	915	970	619	719	481
218839_at	HS. 234434	HEY1	30	233	999	202	160	38	98	33	768
209710_at	HS. 367725	GATA2	75	283	903	317	197	94	345	132	930
205780_at	HS. 475055	BIK	418	1061	2403	804	367	165	1157	746	1003
208937_s_at	HS. 504609	ID1	5378	13769	21979	8886	7177	8627	15486	6468	24305

Tabla 3

Id conjunto de sonda	Id Unigen	Denominación del gen	0 h	2 h	6 h	24 h	30 h	48 h-DE	48 h-M	96 h-DE	96 h-M
206783_at	HS. 1755	FGF4	1138	1401	1558	4521	3291	2538	3581	181	932
229103_at	HS. 445884	WNT3	234	240	717	1415	859	1123	758	881	77
231746_at	HS. 282079	MIXL1	286	427	1252	12014	12911	11598	4121	5674	152
206619_at	HS. 159311	DKK4	35	14	16	3876	3218	3877	7	19	22
219480_at	HS. 48029	SNAIL	78	131	249	525	434	536	338	243	261
1562713_a_at	HS. 465407	NETO1	104	174	192	330	283	165	71	64	19
206524_at	HS. 389457	T (brachyury)	581	552	722	1761	1816	604	344	159	123
219179_at	HS. 48950	DACT1	824	683	702	2734	2023	1016	467	285	680
218454_at	HS. 131933	FLJ22662	974	1318	1106	3651	2532	1205	1048	874	1294
209897_s_at	HS. 29802	SLIT2	223	244	212	547	625	321	173	145	285
205278_at	HS. 420036	GAD1	160	167	212	676	723	292	444	264	18
210234_at	HS. 429018	GRM4	384	359	389	738	823	216	116	139	213

Ejemplo de referencia 18

Marcadores útiles para identificar y/o detectar la diferenciación de células madre embrionarias antes de la etapa de la línea pre-primitiva (células ectodérmicas primitivas)

- 5 Este ejemplo de referencia describe marcadores que son útiles para identificar y/o detectar la diferenciación de las células madre antes de la etapa de la línea pre-primitiva. Tales tipos de células se refieren en este documento como células primitivas del ectodermo. Se apreciará que los marcadores de células ectodermas primitivas descritos en este ejemplo de referencia pueden asociarse con composiciones de células ectodermas primitivas y se utiliza en los métodos que ya se han descrito para la producción y cribado de células de la línea pre-primitiva y/o células mesendodérmicas.
- 10 Con el fin de investigar el procedimiento de diferenciación de hESC al ectodermo primitivo, se realizaron perfiles de expresión global para diferenciar cultivos de hESC como se describe en el ejemplo 17 de referencia.
- 15 La Tabla 4 a continuación describe los marcadores génicos que se expresaron al aumentar o disminuir los niveles elevados antes de 6 horas después de poner en contacto las hESC con activina A. Estos genes son indicativos de las células primitivas del ectodermo. Como se indica en las Tablas 2 y 3 anteriores, en la Tabla 4, la primera columna enumera el número de identificación del conjunto de sondas y la segunda columna proporciona el número de identificación de Unigene. La base de datos de Unigene está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para cualquiera de los marcadores génicos descritos en esta tabla pueden obtenerse mediante una consulta para el número de identificación de Unigene apropiado en el sitio web de NCBI.
- 20 La columna tres de la Tabla 4 proporciona el símbolo del gen comúnmente conocido para cada uno de los marcadores. El resto de las columnas proporcionan los niveles relativos de expresión génica en los puntos de tiempo de 0, 2, 6, 24, 30, 48 y 96 horas. Como se utiliza en esta tabla, "DE" se refiere al endodermo definitivo y "M" se refiere al mesodermo.
- 25 La Tabla 4 muestra que la expresión de los ARNm de FZD10, FGF5 y OCT4 está sustancialmente sobreexpresada 2 horas después de entrar en contacto las hESC con 100 ng/ml de activina A. Por el contrario, la expresión del ARNm de GBX2, ZFP42 y SOX2 está sustancialmente infraregulada 2 horas después de un tratamiento de activina A. La expresión del ARNm de Nanog se espera que sea sustancialmente sobreexpresada en un tiempo antes de seis horas después del tratamiento de activina A.

Tabla 4

Id conjunto de sonda	Id Unigen	Denominación del gen	0 h	2 h	6 h	24 h	30 h	48 h-DE	48 h-M	96 h-DE	96 h-M
219764_at	HS. 31664	FZD10	141	788	318	314	200	67	134	35	9
210311_at	HS. 37055	FGF5	59	130	98	70	49	221	88	161	92
220184_at	HS. 329926	NANOG	8341	8065	14341	8716	7906	4436	8874	3977	1291
214532_x_at	HS. 249184	OCT4	26278	33882	33953	29083	25912	15736	20166	7488	18338
210560_at	HS. 184945	GBX2	161	80	46	29	10	56	43	10	13
1554776_at	HS. 335787	ZFP42	2727	1445	2213	1723	1493	1011	1489	526	2329
213722_at	HS. 518438	SOX2	937	643	518	387	354	193	719	108	472

Los métodos, las composiciones y los dispositivos descritos en este documento son actualmente representativos de las realizaciones preferidas y son ejemplares y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención.

Como se utiliza en las reivindicaciones a continuación y a lo largo de esta descripción, mediante la frase "consistente esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción que se especifican en la descripción de los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "consistente esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Referencias

- 10 En la presente solicitud de patente se han citado numerosas referencias bibliográficas y de patentes.

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

Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G. L., and Stainier, D. Y. (1999). Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Dev Biol* 215, 343-357.
- 15 Alexander, J., and Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol* 9, 1147-1157.

Ang, S.L. et al. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119, 1301-1315 (1993).
- 20 Ang, S.L. & Rossant, J. HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561-574 (1994).

Aoki, T. O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M. R., Peyrieras, N., and 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.
- Arnold, S.J. et al. Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mech Dev* 91, 249-258 (2000).
- 25 Bachiller, D. et al. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 403, 658-661 (2000).

Battle, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89 (2000).
- Beck, S., Le Good, J. A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F., and Constam, D. B. (2002). Extra-embryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4, 981-985.
- 30 Beddington, R. S., Rashbass, P., and Wilson, V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl*, 157-165.

Blum, M. et al. Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell* 69, 1097-1106 (1992).
- Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C., and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9, 2110-2117.
- 35 Brennan, J. et al. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature* 411, 965-969 (2001).

Candia, A.F. et al. Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos. *Development* 116, 1123-1136 (1992).
- Candia, A.F. & Wright, C.V. Differential localization of Mox-1 and Mox-2 proteins indicates distinct roles during development. *Int J Dev Biol* 40, 1179-1184 (1996).
- 40 Chang, H., Brown, C. W., and Matzuk, M. M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823.

Ciruna, B.G., Schwartz, L., Harpal, K., Yamaguchi, T.P. & Rossant, J. Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development* 124, 2829-2841 (1997).
- 45 Ciruna, B. & Rossant, J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1, 37-49 (2001).

Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B., and 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.
- de Caestecker, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 1-11 (2004).
- 5 Dougan, S. T., Warga, R. M., Kane, D. A., Schier, A. F., and Talbot, W. S. (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development* 130, 1837-1851.
- Elms, P. et al. Overlapping and distinct expression domains of *Zic2* and *Zic3* during mouse gastrulation. *Gene Expr Patterns* 4, 505-511 (2004).
- 10 Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F., and 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., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- 15 Futaki, S., Hayashi, Y., Yamashita, M., Yagi, K., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., and 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., and Melton, D. A. (2000). Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16, 124-130.
- Haegel, H. et al. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 121, 3529-3537 (1995).
- 20 Hallonet, M. et al. Maintenance of the specification of the anterior definitive endoderm and forebrain depends on the axial mesendoderm: a study using *HNF3beta/Foxa2* conditional mutants. *Dev Biol* 243, 20-33 (2002).
- Harris, T. M., and Childs, G. (2002). Global gene expression patterns during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells into parietal endoderm. *Funct Integr Genomics* 2, 105-119.
- Henry, G.L. & Melton, D.A. Mixer, a homeobox gene required for endoderm development. *Science* 281, 91-96 (1998).
- Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R. & Lehrach, H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-622 (1990).
- 25 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., and Strickland, S. (1988). Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads. *Differentiation* 37, 20-25.
- 30 Hudson, C., Clements, D., Friday, R. V., Stott, D., and Woodland, H. R. (1997). *Xsox17alpha* and *-beta* mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell* 91, 397-405.
- Huelsken, J. et al. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148, 567-578 (2000).
- 35 Imada, M., Imada, S., Iwasaki, H., Kume, A., Yamaguchi, H., and Moore, E. E. (1987). Fetomodulin: marker surface protein of fetal development which is modulatable by cyclic AMP. *Dev Biol* 122, 483-491.
- Kalinichenko, V.V., Gusarova, G.A., Shin, B. & Costa, R.H. The forkhead box F1 transcription factor is expressed in brain and head mesenchyme during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 3, 153-158 (2003).
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P. P., and Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in *Sox17*-null mutant mice. *Development* 129, 2367-2379.
- 40 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., and 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.
- 45 Kim, C. H., and 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., and Griffin, K. J. (2000). Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10, 350-356.
- Kinder, S.J. et al. The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* 128, 3623-3634 (2001).
- 5 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.
- Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A. J., Wolfman, N. M., ten Dijke, P., and Kuehn, M. R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. *J Biol Chem* 276, 656-661.
- 10 Labosky, P. A., Barlow, D. P., and 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.
- Labosky, P. A., Barlow, D. P., and 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.
- 15 Lacroix, M.C., Guibourdenche, J., Frendo, J.L., Pidoux, G. & Evain-Brion, D. Placental growth hormones. *Endocrine* 19, 73-79 (2002).
- Lawson, K.A. et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424-436 (1999).
- Lickert, H., Kutsch, S., Kanzler, B., Tamai, Y., Taketo, M. M., and Kemler, R. (2002). Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* 3, 171-181.
- 20 Liu, P. et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 22, 361-365 (1999).
- Lowe, L.A., Yamada, S. & Kuehn, M.R. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* 128, 1831-1843 (2001).
- Lu, C. C., Brennan, J., and Robertson, E. J. (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11, 384-392.
- 25 Ma, Q., Jones, D., and 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.
- Maruoka, Y. et al. Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf7 and Fgf18, in the mouse embryo. *Mech Dev* 74, 175-177 (1998).
- 30 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.
- Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H. (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187, 265-276.
- Nagai, T. et al. The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Dev Biol* 182, 299-313 (1997).
- 35 Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and 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.
- Nieto, M.A., Bennett, M.F., Sargent, M.G. & Wilkinson, D.G. Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the Drosophila snail gene. *Development* 116, 227-237 (1992).
- 40 Nieto, M.A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166 (2002).
- Niswander, L. & Martin, G.R. Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* 114, 755-768 (1992).
- Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-148.
- 45 Ogura, H., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2001). Behavioral abnormalities of Zic1 and Zic2 mutant mice: implications as models for human neurological disorders. *Behav Genet* 31, 317-324.
- Ormelstad, M., Astorga, J. & Carlsson, P. Differences in the embryonic expression patterns of mouse Foxf1 and -2 match their distinct mutant phenotypes. *Dev Dyn* 229, 328-333 (2004).

