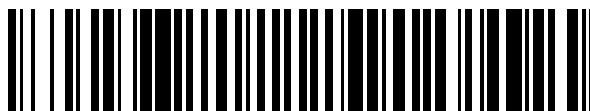


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 001**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2005** **E 10012385 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 2377922**

54 Título: **Endodermo que expresa pdx1**

30 Prioridad:

27.04.2004 US 566293 P

09.07.2004 US 586566 P

14.07.2004 US 587942 P

23.12.2004 US 21618

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

07.01.2021

73 Titular/es:

VIACYTE, INC. (100.0%)

3550 General Atomics Court Building No 2-503

San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

D'AMOUR, KEVIN ALLEN;

AGULNICK, ALAN D.;

ELIAZER, SUSAN y

BAETGE, EMMANUEL E.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 801 001 T3

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

DESCRIPCIÓN

Endodermo que expresa pdx1

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la biología celular. En particular, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden células de endodermo de mamífero PDX1-positivas y a métodos para fabricar, aislar y usar tales células.

Antecedentes

10 Las células madre pluripotentes humanas, como las células madre embrionarias (ES) y las células germinales embrionarias (EG), se aislaron por primera vez en cultivo sin alimentadores de fibroblastos en 1994 (Bongso et al., 1994) y con alimentadores de fibroblastos (Hogan, 1997). Más tarde, Thomson, Reubinoff y Shambloott establecieron cultivos continuos de células ES y EG humanas utilizando capas alimentadoras de ratones inactivadas mitóticamente (Reubinoff et al., 2000; Shambloott et al., 1998; Thomson et al., 1998).

15 Anteriormente, se describió un proceso para producir cuerpos embrioides humanos y se evaluaron los efectos de ocho factores de crecimiento en la diferenciación de células derivadas de células madre embrionarias humanas; Schuldiner y col., PNAS 97 (21): 11307-11312.

20 Las células ES y EG humanas (hESCs) ofrecen oportunidades únicas para investigar las primeras etapas del desarrollo humano, así como para la intervención terapéutica en varios estados de enfermedad, como la diabetes mellitus y la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, el uso de células β productoras de insulina derivadas de hESCs ofrecería una gran mejora con respecto a los procedimientos actuales de terapia celular que utilizan células del páncreas de donantes para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, actualmente no se sabe cómo generar una célula β productora de insulina a partir de hESCs. Como tal, los tratamientos actuales de terapia celular para la diabetes mellitus, que utilizan células de islotes pancreáticos de donantes, están limitados por la escasez de células de islote de alta calidad necesarias para el trasplante. La terapia celular para un solo paciente con diabetes tipo I requiere un trasplante de aproximadamente 8×10^8 células de islotes pancreáticos. (Shapiro et al., 2000; Shapiro et al., 2001a; Shapiro et al., 2001b). Como tal, se requieren al menos dos órganos donantes sanos para obtener suficientes células de islotes para un trasplante exitoso. Las células madre embrionarias humanas ofrecen una fuente de material de partida para desarrollar cantidades sustanciales de células diferenciadas de alta calidad para terapias con células humanas.

30 Dos propiedades que hacen que las hESC sean especialmente adecuadas para las 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 diferenciarse de 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 tejidos extraembrionarios (por ejemplo, placenta) y células germinales. Aunque la pluripotencia imparte una utilidad extraordinaria a 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 de células que pueden surgir al diferenciar los cultivos de hESC, la gran mayoría de los tipos de células se producen con muy baja eficiencia. Además, el éxito en la evaluación de la producción de cualquier tipo de célula depende críticamente de la definición de marcadores apropiados. Lograr una diferenciación eficiente y dirigida es de gran importancia para la aplicación terapéutica de hESCs.

40 Para utilizar hESCs como material de partida para generar células que son útiles en aplicaciones de terapia celular, sería ventajoso superar los problemas anteriores. Por ejemplo, para alcanzar el nivel de material celular requerido para la terapia de trasplante de células de los islotes, sería ventajoso dirigir eficientemente las hESC hacia el linaje de los islotes pancreáticos / células β en las primeras etapas de diferenciación.

45 Además de la dirección eficiente del proceso de diferenciación, también sería beneficioso aislar y caracterizar tipos de células intermedias a lo largo de la ruta de diferenciación hacia el linaje de los islotes pancreáticos/células β y usar tales células como precursores de linaje apropiados para pasos adicionales en la diferenciación.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones según se caracterizan en las reivindicaciones. Por lo tanto, se relaciona con los siguientes elementos:

50 1. Un método para producir una población celular que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1, dicho método comprende los pasos de:

cultivar una población de células humanas pluripotentes en presencia de activina A exógena; y continuar cultivando la población celular en presencia de ácido retinoico produciendo así una población de células que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1, en donde dichas células de endodermo positivas para PDX1 son células

multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo digestivo.

2. El método del ítem 1, en donde la activina A exógena se elimina de la población celular antes de cultivar la población celular en presencia de un retinoide.

5 3. Un cultivo celular que comprende células humanas de endodermo definitivas negativas para PDX1 y activina A, que comprende además células humanas de endodermo positivas para PDX1, en el que dichas células humanas de endodermo positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo digestivo.

4. El cultivo celular según el punto 3, que comprende además ácido retinoico.

10 5. El método o cultivo celular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1, 2 o 4, en el que dichas células humanas de endodermo positivo para PDX1 son células humanas de endodermo del intestino anterior positivas para PDX1.

6. El método o cultivo celular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1, 2, 4 a 5, en el que dicha población celular que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1 comprende al menos 5%, al menos 10%, al menos 25% o al menos 50 % de células humanas de endodermo positivas para PDX1.

15 7. El cultivo celular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 3 a 6, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en al menos 2% de las células humanas, según lo determinado por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa.

20 8. El cultivo celular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1, 2 o 6, en el que dicha población celular que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1 comprende además células alimentadoras humanas, en donde al menos el 2% de las células humanas distintas de dichas células alimentadoras humanas son PDX1-células positivas.

25 9. El cultivo celular según cualquiera de los puntos 3 a 8, en el que dicha población celular comprende además células seleccionadas del grupo que consiste en células endodérmicas viscerales, células endodérmicas parietales, células neurales y una combinación de dichas células en una cantidad inferior al 5% del número total de células presentes en la población celular.

10. El cultivo celular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 3 a 9, en el que dicha población celular comprende además un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en FGF-10, FGF-4, activina B.

30 11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 2 o 5 a 8, que comprende además proporcionar activina B a dichas células humanas pluripotentes.

12. El método del ítem 1, en el que al menos una célula de dicha población de células pluripotentes comprende al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control del promotor PDX1, dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) o un fragmento del mismo biológicamente activo.

35 También se describen composiciones que comprenden células de endodermo que expresan PDX1 (PDX1-positivas). También se describen métodos para producir las mismas. Las realizaciones adicionales se refieren a poblaciones celulares enriquecidas en endodermo PDX1-positivo. También se describen métodos para la producción de tales poblaciones celulares. También se describen métodos para aumentar la expresión de PDX1 en células de endodermo, así como identificar factores útiles para diferenciar aún más el endodermo PDX1 negativo y/o PDX1-positivo. Como se describe en el presente documento, en las composiciones y métodos descritos a lo largo de esta descripción, las células PDX1-positivas del endodermo pueden ser células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior/medio. Como se describe en el presente documento, en las composiciones y métodos descritos a lo largo de esta descripción, las células PDX1-positivas del endodermo pueden ser células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo pueden ser células PDX1-positivas del endodermo de la porción posterior del intestino anterior.

45 También se describen a cultivos celulares que comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, en donde las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo intestinal. En algunas realizaciones, los cultivos celulares comprenden células humanas. En tales cultivos de células humanas, el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo puede comprender al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10% o al menos aproximadamente 25% de las células humanas en el cultivo. En algunas realizaciones, el al menos aproximadamente el 2%, el al menos aproximadamente el 5%, el al menos aproximadamente el 10% o el al menos aproximadamente el 25% se calcula sin tener en cuenta las células alimentadoras presentes en dicho cultivo. Las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior de los cultivos celulares descritos en el presente documento pueden expresar un marcador seleccionado del grupo que consiste en el gen homeobox A13 (HOXA13), el gen homeobox C6 (ROXC6) y SOX17. Los cultivos de células que

comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden estar sustancialmente libres de células de endodermo visceral, células de endodermo parietal y/o células neurales. En algunas realizaciones, los cultivos celulares comprenden además uno de más de los siguientes: un compuesto retinoide, tal como ácido retinoico (AR), FGF-10 o B27.

5 también se describen poblaciones de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, enriquecidas, aisladas o sustancialmente purificadas, en donde las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo intestinal. Se revela que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior se derivan de células pluripotentes, como las células madre embrionarias humanas.

10 También se describe una población celular que comprende células, en donde al menos aproximadamente el 90% de las células son células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, y en donde las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo intestinal. Como se describe aquí, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior comprenden al menos aproximadamente el 95% de las células en la población celular. En
15 realizaciones aún más preferidas, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior comprenden al menos aproximadamente el 98% de las células en la población celular.

También se describen métodos para producir células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior proporcionando un cultivo celular o una población celular que comprende células de endodermo definitivas que no expresan sustancialmente PDX1 (células de endodermo PDX1-negativas definitivas) con un factor de diferenciación del intestino anterior, como un retinoide. El retinoide, por ejemplo, AR, se puede suministrar en una concentración que
20 varía de aproximadamente 0,01 μ M a aproximadamente 50 μ M. Se revela que la diferenciación del endodermo PDX1 negativo definitivo a endodermo PDX1 positivo del intestino anterior aumenta al proporcionar el cultivo celular o la población celular con FGF-10 y/o B27. FGF-10 puede suministrarse en una concentración que varía de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. Se describe que B27 se suministra al cultivo celular o
25 población celular a una concentración que varía de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 20%. FGF-10 y/o B27 se pueden agregar al cultivo celular o la población celular aproximadamente al mismo tiempo que el retinoide o cada uno de los factores se puede agregar por separado con hasta varias horas entre cada adición. Se describe que el retinoide se agrega a un cultivo de endodermo definitivo PDX1 negativo de aproximadamente 4 días de antigüedad. Se describe que el retinoide se agrega a un cultivo de endodermo definitivo PDX1 negativo de aproximadamente 5
30 días de antigüedad.

También se describen métodos para usar un factor de diferenciación del intestino anterior para aumentar aún más la producción de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior en un cultivo celular o población celular que se ha puesto en contacto con un retinoide, como el AR. Se divulga que la diferenciación del endodermo definitivo PDX1-negativo a endodermo PDX1-positivo aumenta al proporcionar al cultivo celular o población celular
35 con activina A y/o activina B. La activina A y/o activina B pueden suministrarse en una concentración que varía de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. Otras realizaciones se refieren a métodos para aumentar la producción de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior en un cultivo celular o población celular mediante la diferenciación de células PDX1-negativas en un medio que comprende un retinoide, en el que el medio ha sido previamente condicionado por el mantenimiento o crecimiento de ciertos tipos de células. Tales tipos de células
40 incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias u otras células pluripotentes que se han diferenciado en un medio que comprende suero o miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β , como activina A, activina B, nodal y/o proteína morfogénica ósea (BMP). Se describe que el medio acondicionado se suministra al cultivo celular o población celular a una concentración que varía de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% del medio de crecimiento completo. Los factores de crecimiento de la superfamilia TGF β y/o el medio acondicionado se pueden
45 agregar al cultivo celular o la población celular aproximadamente al mismo tiempo que el retinoide o cada uno de los factores se puede agregar por separado con hasta varias horas entre cada adición.

También se describen métodos para producir una población celular enriquecida en células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. Se describe que estos métodos comprenden la etapa de obtener una población de células pluripotentes, en donde al menos una célula de la población de células pluripotentes comprende al menos una
50 copia de un ácido nucleico que está bajo el control del promotor PDX1. Se describe que el ácido nucleico comprende una secuencia que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) o un fragmento biológicamente activo de la misma. Se describe que los pasos adicionales del método incluyen, diferenciar las células pluripotentes para producir células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, en donde las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción
55 anterior del tubo intestinal y la separación de las células PDX1-positivas de las células PDX1-negativas. Se describe que en los métodos descritos en el presente documento, la etapa de diferenciación comprende además proporcionar a la población de células pluripotentes al menos un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de las células pluripotentes en células de endodermo definitivas PDX1-negativas, y proporcionar las células de endodermo definitivas PDX1-negativas con un factor de diferenciación del
60 intestino anterior en una cantidad suficiente para promover la diferenciación de las células de endodermo definitivas PDX1-negativas en células de endodermo PDX1-positivas del intestino anterior.

También se describe un método para aumentar la expresión del producto del gen PDX1 en células de endodermo definitivas que expresan SOX17 (positivas para SOX17) poniendo en contacto dichas células con un factor de diferenciación en una cantidad que sea suficiente para aumentar la expresión del producto del gen PDX1. Se revela que el factor de diferenciación se selecciona del grupo que consiste en AR, FGF-10 y B27.

- 5 También se describe un método para identificar un factor de diferenciación capaz de promover la diferenciación de células de endodermo definitivas PDX1-negativas a células de endodermo intestinal anterior PDX1-positivas. En tales métodos, las células de endodermo definitivas PDX1-negativas se ponen en contacto con un factor de diferenciación candidato y se determina si la expresión de PDX1 en la población celular después del contacto con el factor de diferenciación candidato ha aumentado en comparación con la expresión de PDX1 en la población celular antes del
10 contacto con el factor de diferenciación del candidato. Un aumento en la expresión de PDX1 en la población celular indica que el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células de endodermo definitivas PDX1-negativas a las células de endodermo intestinal positivo para PDX1. En algunas realizaciones, la expresión de PDX1 se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR). Se describe que el método anterior comprende además la etapa de determinar la expresión del gen HOXA13 y/o el gen HOXC6
15 en la población celular antes y después del contacto con el factor de diferenciación candidato. Se describe que el factor de diferenciación candidato es una molécula pequeña, por ejemplo, un retinoide, como el AR. Se describe que el factor de diferenciación candidato es un polipéptido, por ejemplo, un factor de crecimiento, tal como FGF-10.

- También se describe un método para identificar un factor de diferenciación capaz de promover la diferenciación de las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. En tales métodos, las células PDX1-positivas del
20 endodermo del intestino anterior se ponen en contacto con un factor de diferenciación candidato y se determina si la expresión de un marcador en la población aumenta o disminuye después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión del mismo marcador en la población antes del contacto con el factor de diferenciación candidato. Un aumento o disminución en la expresión del marcador indica que el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior.
25 En algunas realizaciones, la expresión del marcador se determina por Q-PCR. Se revela que el factor de diferenciación candidato es una molécula pequeña, por ejemplo, un retinoide, como el AR. En otros, el factor de diferenciación candidato es un polipéptido, por ejemplo, un factor de crecimiento, como el FGF-10.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende representar un lenguaje "abierto" que permite la inclusión de cualquier elemento adicional.

- 30 También se divulga lo siguiente con referencia a la Publicación No. US20050158853, titulado ENDODERM DEFINITIVO, presentado el 23 de diciembre de 2004; y número de publicación US20050266554, titulada PDX1 EXPRESSING ENDODERM, presentada el 26 de abril de 2005.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La Figura 1 es un esquema de una vía de diferenciación propuesta para la producción de células beta a partir de hESCs. El primer paso en la vía compromete a la célula ES con el linaje del endodermo definitivo y también representa el primer paso antes de los eventos de diferenciación adicionales para el endodermo pancreático, el endodermo endocrino o las células de los islotes/beta. El segundo paso en la ruta muestra la conversión del endodermo definitivo SOX17-positivo /PDX1-negativo en endodermo intestinal positivo para PDX1. Algunos factores útiles para mediar estas transiciones están en cursiva. Los marcadores relevantes para definir las celdas objetivo están subrayados.

- 40 La Figura 2 es un diagrama del cDNA de SOX17 humano que muestra las posiciones de los motivos conservados y resalta la región utilizada para el procedimiento de inmunización por GENOVAC.

La Figura 3 es un dendrograma relacional que ilustra que SOX17 está más estrechamente relacionado con SOX7 y algo menos con SOX18. Las proteínas SOX17 están más estrechamente relacionadas entre los homólogos de especies que con otros miembros de la subfamilia del grupo F de SOX dentro de la misma especie.

- 45 La Figura 4 es una transferencia Western sondeada con el anticuerpo anti-SOX17 de rata. Esta transferencia demuestra la especificidad de este anticuerpo para la proteína SOX17 humana sobreexpresada en fibroblastos (carril 1) y una falta de inmunoreactividad con EGFP (carril 2) o el miembro de la familia SOX más estrechamente relacionado, SOX7 (carril 3).

- 50 Las Figuras 5A-B son micrografías que muestran un grupo de células SOX17⁺ que muestran un número significativo de células AFP⁺ co-marcadas (A). Esto está en marcado contraste con otros SOX17⁺ grupos (B) donde pocas o ningunas células AFP⁺ se observan.

- Las Figuras 6A-C son micrografías que muestran endodermo parietal y SOX17. El panel A muestra la inmunocitoquímica para la proteína Trombomodulina (TM) humana localizada en la superficie celular de las células de endodermo parietal en cultivos de células hES diferenciados al azar. El panel B es el campo idéntico que se muestra
55 en A con doble etiqueta para TM y SOX17. El panel C es la imagen de contraste de fase del mismo campo con núcleos marcados con DAPI. Tenga en cuenta la correlación completa de los núcleos marcados con DAPI y el marcado SOX17.

- 5 Las Figuras 7A-B son gráficos de barras que muestran la expresión del gen SOX17 por PCR cuantitativa (Q-PCR) y células positivas anti-SOX17 por anticuerpo específico de SOX17. El panel A muestra que la activina A aumenta la expresión del gen SOX17 mientras que el ácido retinoico (AR) suprime fuertemente la expresión de SOX17 en relación con los medios de control no diferenciados (SR20). El panel B muestra el patrón idéntico, así como una magnitud similar de estos cambios se refleja en el número de células SOX17⁺, lo que indica que la medición de Q-PCR de la expresión del gen SOX17 refleja mucho los cambios a nivel de células individuales.
- 10 La Figura 8A es un gráfico de barras que muestra que un cultivo de diferenciación de hESC en presencia de activina A mantiene un bajo nivel de expresión del gen AFP, mientras que las células que se diferencian aleatoriamente en suero bovino fetal al 10% (FBS) exhiben una fuerte regulación positiva de AFP. La diferencia en los niveles de expresión es de aproximadamente 7 veces.
- 15 Las Figuras 8B-C son imágenes de dos micrografías que muestran que la supresión de la expresión de AFP por la activina A también es evidente a nivel de células individuales como lo indican los grupos muy raros y pequeños de AFP⁺ células observadas en condiciones de tratamiento con activina A (abajo) en relación con 10% de FBS solo (arriba).
- 20 Las Figuras 9A-B son imágenes comparativas que muestran la cuantificación del número de células AFP⁺ mediante citometría de flujo. Esta figura demuestra que la magnitud del cambio en la expresión del gen AFP (Figura 8A) en presencia (panel derecho) y ausencia (panel izquierdo) de activina A corresponde exactamente al número de células AFP⁺, apoyando aún más la utilidad de los análisis Q-PCR para indicar los cambios que ocurren a nivel de células individuales.
- 25 Las Figuras 10A-F son micrografías que muestran que la exposición de hESCs a nodal, activina A y activina B (NAA) produce un notable aumento en el número de células SOX17⁺ durante el período de 5 días (A-C). Al comparar con la abundancia relativa de células SOX17⁺ al número total de células presentes en cada campo, como lo indican los núcleos teñidos con DAPI (D-F), se puede ver que aproximadamente el 30-50% de todas las células son inmunorreactivas para SOX17 después de cinco días de tratamiento con NAA.
- 30 La Figura 11 es un gráfico de barras que demuestra que la activina A (0, 10, 30 o 100 ng/ml) aumenta de forma dependiente de la dosis la expresión del gen SOX17 en la diferenciación de hESC. La expresión aumentada ya es robusta después de 3 días de tratamiento en cultivos adherentes y continúa durante los siguientes 1, 3 y 5 días de cultivo en suspensión.
- 35 Las Figuras 12A-C son gráficos de barras que demuestran el efecto de la activina A en la expresión de MIXL1 (panel A), GATA4 (panel B) y HNF3b (panel C). También se observan aumentos dependientes de la dosis de activina A para otros tres marcadores de endodermo definitivo; MIXL1, GATA4 y HNF3b. Las magnitudes del aumento de la expresión en respuesta a la dosis de activina son sorprendentemente similares a las observadas para SOX17, lo que indica que activina A está especificando una población de células que coexpresan los cuatro genes (SOX17⁺, MIXL1⁺, GATA4⁺ y HNF3b⁺).
- 40 Las Figuras 13A-C son gráficos de barras que demuestran el efecto de la activina A en la expresión de AFP (panel A), SOX7 (panel B) y SPARC (panel C). Hay una disminución de la activina A dependiente de la dosis en la expresión del marcador de endodermo visceral AFP. Los marcadores de endodermo primitivo (SOX7) y endodermo parietal (SPARC) permanecen sin cambios o muestran supresión en algunos puntos de tiempo, lo que indica que la activina A no actúa para especificar estos tipos de células de endodermo extraembrionario. Esto respalda aún más el hecho de que el aumento de la expresión de SOX17, MIXL1, GATA4 y HNF3b se debe a un aumento en el número de células de endodermo definitivas en respuesta a la activina A.
- 45 Las Figuras 14A-B son gráficos de barras que muestran el efecto de la activina A en ZIC1 (panel A) y la expresión de Brachyury (panel B). La expresión consistente del marcador neural ZIC1 demuestra que no hay un efecto dependiente de la dosis de activina A en la diferenciación neural. Hay una notable supresión de la diferenciación de mesodermo mediada por 100 ng/ml de tratamiento con activina A, como lo indica la disminución de la expresión de brachyury. Este es probablemente el resultado de la mayor especificación del endodermo definitivo de los precursores del mesendodermo. Los niveles más bajos de tratamiento con activina A (10 y 30ng/ml) mantienen la expresión de brachyury en momentos posteriores de diferenciación en relación con los cultivos de control no tratados.
- 50 Las Figuras 15A-B son micrografías que muestran una disminución de la diferenciación del endodermo parietal en respuesta al tratamiento con activinas. Regiones del endodermo parietal TM^{hi} se encuentran a través del cultivo (A) cuando se diferencia en suero solo, mientras que la diferenciación a las células TM⁺ son escasas cuando se incluyen activinas (B) y la intensidad general de la inmunoreactividad TM es menor.
- 55 Las Figuras 16A-D son micrografías que muestran la expresión del marcador en respuesta al tratamiento con activina A y activina B. Las hESCs se trataron durante cuatro días consecutivos con activina A y activina B y se marcaron tres veces con anticuerpos SOX17, AFP y TM. Panel A - SOX17; Panel B - AFP; Panel C - TM; y Panel D - Fase/DAPI. Observe las numerosas células positivas para SOX17 (A) asociadas con la ausencia total de inmunoreactividad AFP (B) y TM (C).

- La Figura 17 es una micrografía que muestra la aparición de endodermo definitivo y endodermo visceral in vitro a partir de hESCs. Las regiones del endodermo visceral se identifican por AFP^{hi} / SOX17^{lo} / - mientras que el endodermo definitivo muestra el perfil opuesto completo, SOX17^{hi} / AFP^{lo} / -. Este campo fue elegido selectivamente debido a la proximidad de estas dos regiones entre sí. Sin embargo, hay numerosas ocasiones en que regiones SOX17^{hi} / AFP^{lo} - se observan en aislamiento absoluto de cualquier región de células AFP^{hi} , lo que sugiere el origen separado de las células de endodermo definitivas de las células de endodermo visceral.
- La Figura 18 es un diagrama que representa la familia de ligandos y receptores TGFβ. Los factores que activan AR Smads y BR Smads son útiles en la producción de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas (ver, J Cell Physiol.187: 265-76).
- La Figura 19 es un gráfico de barras que muestra la inducción de la expresión de SOX17 a lo largo del tiempo como resultado del tratamiento con factores individuales y combinaciones de factores de TGFβ.
- La Figura 20 es un gráfico de barras que muestra el aumento de número de células SOX17⁺ con el tiempo como resultado del tratamiento con combinaciones de factores TGFβ.
- La Figura 21 es un gráfico de barras que muestra la inducción de la expresión de SOX17 a lo largo del tiempo como resultado del tratamiento con combinaciones de factores de TGFβ.
- La Figura 22 es un gráfico de barras que muestra que la activina A induce un aumento dependiente de la dosis en SOX17⁺ numero de celular.
- La Figura 23 es un gráfico de barras que muestra que la adición de Wnt3a a los cultivos tratados con activina A y activina B aumenta la expresión de SOX17 por encima de los niveles inducidos por activina A y activina B sola.
- Las Figuras 24A-C son gráficos de barras que muestran que la diferenciación al endodermo definitivo se mejora en condiciones de bajo FBS. El tratamiento de hESCs con activinas A y B en medios que contienen FBS al 2% (2AA) produce un nivel de expresión de SOX17 2-3 veces mayor en comparación con el mismo tratamiento en medios FBS al 10% (10AA) (panel A). La inducción del marcador de endodermo definitivo MIXL1 (panel B) también se ve afectada de la misma manera y la supresión de AFP (endodermo visceral) (panel C) es mayor en condiciones de 2% de FBS que en 10% de FBS.
- Las Figuras 25A-D son micrografías que muestran células SOX17⁺ se están dividiendo en cultivo. Las células inmunorreactivas SOX17 están presentes en el borde de diferenciación de una colonia hESC (C, D) y están marcadas con antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (panel B) pero no están marcadas conjuntamente con OCT4 (panel C). Además, se pueden ver figuras mitóticas claras mediante el etiquetado DAPI de núcleos en celdas SOX17⁺ (flechas) así como OCT4⁺, hESCs indiferenciados (puntas de flecha) (D).
- La Figura 26 es un gráfico de barras que muestra el nivel de expresión relativa de CXCR4 en la diferenciación de hESC en diversas condiciones de medios.
- Las Figuras 27A-D son gráficos de barras que muestran cómo un panel de marcadores de endodermo definitivo comparte un patrón de expresión muy similar al CXCR4 en los mismos tratamientos de diferenciación que se muestran en la Figura 26.
- Las Figuras 28A-E son gráficos de barras que muestran cómo los marcadores de mesodermo (BRACHYURY, MOX1), ectodermo (SOX1, ZIC1) y endodermo visceral (SOX7) exhiben una relación inversa con la expresión de CXCR4 en los mismos tratamientos que se muestran en la Figura 26.
- Las Figuras 29A-F son micrografías que muestran la diferencia relativa en las células inmunorreactivas de SOX17 en tres de las condiciones de los medios mostradas en las Figuras 26-28.
- Las Figuras 30A-C son gráficos de puntos de citometría de flujo que demuestran el aumento en número de células CXCR4⁺ con concentración creciente de activina A añadida a los medios de diferenciación.
- Las Figuras 31A-D son gráficos de barras que muestran el CXCR4⁺ las células aisladas del tratamiento con dosis altas de activina A (A100-CX +) se enriquecen aún más para los marcadores de endodermo definitivo que la población original (A100).
- La Figura 32 es un gráfico de barras que muestra la expresión génica de CXCR4⁺ y CXCR4⁻ células aisladas usando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), así como la expresión génica en las poblaciones parentales. Esto demuestra que el CXCR4⁺ las células contienen esencialmente toda la expresión del gen CXCR4 presente en cada población parental y el CXCR4⁻ las poblaciones contienen muy poca o ninguna expresión del gen CXCR4.
- Las Figuras 33A-D son gráficos de barras que demuestran el agotamiento del mesodermo (BRACHYURY, MOX1), ectodermo (ZIC1) y expresión del gen del endodermo visceral (SOX7) en las células CXCR4⁺ aisladas del tratamiento con dosis altas de activina A que ya se ha suprimido en la expresión de estos marcadores de endodermo no definitivos.

- Las Figuras 34A-M son gráficos de barras que muestran los patrones de expresión de genes marcadores que pueden usarse para identificar células de endodermo definitivas. El análisis de expresión de marcadores definitivos de endodermo, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 se muestra en los paneles G-L, respectivamente. El análisis de expresión de genes de marcado de linaje previamente descritos, 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 etiquetada hESC indica la expresión génica de células madre embrionarias humanas purificadas; 2NF indica células tratadas con FBS al 2%, sin adición de activina; 0.1A100 indica células tratadas con 0.1% de FBS, 100 ng/ml de activina A; 1A100 indica células tratadas con 1% de FBS, 100 ng/ml de activina A; y 2A100 indica células tratadas con 2% de FBS, 100 ng/ml de activina A.
- La Figura 35 es un gráfico que muestra la expresión relativa del gen PDX1 en un cultivo de hESCs después de 4 días y 6 días con y sin activina en presencia de ácido retinoico (AR) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) agregado el día 4)
- Las Figuras 36A-F son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESCs después de 4 días y 6 días con y sin activina en presencia de ácido retinoico (AR) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) agregado el día 4. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) SOX17; (B) SOX7; (C) AFP; (D) SOX1; (E) ZIC1; y (F) NFM.
- Las Figuras 37A-C son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESCs después de 4 días y 8 días con y sin activina en presencia o ausencia de combinaciones de ácido retinoico (AR), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-4) agregado el día 4. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) SOX7; y (C) NFM.
- Las Figuras 38A-G son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de células de endodermo definitivas en contacto con 50 ng/ml de FGF-10 en combinación con ácido retinoico (AR) 1 μ M, 0.2 μ M o 0.04 μ M agregado en el día 4. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) HOXA3; (C) HOXC6; (D) HOXA13; (E) CDX1; (F) SOX1; y (G) NFM.
- Las Figuras 39A-E son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESCs después de 4 días y 8 días con y sin activina en presencia de combinaciones de ácido retinoico (AR), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) y uno de los siguientes: reemplazo de suero (SR), suero fetal bovino (FBS) o B27. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) SOX7; (C) AFP; (D) ZIC1; y (E) NFM.
- Las Figuras 40A-B son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores para páncreas (PDX1, HNF6) e hígado (HNF6) en un cultivo de hESCs después de 6 días (justo antes de la adición de AR) y a los 9 días (tres días después exposición al AR). Se incluyeron varias condiciones para comparar la adición de activina B a dosis de 10 ng/ml (a10), 25 ng/ml (a25) o 50 ng/ml (a50) en presencia de 25 ng/ml (A25) o 50 ng/ml (A50) activina A. La condición sin activina A o activina B (NF) sirve como control negativo para la producción definitiva de endodermo y endodermo positivo para PDX1. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1 y (B) HNF6.
- Las Figuras 41A-C son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESCs con 100 ng/ml (A100), 50 ng/ml (A50) o sin (NF) activina A a los 5 días (justo antes de la adición de ácido retinoico) y a los 2, 4 y 6 días después de la exposición al AR (días 7, 9 y 11, respectivamente). La etiqueta de porcentaje directamente debajo de cada barra indica la dosis de FBS durante los días 3-5 de diferenciación. A partir del día 7, las células tratadas con AR (R) se cultivaron en medio RPMI que comprendía 0,5% de FBS. La concentración de AR fue 2 μ M el día 7, 1 μ M el día 9 y 0,2 μ M el día 11. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) ZIC1; (C) SOX7.
- Las Figuras 42A-B son gráficos que muestran la expresión relativa de genes marcadores en un cultivo de hESCs tratados primero con activina A en FBS bajo para inducir endodermo definitivo (día 5) y luego con medio fresco (A25R) que comprende 25 ng/ml de activina A y AR o varios medios condicionados (MEFCM, CM # 2, CM # 3 y CM # 4) y AR para inducir el endodermo que expresa PDX1. La expresión del marcador se determinó los días 5, 6, 7, 8 y 9. Los paneles muestran los niveles relativos de expresión de los siguientes genes marcadores: (A) PDX1; (B) CDX1.
- La Figura 43 es un gráfico que muestra la expresión relativa de PDX1 en un cultivo de hESCs tratadas primero con activina A en FBS bajo para inducir endodermo definitivo y seguidas por medios frescos que comprenden activina A y ácido retinoico (A25R) o cantidades variables de AR en medios condicionados diluidos en medios frescos. El volumen total de los medios es de 5 ml en todos los casos.
- La Figura 44 es una transferencia Western que muestra PDX1 inmunoprecipitado de células de endodermo definitivas tratadas con AR 3 días (d8) y 4 días (d9) después de la adición de AR y 50 ng/ml de activina A.
- La Figura 45 es un cuadro resumen que muestra los resultados de una clasificación de células activadas por fluorescencia (FAC) de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior marcadas genéticamente con un informador EGFP bajo el control del promotor PDX1.

La Figura 46 es un gráfico que muestra los niveles relativos de expresión de PDX1 normalizados a genes de mantenimiento para poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células EGFP negativas (Neg) y células EGFP positivas (GFP+).

La Figura 47 es un gráfico que muestra los niveles relativos de expresión de PDX1 normalizados a genes de mantenimiento para poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células EGFP negativas (Neg), la mitad de la población de células EGFP positivas que tiene la menor intensidad de señal EGFP (Lo) y la mitad de la población de células positivas para EGFP que tiene la mayor intensidad de señal de EGFP (Hi).

Las Figuras 48A-E son gráficos que muestran los niveles de expresión relativa normalizados a los genes de mantenimiento de cinco marcadores de endodermo pancreático en poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células EGFP negativas (Neg) y células EGFP positivas (GFP+). Paneles: A - NKX2.2; B - GLUT2; C - HNF3 β ; D - KRT19 y E - HNF4 α .

La Figura 49 son gráficos que muestran los niveles de expresión relativos normalizados a los genes de mantenimiento de dos marcadores de endodermo no pancreático en poblaciones clasificadas de células vivas (Live), células EGFP negativas (Neg) y células EGFP positivas (GFP+). Paneles: A - ZIC1 y B - GFAP.

15 Descripción detallada

Una etapa crucial en el desarrollo humano temprano denominada gastrulación ocurre 2-3 semanas después de la fertilización. La gastrulación es extremadamente significativa porque es en este momento que las tres capas germinales primarias se especifican y organizan por primera vez (Lu et al., 2001; Schoenwolf y Smith, 2000). El ectodermo es responsable de la eventual formación de las cubiertas externas del cuerpo y de todo el sistema nervioso, 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 responsable de la formación de todo el tubo intestinal que incluye el esófago, el estómago y el intestino delgado y grueso, y los órganos que se derivan del tubo intestinal, como los pulmones, el hígado, el timo, la paratiroides y glándulas tiroideas, vesícula biliar y páncreas (Grapin-Botton y Melton, 2000; Kimelman y Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells y Melton, 1999; Wells y Melton, 2000). Debe hacerse una distinción muy importante entre el endodermo definitivo y el linaje de células completamente separado denominado endodermo primitivo. El endodermo primitivo es el principal responsable de la formación de tejidos extraembrionarios, principalmente las porciones de endodermo parietal y visceral del saco vitelino placentario y el material de la matriz extracelular de la membrana de Reichert.

Durante la gastrulación, el proceso de formación definitiva de endodermo comienza con un evento de migración celular en el que las células de mesendodermo (células competentes para formar mesodermo o endodermo) migran a través de una estructura llamada línea primitiva. El endodermo definitivo se deriva de las células, que migran 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 puebla primero el tubo intestinal más anterior y culmina con la formación del extremo posterior del tubo intestinal.

35 La expresión génica de PDX1 durante el desarrollo

PDX1 (también llamado STF-1, IDX-1 e IPF-1) es un factor de transcripción que es necesario para el desarrollo del páncreas y el duodeno rostral. PDX1 se expresa primero en el endodermo pancreático, que surge del endodermo del intestino anterior posterior y producirá tanto las células exocrinas como las endocrinas, comenzando en E8.5 en el ratón. Más tarde, PDX1 se restringe a las células beta y algunas células delta. Este patrón de expresión se mantiene en el adulto. PDX1 también se expresa en el endodermo duodenal temprano en el desarrollo, que es adyacente al páncreas en formación, luego en los enterocitos duodenales y las células enteroendocrinas, el estómago antral y en los conductos biliares, císticos y biliares comunes. Esta región de expresión también se vuelve limitada, en el momento en que la expresión pancreática se restringe, predominantemente al duodeno rostral.

Células PDX1-positivas y procesos relacionados con las mismas

Se describen procesos nuevos y definidos para la producción de células de endodermo PDX1-positivas, en donde las células de endodermo PDX1-positivas son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la región del intestino anterior/medio del tubo intestinal (intestino anterior-PDX1-positivo/endodermo del intestino medio). Como se usa 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 particulares. Como se usa en el presente documento, "intestino anterior/intestino medio" se refiere a las células de la porción anterior del tubo intestinal, así como a las células de la porción media del tubo intestinal, incluidas las células de la unión del intestino anterior / medio.

Se describen procesos para la producción de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. Se revela que estas células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo intestinal (endodermo del intestino anterior PDX1-positivo).

Se describen procesos para la producción de células de endodermo PDX1 positivas de la porción posterior del intestino anterior. Se revela que estas células de endodermo PDX1-positivas son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción posterior de la región del intestino anterior del tubo intestinal.

- 5 Las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, como las producidas según los métodos descritos en el presente documento, se pueden usar para producir células β productoras de insulina completamente diferenciadas.

Se revela que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior se producen diferenciando las células de endodermo definitivas que no expresan sustancialmente PDX1 (células de endodermo definitivo PDX1-negativas; también denominado en este documento endodermo definitivo positivo) para formar células de endodermo para
10 diferenciando células pluripotentes, tales como células madre embrionarias, como se describe en este documento o mediante cualquier otro método conocido. Un método conveniente y altamente eficiente para producir endodermo definitivo PDX1-negativo a partir de células pluripotentes se describe en US Patent No. 11/021,618, titulado DEFINITIVE ENDODERM, presentado el 23 de diciembre de 2004.

15 Los procesos de producción de células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas proporcionan una base para la producción eficiente de tejidos pancreáticos, como las células acinares, las células ductales y las células de los islotes a partir de células pluripotentes. Se describe que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior humano se derivan de células de endodermo humano definitivas PDX1-negativas, que, a su vez, se derivan de hESC. Estas células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior humano se pueden usar para producir
20 células β productoras de insulina funcionales. Para obtener cantidades útiles de células β productoras de insulina, es deseable una alta eficiencia de diferenciación para cada uno de los pasos de diferenciación que ocurren antes de alcanzar el destino del islote pancreático/célula β . Debido a que la diferenciación de las células de endodermo definitivas PDX1-negativas a las células de endodermo para intestino anterior PDX1-positivas representa un paso temprano hacia la producción de islotes pancreáticos funcionales/células β (como se muestra en la Figura 1), es
25 particularmente deseable una alta eficiencia de diferenciación en este paso.

En vista de la conveniencia de una diferenciación eficiente de las células de endodermo definitivo PDX1 negativo a las células de endodermo intestino anterior PDX1-positivo, se describe metodología *in vitro* que da como resultado una conversión de aproximadamente 2-25% de células de endodermo definitivo PDX1 negativo a células de endodermo intestino anterior PDX1-positivo. Típicamente, tales métodos abarcan la aplicación de condiciones de cultivo y factores de crecimiento de una manera definida y temporalmente especificada. El enriquecimiento adicional de la población celular para las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior se puede lograr mediante el aislamiento y/o la purificación de las células del endodermo del intestino positivo PDX1-positivas de otras células de la población mediante el uso de un reactivo que se une específicamente al endodermo del intestino anterior positivo para PDX1 Células. Como alternativa, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden marcarse con un gen indicador, como la proteína verde fluorescente (GFP), para permitir la detección de la expresión de PDX1. Dichas células marcadas con fluorescencia se pueden purificar mediante clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS). También se describen a cultivos celulares y poblaciones de células enriquecidas que comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. También se describen métodos para identificar factores útiles en la diferenciación hacia y desde el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo.

30 Para determinar la cantidad de células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas en un cultivo o población celular, es deseable un método para distinguir este tipo celular de las otras células en el cultivo o en la población. Por consiguiente, se describen marcadores celulares cuya presencia, ausencia y/o niveles de expresión relativos son indicativos de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, así como métodos para detectar y determinar la expresión de tales marcadores. Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere a la producción de un material o sustancia, así como al nivel o cantidad de producción de un material o sustancia. Por lo tanto, determinar la expresión de un marcador específico se refiere a detectar la cantidad relativa o absoluta del marcador que se expresa o simplemente detectar la presencia o ausencia del marcador. Como se usa en el presente documento, "marcador" se refiere a cualquier molécula que se puede observar o detectar. Por ejemplo, un marcador puede incluir, entre otros, un ácido nucleico, como una transcripción de un gen específico, un producto polipéptido de un gen, un polipéptido producto no genético, una glicoproteína, un carbohidrato, un glicolípido, un lípido, una lipoproteína o una molécula pequeña (por ejemplo, moléculas que tienen un peso molecular de menos de 10,000 Da).

También se describe que la presencia, ausencia y/o nivel de expresión de un marcador se determina por PCR cuantitativa (Q-PCR). Por ejemplo, la cantidad de transcripción producida por ciertos marcadores genéticos, como PDX1, SOX17, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, alfa-fetoproteína (AFP), homeobox A13 (HOXA13), homeobox C6 (HOXC6)
55 y/u otros los marcadores descritos en este documento se determinan por Q-PCR. También se describe que la inmunohistoquímica se usa para detectar las proteínas expresadas por los genes mencionados anteriormente. También se describe que Q-PCR y las técnicas inmunohistoquímicas se usan para identificar y determinar la cantidad o las proporciones relativas de dichos marcadores.