- Pearce, J.J. & Evans, M.J. *Mml*, a mouse *Mix*-like gene expressed in the primitive streak. *Mech Dev* 87, 189-192 (1999).
- Pera, M.F. et al. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist *noggin*. *J Cell Sci* 117, 1269-1280 (2004).
- 5 Pera-Gomez, A. et al. Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis. *Curr Biol* 14, 197-207 (2004).
- Pesce, M. & Scholer, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-278 (2001).
- 10 Pevny, L.H., Sockanathan, S., Placzek, M. & Lovell-Badge, R. A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125, 1967-1978 (1998).
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.
- Robb, L. & Tam, P.P. Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 15, 543-554 (2004).
- 15 Rodaway, A., and 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., and 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.
- 20 Rohr, K. B., Schulte-Merker, S., and Tautz, D. (1999). Zebrafish *zicl* expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling. *Mech Dev* 85, 147-159.
- Rossant, J. & Tam, P.P. Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development. *Dev Cell* 7, 155-164 (2004).
- Sasaki, H. & Hogan, B.L. Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 118, 47-59 (1993).
- 25 Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 589-621.
- Schoenwolf, G. C., and Smith, J. L. (2000). Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates. *Methods Mol Biol* 135, 113-125.
- Shalaby, F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in *Flk-1*-deficient mice. *Nature* 376, 62-66 (1995).
- 30 Shambloott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and 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., and 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.
- 35 Shapiro, A. M., Ryan, E. A., and Lakey, J. R. (2001a). Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15, 241-264.
- Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Lakey, J., Korbitt, G. S., and 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.
- 40 Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y., and Aiso, S. (1996). Cloning and characterization of *Xenopus laevis* *xSox7* cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1309, 73-76.
- Shook, D. & Keller, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 120, 1351-1383 (2003).
- 45 Sinner, D., Rankin, S., Lee, M. & Zorn, A.M. Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* 131, 3069-3080 (2004).
- Smith, J. (1997). Brachyury and the T-box genes. *Curr Opin Genet Dev* 7, 474-480.

- Smith, J. C., Armes, N. A., Conlon, F. L., Tada, M., Umbhauer, M., and 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.
- Stainier, D.Y. A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev* 16, 893-907 (2002).
- 5 Stemmler, M.P., Hecht, A., Kinzel, B. & Kemler, R. Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos. *Dev Dyn* 227, 238-245 (2003).
- Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M. & Martin, G.R. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13, 1834-1846 (1999).
- 10 Sun, X. et al. Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* 25, 83-86 (2000).
- Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M. G., Jay, P., and Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res* 29, 4274-4283.
- Tam, P.P. & Behringer, R.R. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev* 68, 3-25 (1997).
- 15 Taniguchi, K., Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., and 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.
- Thomas, T., Voss, A.K., Petrou, P. & Gruss, P. The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos. *Dev Biol* 227, 324-342 (2000).
- 20 Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and 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., and Robertson, E. J. (2000). Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development* 127, 3079-3090.
- 25 Vallier, L., Reynolds, D. & Pedersen, R.A. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol* 275, 403-421 (2004).
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- 30 Varlet, I., Collignon, J., and 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., and Robertson, E. J. (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev* 17, 1646-1662.
- Wei, C.L. et al. Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells* 23, 166-185 (2005).
- 35 Weiler-Guettler, H., Aird, W. C., Rayburn, H., Husain, M., and 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., and 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.
- 40 Weinstein, D.C. et al. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-588 (1994).
- Wells, J. M., and Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 393-410.
- Wells, J. M., and Melton, D. A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127, 1563-1572.
- 45 Willison, K. (1990). The mouse Brachyury gene and mesoderm formation. *Trends Genet* 6, 104-105.
- Xu, R.H. et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264 (2002).

Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L. & Rossant, J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489-498 (1993).

Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N. & McMahon, A.P. T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev* 13, 3185-3190 (1999).

- 5 Yang, D.H. et al. Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 251, 27-44 (2002).

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo celular que comprende células humanas, donde al menos el 5% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas.
- 5 2. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos el 10% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
3. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos el 20% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.
- 10 4. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos el 30% de dichas células humanas son células de la línea pre-primitiva.
5. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos 40% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
6. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos 50% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
- 15 7. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos 60% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
8. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos el 70% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
- 20 9. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos 80% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
10. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde al menos 90% de las células humanas son células de la línea pre-primitiva.
- 25 11. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y donde al menos el 5% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
12. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos el 25% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
- 30 13. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos el 50% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
14. El cultivo celular de la reivindicación 1, donde las células alimentadoras humanas están presentes en dicho cultivo, y en donde al menos el 75% de las células humanas distintas de las células alimentadoras humanas son células de la línea pre-primitiva.
- 35 15. El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde menos del 5% de dicho cultivo celular son células seleccionadas del grupo consistente en células endodérmicas viscerales, células endodérmicas parietales, células endodérmicas primitivas, células endodérmicas definitivas, ectodérmica células y células mesodérmicas.
16. El cultivo celular de la reivindicación 1 comprende además un medio que comprende menos del 2% (v/v) de suero.
- 40 17. El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende además un medio que comprende menos del 1% (v/v) de suero.
18. El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende además un medio que comprende menos del 0,5% (v/v) de suero.
19. El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende además un medio que comprende menos del 0,2% (v/v) de suero.
- 45 20. El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende un medio que carece de suero o carece de reemplazo de suero.
21. El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que comprende un factor de crecimiento del subgrupo Nodal/activina de la superfamilia TGF β .

22. El cultivo celular de la reivindicación 21, en el que dicho factor de crecimiento del subgrupo Nodal/activina de la superfamilia TGF β comprende la activina A.
- 5 23. Una población celular que comprende células, en donde al menos el 90% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas, siendo dichas células de la línea pre-primitiva células multipotentes que pueden diferenciarse en células mesendodérmicas.
24. La población celular de la reivindicación 23, en donde al menos el 95% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas.
25. La población celular de la reivindicación 23, en donde al menos el 98% de dichas células son células de la línea pre-primitiva humanas.
- 10 26. El cultivo celular de la reivindicación 1 o la población celular de la reivindicación 23, en donde dichas células de la línea pre-primitiva humanas expresan un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina.
- 15 27. El cultivo celular de la reivindicación 1 o la población celular de la reivindicación 23, en donde la expresión de un marcador seleccionado del grupo constituido por FGF8 y β -catenina localizado en el núcleo es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva humanas.
28. El cultivo celular de la reivindicación 1 o la población celular de la reivindicación 23, en el que dichas células de la línea pre-primitiva humanas no expresan sustancialmente ningún marcador seleccionado del grupo consistente en brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.
- 20 29. El cultivo celular de la reivindicación 1 o la población celular de la reivindicación 23, en donde dichas células de la línea pre-primitiva humanas expresan FGF8 y β -catenina localizada en el núcleo.
30. El cultivo celular o la población celular de la reivindicación 29, en donde la expresión de FGF8 y β -catenina es mayor que la expresión de brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1 en dichas células de la línea pre-primitiva humanas.
- 25 31. El cultivo celular o la población celular de la reivindicación 29, en donde dichas células de la línea pre-primitiva humanas no expresan sustancialmente brachyury, FGF4, SNAI1, SOX17, FOXA2, SOX7 y SOX1.