Mediante el uso de los métodos de diferenciación y detección descritos en este documento, es posible identificar
60 células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, así como determinar la proporción de células PDX1-

positivas del endodermo del intestino anterior en un cultivo o población celular. Por ejemplo, también se describe que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior o las poblaciones de células que se producen expresan el gen PDX1 a un nivel de al menos aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones de células PDX1-negativas. También se describe que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior y las poblaciones celulares que se producen expresan el gen PDX1 a un nivel de más de 2 órdenes de magnitud mayor que las células o poblaciones celulares PDX1-negativas. También se describe que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior o las poblaciones celulares que se producen expresan uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en PDX1, SOX17, HOXA13 y HOXC6 a un nivel de aproximadamente 2 o más de 2 órdenes de magnitud mayor que las células de endodermo definitivas PDX1-negativas o poblaciones de células.

Las composiciones y métodos descritos en este documento tienen varias características útiles. Por ejemplo, los cultivos y las poblaciones celulares que comprenden endodermo PDX1-positivo, así como los métodos para producir tales cultivos y poblaciones celulares, son útiles para modelar las primeras etapas del desarrollo humano. Además, las composiciones y métodos descritos en el presente documento también pueden servir para intervención terapéutica en estados de enfermedad, tales como diabetes mellitus. Por ejemplo, dado que el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo sirve como fuente de solo un número limitado de tejidos, puede usarse en el desarrollo de tejidos puros o tipos de células.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO PDX1-NEGATIVO (ENDODERMO DEFINITIVO) DE CÉLULAS PLURIPOTENTES

Los cultivos celulares y/o las poblaciones celulares que comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior se producen a partir de células pluripotentes produciendo primero endodermo definitivo PDX1-negativo (también denominado "endodermo definitivo"). Los procesos para diferenciar las células pluripotentes para producir cultivos celulares y poblaciones de células enriquecidas que comprenden endodermo definitivo se describen brevemente a continuación y en detalle en US Patent No. 11/021,618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004. Se revela que las células pluripotentes utilizadas como material de partida son células madre. En ciertos procesos, se describe en el contexto de la presente invención que los cultivos de células de endodermo definitivos y las poblaciones de células enriquecidas que comprenden células de endodermo definitivas se producen a partir de células madre embrionarias. Como se usa en el presente documento, en el contexto de la presente divulgación "embrionario" se refiere a un rango de etapas de desarrollo de un organismo que comienza con un único cigoto y termina con una estructura multicelular que ya no comprende células pluripotentes o totipotentes que no sean células gaméticas desarrolladas. Un método para derivar células de endodermo definitivas como se describe en el presente documento utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida para la producción definitiva de endodermo. Se describe que tales células pluripotentes pueden ser células que se originan a partir de la mórula, la masa celular embrionaria interna o las obtenidas de las crestas gonadales embrionarias. Las células madre embrionarias humanas pueden mantenerse en cultivo en un estado pluripotente sin diferenciación sustancial utilizando métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en US Patent Nos. 5,453,357, 5,670,372, 5,690,926 5,843,780, 6,200,806 y 6,251,671.

En algunos procesos para producir células de endodermo definitivas, se describe que las hESCs se mantienen en una capa de alimentación. En tales procesos, se puede usar cualquier capa de alimentación que permita que las hESCs se mantengan 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 fibroblastos humanos para su uso en el cultivo de hESCs (ver US Patent Application No. 2002/0072117). Los procesos alternativos para producir endodermo definitivo permiten el mantenimiento de hESC pluripotente sin el uso de una capa de alimentación. Se han descrito métodos para mantener hESCs pluripotentes en condiciones libres de alimentación.

Las células madre embrionarias humanas usadas en el presente documento en el contexto de la presente descripción 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.

Las células madre se mantienen en cultivo en un estado pluripotente mediante pasaje de rutina hasta que se desea diferenciarlas en endodermo definitivo. En algunos procesos, la diferenciación al 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 al endodermo definitivo. Los factores de crecimiento de la superfamilia TGF β que son útiles para la producción de endodermo definitivo se seleccionan de los subgrupos Nodal / Activina o BMP. Como se describe aquí, en algunos procesos de diferenciación, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en Nodal, activina A, activina B y BMP4. Además, el factor de crecimiento Wnt3a y otros miembros de la familia Wnt son útiles para la producción de células de endodermo definitivas. Como se describe en este documento, en ciertos procesos de diferenciación, se pueden usar combinaciones de cualquiera de los factores de crecimiento mencionados anteriormente.

Como se describe en el presente documento, con respecto a algunos de los procesos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células de endodermo definitivas, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se

proporcionan a las células para que los factores de crecimiento estén presentes en los cultivos a concentraciones suficientes para promover la diferenciación de al menos una porción de las células madre a las células endodermo definitivas. En algunos procesos, los factores de crecimiento mencionados anteriormente están presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml, al menos aproximadamente 1000 ng/ml, al menos aproximadamente 2000 ng/ml, al menos aproximadamente 3000 ng/ml, al menos aproximadamente 4000 ng/ml, al menos aproximadamente 5000 ng/ml o más de aproximadamente 5000 ng/ml.

En ciertos procesos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células de endodermo definitivas como se describe aquí, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de crecimiento pueden eliminarse en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición. En los procesos descritos aquí, los factores de crecimiento pueden eliminarse aproximadamente cuatro días después de su adición.

Se pueden cultivar cultivos de células de endodermo definitivas en un medio que contenga suero reducido o sin suero. Bajo ciertas condiciones de cultivo, las concentraciones séricas pueden variar de aproximadamente 0.05% v/v a aproximadamente 20% v/v. Por ejemplo, en algunos procesos de diferenciación, la concentración sérica del medio puede ser menor de aproximadamente 0.05% (v/v), menor de aproximadamente 0.1% (v/v), menor de aproximadamente 0.2% (v/v), menor de aproximadamente 0.3% (v/v), menor de aproximadamente 0.4% (v/v), menor de aproximadamente 0.5% (v/v), menor de aproximadamente 0.6% (v/v), menor de aproximadamente 0.7% (v/v), menor de aproximadamente 0.8% (v/v), menor de aproximadamente 0.9% (v/v), menor de aproximadamente 1% (v/v), menor de aproximadamente 2% (v/v), menor de aproximadamente 3% (v/v), menor de aproximadamente 4% (v/v), menor de aproximadamente 5% (v/v), menor de aproximadamente 6% (v/v), menor de aproximadamente 7% (v/v), menor de aproximadamente 8% (v/v), menor de aproximadamente 9% (v/v), menor de aproximadamente 10% (v/v), menor de aproximadamente 15% (v/v) o menor de aproximadamente 20% (v/v). En algunos procesos, las células de endodermo definitivas se cultivan sin suero o con reemplazo de suero. En otros procesos, las células de endodermo definitivas se cultivan en presencia de B27. En tales procesos, la concentración del suplemento B27 puede variar de aproximadamente 0.1% v/v a aproximadamente 20% v/v.

SEGUIMIENTO DE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES AL ENDODERMO DEFINITIVO PDX1-NEGATIVO (ENDODERMO DEFINITIVO)

La progresión del cultivo de hESC a endodermo definitivo puede controlarse determinando la expresión de marcadores característicos de endodermo definitivo. En algunos procesos como se describe aquí, la expresión de ciertos marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de ciertos marcadores se puede determinar midiendo el nivel al que el marcador está presente en las células del cultivo o la población celular. En tales procesos, la medición de la expresión del marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método para cuantificar la expresión de marcadores producidos por genes marcadores es mediante el uso de PCR cuantitativa (Q-PCR). Los métodos para realizar Q-PCR son bien conocidos en la técnica. Otros métodos que se conocen en la técnica también pueden usarse para cuantificar la expresión del gen marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto genético marcador puede detectarse mediante el uso de anticuerpos específicos para el producto genético marcador de interés. En ciertos procesos, la expresión de genes marcadores característicos del endodermo definitivo, así como la falta de expresión significativa de genes marcadores característicos de se determina hESCs y otros tipos de células.

Como se describe más adelante en los Ejemplos de referencia a continuación, un marcador confiable de endodermo definitivo es el gen SOX17. Como tal, las células de endodermo definitivas producidas por los procesos descritos en este documento expresan el gen marcador SOX17, produciendo así el producto del gen SOX17. Otros marcadores de endodermo definitivo son MIXL1, GATA4, HNP3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1. Dado que las células de endodermo definitivas expresan el gen marcador SOX17 a un nivel superior al del gen marcador SOX7, que es característico del endodermo primitivo y visceral (ver Tabla 1), en algunos procesos, se monitoriza la expresión de SOX17 y SOX7. En otros procesos, se monitorea la expresión tanto del gen marcador SOX17 como del gen marcador OCT4, que es característico de las hBSCs. Además, debido a que las células de endodermo definitivas expresan el gen marcador SOX17 a un nivel superior al de los genes marcadores AFP, SPARC o Trombomodulina (TM), la expresión de estos genes también se puede controlar.

Otro marcador de endodermo definitivo es el gen CXCR4. El gen CXCR4 codifica un receptor de quimiocinas de la superficie celular cuyo ligando es el quimioatrayente SDF-1. Se cree que las funciones principales de las células portadoras de receptores CXCR4 en el adulto 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 coreceptor para la entrada de VIH-1 en las células T [Feng, Y. y col. Science, 272, 872-877 (1996)]. En una extensa serie de estudios realizados por [McGrath, K.E. et al. Dev. Biología 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)], se delinearon durante el desarrollo temprano y la vida adulta en el ratón. La interacción CXCR4 / SDF1 en el desarrollo se hizo evidente cuando se demostró que si alguno de los genes estaba alterado en ratones transgénicos [Nagasawa y col. Nature, 382, 635-638 (1996)], Ma, Q., et al Immunity, 10, 463-471 (1999)] resultó en letalidad embrionaria tardía. McGrath y col. demostró que CXCR4 es el ARN mensajero del receptor de quimiocinas más abundante detectado durante los embriones gastrulantes tempranos (E7.5) usando una combinación de protección RNasa y metodologías de hibridación *in situ*. En el embrión en proceso de gástrula, la señalización de CXCR4/SDF-1 parece estar implicada principalmente en la inducción de la migración de las células germinales de la línea primitiva y se expresa en el endodermo definitivo, el mesodermo y el mesodermo extraembrionario presente en este momento. En los embriones de ratón E7.2-7.8, CXCR4 y alfa-fetoproteína son mutuamente excluyentes, lo que indica una falta de expresión en el endodermo visceral [McGrath, K.E. et al. Dev. Biology 213, 442-456 (1999)].

Dado que las células de endodermo definitivas producidas al diferenciar las células pluripotentes expresan el gen marcador CXCR4, la expresión de CXCR4 se puede controlar para rastrear la producción de células de endodermo definitivas. Además, las células de endodermo definitivas producidas por los métodos descritos en este documento expresan otros marcadores de endodermo definitivo que incluyen, entre otros, SOX17, MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1. Dado que las células de endodermo definitivas expresan el gen marcador CXCR4 a un nivel superior al del gen marcador SOX7, se puede controlar la expresión de CXCR4 y SOX7. En otros procesos, se controla la expresión tanto del gen marcador CXCR4 como del gen marcador OCT4. Además, debido a que las células de endodermo definitivas expresan el gen marcador CXCR4 a un nivel más alto que el de los genes marcadores AFP, SPARC o Trombomodulina (TM), la expresión de estos genes también se puede monitorear.

Se apreciará que la expresión de CXCR4 en células endodérmicas no excluye la expresión de SOX17. Como tal, las células de endodermo definitivas producidas por los procesos descritos aquí expresarán sustancialmente SOX17 y CXCR4, pero no expresarán sustancialmente AFP, TM, SPARC o PDX1.

ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y/O PURIFICACIÓN DEL ENDODERMO DEFINITIVO

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

Los métodos para fabricar anticuerpos y usarlos para el aislamiento celular son conocidos en la técnica y dichos métodos pueden implementarse para su uso con los anticuerpos y las células de endodermo definitivas descritas aquí. En un proceso, un anticuerpo que se une a CXCR4 se une a un cordón magnético y luego se deja unir a las células de endodermo definitivas en un cultivo celular que ha sido tratado enzimáticamente para reducir la adhesión intercelular y del sustrato. Los complejos célula/anticuerpo/perla se exponen luego a un campo magnético móvil que se usa para separar las células de endodermo definitivas unidas a la perla de las células no unidas. Una vez que las células de endodermo definitivas se separan físicamente de otras células en cultivo, la unión del anticuerpo se interrumpe y las células se vuelven a colocar en un medio de cultivo de tejido apropiado.

También se pueden usar métodos adicionales para obtener cultivos o poblaciones de células de endodermo definitivas enriquecidas, aisladas o purificadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo CXCR4 se incuba con un cultivo celular definitivo que contiene endodermo que se ha tratado para reducir la adhesión intercelular y del sustrato. Las células se lavan, centrifugan y resuspenden. La suspensión celular se incuba luego con un anticuerpo secundario, como un anticuerpo conjugado con FITC que es capaz de unirse al anticuerpo primario. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden en tampón. La suspensión celular se analiza y clasifica utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Las células positivas para CXCR4 se recogen por separado de las células negativas para CXCR4, lo que da como resultado el aislamiento de tales tipos de células. Si se desea, las composiciones celulares aisladas pueden purificarse adicionalmente usando un método alternativo basado en afinidad o mediante rondas adicionales de clasificación usando los mismos marcadores o marcadores diferentes que son específicos para el endodermo definitivo.

En otros procesos, las células de endodermo definitivas se enriquecen, aíslan y/o purifican usando un ligando u otra molécula que se une a CXCR4. En algunos procesos, la molécula es SDF-1 o un fragmento, fusión o mimético de la misma.

En los procesos preferidos, las células de endodermo definitivas se enriquecen, aíslan y/o purifican de otras células de endodermo no definitivas después de que los cultivos de células madre son inducidos a diferenciarse hacia el linaje de endodermo definitivo. Se apreciará que los procedimientos de enriquecimiento, aislamiento y purificación descritos

anteriormente pueden usarse con tales cultivos en cualquier etapa de diferenciación.

Además de los procedimientos que se acaban de describir, las células de endodermo definitivas también pueden aislarse mediante otras técnicas para el aislamiento celular. Además, las células de endodermo definitivas también pueden enriquecerse o aislarse mediante métodos de subcultivo en serie en condiciones de crecimiento que promueven la supervivencia selectiva o la expansión selectiva de las células de endodermo definitivas.

Usando los métodos descritos en este documento, se pueden producir poblaciones enriquecidas, aisladas y/o purificadas de células y/o tejidos de endodermo definitivo *in vitro* de cultivos celulares pluripotentes o poblaciones de células, tales como cultivos o poblaciones de células madre, que han sufrido al menos alguna diferenciación. En algunos métodos, las células experimentan diferenciación aleatoria. Sin embargo, en un método preferido, las células se dirigen a diferenciarse principalmente en endodermo definitivo. También se revela que los métodos de enriquecimiento, aislamiento y/o purificación se relacionan con producción *in vitro* de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas. Usando los métodos descritos en el presente documento, las poblaciones o los cultivos celulares pueden enriquecerse en contenido definitivo de endodermo en al menos aproximadamente 2 veces a aproximadamente 1000 veces en comparación con las poblaciones celulares o cultivos celulares no tratados.

COMPOSICIONES QUE INCLUYEN ENDODERMO DEFINITIVO PDX1-NEGATIVO (ENDODERMO DEFINITIVO)

Las composiciones celulares producidas por los métodos descritos anteriormente incluyen cultivos celulares que comprenden endodermo definitivo y poblaciones celulares enriquecidas en endodermo definitivo. Por ejemplo, se pueden producir cultivos celulares que comprenden células de endodermo definitivas, en donde al menos aproximadamente 50-80% de las células en cultivo son células de endodermo definitivas. Debido a que la eficiencia del proceso de diferenciación puede ajustarse modificando ciertos parámetros, que incluyen, entre otros, las condiciones de crecimiento celular, las concentraciones de factor de crecimiento y el momento de los pasos de cultivo, los procedimientos de diferenciación descritos en este documento pueden dar como resultado 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 conversión de células pluripotentes a endodermo definitivo. En los procesos en los que se emplea el aislamiento de células de endodermo definitivas, por ejemplo, mediante el uso de un reactivo de afinidad que se une al receptor CXCR4, se puede recuperar una población de células de endodermo definitivo sustancialmente puro.

PRODUCCIÓN DE ENDODERMO INTESTINO ANTERIOR PDX1-POSITIVO A PARTIR DE ENDODERMO DEFINITIVO PDX1-NEGATIVO

Los cultivos y las poblaciones de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior que comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior que se describen en el presente documento se producen a partir de endodermo definitivo PDX1-negativo, que se genera a partir de células pluripotentes como se describió anteriormente. Un método preferido como se describe en el presente documento utiliza células madre embrionarias humanas como material de partida. Se revela que las hESC se convierten primero en células de endodermo definitivas PDX1-negativas, que luego se convierten en células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. Sin embargo, se apreciará que los materiales de partida para la producción de endodermo del intestino anterior PDX1-positivo no se limitan a las células de endodermo definitivas producidas usando métodos de diferenciación de células pluripotentes. Por el contrario, cualquier célula de endodermo definitiva PDX1 negativa puede usarse en los métodos descritos en este documento, independientemente de su origen.

Como se desvela en el presente documento, los cultivos celulares o las poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivas PDX1-negativas se pueden usar para una mayor diferenciación a cultivos celulares y/o poblaciones de células enriquecidas que comprenden células de endodermo intestinal anterior a PDX1 positivas. Por ejemplo, se puede usar un cultivo celular o una población celular que comprende células del endodermo humanas definitivas positivas para SOX17, PDX1-negativas. También se describe que el cultivo celular o la población celular también pueden comprender factores de diferenciación, como activinas, nodales y/o BMP, que permanecen del paso de diferenciación anterior (es decir, el paso de diferenciación células pluripotentes en células de endodermo definitivas). También se describe que los factores utilizados en la etapa de diferenciación previa se eliminan del cultivo celular o de la población celular antes de la adición de factores utilizados para la diferenciación de las células de endodermo definitivas positivas para SOX17 PDX1-positivas a células de endodermo del intestino anterior PDX1-positivas. También se describe que las poblaciones de células enriquecidas para células de endodermo definitivas positivas para SOX17 PDX1-negativas se usan como fuente para la producción de células de endodermo intestinal positivo para PDX1.

Las células de endodermo definitivas PDX1-negativas en cultivo se diferencian a las células de endodermo PDX1-positivas al proporcionar a un cultivo celular que comprende células de endodermo definitivas positivas para SOX17 y PDX1-negativas, un factor de diferenciación que promueve la diferenciación de las células a células de endodermo del intestino anterior PDX1-positivas (factor de diferenciación del intestino anterior). En algunas realizaciones de la

presente invención, el factor de diferenciación del intestino anterior es retinoide, como el ácido retinoico (AR). En algunas realizaciones, el retinoide se usa junto con un factor de crecimiento de fibroblastos, como FGF-4 o FGF-10. En otras realizaciones, el retinoide se usa junto con un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGFβ y/o un medio condicionado.

- 5 Por "medio condicionado" se entiende un medio que se altera en comparación con un medio base. Por ejemplo, el acondicionamiento de un medio puede hacer que las moléculas, como los nutrientes y/o los factores de crecimiento, se agreguen o agoten de los niveles originales encontrados en el medio base.

10 Como se describe en este documento, un medio está condicionado permitiendo que células de ciertos tipos crezcan o se mantengan en el medio bajo ciertas condiciones durante un cierto período de tiempo. Por ejemplo, un medio puede acondicionarse permitiendo que las hESCs se expandan, diferencien o mantengan en un medio de composición definida a una temperatura definida durante un número definido de horas. Como apreciarán los expertos en la materia, se pueden usar numerosas combinaciones de células, tipos de medios, duraciones y condiciones ambientales para producir casi una matriz infinita de medios condicionados. Como se describe en el presente documento, un medio está condicionado permitiendo que las células pluripotentes diferenciadas crezcan o se mantengan en un medio que comprende aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de concentración en suero. Como también se describe en el presente documento, un medio está condicionado al permitir que las células pluripotentes diferenciadas crezcan o se mantengan en un medio que comprende aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml de activina A. También se describe que un medio está condicionado permitiendo células pluripotentes diferenciadas para crecer o mantenerse en un medio que comprende aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml de BMP4.

- 20 También se describe que se prepara un medio acondicionado permitiendo que se desarrollen o mantengan hESCs diferenciadas durante 24 horas en un medio, tal como RPMI, que comprende aproximadamente 25 ng/ml de activina A y aproximadamente 2 μM de AR.

25 También se describe que las células utilizadas para acondicionar el medio, que se utiliza para mejorar la diferenciación del endodermo definitivo PDX1-negativo a endodermo intestinal positivo para PDX1, son células que se diferencian de las células pluripotentes, como hESC, en aproximadamente 5 período de tiempo de día en un medio tal como RPMI que comprende aproximadamente 0% a aproximadamente 20% de suero y/o uno o más factores de crecimiento / diferenciación de la superfamilia de TGFβ. Los factores de diferenciación, como la activina A y BMP4, se suministran a concentraciones que varían de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. También se describe que las células utilizadas para acondicionar el medio se diferencian de las hESCs durante un período de aproximadamente 5 días en un nivel bajo de RPMI en suero. Como se describe en este documento, RPMI bajo en suero se refiere a un medio que contiene suero bajo, en el que la concentración de suero se incrementa gradualmente durante un período de tiempo definido. Por ejemplo, un RPMI bajo en suero comprende una concentración de aproximadamente 0.2% de suero fetal bovino (FBS) en el primer día de crecimiento celular, aproximadamente 0.5% de FBS en el segundo día de crecimiento celular y aproximadamente 2% de FBS en el tercer al quinto día de crecimiento celular. El RPMI bajo en suero también puede comprender una concentración de aproximadamente 0% en el día uno, aproximadamente 0.2% en el día dos y aproximadamente 2% en los días 3-6. También se describe que la RPMI baja en suero se complementa con uno o más factores de diferenciación, como la activina A y BMP4. Además de su uso en la preparación de células utilizadas para acondicionar medios, se puede usar RPMI bajo en suero como medio para la diferenciación de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior de células de endodermo definitivas PDX1-negativas.

- 40 Los expertos en la técnica apreciarán que los medios condicionados se pueden preparar a partir de medios distintos de RPMI, siempre que dichos medios no interfieran con el crecimiento o el mantenimiento de las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. También se apreciará que las células utilizadas para acondicionar el medio pueden ser de varios tipos. Cuando se usan células recién diferenciadas para acondicionar un medio, dichas células se pueden diferenciar en un medio distinto de RPMI siempre que el medio no inhiba el crecimiento o el mantenimiento de tales células. Además, un experto en la técnica apreciará que ni la duración del acondicionamiento ni la duración de la preparación de las células utilizadas para el acondicionamiento deben ser de 24 horas o 5 días, respectivamente, ya que otros períodos de tiempo serán suficientes para lograr los efectos informados aquí.

50 En general, el uso de un retinoide en combinación con un factor de crecimiento de fibroblastos, un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGFβ, un medio condicionado o una combinación de cualquiera de estos factores de diferenciación del intestino anterior causa una mayor diferenciación del endodermo definitivo PDX1 - negativo a 1 endodermo del intestino anterior PDX1-positivo que el uso de un retinoide solo. Se describe que AR y FGF-10 se proporcionan al cultivo de células de endodermo definitivo PDX1-negativo. También se describe que las células de endodermo definitivas PDX1-negativas se diferencian en un cultivo que comprende un medio condicionado, activina A, activina B y AR.

- 55 Como se describe en el contexto de los procesos de diferenciación descritos aquí, los factores de diferenciación del intestino anterior mencionados anteriormente se proporcionan a las células para que estos factores estén presentes en el cultivo celular o en la población celular a concentraciones suficientes para promover la diferenciación de al menos una parte de la cultivo de células de endodermo definitivo negativo a PDX1 o población celular a células de endodermo del intestino anterior positivas a PDX1. Cuando se usa en conexión con cultivos celulares y/o poblaciones celulares, el término "porción" significa cualquier cantidad distinta de cero del cultivo celular o la población celular, que varía

desde una sola célula hasta la totalidad del cultivo celular o la población celular.

Se describe que se proporciona un retinoide a las células de un cultivo celular de modo que esté presente en una concentración de al menos aproximadamente 0,01 μM , al menos aproximadamente 0,02 μM , al menos aproximadamente 0,04 μM , al menos aproximadamente 0,08 μM , al menos aproximadamente 0,1 μM , al menos aproximadamente 0,2 μM , al menos aproximadamente 0,3 μM , al menos aproximadamente 0,4 μM , al menos aproximadamente 0,5 μM , al menos aproximadamente 0,6 μM , al menos aproximadamente 0,7 μM , al menos aproximadamente 0,8 μM , al menos aproximadamente 0,9 μM , al menos aproximadamente 1 μM , al menos aproximadamente 1,1 μM , al menos aproximadamente 1,2 μM , al menos aproximadamente 1,3 μM , al menos aproximadamente 1,4 μM , al menos aproximadamente 1,5 μM , al menos aproximadamente 1,6 μM , al menos aproximadamente 1,7 μM , al menos aproximadamente 1,8 μM , al menos aproximadamente 1,9 μM , al menos aproximadamente 2 μM , al menos aproximadamente 2,1 μM , al menos aproximadamente 2,2 μM , al menos aproximadamente 2,3 μM , al menos aproximadamente 2,4 μM , al menos aproximadamente 2,5 μM , al menos aproximadamente 2,6 μM , al menos aproximadamente 2,7 μM , al menos aproximadamente 2,8 μM , al menos aproximadamente 2,9 μM , al menos aproximadamente 3 μM , al menos aproximadamente 3,5 μM , al menos aproximadamente 4 μM , al menos aproximadamente 4,5 μM , al menos aproximadamente 5 μM , al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 20 μM , al menos aproximadamente 30 μM , al menos aproximadamente 40 μM o al menos aproximadamente 50 μM . Como se usa en el presente documento, "retinoide" se refiere a retinol, ácido retiniano o retinoico, así como a derivados de cualquiera de estos compuestos. Como se describe en el presente documento, el retinoide puede ser ácido retinoico.

También se describe que uno o más factores de diferenciación de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos están presentes en el cultivo celular. Por ejemplo,

FGF-4 puede estar presente en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml. También se describe que el FGF-10 está presente en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml. También se describe que se proporciona FGF-4 o FGF-10, pero no ambos, al cultivo celular junto con AR.

También se describe que AR está presente en el cultivo celular a 1 μM y FGF-10 está presente a una concentración de 50 ng/ml.

Como se describe en el presente documento, los factores de crecimiento de la superfamilia TGF β y/o un medio acondicionado están presentes en el cultivo celular. Estos factores de diferenciación pueden usarse en combinación con el AR y / u otros factores de diferenciación del intestino anterior medio, incluidos, entre otros, FGF-4 y FGF-10. Por ejemplo, la activina A y/o la activina B pueden estar presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml, o al menos aproximadamente 1000 ng/ml. También se describe que un medio acondicionado está presente en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, 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 al menos aproximadamente 100% del medio total. También se describe que activina: A, activina B y un medio acondicionado se proporcionan al cultivo celular junto con AR. También se describe que las células de endodermo definitivas PDX1-negativas se diferencian a las células PDX1-positivas de endodermo intestinal anterior en cultivos que comprenden aproximadamente AR 1 μM , aproximadamente 25 ng/ml de activina A y medio bajo en suero RPMI que se ha acondicionado durante aproximadamente 24 por hESCs diferenciadas, en donde las hESCs diferenciadas se han diferenciado durante aproximadamente 5 días en un RPMI bajo en suero que comprende aproximadamente 100 ng/ml de activina A. También se describe que la activina B y/o FGF-10 también están presentes en el cultivo a 25 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente.

También se describe que los factores de diferenciación del intestino anterior mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación del intestino anterior pueden eliminarse en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

Los cultivos de células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas pueden cultivarse en un medio que contenga suero reducido. Las concentraciones séricas pueden variar de aproximadamente 0.05% (v/v) a

aproximadamente 20% (v/v). También se describe que las células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas se cultivan con reemplazo de suero. Por ejemplo, la concentración sérica del medio puede ser inferior a aproximadamente 0,05% (v/v), inferior a aproximadamente 0,1% (v/v), inferior a aproximadamente 0,2% (v/v), inferior a aproximadamente 0,3% (v/v), menos de aproximadamente 0,4% (v/v), menos de aproximadamente 0,5% (v/v), menos de aproximadamente 0,6% (v/v), menos de aproximadamente 0,7% (v/v), menos de aproximadamente 0,8% (v/v), menos de aproximadamente 0,9% (v/v), menos de aproximadamente 1% (v/v), menos de aproximadamente 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). También se describe que las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior se cultivan sin suero. También se describe que las células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas se cultivan con reemplazo de suero.

También se describe que las células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas se cultivan en presencia de B27. Se describe que B27 puede proporcionarse al medio de cultivo en concentraciones que varían de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 20% (v/v) o en concentraciones superiores a aproximadamente el 20% (v/v). Como se describe aquí, la concentración de B27 en el medio es 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 2% (v/v), aproximadamente 3% (v/v), aproximadamente 4% (v/v), aproximadamente 5% (v/v), aproximadamente 6% (v/v), aproximadamente 7% (v/v), aproximadamente 8% (v/v), aproximadamente 9% (v/v), aproximadamente 10% (v/v), aproximadamente 15% (v/v) o aproximadamente 20% (v/v). Alternativamente, la concentración del suplemento B27 agregado se puede medir en términos de múltiplos de la potencia de una solución madre de B27 disponible comercialmente. Por ejemplo, B27 está disponible en Invitrogen (Carlsbad, CA) como una solución stock 50X. La adición de una cantidad suficiente de esta solución stock a un volumen suficiente de medio de crecimiento produce un medio suplementado con la cantidad deseada de B27. Por ejemplo, la adición de 10 ml de solución stock 50X B27 a 90 ml de medio de crecimiento produciría un medio de crecimiento suplementado con 5X B27. La concentración de suplemento de B27 en el medio puede ser aproximadamente 0.1X, aproximadamente 0.2X, aproximadamente 0.3X, aproximadamente 0.4X, aproximadamente 0.5X, aproximadamente 0.6X, aproximadamente 0.7X, aproximadamente 0.8X, aproximadamente 0.9X, aproximadamente 1X, aproximadamente 1.1X, aproximadamente 1.2X, aproximadamente 1.3X, aproximadamente 1.4X, aproximadamente 1.5X, aproximadamente 1.6X, aproximadamente 1.7X, aproximadamente 1.8X, aproximadamente 1.9X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2.5X, aproximadamente 3X, aproximadamente 3.5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4.5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, aproximadamente 11X, aproximadamente 12X, aproximadamente 13X, aproximadamente 14X, aproximadamente 15X, aproximadamente 16X, aproximadamente 17X, aproximadamente 18X, aproximadamente 19X, aproximadamente 20X y mayor que aproximadamente 20X.

MONITOREO DE LA DIFERENCIACIÓN DEL ENDODERMO DEFINITIVO PDX1-NEGATIVO AL ENDODERMO PDX1-POSITIVO

Al igual que con la diferenciación de las células de endodermo definitivas de las células pluripotentes, la progresión de la diferenciación de endodermo definitivo PDX1-negativo, SOX17-positivo a endodermo del intestino anterior PDX1-positivo se puede controlar determinando la expresión de marcadores característicos de estos tipos de células. Tal monitoreo permite determinar la cantidad de tiempo suficiente para la producción de una cantidad deseada de endodermo del intestino anterior positivo para PDX1 en diversas condiciones, por ejemplo, una o más concentraciones de factores de diferenciación y condiciones ambientales. Se revela que la cantidad de tiempo que es suficiente para la producción de una cantidad deseada de endodermo del intestino anterior positivo para PDX1 se determina detectando la expresión de PDX1. 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 se puede determinar midiendo el nivel al que el marcador está presente en las células del cultivo celular o la población celular. Se revela que la medición de la expresión del marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Como se describió anteriormente, un método preferido para cuantificar los marcadores de expresión producidos por los genes marcadores es mediante el uso de Q-PCR. Se describe que Q-PCR se usa para controlar la progresión de las células del cultivo de endodermo definitivo positivo para SOX17, PDX1-negativo a células de endodermo para intestino anterior PDX1-positivo cuantificando la expresión de genes marcadores característicos del endodermo para intestino anterior positivo PDX1 y la falta de expresión de genes marcadores característicos de otros tipos de células. Otros métodos que se conocen en la técnica también se pueden usar para cuantificar la expresión del gen marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto genético marcador puede detectarse mediante el uso de anticuerpos específicos para el producto genético marcador de interés.

También se describe que se determina la expresión de genes marcadores característicos del endodermo del intestino anterior PDX1-positivo, así como la falta de expresión significativa de los genes marcadores característicos del endodermo definitivo PDX1-negativo, hESCs y otros tipos de células.

Como se describe más adelante en los Ejemplos de referencia a continuación, PDX1 es un gen marcador que está asociado con el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo. Como tal, se revela que se determina la expresión de

PDX1. También se describe que también se determina la expresión de otros marcadores, que se expresan en el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo, que incluyen, pero no se limitan a, SOX17, HOXA13 y/o HOXC6. Dado que PDX1 también puede expresarse por ciertos otros tipos de células (es decir, endodermo visceral y cierto ectodermo neural), se divulga la demostración de la ausencia o ausencia sustancial de expresión del gen marcador asociada con el endodermo visceral y/o el ectodermo neural. Por ejemplo, se determina la expresión de marcadores, que se expresan en endodermo visceral y/o células neurales, que incluyen, pero no se limitan a, SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

Como se describe en el presente documento, los cultivos de células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivos producidos por los métodos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de células que expresan los genes marcadores SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 o NFM. Como se describe en el presente documento, los cultivos de células de endodermo del intestino anterior PDX1-positivos producidos por los procesos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de endodermo visceral, endodermo parietal y/o células neurales.

ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y/O PURIFICACIÓN DEL ENDODERMO INTESTINO ANTERIOR PDX1-POSITIVO

Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden enriquecerse, aislarse y/o purificarse. También se describe que las poblaciones de células enriquecidas para las células del endodermo del intestino anterior PDX1 positivas se producen aislando dichas células de los cultivos celulares.

Se describe que las células de endodermo del intestino anterior con PDX1-positivo pueden marcarse con fluorescencia y luego aislarse de las células sin marcar usando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). Se puede usar un ácido nucleico que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) u otro ácido nucleico que codifica un gen marcador fluorescente expresable para marcar las células PDX1 positivas. Por ejemplo, al menos una copia de un ácido nucleico que codifica GFP o un fragmento biológicamente activo del mismo se introduce en una célula pluripotente, preferiblemente una célula madre embrionaria humana, downstream del promotor PDX1 de manera que la expresión del producto del gen GFP o un fragmento biológicamente activo del mismo está bajo el control del promotor PDX1. También se describe que toda la región de codificación del ácido nucleico, que codifica PDX1, se reemplaza por un ácido nucleico que codifica GFP o un fragmento biológicamente activo del mismo. También se describe que el ácido nucleico que codifica GFP o un fragmento biológicamente activo del mismo se fusiona en el marco con al menos una porción del ácido nucleico que codifica PDX1, generando así una proteína de fusión. Se revela que la proteína de fusión retiene una actividad fluorescente similar a la GFP.

Las células marcadas con fluorescencia, como las células pluripotentes descritas anteriormente, se diferencian en endodermo definitivo y luego en endodermo intestinal PDX1-positivo como se describió anteriormente. Debido a que las células del endodermo del intestino anterior PDX1 positivas expresan el gen marcador fluorescente, mientras que las células negativas PDX1 no lo hacen, estos dos tipos de células pueden separarse. Como también se describe, las suspensiones celulares que comprenden una mezcla de células PDX1-positivas marcadas con fluorescencia y células PDX1-negativas sin marcar se clasifican usando un FACS. Las células PDX1-positivas se recogen por separado de las células PDX1-negativas, lo que da como resultado el aislamiento de tales tipos de células. Si se desea, las composiciones celulares aisladas se pueden purificar adicionalmente mediante rondas adicionales de clasificación usando los mismos marcadores o marcadores diferentes que son específicos para el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo.

Además de los procedimientos que se acaban de describir, las células de endodermo del intestino anterior con PDX1-positivo también pueden aislarse mediante otras técnicas para el aislamiento celular. Además, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior también pueden enriquecerse o aislarse mediante métodos de subcultivo en serie en condiciones de crecimiento que promueven la supervivencia selectiva o la expansión selectiva de dichas células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior.

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

Usando los métodos descritos en el presente documento, se pueden producir poblaciones enriquecidas, aisladas y/o purificadas de células y/o tejidos de endodermo del intestino anterior con PDX1-positivo *in vitro* de cultivos celulares de endodermo definitivos PDX1-negativos, SOX17-negativos o poblaciones de células que han sufrido al menos alguna diferenciación. Se revela que las células pueden sufrir una diferenciación aleatoria. Sin embargo, se describe que las células se dirigen a diferenciarse principalmente en células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. Como se describe en este documento, los métodos de aislamiento y/o purificación se refieren a producción *in vitro* de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior a partir de células madre embrionarias humanas.

Usando los métodos descritos en este documento, las poblaciones celulares o los cultivos celulares pueden enriquecerse en el contenido de células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivo en al menos aproximadamente 2 veces a aproximadamente 1000 veces en comparación con las poblaciones celulares o cultivos celulares no tratados. Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo del

intestino anterior pueden enriquecerse al menos aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 500 veces en comparación con poblaciones de células o cultivos celulares no tratados. Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden enriquecerse de al menos aproximadamente 10 a aproximadamente 200 veces en comparación con poblaciones de células o cultivos celulares no tratados. Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden enriquecerse de al menos aproximadamente 20 a aproximadamente 100 veces en comparación con poblaciones celulares o cultivos celulares no tratados. Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden enriquecerse de al menos aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces en comparación con poblaciones de células o cultivos celulares no tratados. Como se describe en el presente documento, las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior pueden enriquecerse de al menos aproximadamente 2 a aproximadamente 20 veces en comparación con poblaciones de células o cultivos celulares no tratados.

COMPOSICIONES QUE INCLUYEN ENDODERMO DEL INTESTINO ANTERIOR PDX1-POSITIVO

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a composiciones celulares, tales como cultivos o poblaciones celulares, que comprenden células de endodermo PDX1-positivas, en donde las células de endodermo PDX1-positivas son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo intestinal (endodermo del intestino anterior PDX1-positivo). De acuerdo con ciertas realizaciones, el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo son células de mamífero, y en una realización preferida, las células de endodermo definitivo son células humanas.

También se describen composiciones, tales como cultivos o poblaciones celulares, que comprenden células de uno o más tipos de células seleccionados del grupo que consiste en hESCs, células de endodermo definitivas PDX1-negativas, células de endodermo para intestino anterior PDX1-positivas y células de mesodermo. Como se describe en este documento, las hESCs comprenden menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% del total de células en el cultivo. Como se describe en el presente documento, las células de endodermo definitivas PDX1-negativas comprenden menos de aproximadamente 90%, menos de aproximadamente 85%, menos de aproximadamente 80%, menos de aproximadamente 75%, menos de aproximadamente 70%, menos de aproximadamente 65%, menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 55%, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 45%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 35%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 12%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% del total de células en el cultivo. Como se describe en el presente documento, las células mesodermo comprenden menos de aproximadamente 90%, menos de aproximadamente 85%, menos de aproximadamente 80%, menos de aproximadamente 75%, menos de aproximadamente 70%, menos de aproximadamente 65%, menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 55%, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 45%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 35%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 12%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente el 1% del total de células en el cultivo.

Las realizaciones adicionales de la presente invención se refieren a composiciones, tales como cultivos o poblaciones celulares, producidas por los procesos descritos en el presente documento comprenden el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo como el tipo celular mayoritario. Se describe que los procesos descritos en el presente documento producen cultivos celulares y/o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 54%, al menos aproximadamente el 53%, al menos aproximadamente el 52% o al menos aproximadamente el 51% de las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. En realizaciones preferidas, las células de los cultivos celulares o las poblaciones celulares comprenden células humanas. Se describe que los procesos descritos en el presente documento producen cultivos o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 24%, al menos aproximadamente 23%, al menos aproximadamente 22%, al menos aproximadamente 21%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 19%, al menos aproximadamente 18%, al menos aproximadamente 17%, al menos aproximadamente 16%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 14%, al menos aproximadamente 13%, al menos aproximadamente 12%, al menos aproximadamente 11%, al menos

aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 9%, al menos aproximadamente 8%, al menos aproximadamente el 7%, al menos aproximadamente el 6%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 2% o al menos aproximadamente el 1% de las células de endodermo del intestino anterior PDX1 positivas. En realizaciones preferidas, las células de los cultivos o poblaciones celulares comprenden células humanas. También se describe que el porcentaje de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior en los cultivos o poblaciones celulares se calcula sin tener en cuenta las células alimentadoras que permanecen en el cultivo.

También se describen composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones de células, que comprenden mezclas de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior y células de endodermo definitivas PDX1-negativas. Por ejemplo, se pueden producir cultivos o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 5 células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior por cada 95 células de endodermo definitivas PDX1-negativas. También se describen cultivos o poblaciones celulares que comprenden al menos aproximadamente 95 células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior por cada 5 células de endodermo definitivas PDX1-negativas que se pueden producir. Además, se describen cultivos o poblaciones celulares que comprenden otras proporciones de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior a células de endodermo definitivas PDX1-negativas. Por ejemplo, composiciones que comprenden al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente 1,000,000 de células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 100,000 células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 10,000 células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por cada aproximadamente cada 1000 células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 500 células de endodermo definitivo PDX1-negativo, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 100 células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva del endodermo del intestino por aproximadamente cada 10 células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 5 células de endodermo definitivo negativas de PDX1, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 4 células de endodermo definitivo PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula del endodermo del intestino anterior PDX1-positiva por aproximadamente 2 células de endodermo definitivas PDX1-negativas, al menos aproximadamente 1 célula PDX1-positiva de endodermo del intestino anterior por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 2 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas, por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 4 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 5 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 10 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 20 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 50 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 100 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 1000 células del endodermo del intestino positivo PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 10,000 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa, al menos aproximadamente 100,000 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa y al menos aproximadamente 1,000,000 células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas por aproximadamente cada 1 célula de endodermo definitivo PDX1-negativa.