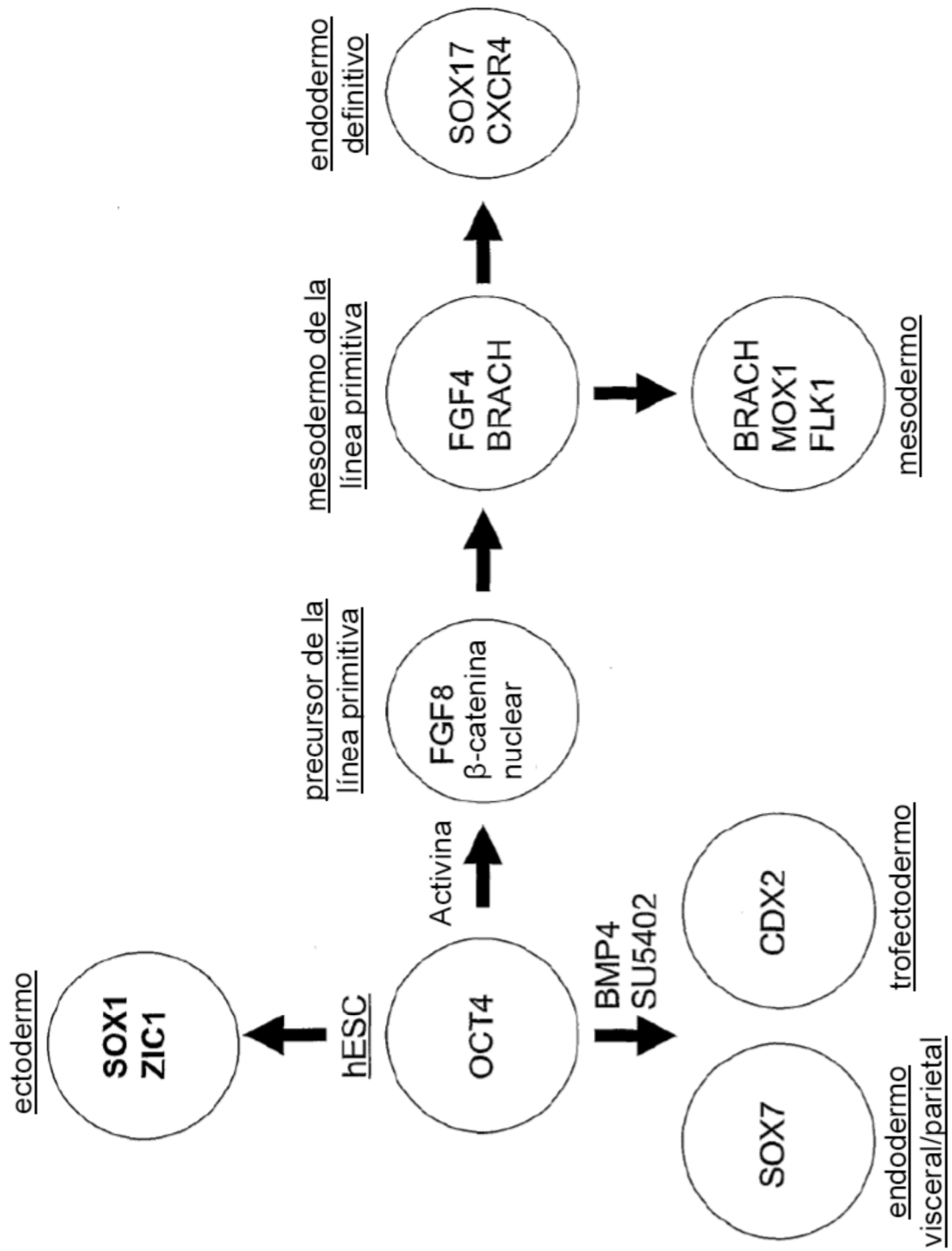


Figura 1

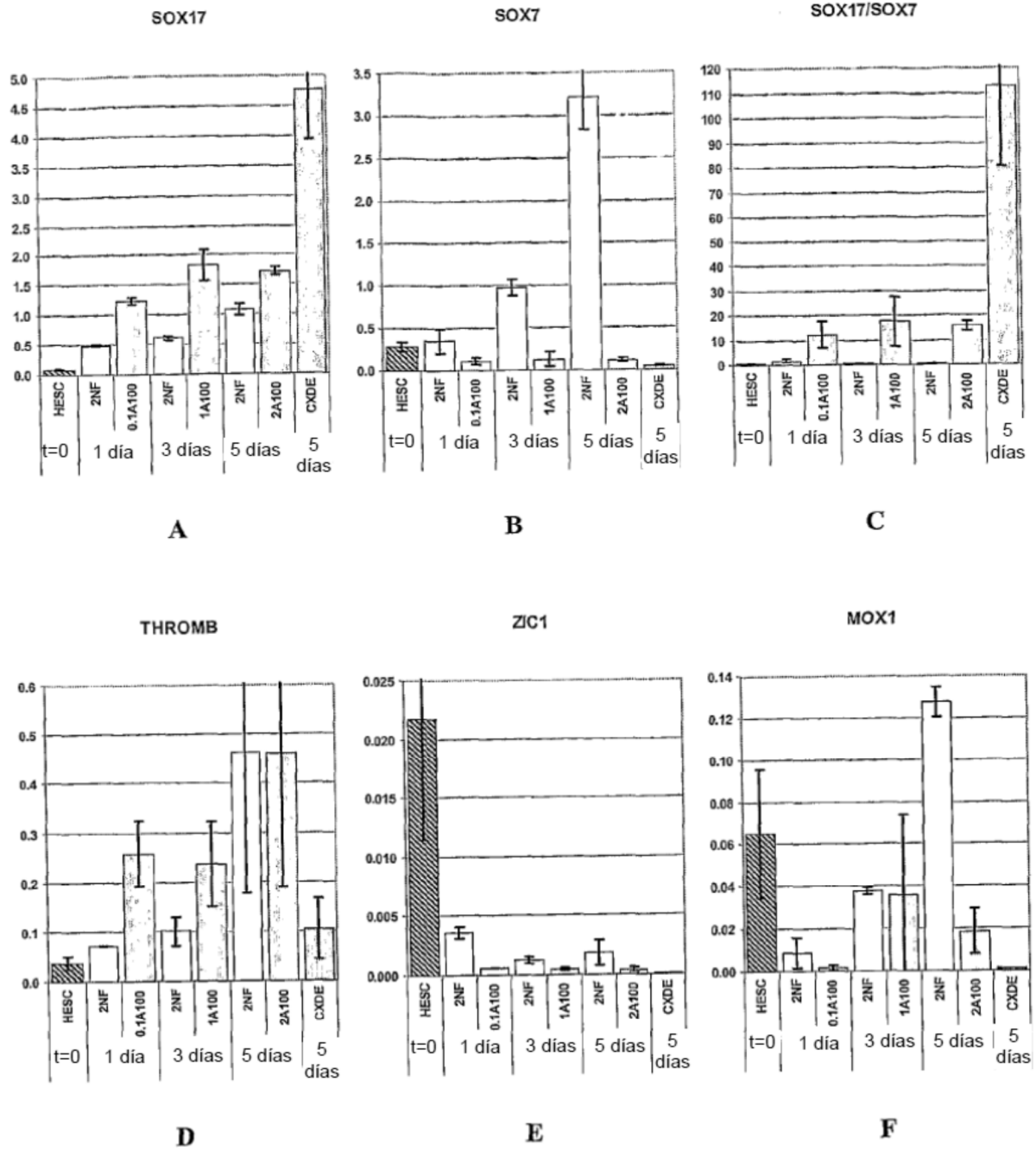


Figura 2

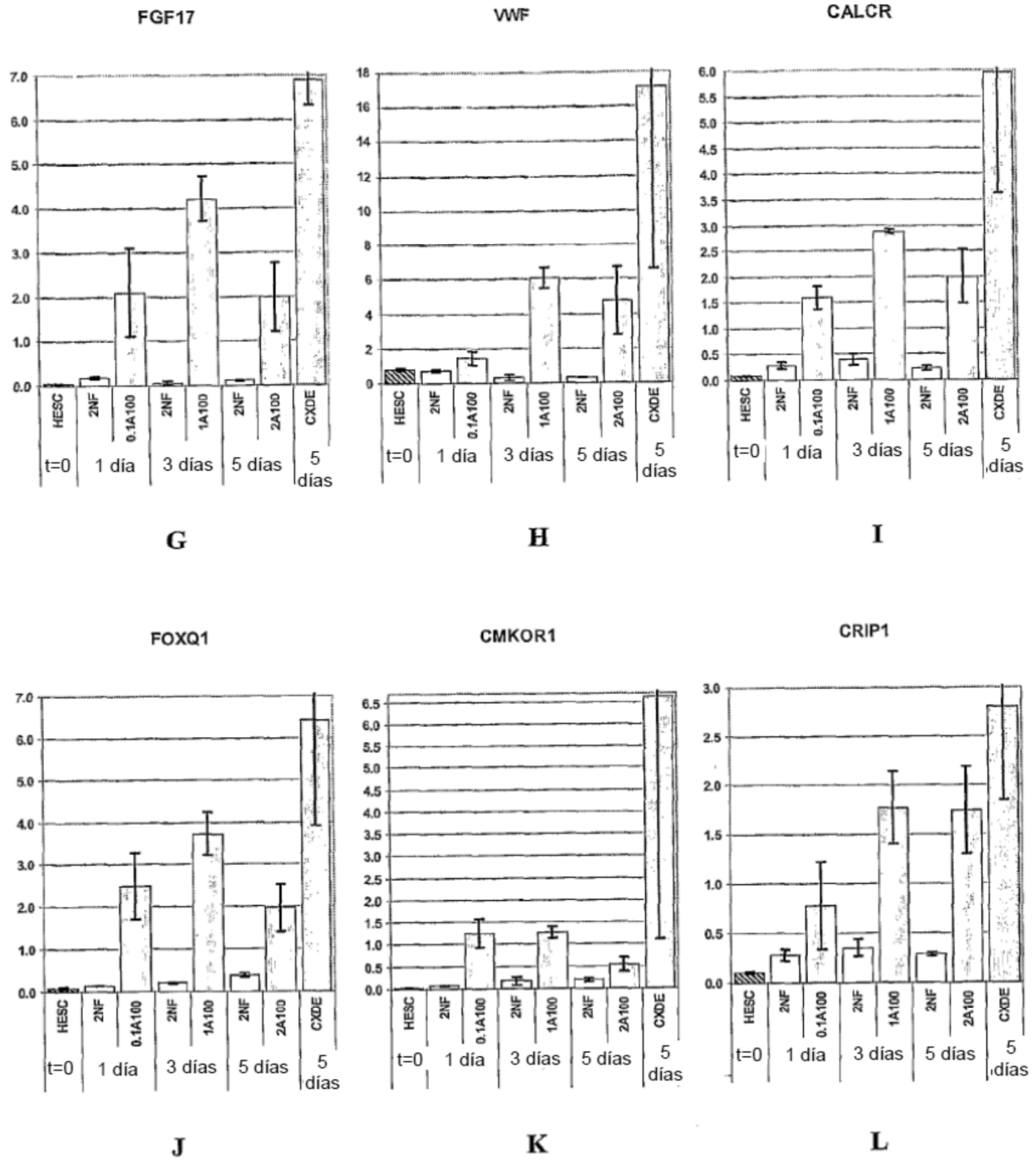


Figura 2