Como se describe en el presente documento, las células de endodermo definitivas PDX1-negativas a partir de las cuales se producen células de endodermo para intestino anterior PDX1-positivas pueden derivarse de células pluripotentes humanas, tales como células madre pluripotentes humanas.

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

También se describen composiciones, tales como cultivos o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, incluido el endodermo del intestino anterior PDX1-positivo humano, en las que la expresión del marcador PDX1 es mayor que la expresión de AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o Marcador NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células humanas. También se describe que la expresión del marcador PDX1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de los células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células

humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente 80 % de las células humanas, en al menos aproximadamente el 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. También se describe que el porcentaje de células humanas en los cultivos o poblaciones celulares, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM, se calcula independientemente de las células alimentadoras.

También se describen composiciones, tales como cultivos o poblaciones celulares, que comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior humano, en las que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 es mayor que la expresión de AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o marcador NFM de al menos aproximadamente 2% a mayor que al menos aproximadamente 98% de las células humanas. También se describe que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 10% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 15% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 20% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 25% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 30% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 35% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 40% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 45% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 50% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 55% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 60% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 65% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 70% de las células humanas, en al menos aproximadamente 75% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 80% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 85% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 90% de las células humanas, en al menos aproximadamente el 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas. También se describe que el porcentaje de células humanas en los cultivos o poblaciones celulares, en el que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 es mayor que la expresión de AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o marcador NFM, se calcula sin tener en cuenta las celdas de alimentación.

También se describen composiciones, tales como cultivos o poblaciones celulares, que comprenden células endodérmicas de mamíferos, tales como células endodérmicas humanas, en las que la expresión del marcador PDX1 es mayor que la expresión de AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM marcador en al menos aproximadamente el 2% de las células endodérmicas. También se describe que la expresión del marcador PDX1 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 10% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 15% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 20% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 25% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 30% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente 35% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 40% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 45% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 50% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 55% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 60% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 65% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 70% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 75% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente 80 % de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 85% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 90% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 95% de las células endodérmicas o al menos en aproximadamente el 98% de las células endodérmicas.

También se describen composiciones, tales como cultivos o poblaciones celulares, que comprenden células endodérmicas de mamífero, tales como células endodérmicas humanas, en las que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células endodérmicas. También se describe que la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en SOX17, HOXA13 y HOXC6 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 10% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 15% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 20% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 25% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 30% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 35% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 40% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 45% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 50% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 55% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 60% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 65% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el

70% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente 75% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 80% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 85% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 90% de las células endodérmicas, en al menos aproximadamente el 95% de las células endodérmicas o al menos aproximadamente el 98% de las células endodérmicas.

- 5 Usando los procesos descritos en el presente documento, se pueden producir composiciones que comprenden células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior sustancialmente libres de otros tipos de células. Con respecto a las células en cultivos celulares o en poblaciones celulares, el término "sustancialmente libre de" significa que el tipo de célula especificado del cual el cultivo celular o la población celular está libre, está presente en una cantidad de menos de aproximadamente el 5% del total número de células presentes en el cultivo celular o población celular.
- 10 También se describe que las poblaciones de células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior o cultivos celulares producidos por los métodos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de células que expresan significativamente los genes marcadores AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

También se describe que una descripción de una célula de endodermo del intestino anterior PDX1-positiva basada en la expresión de genes marcadores es PDX1 alta, AFP baja, SOX7 baja, SOX1 baja, ZIC1 baja y NFM baja.

15 **AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE PDX1 EN UNA CÉLULA DE ENDODERMO DEFINITIVA SOX17-POSITIVA**

- También se describen métodos para aumentar la expresión del producto del gen PDX1 en cultivos o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivas positivas para SOX17. Se describe que las células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se ponen en contacto con un factor de diferenciación en una cantidad que es suficiente para aumentar la expresión del producto del gen PDX1. Las células de endodermo definitivas
- 20 positivas para SOX17 que están en contacto con el factor de diferenciación pueden ser PDX1-negativas o PDX1-positivas. Se revela que el factor de diferenciación puede ser un retinoide. Se describe que las células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se ponen en contacto con un retinoide a una concentración que varía de aproximadamente 0,01 μ M a aproximadamente 50 μ M. Como se describe en este documento, el retinoide puede ser AR.

- 25 Como se describe en el presente documento, la expresión del producto del gen PDX1 en cultivos o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se incrementa poniendo en contacto las células positivas para SOX17 con un factor de diferenciación de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos. Tales factores de diferenciación pueden usarse solos o en combinación con el AR. Se describe que las células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se ponen en contacto con un factor de crecimiento de
- 30 fibroblastos a una concentración que varía de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. Se revela que el factor de crecimiento FGF es FGF-10.

- Se describe que la expresión del producto del gen PDX1 en cultivos o poblaciones celulares que comprenden células endodermo definitivas positivas para SOX17 se incrementa al poner en contacto las células positivas para SOX17 con B27. Este factor de diferenciación puede usarse solo o en combinación con uno o ambos de retinoide y familia de
- 35 factores de diferenciación FGF.

Se describe que las células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se ponen en contacto con B27 a una concentración que varía de aproximadamente el 0,1% (v/v) a aproximadamente el 20% (v/v). También se describe que las células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se ponen en contacto con AR, FGF-10 y B27.

- Los métodos para aumentar la expresión del producto del gen PDX1 en cultivos o poblaciones celulares que comprenden células de endodermo definitivas positivas para SOX17 se pueden llevar a cabo en medio de crecimiento que contenga suero reducido o sin suero. Se describe que las concentraciones séricas varían de aproximadamente 0,05% (v/v) a aproximadamente 20% (v/v). Se revela que las células positivas para SOX17 se cultivan con reemplazo de suero.
- 40

45 **IDENTIFICACIÓN DE FACTORES CAPACES DE PROMOVER LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDODÉRMICAS DEFINITIVAS PDX1-NEGATIVAS A LAS CÉLULAS ENDODÉRMICAS DEL INTESTINO ANTERIOR PDX1-POSITIVAS**

- También se describen métodos para identificar uno o más factores de diferenciación capaces de promover la diferenciación de células de endodermo definitivas PDX1-negativas a células de endodermo para intestino anterior PDX1-positivas. En tales métodos, se obtiene un cultivo o población celular que comprende células de endodermo
- 50 definitivas PDX1-negativas y se determina la expresión de PDX1 en el cultivo o población celular. Después de determinar la expresión de PDX1, las células del cultivo o población celular se ponen en contacto con un factor de diferenciación candidato. Se revela que la expresión de PDX1 se determina en el momento del contacto o poco después de contactar las células con un factor de diferenciación candidato. La expresión de PDX1 se determina luego una o más veces después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato. Si la expresión de PDX1 ha aumentado después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión de
- 55 PDX1 antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, el factor de diferenciación candidato se identifica como capaz de promover la diferenciación de células de endodermo definitivas PDX1-negativas a células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior.

Como se describe en el presente documento, los métodos descritos anteriormente para identificar factores capaces de promover la diferenciación de células de endodermo definitivas PDX1-negativas a células de endodermo intestinal positivo para PDX1 también incluyen determinar la expresión del gen HOXA13 y/o el gen HOXC6 en el cultivo o población celular. Se describe que la expresión de HOXA13 y/o HOXC6 se determina tanto antes como después de que las células se pongan en contacto con el factor de diferenciación candidato. Si la expresión de PDX1 y HOXA13 ha aumentado después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión de PDX1 y HOXA13 antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, el factor de diferenciación candidato se identifica como capaz de promover la diferenciación del endodermo definitivo PDX1-negativo células a las células PDX1 positivas para el endodermo del intestino anterior. De manera similar, si la expresión de PDX1 y HOXC6 ha aumentado después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión de PDX1 y HOXC6 antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, el factor de diferenciación candidato se identifica como capaz de promover la diferenciación de PDX1 negativo células de endodermo definitivas a células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. Se revela que un factor de diferenciación candidato se identifica como capaz de promover la diferenciación de células de endodermo definitivas PDX1-negativas a células de endodermo intestinal positivo para PDX1 determinando la expresión de PDX1, HOXA13 y HOXC6 tanto antes como después de contactar las células del cultivo o población celular con el factor de diferenciación candidato. Se describe que la expresión de PDX1, HOXA13 y/o HOXC6 se determina con Q-PCR.

También se describe que la expresión de uno o más de PDX1, HOXA13 y HOXC6 se puede determinar en el momento del contacto o poco después de contactar las células de los cultivos o las poblaciones celulares con un factor de diferenciación candidato en lugar de antes de contactar las células con un factor de diferenciación candidato. También se describe que la expresión de uno o más de PDX1, HOXA13 y HOXC6 en el momento de contactar o poco después de contactar las células con un factor de diferenciación candidato se compara con la expresión de uno o más de PDX1, HOXA13 y HOXC6 en uno o más veces después de contactar las células con un factor de diferenciación candidato.

En los métodos descritos anteriormente, la una o más veces en que se puede determinar la expresión de PDX1 después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato puede variar de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 días. Por ejemplo, la expresión de PDX1 se puede determinar aproximadamente 1 hora después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 2 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 4 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 6 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 8 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 10 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 12 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 16 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 24 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 2 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 3 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 4 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 5 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 6 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 7 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 8 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 9 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 10 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato o más de 10 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato.

Los factores de diferenciación candidatos para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden seleccionarse de compuestos, tales como polipéptidos y moléculas pequeñas. Por ejemplo, los polipéptidos candidatos pueden incluir, entre otros, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, proteínas de matriz extracelular y péptidos sintéticos. Se revela que el factor de crecimiento puede ser de la familia FGF, por ejemplo, FGF-10. Las moléculas pequeñas candidatas incluyen, entre otros, compuestos generados a partir de síntesis química combinatoria y productos naturales, como esteroides, isoprenoides, terpenoides, fenilpropanoides, alcaloides y flavinoides. Los expertos en la materia apreciarán que están disponibles miles de clases de moléculas pequeñas naturales y sintéticas y que las moléculas pequeñas contempladas para su uso en los métodos descritos en el presente documento no se limitan a las clases ejemplificadas anteriormente. Típicamente, las moléculas pequeñas tendrán un peso molecular inferior a 10,000 Da. En una realización preferida, la molécula pequeña es un retinoide, por ejemplo, AR.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES CAPACES DE PROMOVER LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL ENDODERMO DEL INTESTINO ANTERIOR PDX1-POSITIVAS

También se describen métodos para identificar uno o más factores de diferenciación capaces de promover la diferenciación de las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior. En tales métodos, se obtiene un cultivo o población celulares que comprende células del endodermo del intestino anterior PDX1 positivas y se determina la expresión de un marcador en el cultivo o población celulares. Después de determinar la expresión del marcador, las células del cultivo o la población celulares se ponen en contacto con un factor de diferenciación candidato. Se revela que la expresión del marcador se determina en el momento del contacto o poco después de contactar las células con un factor de diferenciación candidato. La expresión del mismo marcador se determina luego

una o más veces después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato. Si la expresión del marcador ha aumentado o disminuido después del contacto con el factor de diferenciación candidato en comparación con la expresión del marcador antes del contacto con el factor de diferenciación candidato, el factor de diferenciación candidato se identifica como capaz de promover la diferenciación de células del endodermo del intestino anterior PDX1-positivas. Se revela que la expresión del marcador se determina por Q-PCR.

En los métodos descritos anteriormente, la una o más veces en las que se revela que la expresión del marcador se determina después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato puede variar de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 días. Por ejemplo, la expresión del marcador se puede determinar aproximadamente 1 hora después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 2 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 4 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 6 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 8 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 10 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 12 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 16 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 24 horas después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 2 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 3 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 4 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 5 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 6 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 7 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 8 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 9 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato, aproximadamente 10 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato o más de 10 días después de contactar las células con el factor de diferenciación candidato.

Como se describió anteriormente, los factores de diferenciación candidatos para usar en los métodos descritos en el presente documento pueden seleccionarse de compuestos tales como polipéptidos y moléculas pequeñas.

Aunque cada uno de los métodos descritos aquí se ha descrito con respecto a las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior, se apreciará que estos métodos pueden usarse para producir composiciones que comprenden las células de endodermo del intestino anterior/medio PDX1-positivas que se describen en este documento y/o las células PDX1-positivas del endodermo de la porción posterior del intestino anterior que se describen en este documento. Además, cualquiera de los tipos de células de endodermo PDX1-positivas descritos en esta especificación se puede utilizar en los métodos de detección descritos aquí.

Habiendo descrito generalmente esta invención, se puede obtener una comprensión adicional por referencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

Muchos de los ejemplos de referencia a continuación describen el uso de células humanas pluripotentes. Los métodos para producir células humanas pluripotentes son bien conocidos en la técnica y se han descrito numerosas publicaciones científicas, que incluyen U.S. Patent Nos. 5,453,357, 5,670,372, 5,690,926, 6,090,622, 6,200,806 y 6,251,671 tanto como U.S. Patent Application Publication No. 2004/0229350.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Células BS humanas

Para nuestros estudios sobre el desarrollo del endodermo, empleamos células madre embrionarias humanas, que son pluripotentes y pueden dividirse aparentemente indefinidamente en cultivo mientras se mantiene un cariotipo normal. Las células ES se derivaron de la masa celular interna del embrión de 5 días de edad utilizando métodos inmunológicos o mecánicos para el aislamiento. En particular, la línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 se derivó de un embrión congelado supernumerario de un ciclo de fertilización *in vitro* luego del consentimiento informado del paciente. Al descongelar el blastocisto incubado se sembró en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), en medio ES (DMEM, FBS al 20%, aminoácidos no esenciales, beta-mercaptoetanol, suplemento ITS). El embrión se adhirió a la placa de cultivo y después de aproximadamente dos semanas, las regiones de hESC indiferenciadas se transfirieron a nuevas placas con MEF. La transferencia se realizó con corte mecánico y una breve digestión con dispasa, seguida de la eliminación mecánica de los grupos de células, lavado y reposición. Desde la derivación, hESCyt-25 se ha pasado en serie más de 100 veces. Empleamos la línea de células madre embrionarias humanas hESCyt-25 como nuestro material de partida para la producción de endodermo definitivo.

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

EJEMPLO DE REFERENCIA 2**Caracterización de hESCyt-25**

La línea de células madre embrionarias humanas, hESCyt-25, ha mantenido 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 hESC indiferenciados y muestra actividad de fosfatasa alcalina, así como una morfología idéntica a otras líneas de hESC establecidas. Además, la línea de células madre humanas, hESCyt-25, también forma fácilmente cuerpos embrioides (EB) cuando se cultiva en suspensión. Como demostración de su naturaleza pluripotente, hESCyt-25 se diferencia en varios tipos de células que representan las tres capas germinales principales. La producción de ectodermo se demostró mediante Q-PCR para ZIC1, así como inmunocitoquímica (ICC) para nestina y marcadores neuronales más maduros. Se observó tinción inmunocitoquímica para tubulina β -III en grupos de células alargadas, característicos de las neuronas tempranas. Anteriormente, tratamos los EB en suspensión con ácido retinoico, para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes a endodermo visceral (VE), un linaje extraembrionario. Las células tratadas expresaron altos niveles de α -fetoproteína (AFP) y SOX7, dos marcadores de VE, a las 54 horas de tratamiento. Las células diferenciadas en monocapa expresaron AFP en parches esporádicos como lo demuestra la tinción inmunocitoquímica. Como se describirá a continuación, la línea celular hESCyt-25 también fue capaz de formar endodermo definitivo, según lo validado por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) y la inmunocitoquímica para SOX17, en ausencia de expresión de AFP. Para demostrar la diferenciación al mesodermo, se analizaron las EB diferenciadoras para determinar la expresión del gen Brachyury en varios puntos temporales. La expresión de Brachyury aumentó progresivamente en el transcurso del experimento. En vista de lo anterior, la línea hESCyt-25 es pluripotente como se muestra por la capacidad de formar células que representan las tres capas germinales.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3**Producción de anticuerpo SOX17**

Un obstáculo principal para la identificación del endodermo definitivo en cultivos de hESC es la falta de herramientas apropiadas. Por lo tanto, emprendimos la producción de un anticuerpo producido contra la proteína SOX17 humana.

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

Como se describe en detalle aquí, el anticuerpo SOX17 se utilizó para examinar específicamente los efectos de diversos tratamientos y procedimientos de diferenciación dirigidos a la producción de células de endodermo definitivo SOX17-positivas. Otros anticuerpos reactivos a AFP, SPARC y trombomodulina también se emplearon para descartar la producción de endodermo visceral y parietal (endodermo extraembrionario).

Para producir un anticuerpo contra SOX17, una porción del cDNA de SOX17 humano (SEQ ID NO: 1) correspondiente a los aminoácidos 172-414 (SEQ ID NO: 2) en el extremo carboxiterminal de la proteína SOX17 (Figura 2) fue utilizado para la inmunización genética en ratas en la compañía productora de anticuerpos GENOVAC (Friburgo, Alemania), de acuerdo con los procedimientos desarrollados allí. Los procedimientos para la inmunización genética se pueden encontrar en US Patent Nos. 5,830,876, 5,817,637, 6,165,993 y 6,261,281 así como las publicaciones de solicitud de patente internacional núms. WO 00/29442 y WO 99/13915.

Otros métodos adecuados para la inmunización genética también se describen en la literatura no patentada. Por ejemplo, Barry y col. describe la producción de anticuerpos monoclonales por inmunización genética en Biotechniques 16: 616-620, 1994. Se pueden encontrar ejemplos específicos de métodos de inmunización genética para producir anticuerpos contra proteínas específicas, por ejemplo, en Costaglia et al., (1998) Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor, J. Immunol. 160: 1458-1465 ; Kilpatrick et al (1998) Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor, Hybridoma 17: 569-576 ; Schmolke et al., (1998) Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization, J. Virol. 72: 4541-4545 ; Krasemann et al., (1999) Generation of monoclonal antibodies against proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy, J. Biotechnol. 73: 119-129 ; and Olivieri et al., (1996) Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by DNA immunization, J. Biotechnol. 51: 191-194.

SOX7 y SOX18 son los parientes más cercanos de la familia Sox a SOX17 como se muestra en el dendrograma relacional que se muestra en la Figura 3. Empleamos el polipéptido SOX7 humano como control negativo para demostrar que el anticuerpo SOX17 producido por inmunización genética es específico para SOX17 y no reacciona con su familiar más cercano. En particular, SOX7 y otras proteínas se expresaron en fibroblastos humanos y luego se

analizaron para determinar la reactividad cruzada con el anticuerpo SOX17 mediante Western blot e ICC. Por ejemplo, se utilizaron los siguientes métodos para la producción de los vectores de expresión SOX17, SOX7 y EGFP, su transfección en fibroblastos humanos y el análisis por transferencia Western. Los vectores de expresión empleados para la producción de SOX17, SOX7 y EGFP fueron pCMV6 (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD), pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA), respectivamente. Para la producción de proteínas, los fibroblastos humanos MDX inmortalizados por telomerasa se transfectaron transitoriamente con ADN superenrollado en presencia de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los lisados celulares totales se recogieron 36 horas después de la transfección en TRIS-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato al 0,5%, que contiene un cóctel de inhibidores de la proteasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN). El análisis de Western blot de 100 µg de proteínas celulares, separadas por SDS-PAGE en NuPAGE (gradiente de poliacrilamida al 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA), y transferidas por transferencia electrónica sobre membranas PDVF (Hercules, CA), se sondearon con una dilución 1/1000 del antisuero SOX17 de rata en TRIS-HCl 10 mM (pH 8), NaCl 150 mM, BSA al 10%, Tween-20 al 0,05% (Sigma, St. Louis, MO), seguido de fosfatasa alcalina IgG anti-rata conjugada (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), y revelada a través de la tinción con Vector Black Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El estándar de tamaño de proteínas utilizado fue una amplia gama de marcadores de color (Sigma, St. Louis, MO).

En la Figura 4, los extractos de proteínas hechos de células de fibroblastos humanos que se transfectaron transitoriamente con cDNA de SOX17, SOX7 o EGFP se sondearon en transferencias Western con el anticuerpo SOX17. Solo el extracto de proteína de las células transfectadas con hSOX17 produjo una banda de ~51Kda que coincidía estrechamente con el peso molecular previsto de 46 Kda de la proteína SOX17 humana. No hubo reactividad del anticuerpo SOX17 a extractos hechos de células transfectadas con SOFP o EGFP humano. Además, el anticuerpo SOX17 marcó claramente los núcleos de las células de fibroblastos humanos transfectadas con la construcción de expresión hSOX17, pero no marcó las células transfectadas solo con EGFP. Como tal, el anticuerpo SOX17 exhibe especificidad por ICC.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Validación del anticuerpo SOX17 como marcador de endodermo definitivo

Las hESC parcialmente diferenciadas se marcaron conjuntamente con los anticuerpos SOX17 y AFP para demostrar que el anticuerpo SOX17 es específico para la proteína SOX17 humana y además marca el endodermo definitivo. Se ha demostrado que SOX17, SOX7 (que es un miembro estrechamente relacionado del subgrupo F de la familia de genes SOX (Figura 3)) y AFP se expresan en endodermo visceral. Sin embargo, AFP y SOX7 no se expresan en células de endodermo definitivas a niveles detectables por ICC, y, por lo tanto, pueden emplearse como marcadores negativos para células de endodermo definitivas de bonifide. Se demostró que el anticuerpo SOX17 marca poblaciones de células que existen como agrupaciones discretas de células o que se mezclan con células positivas para AFP. En particular, la Figura 5A muestra que pequeñas cantidades de células SOX17 se etiquetaron conjuntamente con AFP; sin embargo, también se encontraron regiones donde había poca o ninguna AFP⁺ células en el campo de Células SOX17⁺ (Figura 5B). De manera similar, dado que se ha informado que el endodermo parietal expresa SOX17, se puede usar el etiquetado de anticuerpos con SOX17 junto con los marcadores parietales SPARC y/o trombosmodulina (TM) para identificar el SOX17⁺ células que son endodermo parietal. Como se muestra en las Figuras 6A-C, las células de endodermo parietal trombosmodulina y SOX17 conjuntamente marcadas se produjeron por diferenciación aleatoria de células hES.

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

Como evidencia adicional de la especificidad del perfil del marcador SOX17^{hi}/AFP^{lo}/TM^{lo}/SPARC^{lo} como predictivo del endodermo definitivo, la expresión del gen SOX17 y AFP se comparó cuantitativamente con el número relativo de células marcadas con anticuerpos. Como se muestra en la Figura 7A, las hESC tratadas con ácido retinoico (inductor de endodermo visceral) o activina A (inductor de endodermo definitivo), dieron como resultado una diferencia de 10 veces en el nivel de expresión de ARNm de SOX17. Este resultado reflejó la diferencia de 10 veces en el número de células marcadas con anticuerpo SOX17 (Figura 7B). Además, como se muestra en la Figura 8A, el tratamiento con activina A de hESC suprimió la expresión del gen AFP por 6.8 veces en comparación con ningún tratamiento. Esto se reflejó visualmente por una disminución dramática en el número de células marcadas con AFP en estos cultivos como se muestra en las Figuras 8B-C. Para cuantificar esto aún más, se demostró que esta disminución de aproximadamente 7 veces en la expresión del gen AFP fue el resultado de una disminución similar de 7 veces en el número de células marcadas con anticuerpos de AFP medida por citometría de flujo (Figuras 9A-B). Este resultado es extremadamente significativo, ya que indica que los cambios cuantitativos en la expresión génica como se ve por Q-PCR reflejan los cambios en la especificación del tipo de célula como se observa por la tinción de anticuerpos.

La incubación de hESCs en presencia de miembros de la familia Nodal (Nodal, activina A y activina B - NAA) resultó en un aumento significativo en las células marcadas con anticuerpos SOX17 con el tiempo. A los 5 días de tratamiento

continuo con activina, más del 50% de las células fueron marcadas con SOX17 (Figuras 10A-F). Hubo pocas o ninguna célula marcada con AFP después de 5 días de tratamiento con activina.

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

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Q-PCR Ensayo de expresión génica

En los siguientes experimentos, la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) fue el ensayo principal utilizado para detectar los efectos de varios tratamientos en la diferenciación de hESC. En particular, las mediciones en tiempo real de la expresión génica se analizaron para múltiples genes marcadores en múltiples puntos de tiempo mediante Q-PCR. Los genes marcadores característicos de los tipos de células deseados y no deseados se evaluaron para obtener una mejor comprensión de la dinámica general de las poblaciones celulares. La fuerza del análisis Q-PCR incluye su extrema sensibilidad y relativa facilidad para desarrollar los marcadores necesarios, ya que la secuencia del genoma está fácilmente disponible. Además, la sensibilidad extremadamente alta de Q-PCR permite la detección de la expresión génica de un número relativamente pequeño de células dentro de una población mucho más grande. Además, la capacidad de detectar niveles muy bajos de expresión génica proporciona indicaciones de "sesgo de diferenciación" dentro de la población. El sesgo hacia una ruta de diferenciación particular, antes de la diferenciación abierta de esos fenotipos celulares, es irreconocible utilizando técnicas inmunocitoquímicas. Por esta razón, Q-PCR proporciona un método de análisis que es al menos complementario y potencialmente muy superior a las técnicas inmunocitoquímicas para detectar el éxito de los tratamientos de diferenciación. Además, Q-PCR proporciona un mecanismo por el cual evaluar el éxito de un protocolo de diferenciación en un formato cuantitativo en escalas de análisis de rendimiento semi-alto.

El enfoque adoptado aquí fue realizar una cuantificación relativa usando la química SYBR Green en un instrumento Rotor Gene 3000 (Corbett Research) y un formato RT-PCR de dos pasos. Tal enfoque permitió el almacenamiento de muestras de cDNA para el análisis de genes marcadores adicionales en el futuro, evitando así la variabilidad en la eficiencia de la transcripción inversa entre muestras.

Los cebadores se diseñaron para ubicarse sobre los límites exón-exón o abarcar intrones de al menos 800 pb cuando sea posible, ya que esto se ha determinado empíricamente para eliminar la amplificación del ADN genómico contaminante. Cuando se emplearon genes marcadores que no contienen intrones o poseen pseudogenes, se realizó el tratamiento con DNasa I de muestras de ARN.

Usamos habitualmente Q-PCR para medir la expresión génica de múltiples marcadores de tipos de células objetivo y no objetivo con el fin de proporcionar una descripción amplia del perfil de la expresión génica en muestras de células. Los marcadores relevantes para las fases tempranas de la diferenciación de hESC (específicamente ectodermo, mesodermo, endodermo definitivo y endodermo extraembrionario) y para los que están disponibles conjuntos de cebadores validados se proporcionan a continuación en la Tabla 1. La especificidad humana de estos conjuntos de cebadores también se ha demostrado. Este es un hecho importante ya que las hESC a menudo se cultivaron en capas de alimentación de ratón. Típicamente, se tomaron muestras por triplicado para cada condición y se analizaron independientemente por duplicado para evaluar la variabilidad biológica asociada con cada determinación cuantitativa.

Para generar la plantilla de PCR, se aisló el ARN total usando RNeasy (Qiagen) y se cuantificó usando RiboGreen (Molecular Probes). La transcripción inversa de 350-500 ng de ARN total se llevó a cabo utilizando el kit de transcriptasa inversa iScript (BioRad), que contiene una mezcla de oligo-dT y cebadores aleatorios. Cada reacción de 20 µL se diluyó posteriormente hasta un volumen total de 100 µL y se usaron 3 µL en cada reacción de Q-PCR de 10 µL que contenía cebadores directos e inversos 400 nM y 5 µL de mezcla maestra verde SYX 2X (Qiagen). Se utilizaron dos parámetros de ciclo de etapas empleando una desnaturalización de 5 segundos a 85-94°C (seleccionada específicamente de acuerdo con la temperatura de fusión del amplicón para cada conjunto de cebador) seguido de un recocido/extensión de 45 segundos a 60°C. Los datos de fluorescencia se recogieron durante los últimos 15 segundos de cada fase de extensión. Se utilizó una serie de dilución de 10 puntos de tres puntos para generar la curva estándar para cada ejecución y los umbrales de ciclo (Ct) se convirtieron en valores cuantitativos basados en esta curva estándar. Los valores cuantificados para cada muestra se normalizaron al rendimiento del gen de mantenimiento y luego se calcularon las desviaciones promedio y estándar para muestras triplicadas. Al finalizar el ciclo de PCR, se realizó un análisis de curva de fusión para determinar la especificidad de la reacción. Un único producto específico se indicó mediante un único pico en la T_m apropiado para ese amplicón de PCR. Además, las reacciones realizadas sin transcriptasa inversa sirvieron como control negativo y no se amplifican.

Un primer paso para establecer la metodología Q-PCR fue la validación de los genes de mantenimiento apropiados (HG) en el sistema experimental. Dado que el HG se usó para normalizar a través de las muestras para la entrada de ARN, la integridad del ARN y la eficiencia de la RT fue valioso que el HG exhibiera un nivel constante de expresión a lo largo del tiempo en todos los tipos de muestra para que la normalización sea significativa. Medimos los niveles de expresión de *Ciclofilina G*, *hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT)*, *beta-2-microglobulina*, *hidroximetilbiano sintasa (HMBS)*, *proteína de unión a TATA (TBP)* y *glucoronidasa beta (GUS)* en hESCs diferenciadoras. Nuestros resultados indicaron que *beta-2-microglobulina* los niveles de expresión aumentaron en el transcurso de la diferenciación y, por lo tanto, excluimos el uso de este gen para la normalización. Los otros genes exhibieron niveles de expresión consistentes a lo largo del tiempo, así como a través de tratamientos. Usamos tanto la ciclofilina G como la GUS para calcular un factor de normalización para todas las muestras. El uso de múltiples HG simultáneamente reduce la variabilidad inherente al proceso de normalización y aumenta la fiabilidad de los valores relativos de expresión génica.

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

TABLA 1

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

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

Se predijo que las células de endodermo definitivas expresarían niveles altos de ARNm de SOX17 y niveles bajos de AFP y SOX7 (endodermo visceral), SPARC (endodermo parietal) y Brachyury (mesodermo). Además, ZIC1 se usó aquí para descartar aún más la inducción de ectodermo temprano. Finalmente, GATA4 y HNF3b se expresaron en endodermo definitivo y extraembrionario y, por lo tanto, se correlacionan con la expresión de SOX17 en endodermo definitivo (Tabla 1). Se muestra un experimento representativo en las Figuras 11-14 que demuestra cómo los genes marcadores descritos en la Tabla 1 se correlacionan entre sí entre las diversas muestras, destacando así patrones específicos de diferenciación al endodermo definitivo y al endodermo extraembrionario, así como al mesodérmico y neural. tipos de células

En vista de los datos anteriores, está claro que el aumento de las dosis de activina dio como resultado un aumento de la expresión del gen SOX17. Además, esta expresión de SOX17 representaba predominantemente endodermo definitivo en oposición al endodermo extraembrionario. Esta conclusión se deriva de la observación de que la expresión del gen SOX17 se correlacionó inversamente con la expresión del gen AFP, SOX7 y SPARC.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

Diferenciación dirigida de células ES humanas a endodermo definitivo

Los cultivos de células ES humanas se diferencian aleatoriamente si se cultivan en condiciones que no mantienen activamente su estado indiferenciado. Esta diferenciación heterogénea da como resultado la producción de células de endodermo extraembrionarias compuestas de endodermo parietal y visceral (expresión de AFP, SPARC y SOX7), así como derivados ectodérmicos y mesodérmicos tempranos marcados por ZIC1 y Nestin (ectodermo) y expresión de Brachyury (mesodermo). El aspecto definitivo de las células del endodermo no se ha examinado ni especificado por falta de marcadores de anticuerpos específicos en cultivos de células ES. Como tal, y por defecto, la producción de endodermo definitiva temprana en cultivos de células ES no ha sido bien estudiada. Como los reactivos de anticuerpos satisfactorios para las células de endodermo definitivas no han estado disponibles, la mayor parte de la caracterización se ha centrado en el ectodermo y el endodermo extraembrionario. En general, hay un número significativamente mayor de tipos de células extraembrionarias y neuroectodérmicas en comparación con células de endodermo definitivas SOX17^{hi} en cultivos de células ES diferenciados aleatoriamente.

A medida que las colonias de hESC no diferenciadas se expanden en un lecho de alimentadores de fibroblastos, las células en los bordes de la colonia adquieren morfologías alternativas que son distintas de las células que residen en el interior de la colonia. Muchas de estas células del borde externo se pueden distinguir por su morfología del cuerpo celular menos uniforme y más grande y por la expresión de niveles más altos de OCT4. Se ha descrito que a medida que las células ES comienzan a diferenciarse, alteran los niveles de expresión de OCT4 hacia arriba o hacia abajo en relación con las células ES no diferenciadas. La alteración de los niveles de OCT4 por encima o por debajo del umbral indiferenciado puede significar las etapas iniciales de diferenciación lejos del estado pluripotente.

Cuando se examinaron colonias indiferenciadas por inmunocitoquímica SOX17, ocasionalmente se detectaron pequeños grupos de 10-15 células de células positivas para SOX17 en ubicaciones aleatorias en la periferia y en las uniones entre colonias hESC indiferenciadas. Como se señaló anteriormente, estos bolsillos dispersos de los bordes exteriores de las colonias parecían ser algunas de las primeras células en diferenciarse de la morfología clásica de las células ES a medida que la colonia se expandía en tamaño y se volvía más llena. Las colonias más pequeñas e indiferenciadas más pequeñas (<1 mm; 4-5 días de edad) no mostraron células positivas para SOX17 dentro o en los bordes de las colonias, mientras que las colonias más grandes y viejas (1-2 mm de diámetro, > 5 días de edad) tenían parches aislados esporádicos de Células positivas para SOX17, negativas para AFP en la periferia de algunas colonias o en regiones interiores al borde que no mostraban la morfología clásica de hESC descrita anteriormente. Dado que este fue el primer desarrollo de un anticuerpo SOX17 eficaz, las células endodermo definitivas generadas en tales cultivos de células ES "indiferenciadas" tempranas nunca se han demostrado previamente.

Con base en las correlaciones negativas de los niveles de expresión del gen SOX17 y SPARC por Q-PCR, la gran mayoría de estas células positivas para SOX17 y AFP negativas serán negativas para los marcadores de endodermo parietal mediante el etiquetado conjunto de anticuerpos. Esto se demostró específicamente para las células de endodermo parietal que expresan TM como se muestra en las Figuras 15A-B. La exposición a los factores nodales activina A y B resultó en una disminución dramática en la intensidad de la expresión TM y el número de células TM positivas. Mediante el triple etiquetado utilizando anticuerpos SOX17, AFP y TM en un cultivo tratado con activina, se observaron grupos de células positivas para SOX17 que también fueron negativas para AFP y TM (Figuras 16A-D). Estas son las primeras demostraciones celulares de células de endodermo definitivas SOX17- positivas en cultivos diferenciados de hESC (Figuras 16A-D y 17).

Con el anticuerpo SOX17 y las herramientas Q-PCR descritas anteriormente, hemos explorado una serie de procedimientos capaces de programar eficientemente hESCs para convertirse en células de endodermo definitivas SOX17^{hi}/ AFP^{lo} / SPARC / TM^{lo}. Aplicamos una variedad de protocolos de diferenciación destinados a aumentar el número y la capacidad proliferativa de estas células, medida a nivel de población mediante Q-PCR para la expresión del gen SOX17 y a nivel de células individuales mediante el marcado de anticuerpos de la proteína SOX17.

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

Como se muestra en la Figura 19, la adición de activina A a 100 ng/ml dio como resultado una inducción de 19 veces de la expresión del gen SOX17 frente a hESC no diferenciadas en el día 4 de diferenciación. Agregar activina B, un segundo miembro de la familia de activina, junto con activina A, resultó en una inducción de 37 veces sobre hESC indiferenciadas para el día 4 del tratamiento combinado con activina. Finalmente, al agregar un tercer miembro de la familia TGFβ de los subgrupos Nodal / Activina y BMP, BMP4, junto con activina A y activina B, aumentó la inducción de pliegues a 57 veces la de hESC indiferenciados (Figura 19). Cuando se comparó la inducción de SOX17 con activinas y BMP a sin controles de medio factor, se produjeron inducciones de 5, 10 y 15 veces en el punto de tiempo de 4 días. A los cinco días de tratamiento triple con activinas A, B y BMP, se indujo SOX17 más de 70 veces más que las hESC. Estos datos indican que dosis más altas y tiempos de tratamiento más largos de los miembros de la familia Nodal / activina TGFβ dan como resultado una mayor expresión de SOX17.

Las moléculas nodales y relacionadas activina A, B y BMP facilitan la expresión de SOX17 y la formación definitiva de endodermo *in vivo* o *in vitro*. Además, la adición de BMP da como resultado una inducción mejorada de SOX17

posiblemente a través de la inducción adicional de Cripto, el correceptor nodal.

Hemos demostrado que la combinación de las activinas A y B junto con BMP4 produce aumentos aditivos en la inducción de SOX17 y, por lo tanto, en la formación definitiva de endodermo. La adición de BMP4 durante períodos prolongados (> 4 días), en combinación con activina A y B, puede inducir SOX17 en el endodermo parietal y visceral, así como en el endodermo definitivo. En algunas realizaciones de la presente invención, por lo tanto, es valioso eliminar BMP4 del tratamiento dentro de los 4 días posteriores a la adición.

Para determinar el efecto del tratamiento con el factor TGF β a nivel celular individual, se examinó un curso de tiempo de la adición del factor TGF β usando el marcaje de anticuerpos SOX17. Como se mostró previamente en las Figuras 10A-F, hubo un aumento dramático en el número relativo de células marcadas con SOX17 con el tiempo. La cuantificación relativa (Figura 20) muestra un aumento de más de 20 veces en las células marcadas con SOX17. Este resultado indica que tanto el número de células como el nivel de expresión del gen SOX17 están aumentando con el tiempo de exposición al factor TGF β . Como se muestra en la Figura 21, después de cuatro días de exposición a Nodal, activina A, activina B y BMP4, el nivel de inducción de SOX17 alcanzó 168 veces más que las hESC no diferenciadas. La Figura 22 muestra que el número relativo de células positivas para SOX17 también fue sensible a la dosis. Las dosis de activina A de 100 ng/ml o más fueron capaces de inducir potentemente la expresión del gen SOX17 y el número de células.

Además de los miembros de la familia TGF β , la familia de moléculas Wnt puede desempeñar un papel en la especificación y/o mantenimiento del endodermo definitivo. El uso de moléculas Wnt también fue beneficioso para la diferenciación de hESC a endodermo definitivo, como lo indica el aumento de la expresión del gen SOX17 en muestras que fueron tratadas con activinas más Wnt3a sobre las de activinas solas (Figura 23).

Todos los experimentos descritos anteriormente se realizaron utilizando un medio de cultivo de tejidos que contenía suero al 10% con factores añadidos. Sorprendentemente, descubrimos que la concentración de suero tenía un efecto sobre el nivel de expresión de SOX17 en presencia de activinas añadidas como se muestra en las Figuras 24A-C. Cuando los niveles séricos se redujeron del 10% al 2%, la expresión de SOX17 se triplicó en presencia de las activinas A y B.

Finalmente, demostramos que la activina indujo división de las células SOX17⁺ en cultivo como se muestra en las Figuras 25A-D. Las flechas muestran células marcadas con SOX17 / PCNA / DAPI que están en mitosis como lo demuestra el patrón de placa mitótica marcada con PCNA / DAPI y el perfil mitótico de contraste de fase.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

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

Como se describió anteriormente, se puede inducir a las hESC a diferenciarse en la capa germinal del endodermo definitivo mediante la aplicación de citocinas de la familia TGF β y más específicamente de la subfamilia activina / ganglionar. Además, hemos demostrado que la proporción de suero fetal bovino (FBS) en el medio de cultivo de diferenciación afecta la eficiencia de la diferenciación definitiva del endodermo de las hESC. Este efecto es tal que a una concentración dada de activina A en el medio, niveles más altos de FBS inhibirán la diferenciación máxima al endodermo definitivo. En ausencia de activina A exógena, la diferenciación de hESC en el linaje de endodermo definitivo es muy ineficiente y la concentración de FBS tiene efectos mucho más leves en el proceso de diferenciación de hESCs.

En estos experimentos, las hESC se diferenciaron al crecer en medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA; cat # 61870-036) suplementado con 0.5%, 2.0% o 10% de FBS y con o sin 100 ng/ml de activina A durante 6 días. Además, también se usó un gradiente de FBS que varía de 0.5% a 2.0% durante los primeros tres días de diferenciación junto con 100 ng/ml de activina A. Después de los 6 días, se recolectaron muestras replicadas de cada condición de cultivo y se analizaron para la expresión genética relativa por PCR cuantitativa en tiempo real. Las células restantes se fijaron para la detección inmunofluorescente de la proteína SOX17.

Los niveles de expresión de CXCR4 variaron dramáticamente a través de las 7 condiciones de cultivo utilizadas (Figura 26). En general, la expresión de CXCR4 fue alta en cultivos tratados con activina A (A100) y baja en aquellos que no recibieron activina A exógena (NF). Además, entre los cultivos tratados con A100, la expresión de CXCR4 fue más alta cuando la concentración de FBS fue más baja. Hubo una disminución notable en el nivel de CXCR4 en la condición de FBS al 10%, de modo que la expresión relativa estaba más en línea con las condiciones que no recibieron activina A (NF).