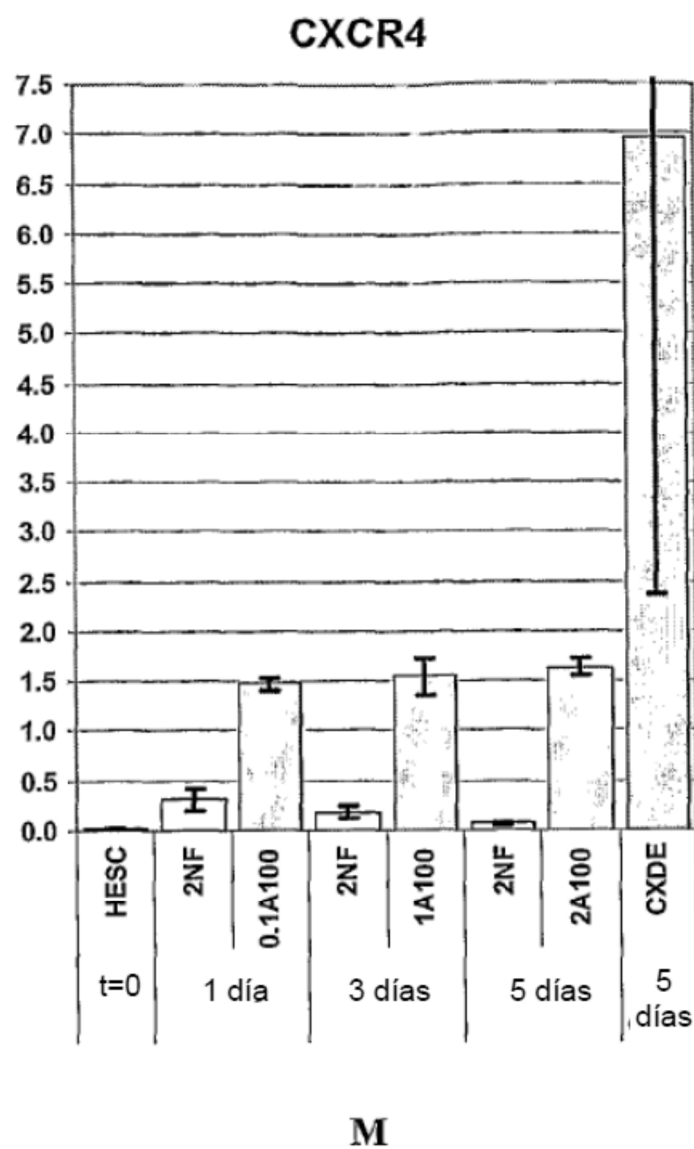


Figura 2

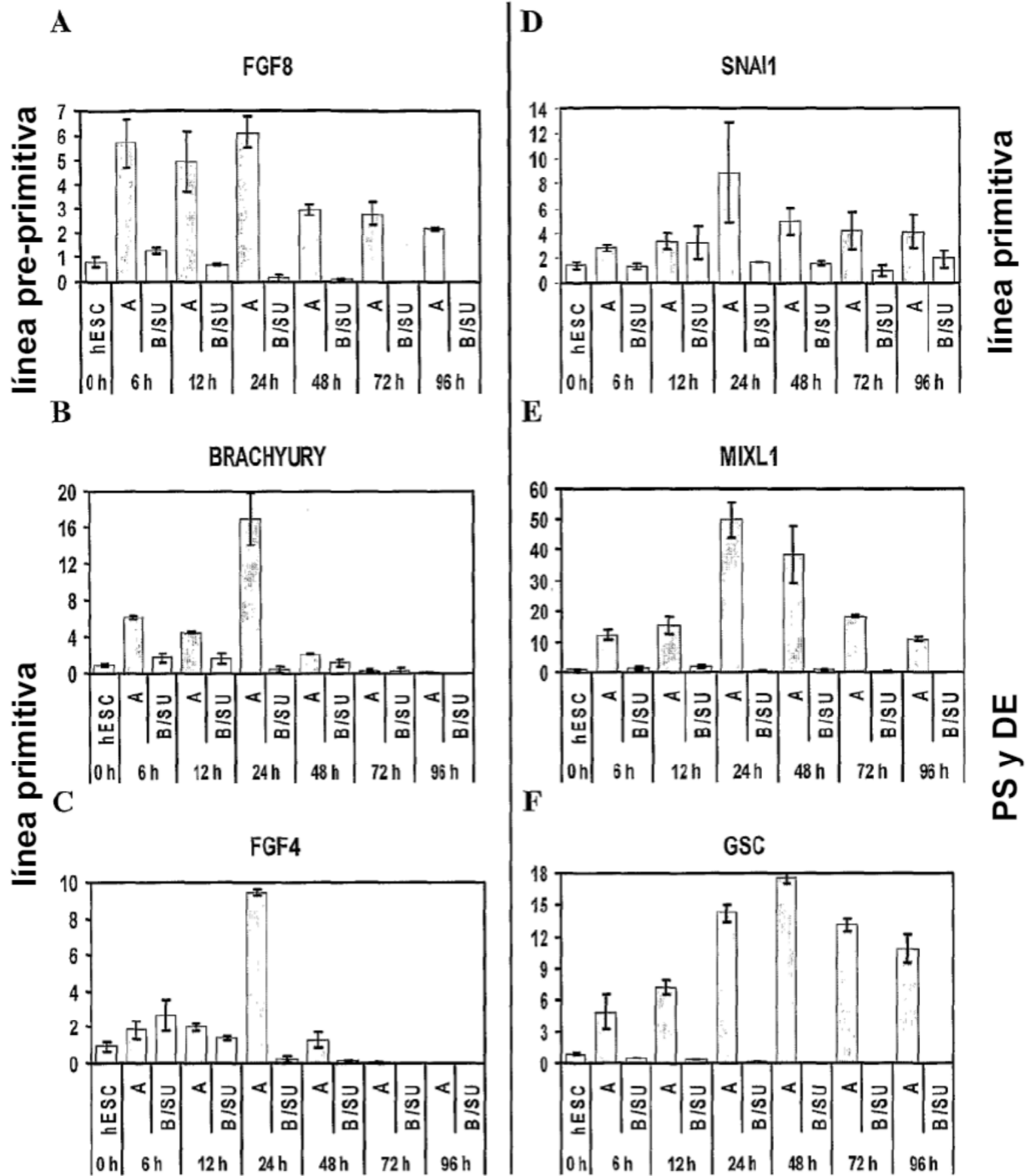


Figura 3

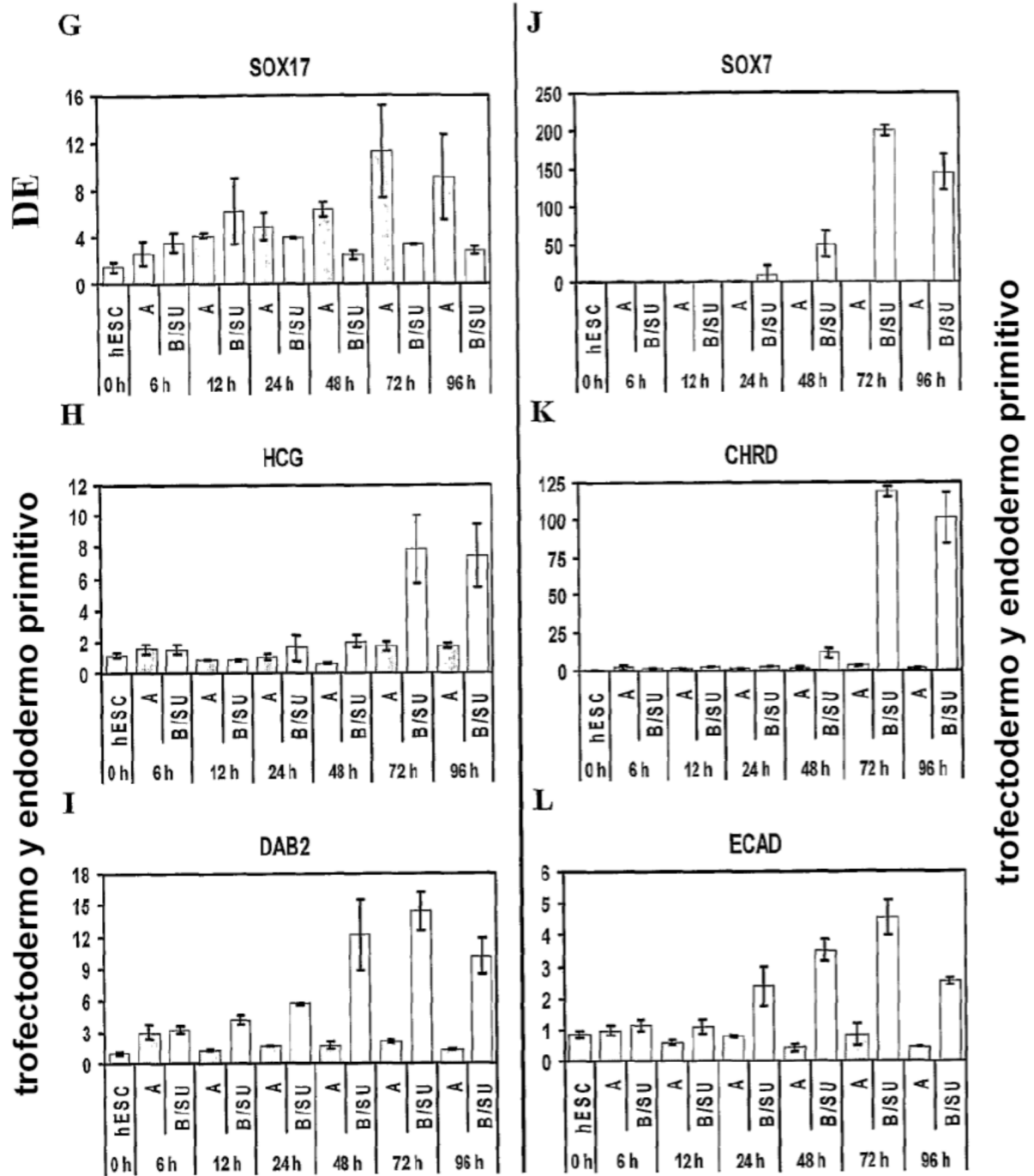
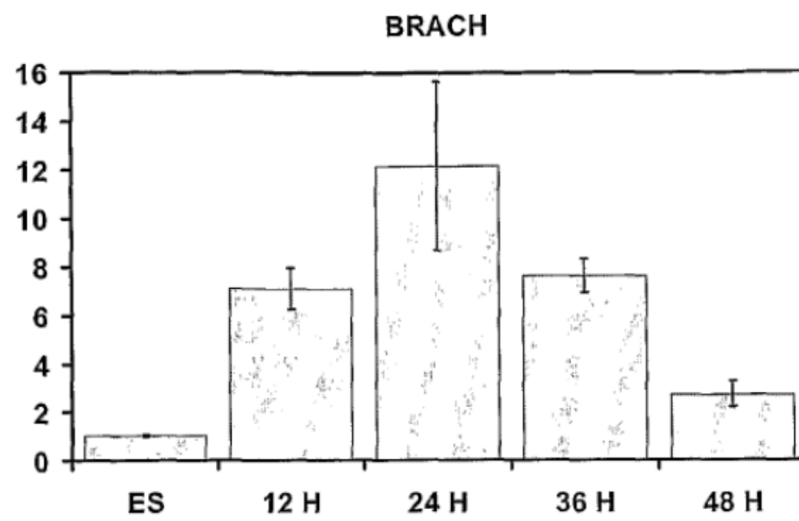