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

Los linajes de ectodermo y mesodermo se pueden distinguir del endodermo definitivo por su expresión de varios

marcadores. El mesodermo temprano expresa los genes Brachyury y MOX1, mientras que el neuroectodermo naciente expresa SOX1 y ZIC1. Las Figuras 28A-D demuestran que los cultivos que no recibieron activina A exógena se enriquecieron preferentemente para la expresión génica de mesodermo y ectodermo y que entre los cultivos tratados con activina A, la condición de FBS al 10% también tenía niveles aumentados de expresión de marcador de mesodermo y ectodermo. Estos patrones de expresión fueron inversos a los de CXCR4 e indicaron que CXCR4 no se expresó mucho en mesodermo o ectodermo derivado de hESC en este período de tiempo de desarrollo.

Durante el desarrollo de los mamíferos, también se produce la diferenciación temprana a linajes extraembrionarios. De particular relevancia aquí es la diferenciación del endodermo visceral que comparte la expresión de muchos genes en común con el endodermo definitivo, incluido SOX17. Para distinguir el endodermo definitivo del endodermo visceral extraembrionario, se debe examinar un marcador que sea distinto entre estos dos. SOX7 representa un marcador que se expresa en el endodermo visceral pero no en el linaje de endodermo definitivo. Por lo tanto, es probable que las condiciones de cultivo que exhiben una expresión sólida del gen SOX17 en ausencia de expresión de SOX7 contengan endodermo definitivo y no visceral. Se muestra en la Figura 28E que SOX7 se expresó altamente en cultivos que no recibieron activina A, SOX7 también exhibió una expresión aumentada incluso en presencia de activina A cuando se incluyó FBS al 10%. Este patrón es el inverso del patrón de expresión de CXCR4 y sugiere que CXCR4 no está altamente expresado en el endodermo visceral.

El número relativo de células SOX17 inmunorreactivas (SOX17⁺) presentes también se determinó en cada una de las condiciones de diferenciación mencionadas anteriormente. Cuando las hESC se diferenciaron en presencia de altas dosis de activina A y baja concentración de FBS (0.5% - 2.0%) SOX17⁺ las células se distribuyeron ubicuamente en todo el cultivo. Cuando se utilizó dosis altas de activina A, pero se incluyó FBS al 10% (v/v), las células SOX17⁺ aparecieron a una frecuencia mucho más baja y siempre aparecieron en grupos aislados en lugar de distribuirse uniformemente en todo el cultivo (Figuras 29A y C, así como B y E). Una disminución adicional en células SOX17⁺ se observó cuando no se usó activina A exógena. En estas condiciones, las células SOX17⁺ también aparecieron en grupos y estos grupos eran más pequeños y mucho más raros que los encontrados en el tratamiento con alto contenido de FBS y activina A alta (Figura 29 C y F). Estos resultados demuestran que los patrones de expresión de CXCR4 no solo corresponden a la expresión definitiva del gen del endodermo sino también al número de células de endodermo definitivo en cada condición.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

Las condiciones de diferenciación que enriquecen el endodermo definitivo aumentan la proporción de células positivas para CXCR 4

La dosis de activina A también afecta la eficiencia a la que se puede derivar el endodermo definitivo de hESCs. Este ejemplo de referencia demuestra que el aumento de la dosis de activina A aumenta la proporción de células CXCR4⁺ en el cultivo.

Las hESC se diferenciaron en medios RPMI suplementados con 0.5% -2% de FBS (aumentó de 0.5% a 1.0% a 2.0% durante los primeros 3 días de diferenciación) y 0, 10 o 100 ng/ml de activina A. Después de 7 días de diferenciación las células se disociaron en PBS sin Ca²⁺/ Mg²⁺ que contiene 2% de FBS y 2 mM (EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se filtraron a través de filtros de nylon de 35 µm, se contaron y se granularon. Los gránulos se resuspendieron en un pequeño volumen de 50% de suero humano / 50% de suero de burro normal y se incubaron durante 2 minutos en hielo para bloquear sitios de unión de anticuerpos no específicos. A esto, se añadió 1 µl de anticuerpo anti-CXCR4 de ratón (Abcam, cat # ab10403-100) por 50 µl (que contiene aproximadamente 10⁵ células) y el etiquetado se realizó durante 45 minutos en hielo. Las células se lavaron agregando 5 ml de PBS que contenía suero humano al 2% (tampón) y se sedimentaron. Se completó un segundo lavado con 5 ml de tampón, luego las células se resuspendieron en 50 µl de tampón por 10⁵ Células. Se añadió anticuerpo secundario (FTTC conjugado anti-ratón de burro; Jackson ImmunoResearch, cat # 715-096-151) a una concentración final de 5 µg / ml y se dejó etiquetar durante 30 minutos seguido de dos lavados en tampón como se indicó anteriormente. Las células fueron resuspendidas a 5x10⁶ células / ml en tampón y analizadas y clasificadas utilizando un FACS Vantage (Beckton Dickenson) por el personal de la instalación central de citometría de flujo (The Scripps Research Institute). Las células se recogieron directamente en tampón de lisis RLT (Qiagen) para el posterior aislamiento del ARN total para el análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real.

El número de células CXCR4⁺ determinadas por citometría de flujo se observó que aumentaban dramáticamente a medida que aumentaba la dosis de activina A en los medios de cultivo de diferenciación (Figuras 30A-C). Las células CXCR4⁺ fueron las que cayeron dentro de la puerta R4 y esta puerta se estableció usando un control secundario de solo anticuerpo para el cual el 0.2% de los eventos se ubicaron en la puerta R4. El número dramáticamente aumentado de células CXCR4⁺ se correlacionan con un aumento robusto en la expresión definitiva del gen del endodermo a medida que aumenta la dosis de activina A (Figuras 31A-D).

EJEMPLO DE REFERENCIA 9

El aislamiento de células positivas para CXCR4 enriquece la expresión definitiva del gen del endodermo y agota las células que expresan marcadores de mesodermo, ectodermo y endodermo visceral.

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

Los niveles relativos de expresión del gen CXCR4 aumentó dramáticamente con el aumento de la dosis de activina A (Figura 32). Esto se correlacionó muy bien con el aumento dependiente de la dosis de activina A de células CXCR4⁺ (Figuras 30A-C). También está claro que el aislamiento de células CXCR4⁺ de cada población representaron casi toda la expresión del gen CXCR4 en esa población. Esto demuestra la eficiencia del método FACS para recolectar estas células.

El análisis de expresión génica reveló que las células CXCR4⁺ contienen no solo la mayoría de la expresión del gen CXCR4, sino que también contienen la expresión del gen para otros marcadores de endodermo definitivo. Como se muestra en las Figuras 31A-D, las células CXCR4⁺ se enriquecieron aún más sobre la población madre A100 para SOX17, GSC, HNF3B y MIXL1. Además, la fracción CXCR4⁻ contenía muy poca expresión génica para estos marcadores de endodermo definitivos. Por otra parte, las poblaciones CXCR4⁺ y CXCR4⁻ mostraron el patrón inverso de expresión génica para marcadores de mesodermo, ectodermo y endodermo extraembrionario. Las Figuras 33A-D muestran que las células CXCR4⁺ se agotaron para la expresión génica de Brachyury, MOX1, ZIC1. y SOX7 en relación con la población progenitora A100. Esta población de padres A100 ya era baja en la expresión de estos marcadores en relación con la dosis baja o sin condiciones de activina A. Estos resultados muestran que el aislamiento de las células CXCR4⁺ de hESCs diferenciadas en presencia de alta activina A producen una población altamente enriquecida y con endodermo definitivo sustancialmente puro.

20 EJEMPLO DE REFERENCIA 10

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

Para confirmar la cuantificación de la proporción de células de endodermo definitivas presentes en un cultivo celular o población celular como se determinó anteriormente en este documento y como se determina en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 60/532,004, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2003, las células que expresan CXCR4 y otros marcadores de endodermo definitivo fueron analizadas por FACS.

Usando los métodos como los descritos en los ejemplos de referencia anteriores, las hESC se diferenciaron para producir endodermo definitivo. En particular, para aumentar el rendimiento y la pureza en la diferenciación de cultivos celulares, la concentración sérica del medio se controló de la siguiente manera: 0.2% de FBS en el día 1, 1.0% de FBS en el día 2 y 2.0% de FBS en los días 3-6. Los cultivos diferenciados se clasificaron por FACS usando tres epítopos de la superficie celular, E-Cadherina, CXCR4 y Trombomodulina. Las poblaciones de células clasificadas se analizaron luego por Q-PCR para determinar los niveles de expresión relativa de los marcadores de endodermo definitivo y extraembrionario, así como de otros tipos de células. Las células clasificadas por CXCR4 tomadas de cultivos óptimamente diferenciados dieron como resultado el aislamiento de células de endodermo definitivas que eran >98% puras.

La Tabla 2 muestra los resultados de un análisis de marcadores para un cultivo de endodermo definitivo que se diferenciaba de hESCs usando los métodos descritos en este documento.

Tabla 2

Composición de cultivos de endodermo definitivo

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

En particular, la Tabla 2 indica que las células positivas para CXCR4 y SOX17 (endodermo) comprendían del 70% al

80% de las células en el cultivo celular. De estas células que expresan SOX17, menos del 2% expresó TM (endodermo parietal) y menos del 1% expresó AFP (endodermo visceral). Después de restar la proporción de células TM-positivas y AFP-positivas (endodermo parietal y visceral combinado; 3% en total) de la proporción de células positivas SOX17 / CXCR4, se puede ver que aproximadamente 67% a aproximadamente 77% del cultivo celular fue endodermo definitivo. Aproximadamente el 10% de las células fueron positivas para E-Cadherina (ECAD), que es un marcador de hESC, y aproximadamente el 10-20% de las células eran de otros tipos de células.

Hemos descubierto que la pureza del endodermo definitivo en los cultivos celulares diferenciadores que se obtienen antes de la separación de FACS se puede mejorar en comparación con el procedimiento de suero bajo descrito anteriormente manteniendo la concentración de FBS en $\leq 0.5\%$ durante el procedimiento de diferenciación de 5-6 días. Sin embargo, mantener el cultivo celular a $\leq 0.5\%$ durante el procedimiento de diferenciación de 5-6 días también da como resultado un número reducido de células de endodermo definitivas totales que se producen.

Las células de endodermo definitivas producidas por los métodos descritos aquí se han mantenido y expandido en cultivo en presencia de activina durante más de 50 días sin diferenciación apreciable. En tales casos, la expresión de SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNP3 β se mantiene durante el período de cultivo. Además, TM, SPARC, OCT4, AFP, SOX7, ZIC1 y BRACH no se detectaron en estos cultivos. Es probable que tales células puedan mantenerse y expandirse en cultivo durante sustancialmente más de 50 días sin una diferenciación apreciable.

EJEMPLO DE REFERENCIA 11

Marcador adicional de células de endodermo definitivo

En el siguiente experimento, se aisló ARN de endodermo definitivo purificado y poblaciones de células madre embrionarias humanas. La expresión génica se analizó por análisis de chip génico del ARN de cada población purificada. Q-PCR también se realizó para investigar más a fondo 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 20% de reemplazo de suero KnockOut, 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante básico (bFGF), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina, amino ácidos no esenciales y penicilina / estreptomycin. Las hESC se diferenciaron en endodermo definitivo mediante cultivo durante 5 días en medio RPMI suplementado con 100 ng/ml de activina humana recombinante A, suero bovino fetal (FBS) y penicilina / estreptomycin. La concentración de FBS se varió cada día de la siguiente manera: 0.1% (primer día), 0.2% (segundo día), 2% (días 3-5).

Las células se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para obtener poblaciones purificadas de hESC y endodermo definitivo para el análisis de expresión génica. La inmuno-purificación se logró para hESCs usando el antígeno SSEA4 (R&D Systems, cat # FAB1435P) y para el endodermo definitivo usando CXCR4 (R&D Systems, cat # FAB170P). Las células se disociaron usando tripsina / EDTA (Invitrogen, cat # 25300-054), se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero humano al 2% y se resuspendieron en suero humano al 100% 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 de FACS se llevó a cabo en las instalaciones centrales del Instituto de Investigación Scripps utilizando un FACS Vantage (BD Biosciences). Las células se recogieron directamente en tampón de lisis RLT y RNeasy aisló el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen).

El ARN purificado se envió por duplicado al Análisis de Expresión (Durham, NC) para la generación de los datos del perfil de expresión utilizando la matriz Affymetrix, la plataforma y los conjuntos de oligonucleótidos de alta densidad U133 Plus 2.0. Los datos presentados son una comparación grupal que identifica genes expresados diferencialmente entre las dos poblaciones, hESCs y endodermo definitivo. Los genes que exhibieron un cambio ascendente robusto en el nivel de expresión sobre el encontrado en hESCs se seleccionaron como nuevos marcadores candidatos que son altamente característicos del endodermo definitivo. Los genes seleccionados se analizaron mediante Q-PCR, como se describió anteriormente, para verificar los cambios de expresión génica encontrados en el chip genético y también para investigar el patrón de expresión de estos genes durante un curso de tiempo de diferenciación de hESC.

Las Figuras 34A-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 de endodermo definitivas que expresan CXCR4 purificadas al final del procedimiento de diferenciación de cinco días (CXDE), y en hESC purificadas. Una comparación de las Figuras 34C y GM demuestra que los seis genes marcadores, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1, exhiben un patrón de expresión que es casi idéntico entre sí y que también es idéntico al patrón de expresión de CXCR4 y a la relación de SOX17 / SOX7. Como se describió anteriormente, SOX17 se expresa tanto en el endodermo definitivo como en el endodermo extraembrionario que expresa SOX7. Dado que SOX7 no se expresa en el endodermo definitivo, la relación de SOX17 / SOX7 proporciona una estimación confiable de la contribución definitiva del endodermo a la expresión de SOX17 observada en la población en su conjunto. La similitud de los paneles G-L y M con el panel C indica que FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 son marcadores probables de endodermo definitivo y que no se expresan significativamente en

células de endodermo extraembrionario.

Se apreciará que los resultados de Q-PCR descritos en este documento pueden confirmarse adicionalmente por ICC.

EJEMPLO DE REFERENCIA 12

El ácido retinoico y el FGF-10 inducen PDX1 específicamente en cultivos de endodermo definitivo

- 5 El siguiente experimento demuestra que AR y FGF-10 inducen la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivas.

Las células madre embrionarias humanas se cultivaron con o sin activinas durante cuatro días. En el día cuatro, se añadieron AR 1 μM y 50 ng/ml de FGF-10 al cultivo celular. Cuarenta y ocho horas después de la adición de AR / FGF-10, la expresión del gen marcador PDX1 y otros genes marcadores no específicos del endodermo del intestino anterior se cuantificaron mediante Q-PCR.

- 10 La aplicación de AR a las células de endodermo definitivas causó un aumento robusto en la expresión del gen PDX1 (ver Figura 35) sin aumentar la expresión de marcadores de expresión génica visceral (SOX7, AFP), neuronal (SOX1, ZIC1) o neuronal (NFM) (ver Figura 36A-F). La expresión del gen PDX1 se indujo a niveles aproximadamente 500 veces superiores a los observados en el endodermo definitivo después de 48 horas de exposición a AR 1 μM y 50 ng/ml de FGF-10. Además, estos resultados muestran que solo se produjo una inducción sustancial de PDX1, en cultivos celulares que se habían diferenciado previamente al endodermo definitivo (SOX17) como se indica por la expresión PDX1 160 veces mayor que se encuentra en los cultivos celulares tratados con activina en relación con aquellos cultivos que no recibieron activina antes de la aplicación de AR.

EJEMPLO DE REFERENCIA 13

- 20 **FGF-10 proporciona un aumento adicional en la expresión de PDX1 sobre AR solo**

Este ejemplo muestra que la combinación de AR y FGF-10 induce la expresión de PDX1 en mayor medida que el AR solo.

- 25 Como en el ejemplo de referencia anterior, se cultivaron hESC con o sin activinas durante cuatro días. El día cuatro, las células se trataron con uno de los siguientes: AR 1 μM solo; AR 1 μM en combinación con FGF-4 o FGF-10; o AR 1 μM en combinación con FGF-4 y FGF-10. La expresión de PDX1, SOX7 y NFM se cuantificó por Q-PCR noventa y seis horas después de AR o AR / FGF.

- 30 El tratamiento de los cultivos de hESC con activina seguido de ácido retinoico indujo un aumento de 60 veces en la expresión del gen PDX1. La adición de FGF-4 al tratamiento de AR indujo un poco más de PDX1 (aproximadamente 3 veces más que el AR solo). Sin embargo, al agregar FGF-10 y ácido retinoico juntos, la inducción de PDX1 aumentó aún más 60 veces sobre el AR solo (ver Figura 37A). Esta inducción PDX1 muy robusta fue mayor de 1400 veces mayor que sin tratamiento con activina o AR / FGF. Curiosamente, la adición de FGF-4 y FGF-10 simultáneamente abolió el efecto beneficioso del FGF-10, produciendo solo el modesto aumento de PDX1 atribuido a la adición de FGF-4.

- 35 La adición de combinaciones AR / FGF-4 o AR / FGF-10 no aumentó la expresión de genes marcadores no asociados con el endodermo del intestino anterior en comparación con las células no expuestas a combinaciones AR / FGF (ver Figura 37B-C).

EJEMPLO DE REFERENCIA 14

Dosis de ácido retinoico afecta la posición anterior-posterior (A-P) *In vitro*

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

Las células madre embrionarias humanas se cultivaron con o sin activinas durante cuatro días. El día cuatro, se añadió FGF-10 a 50 ng/ml al cultivo en combinación con AR a 0,04 μM , 0,2 μM o 1,0 μM . La Q-PCR cuantificó la expresión del gen marcador PDX1, así como otros marcadores no específicos para el endodermo del intestino anterior.

- 45 La adición de ácido retinoico a varias dosis, en combinación con FGF-10 a 50 ng/ml, indujo patrones de expresión génica diferencial que se correlacionan con patrones posicionales anterior-posteriores específicos. La dosis más alta de AR (1 μM) indujo preferentemente la expresión del marcador de endodermo anterior (HOXA3) y también produjo el aumento más robusto en PDX1 (Figura 38A-B). La dosis media de AR (0,2 μM) indujo marcadores de endodermo del intestino medio (CDX1, HOXC6) (ver Figura 38C y 41E), mientras que la dosis más baja de AR (0,04 μM) indujo preferentemente un marcador de endodermo del intestino posterior (HOXA13) (ver Figura 38D). La dosis de AR no tuvo esencialmente ningún efecto sobre la expresión relativa de marcadores neuronales (SOX1) o neuronales (NFM) (ver Figura 38F-G). Este ejemplo de referencia destaca el uso del AR como morfógeno *in vitro* y en particular como un morfógeno de derivados de endodermo de hESCs diferenciadoras.

EJEMPLO DE REFERENCIA 15**El uso del suplemento B27 mejora la expresión de PDX1**

La expresión de PDX1 en endodermo definitivo puede verse influenciada por el uso de una serie de factores y condiciones de crecimiento / diferenciación celular. En el siguiente experimento, mostramos que el uso del suplemento B27 mejora la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivas.

Se indujo a las células madre embrionarias humanas a diferenciarse al endodermo definitivo mediante el tratamiento de células hES no diferenciadas cultivadas en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón con altas dosis de activina A (100-200 ng/ml en 0.5-2% FBS / DMEM / F12) durante 4 días. El control sin activina A recibió 0.5-2% de FBS / DMEM / F12 sin activina A agregada. A los cuatro días, los cultivos no recibieron activina A en 2% de FBS (ninguno) y en 2% de reemplazo de suero (SR), o 50 ng/ml de activina A junto con 2 μ M de AR y 50 ng/ml de FGF-10 en 2% de FBS / DMEM / F12 (ninguno, + FBS, + B27) y de manera similar en 2% de reemplazo de suero (SR). El suplemento B27, (Gibco / BRL), se añadió como una dilución 1/50 directamente en FBS / DMEM / F12 al 2% (+ B27). Se tomaron muestras de células duplicadas para cada punto, y el ARN total se aisló y se sometió a Q-PCR como se describió anteriormente.

La Figura 39A-E muestra que el suplemento B27 sin suero proporcionó un beneficio adicional para la inducción de la expresión del gen PDX1 sin inducir un aumento en la expresión de genes marcadores no específicos para el endodermo del intestino anterior en comparación con dicha expresión del gen marcador en células cultivadas sin suero.

EJEMPLO DE REFERENCIA 16**Uso de activina B para mejorar la inducción de PDX1**

Este ejemplo de referencia muestra que el uso de activina B mejora la diferenciación de las células PDX1-negativas a las células PDX1-positivas en cultivos de células *in vitro*.