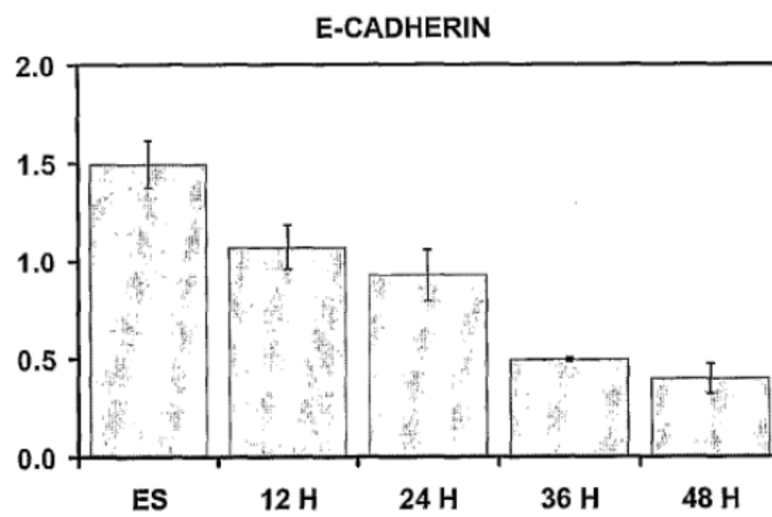


Figura 3

A



B



C

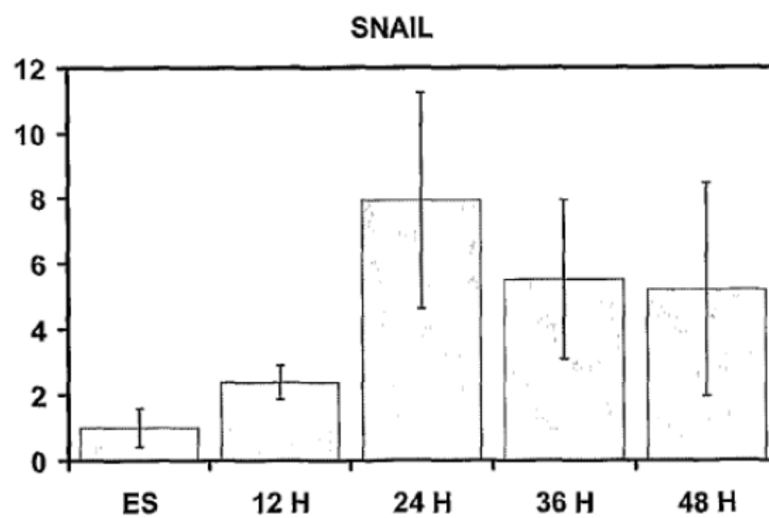
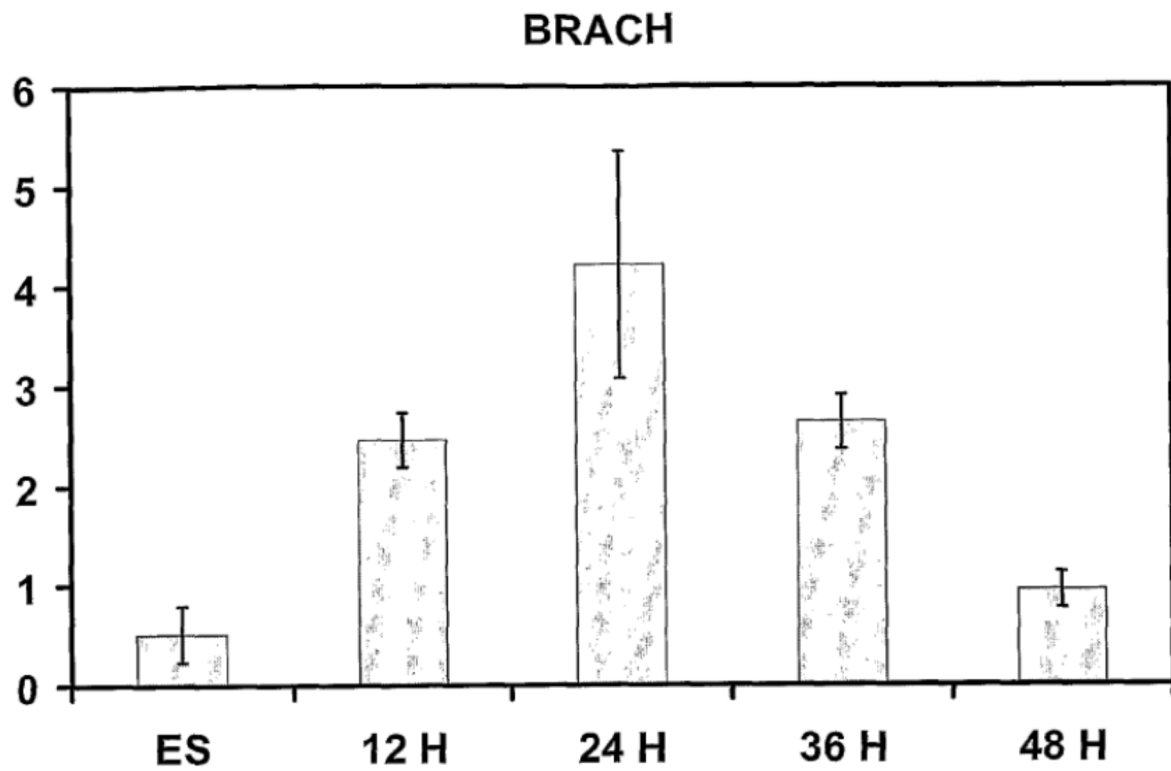


Figura 4

A



B

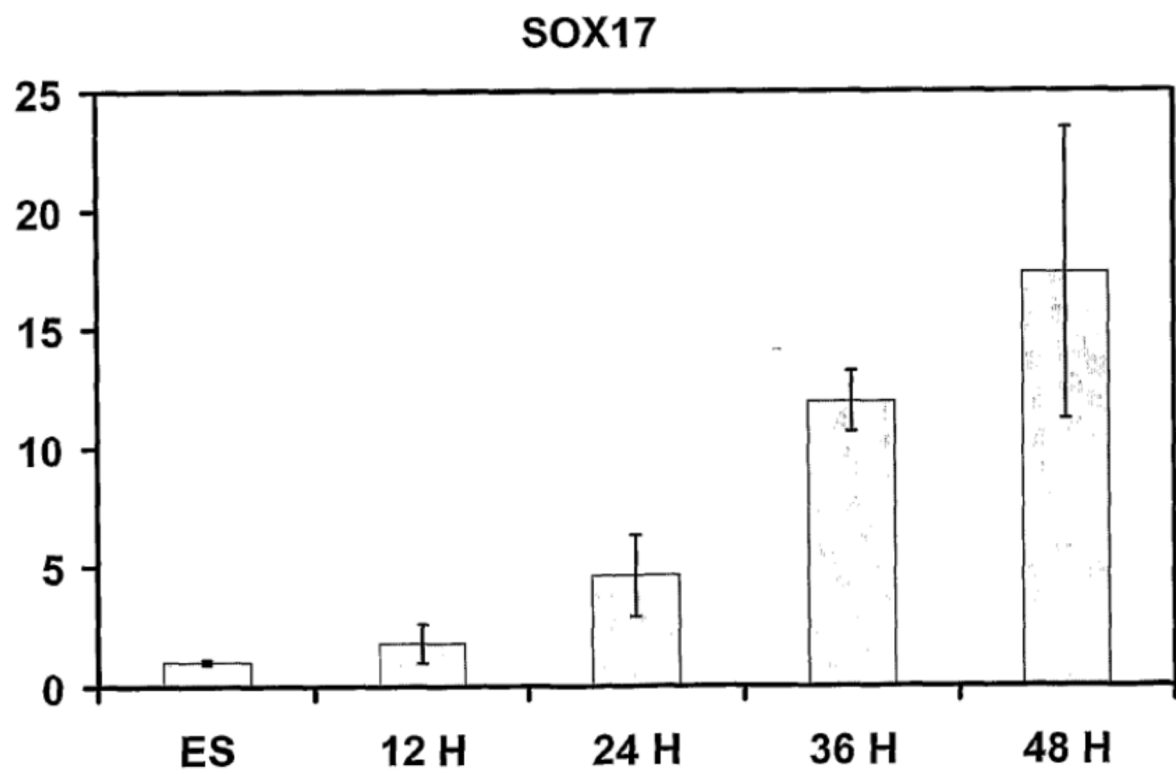


Figura 5

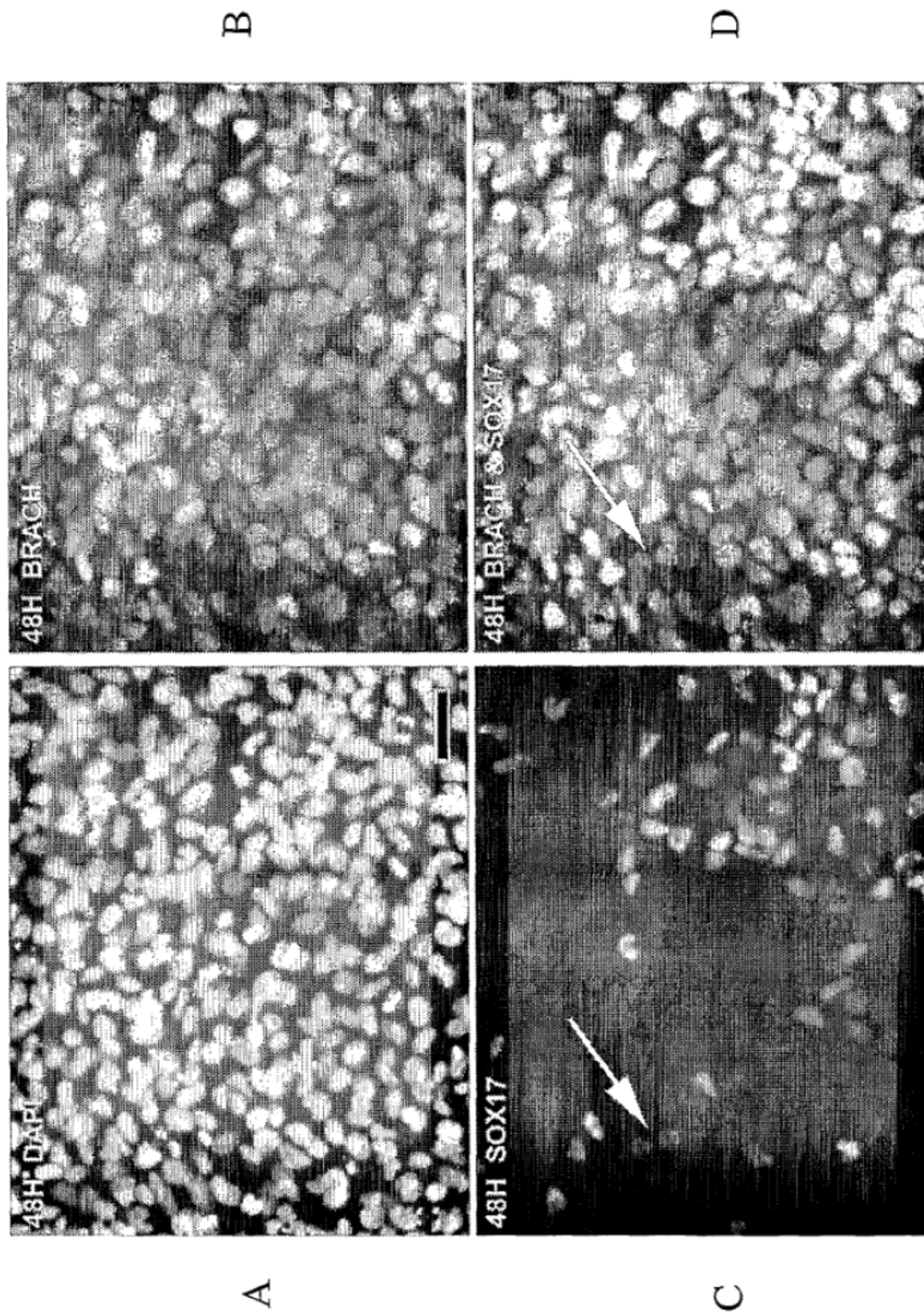


Figura 6

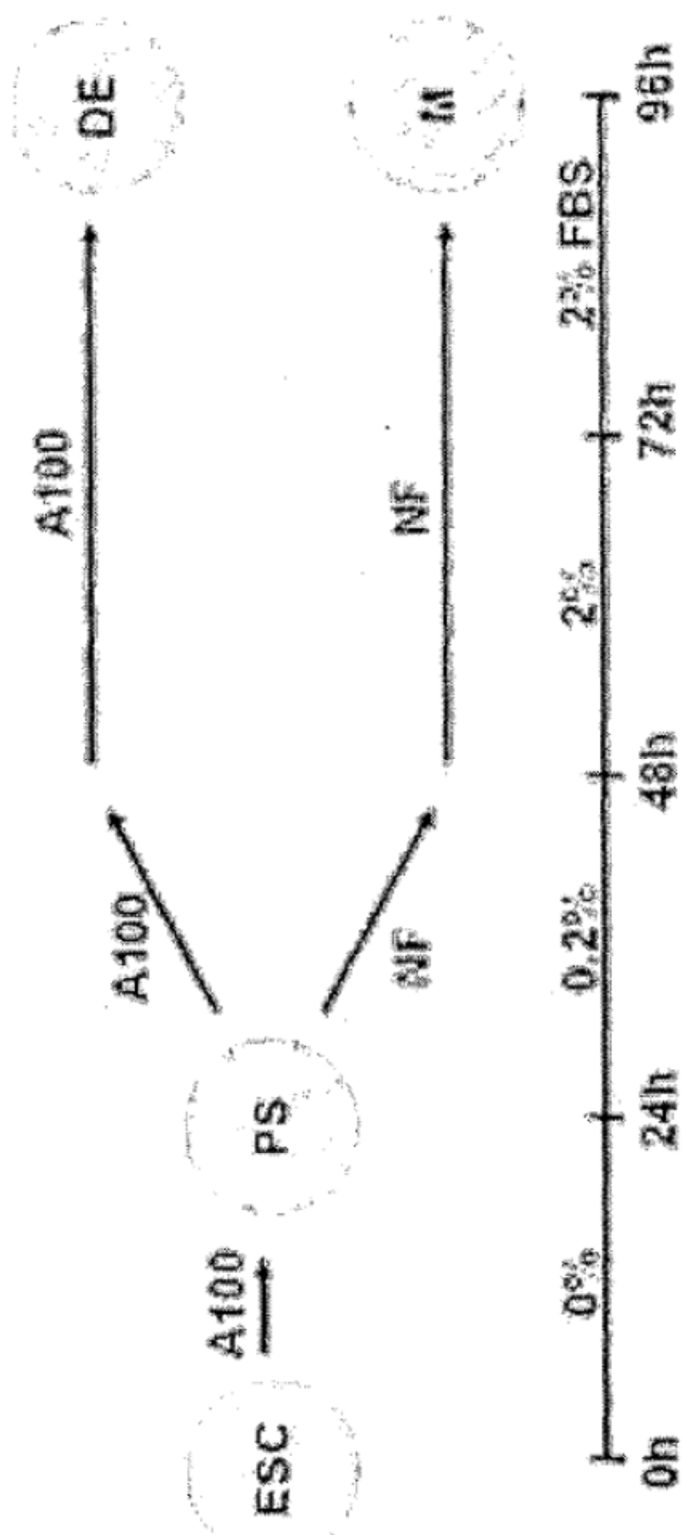


Figura 7

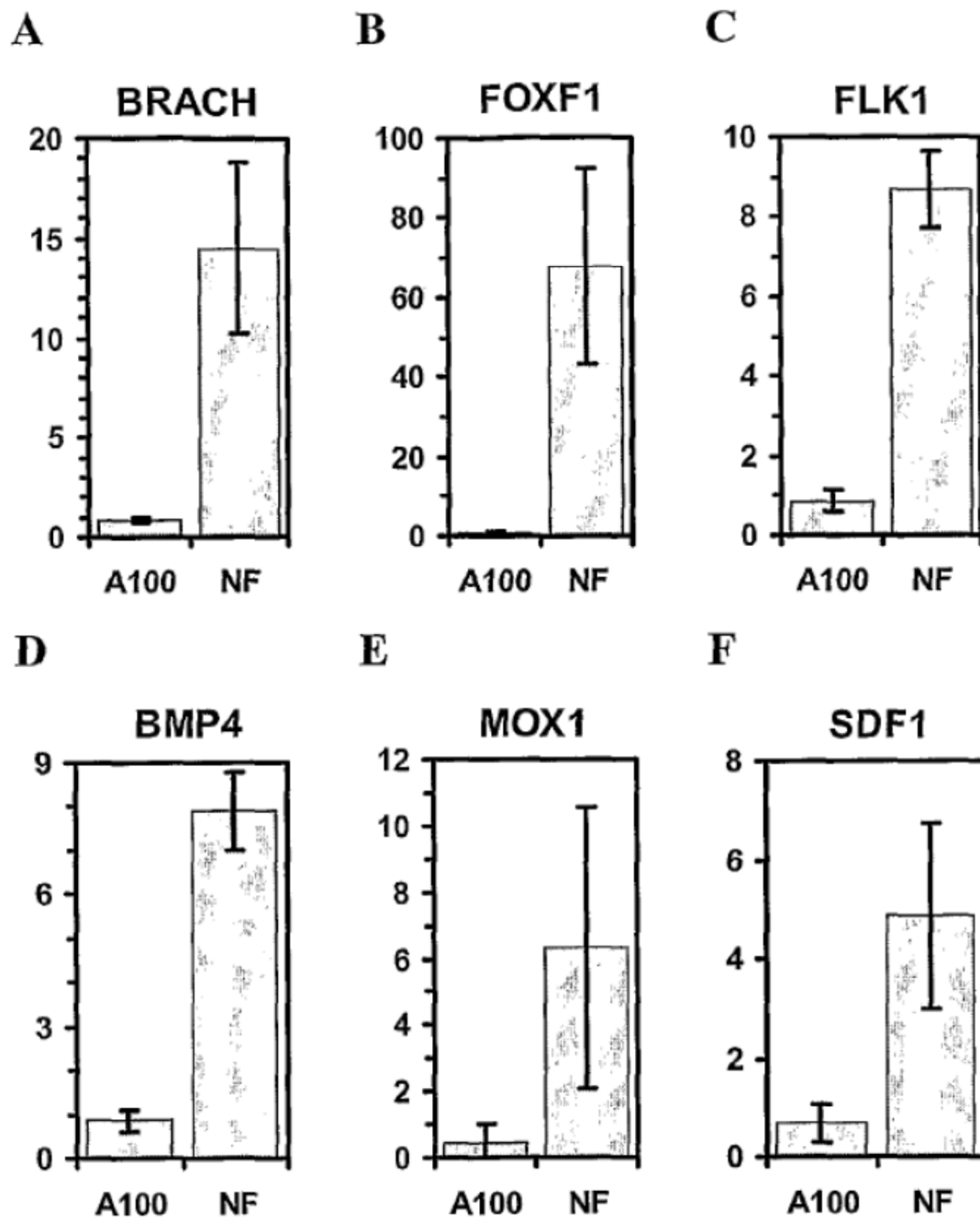


Figura 8

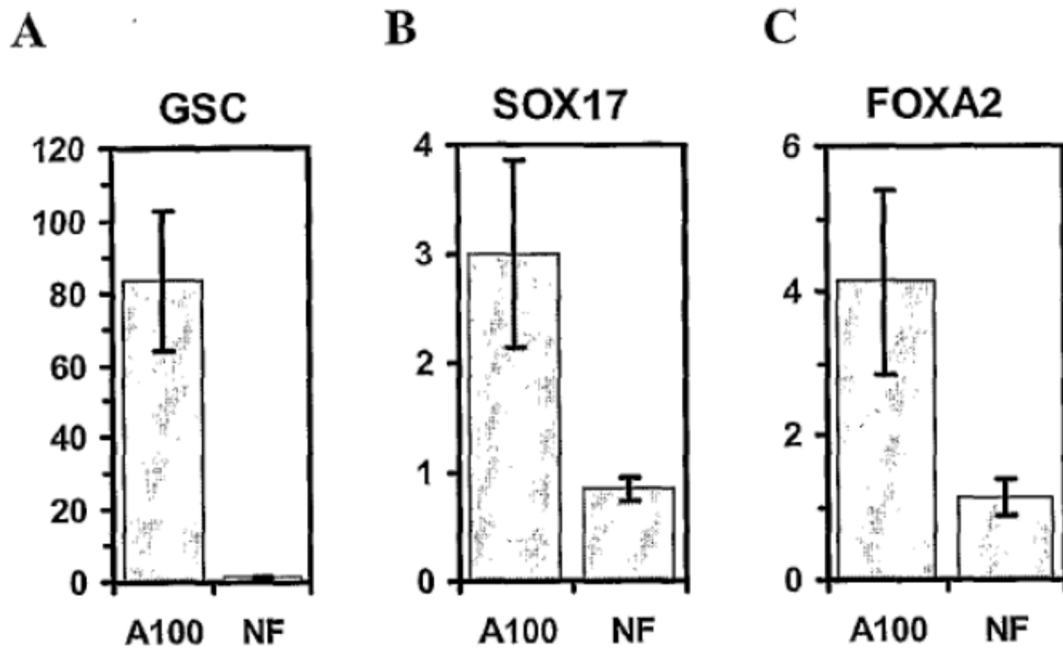


Figura 9

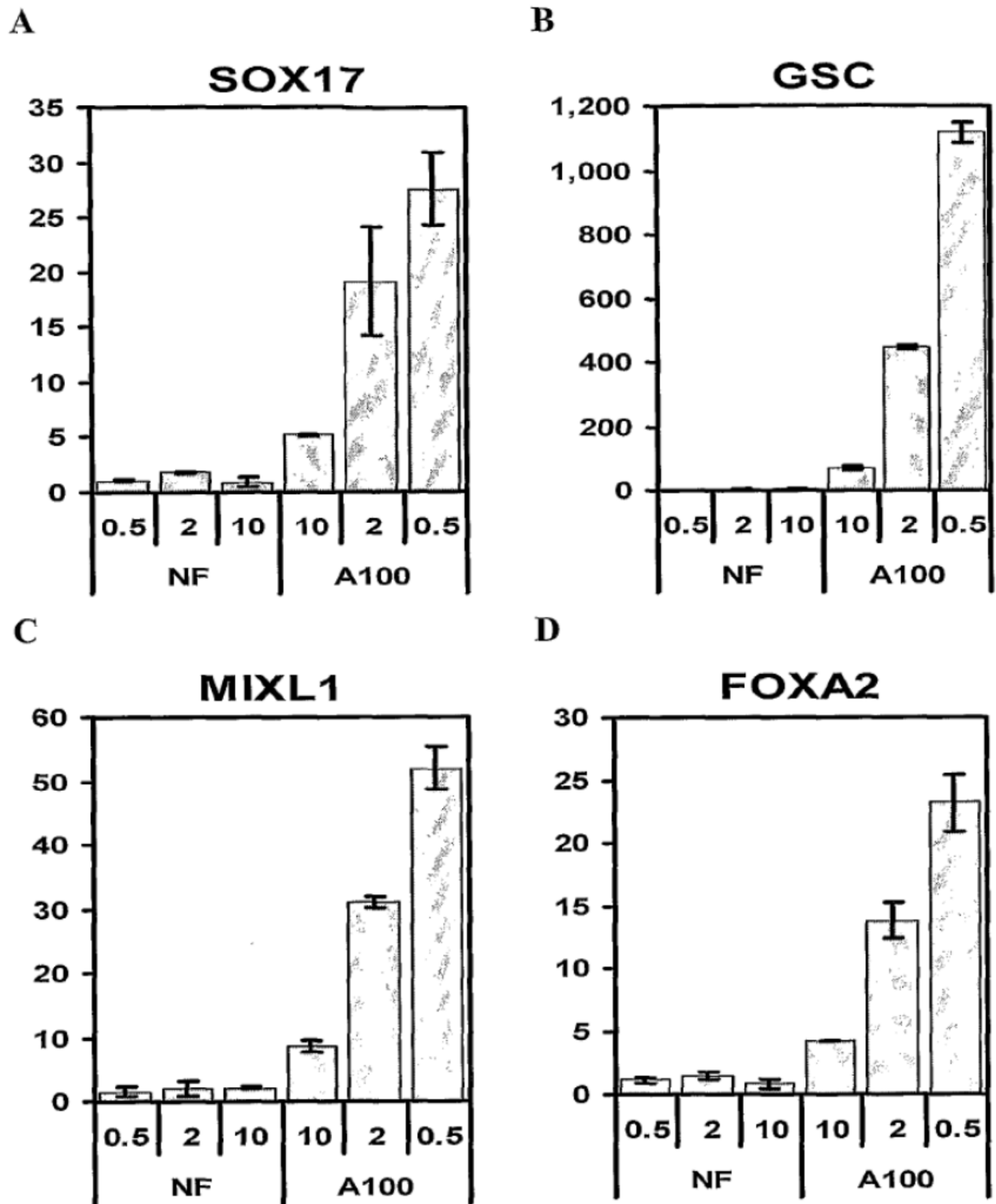


Figura 10

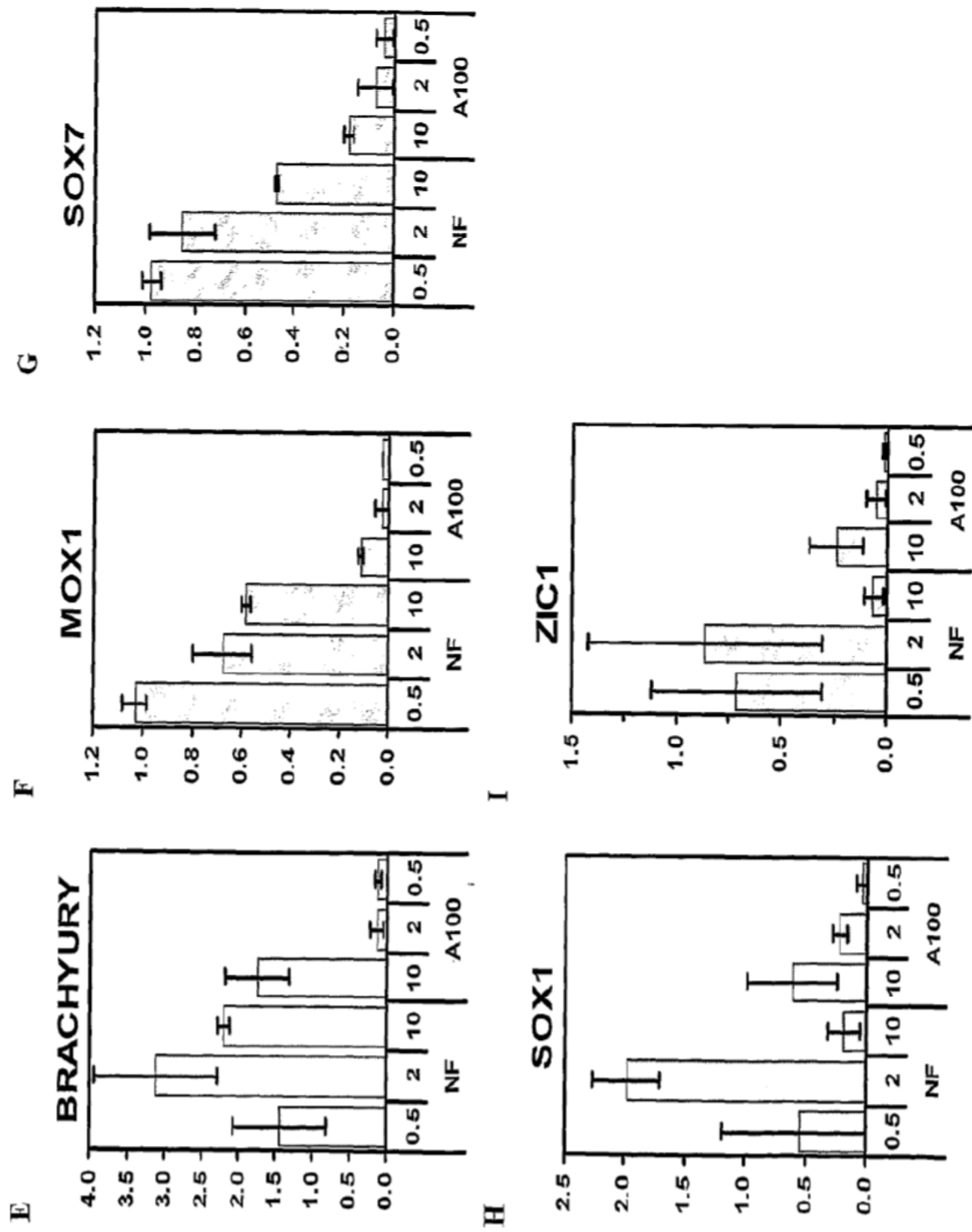


Figure 10

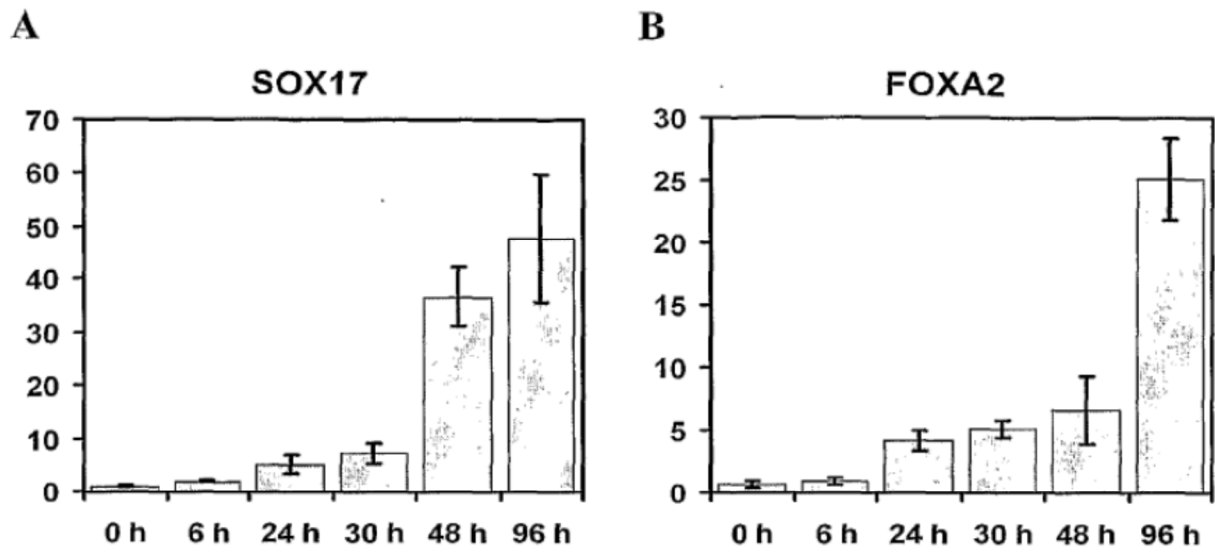


Figura 11

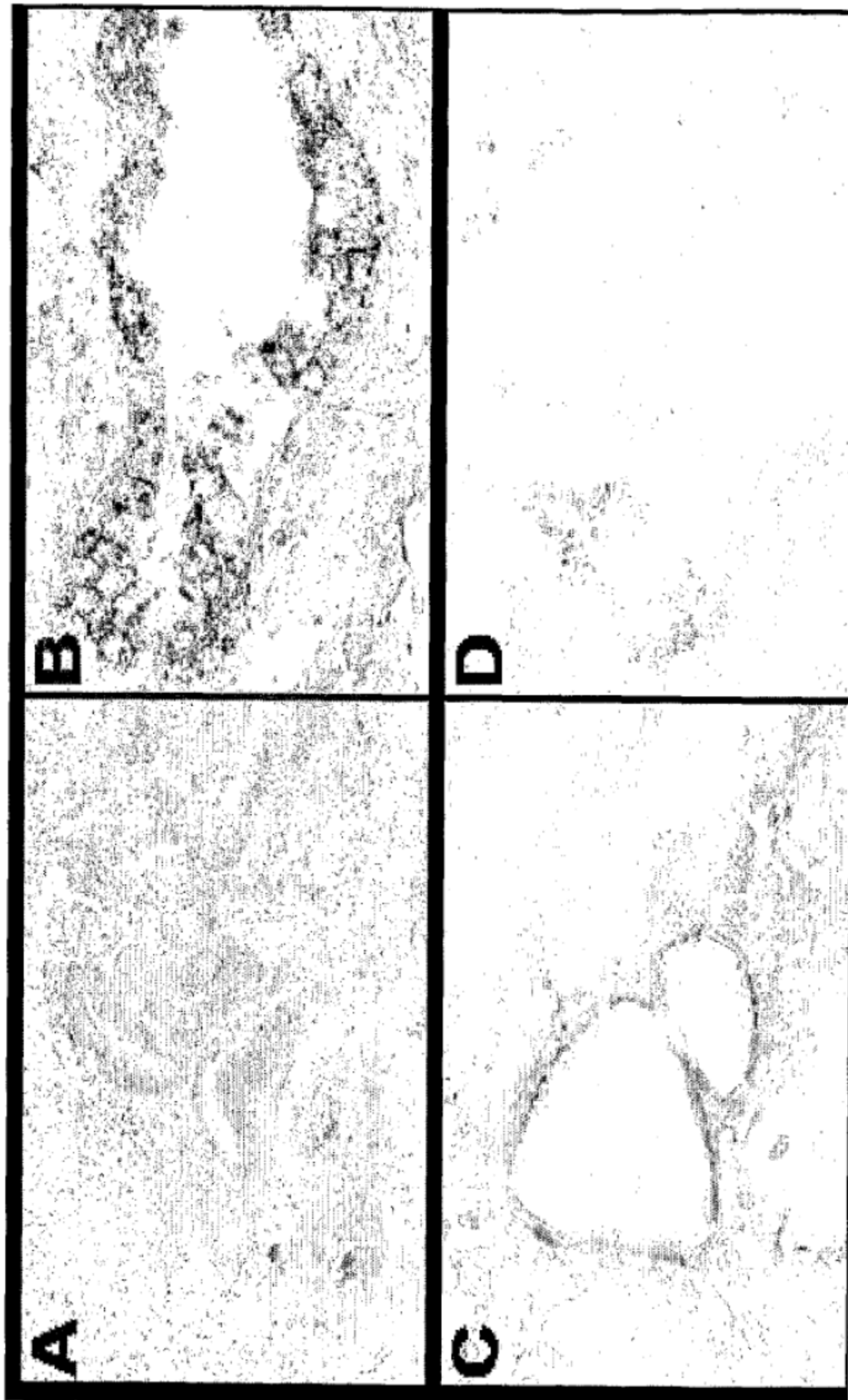


Figure 12