Se indujo a las células madre embrionarias humanas a diferenciarse al endodermo definitivo mediante el tratamiento de hESC no diferenciadas cultivadas en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón con altas dosis de activina A (50 ng/ml) en suero bajo / RPMI durante 6 días. La dosis de FBS fue de 0% en el día uno, 0.2% en el día dos y 2% en los días 3-6. El control negativo para la producción definitiva de endodermo (NF) recibió FBS / RPMI al 2% sin activina A añadida. Para inducir la expresión de PDX1, cada uno de los cultivos recibió ácido retinoico a 2 μ M en FBS / RPMI al 2% el día 6. Los cultivos tratados con activina A en los días uno a cinco recibieron diferentes combinaciones de dosificación de activina A y activina B o permanecieron en activina A sola a 50 ng/ml. El cultivo de control sin activina A (NF) no se proporcionó ni activina A ni activina B. Este tratamiento de AR / activina se llevó a cabo durante 3 días, momento en el que se midió la expresión del gen PDX1 por Q-PCR a partir de muestras de células duplicadas.

La Figura 40A muestra que la adición de activina B a dosis que oscilan entre 10-50 ng/ml (a10, a25 y a50) en presencia de 25 ng/ml (A25) o 50 ng/ml (A50) de activina A aumentó la Expresión de PDX1 al menos 2 veces sobre el cultivo que recibió solo activina A a 50 ng/ml. El aumento en PDX1 como resultado de la adición de activina B fue sin aumento en la expresión de HNF6 (ver Figura 40B), que es un marcador para el hígado y el páncreas en este momento en desarrollo. Este resultado sugiere que la proporción de células que se diferencian del páncreas se ha incrementado en relación con el hígado.

EJEMPLO DE REFERENCIA 17**Uso de dosis de suero para mejorar la inducción de PDX1**

La expresión de PDX1 en células de endodermo definitivas está influenciada por la cantidad de suero presente en el cultivo celular a lo largo del proceso de diferenciación. El siguiente experimento muestra que el nivel de suero en un cultivo durante la diferenciación de hESCs a endodermo definitivo PDX1-negativo tiene un efecto sobre la expresión de PDX1 durante la diferenciación adicional de estas células a endodermo positivo para PDX1.

Se indujo a las células madre embrionarias humanas a diferenciarse al endodermo definitivo mediante el tratamiento de hESC no diferenciadas cultivadas en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón con altas dosis de activina A (100 ng/ml) en suero bajo / RPMI durante 5 días. La dosis de FBS fue de 0.1% en el día uno, 0.5% en el día dos y 0.5%, 2% o 10% en los días 3-5. El control sin activina A (NF) recibió la misma dosis diaria de FBS / RPMI, pero sin activina A. La expresión de PDX1 se indujo a partir del día 6 mediante la adición de AR. Durante los días 6-7, los cultivos recibieron ácido retinoico a 2 μ M en 0.5% FBS / RPMI, 1 μ M el día 8 y 0.2 μ M el día 9-11. La activina A se redujo a 50 ng/ml durante el tratamiento con ácido retinoico y se dejó ausente del control sin activina A (NF).

La Figura 41A muestra que la dosificación de FBS durante el período de 3 días de inducción definitiva del endodermo (días 3, 4 y 5) tenía una capacidad duradera para cambiar la inducción de la expresión del gen PDX1 durante el tratamiento con ácido retinoico. Esto fue sin alteración significativa en el patrón de expresión de la expresión del gen ZIC1 (Figura 41B) o SOX7 (Figura 41C).

EJEMPLO DE REFERENCIA 18**Uso de medio condicionado para mejorar la inducción de PDX1**

También se estudiaron otros factores y condiciones de crecimiento que influyen en la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivas. El siguiente experimento muestra el efecto de los medios condicionados en la diferenciación de las células de endodermo definitivas PDX1-negativas a las células de endodermo PDX1-positivas.

Se indujo a las células madre embrionarias humanas a diferenciarse al endodermo definitivo mediante el tratamiento de hESC no diferenciadas cultivadas en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón con altas dosis de activina A (100 ng/ml) en suero bajo / RPMI durante 5 días. La dosis de FBS fue de 0.2% en el día uno, 0.5% en el día dos y 2% en los días 3-5.

Los cultivos de endodermo definitivos generados por 5 días de tratamiento con activina A se indujeron a diferenciarse para endodermo que expresa PDX1 mediante la adición de AR en FBS / RPMI al 2% que contiene activina A a 25 ng/ml durante cuatro días. El AR fue de 2 μ M durante los primeros dos días de adición, 1 μ M en el tercer día y 0,5 μ M en el cuarto día. Este medio base para la inducción de PDX1 se proporcionó fresco (2A25R) o después del acondicionamiento durante 24 horas por una de cuatro poblaciones celulares diferentes. Los medios condicionados (CM) se generaron a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFCM) o de hESC que se diferenciaron por primera vez durante 5 días por una de tres condiciones; i) 3% de FBS / RPMI (CM2), o ii) activina A (CM3) o iii) proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) (CM4). Los factores de activina A o BMP4 se proporcionaron a 100 ng/ml bajo el mismo régimen de dosificación de FBS descrito anteriormente (0,2%, 0,5%, 2%). Estos tres paradigmas de diferenciación diferentes producen tres poblaciones muy diferentes de células humanas por las cuales los medios de inducción PDX1 pueden ser condicionados. El 3% de FBS sin factor de crecimiento agregado (NF) produce una población heterogénea compuesta en gran parte de células extraembrionarias de endodermo, ectodermo y mesodermo. El cultivo tratado con activina A (A100) produce una gran proporción de endodermo definitivo y el cultivo tratado con BMP4 (B100) produce principalmente trofotodermo y algo de endodermo extraembrionario.

La Figura 42A muestra que PDX1 se indujo de manera equivalente en medios frescos y acondicionados durante los primeros dos días de tratamiento de AR. Sin embargo, al tercer día, la expresión de PDX1 había comenzado a disminuir en los medios nuevos y en los tratamientos con medios condicionados MEF. Las hESC diferenciadas produjeron medios condicionados que resultaron en mantenimiento o aumentos adicionales en la expresión del gen PDX1 a niveles 3 a 4 veces mayores que los medios frescos. El efecto de mantener una alta expresión de PDX1 en medios acondicionados con hESC se amplificó aún más el día cuatro del tratamiento de AR, alcanzando niveles de 6 a 7 veces más altos que en medios frescos. La Figura 42B muestra que los tratamientos con medios condicionados dieron como resultado niveles mucho más bajos de expresión del gen CDX1, un gen no expresado en la región del endodermo que expresa PDX1. Esto indica que la pureza general del endodermo que expresa PDX1 mejoró mucho tratando el endodermo definitivo con medios condicionados generados a partir de cultivos diferenciados de hESC.

La Figura 43 muestra que la expresión del gen PDX1 exhibió una respuesta de dosis positiva a la cantidad de medio acondicionado aplicado a las células de endodermo definitivas. El volumen total de medio agregado a cada placa fue de 5 ml y el volumen indicado (ver Figura 43) de medio acondicionado se diluyó en medio nuevo (A25R). Es de notar que solo 1 ml de medio acondicionado agregado a 4 ml de medio fresco todavía pudo inducir y mantener niveles de expresión PDX1 más altos que 5 ml de medio fresco solo. Esto sugiere que el efecto beneficioso de los medios condicionados para la inducción del endodermo que expresa PDX1 depende de la liberación de alguna sustancia o sustancias de las células en los medios condicionados y que esta (s) sustancia (s) aumenta la producción de endodermo que expresa PDX1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 19**Validación de anticuerpos que se unen a PDX1**

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

En un primer experimento, la unión del anticuerpo IgY anti-PDX1 (IgY α -PDX1) a PDX1 en lisados celulares se validó mediante análisis de transferencia Western. En este análisis, se comparó la unión del anticuerpo IgY α -PDX1 a 50 μ g de lisado celular total de fibroblastos humanos MDX12 o células MDX12 transfectadas 24 horas antes con un vector de expresión PDX1. Los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana mediante electroblotting y luego se sondearon con el antisuero primario IgY α -PDX1 seguido de anticuerpos secundarios anti-IgY (Rb α -IgY) de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Se aplicaron diferentes diluciones de anticuerpos primarios y secundarios a tiras separadas de la membrana en las siguientes combinaciones: A (dilución 500x de primaria, dilución 10,000x de secundaria), B (2,000x, 10,000x), C (500x, 40,000x), D (2,000x, 40,000), E (8,000x, 40,000x).

Se detectó la unión en células transfectadas con el vector de expresión PDX1 (PDX1-positivo) en todas las combinaciones de anticuerpos analizadas. La unión solo se observó en fibroblastos no transfectados (negativos para PDX1) cuando se usaron las concentraciones más altas de anticuerpos primarios y secundarios juntos (combinación

A). Dicha unión no específica se caracterizó por la detección de una banda adicional con un peso molecular ligeramente superior a PDX1 tanto en los fibroblastos transfectados como en los no transfectados.

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

Unión de los anticuerpos Rb α -PDX1 y α -EGFP co-localizados con expresión de GPP.

EJEMPLO DE REFERENCIA 20

Inmunocitoquímica del tejido pancreático humano

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

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

El análisis de las secciones pancreáticas humanas reveló la presencia de una fuerte tinción de los islotes de Langerhans. Aunque la señal PDX1 más fuerte apareció en los islotes (insulina positiva), también se observó una tinción débil en el tejido acinar (insulina negativa). La tinción conjunta de DAPI y PDX1 muestra que PDX1 estaba principalmente pero no exclusivamente localizado en el núcleo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 21

Inmunoprecipitación de PDX1 de células tratadas con ácido retinoico

Para confirmar aún más la expresión de PDX1 en células de endodermo definitivas que se han diferenciado en presencia de AR y la falta de PDX1 en células de endodermo definitivas que no se han diferenciado con AR, se usó un anticuerpo de conejo anti-PDX1 (Rb α -PDX1) para PDX1 inmunoprecipitado de células de endodermo definitivas tanto diferenciadas como no diferenciadas de AR. El AR inmunoprecipitado se detectó mediante análisis de transferencia Western usando anticuerpo IgY α -PDX1.

Para obtener lisados de células de endodermo definitivos indiferenciados y diferenciados para inmunoprecipitación, se trataron hESC durante 5 días con activina A a 100 ng/ml en suero bajo (endodermo definitivo) seguido de tratamiento con activina A a 50 ng/ml y 2 μ M AR todo trans durante dos días, 1 μ M por un día y 0.2 μ M por un día (endodermo del intestino anterior positivo para PDX1). Como control positivo, los lisados celulares también se prepararon a partir de células MS1-V (ATCC # CRL-2460) transfectadas con un vector de expresión PDX1. PDX1 se inmunoprecipitó añadiendo Rb α -PDX1 y anticuerpos secundarios específicos de conejo a cada lisado. El precipitado se cosechó por centrifugación. Los inmunoprecipitados se disolvieron en tampón que contenía SDS y luego se cargaron en un gel de poliacrilamida. Después de la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana mediante electroblotting, y luego se sondearon con el anticuerpo primario IgY α -PDX1 seguido de anticuerpos secundarios marcados Rb α -IgY.

Los inmunoprecipitados recolectados de las células de control positivo MS1-V, así como los del día 8 (línea d8, tres días después del inicio del tratamiento de AR) y el día 9 (línea d9, cuatro días después del inicio del AR), las células fueron positivas para la proteína de PDX1 (Figura 44). Los precipitados obtenidos de las células de endodermo definitivas indiferenciadas (es decir, las células del día 5 tratadas con activina A - designada (A) en la Figura 44) y las hESC indiferenciadas (es decir, las células del día 5 no tratadas - designadas como (NF) en la Figura 44) fueron PDX1-negativas.

EJEMPLO DE REFERENCIA 22

Generación de líneas hESC transgénicas del promotor PDX1-EGFP

Para utilizar el marcador PDX1 para el aislamiento celular, marcamos genéticamente las células PDX1-positivas del endodermo del intestino anterior con un gen indicador expresable. Este ejemplo de referencia describe la construcción de un vector que comprende un casete indicador que comprende un gen indicador bajo el control de la región reguladora PDX1. Este ejemplo de referencia también describe la preparación de una célula, tal como una célula

madre embrionaria humana, transfectada con este vector, así como una célula que tiene este casete indicador integrado en su genoma.

Las líneas celulares de endodermo definitivas que expresan PDX1 genéticamente etiquetadas con un gen indicador se construyeron colocando un gen indicador GFP bajo el control de la región reguladora (promotor) del gen PDX1. Primero, se generó una construcción de plásmido en la que la expresión de EGFP es impulsada por el promotor del gen PDX1 humano reemplazando el promotor CMV del vector pEGFP-N1 (Clontech) con la región de control PDX1 humana (Genbank Accession No. AF192496), que comprende un nucleótido secuencia que varía desde aproximadamente 4,4 kilobases pares (kb) upstream hasta aproximadamente 85 pares de bases (pb) downstream del sitio de inicio de la transcripción PDX1. Esta región contiene los elementos reguladores caracterizados del gen PDX1, y es suficiente para conferir el patrón de expresión PDX1 normal en ratones transgénicos. En el vector resultante, la expresión de EGFP es dirigida por el promotor PDX1. En algunos experimentos, este vector puede transfectarse en hESCs.

El casete promotor PDX1 / EGFP se cortó del vector anterior, y luego se subclonó en un vector de selección que contenía el gen de la neomicina fosfotransferasa bajo el control del promotor fosfoglicerato quinasa-1. El casete de selección estaba flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa flp para permitir la extracción del casete. Este vector de selección se linealizó y luego se introdujo en hESC utilizando métodos estándar de lipofección. Después de 10-14 días de selección en G418, se aislaron y expandieron clones de hESC transgénicos no diferenciados.

EJEMPLO DE REFERENCIA 23

Aislamiento del endodermo del intestino anterior PDX1-positivo

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

Las hESC transgénicas de promotor PDX1 / EGFP se diferenciaron durante 5 días en medios que contienen activina A seguidos de dos días en medios que comprenden activina A y AR. Las células diferenciadas se cosecharon luego por digestión con tripsina y se clasificaron en una FACS Diva Becton Dickinson directamente en tampón de lisis de ARN o PBS. Se tomó una muestra de células vivas únicas sin compuerta para EGFP (Live) y las células vivas únicas se seleccionaron en poblaciones positivas para EGFP (GFP) y negativas para GFP (Neg). En un experimento, la fracción positiva de EGFP se separó en dos poblaciones de igual tamaño según la intensidad de fluorescencia (Hi y Lo).

Después de la clasificación, las poblaciones celulares se analizaron tanto por Q-PCR como por inmunocitoquímica. Para el análisis Q-PCR, el ARN se preparó usando columnas Qiagen RNeasy y luego se convirtió en cDNA. Q-PCR se realizó como se describió anteriormente. Para el análisis inmunocitoquímico, las células se clasificaron en PBS, se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% y se adhirieron a portaobjetos de vidrio usando una centrífuga Cytospin. Los anticuerpos primarios contra la citoqueratina19 (KRT19) fueron de Chemicon; el factor nuclear de hepatocitos 3 beta (HNF3β) de Santa Cruz; el transportador de glucosa 2 (GLUT2) de los sistemas de I + D. Se usaron anticuerpos secundarios apropiados conjugados con FITC (verde) o Rhodamine (Rojo) para detectar la unión de los anticuerpos primarios.

En la Figura 45 se muestra un tipo típico de células diferenciadas de FACS. El porcentaje de células PDX1-positivas aisladas en este ejemplo de referencia fue aproximadamente del 7%, que varió dependiendo de la eficiencia de diferenciación de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%.

Las células clasificadas se sometieron adicionalmente a análisis Q-PCR. Las células diferenciadas mostraron una correlación de la fluorescencia de EGFP con la expresión del gen PDX1 endógeno. En comparación con las células no fluorescentes, las células positivas para EGFP mostraron un aumento de más de 20 veces en los niveles de expresión de PDX1 (Figura 46). La separación de las células de intensidad EGFP alta y baja indicó que el nivel de expresión de EGFP se correlacionaba con el nivel de expresión de PDX1 (Figura 47). Además del análisis de marcador PDX1, las células clasificadas se sometieron a análisis Q-PCR de varios genes que se expresan en endodermo pancreático. Los productos de cada uno de estos genes marcadores (NKX2.2, GLUT2, KRT19, HNF4α y HNF3β) se enriquecieron en la fracción positiva de EGFP (Figuras 48A-E). En contraste, los marcadores neurales ZIC1 y GFAP no se enriquecieron en células que expresan EGFP clasificadas (Figuras 49A y B).

Por inmunocitoquímica, se vio que prácticamente todas las células PDX1-positivas aisladas expresaban KRT19 y GLUT2. Este resultado se espera para las células del linaje del endodermo pancreático. Muchas de estas células también fueron positivas para HNF3β por tinción de anticuerpos.

Tal como se utiliza en las reivindicaciones a continuación y a lo largo de esta divulgación, por la frase "que consiste esencialmente en" se entiende todos los elementos enumerados después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son obligatorios o mandatorios, 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

Numerosas publicaciones bibliográficas y referencias de patentes han sido citadas en la presente solicitud de patente.

Para algunas referencias, la cita completa está en el cuerpo del texto. Para otras referencias, la cita en el cuerpo del texto es por autor y año, la cita completa es la siguiente:

- 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.
- Alexander, J., and Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol* 9, 1147-1157.
- 10 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.
- 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.
- 15 Beddington, R. S., Rashbass, P., and Wilson, V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl*, 157-165.
- 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.
- 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.
- 20 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.
- 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 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.
- 40 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.
- 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.
- 45 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.

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 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.
- 15 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.
- 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 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.
- 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.
- 25 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.
- 30 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.
- Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-148.
- 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.
- 35 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.
- 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.
- 40 Rohr, K. B., Schulte-Merker, S., and Tautz, D. (1999). Zebrafish zic1 expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling. *Mech Dev* 85, 147-159.
- Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 589-621.
- Schoenwolf, G. C., and Smith, J. L. (2000). Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates. *Methods Mol Biol* 135, 113-125.
- 45 Shambloott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., 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., Korbutt, 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.
- 5 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., Korbutt, 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.
- 10 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.
- 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.
- 15 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.
- 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.
- 20 Technau, U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* 23, 788-794.
- 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 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.
- 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.
- 30 . 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.
- 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.
- 35 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.
- 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.
- 40 Willison, K. (1990). The mouse Brachyury gene and mesoderm formation. *Trends Genet* 6, 104-105.
- Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56.
- 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cytera, Inc., D'Amour, Kevin Allen, Agulnick, Alan D., Eliazer, Susan, Baetge, Emmanuel E.

<120> ENDODERMO QUE EXPRESA PDX1

5 <130> CYTHERA. 043VPC

<150> US 11/021,618

<151> 2004-12-23

<150> US 60/587,942

<151> 2004-07-14

10 <150> US 60/586,566

<151> 2004-07-09

<150> US 60/566,293

<151> 2004-04-24

<160> 2

15 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1245

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

```

atgagcagcc cggatgcggg atacgccagt gacgaccaga gccagaccca gagcgcgctg 60
ccccgcgtga tggccggggt gggcccttgc ccctgggccc agtcgctgag ccccatcggg 120
gacatgaagg tgaaggcgga ggcgcggcgc aacagcggag caccggccgg ggccgcgggc 180
cgagccaagg gcgagtcccg tatccggcgg ccgatgaacg ctttcatggt gtgggctaag 240
gacgagcgca agcggctggc gcagcagaat ccagacctgc acaacgcgga gttgagcaag 300
atgctgggca agtcgtggaa ggcgctgacg ctggcggaga agcggccctt cgtggaggag 360
gcagagcggc tgcgcgtgca gcacatgcag gaccaccca actacaagta ccggccgcgg 420
cggcgcaagc aggtgaagcg gctgaagcgg gtggaggggc gcttcctgca cggcctggct 480
gagccgcagg cggccgcgct gggcccccag ggcggccgcg tggccatgga cggcctgggc 540
ctccagttcc ccgagcaggg cttccccgcc ggcccgcgcg tgctgcctcc gcacatgggc 600
ggccactacc gcgactgcca gagtctgggc gcgcctccgc tcgacggcta cccgttgccc 660
acgcccga ca cgtccccgct ggacggcgtg gaccccgacc cggctttctt cgcgcggcgg 720
atgcccgggg actgcccggc ggccggccacc tacagctacg cgcaggtctc ggactacgct 780
ggccccccgg agcctcccg cggctccatg cacccccga ctcggccaga gcccgcggt 840
ccctcgattc cgggcctcct ggccgcaacc agcgccttc acgtgtacta cggcgcgatg 900
ggctcgcccc gggcgggcgg cgggcgcggc ttccagatgc agccgcaaca ccagcaccag 960
caccagcacc agcaccaccc cccgggcccc ggacagccgt cggccctcc ggaggcactg 1020
ccctgcccgg acggcacgga cccagtcag cccgcccagc tcctcgggga ggtggaccgc 1080
acggaatttg aacagtatct gcacttcgtg tgcaagcctg agatgggcct cccctaccag 1140
gggcatgact ccggtgtgaa tctccccgac agccacgggg ccatttcctc ggtgggtgtc 1200
gacgccagct ccgcggtata ttactgcaac tatcctgacg tgtga 1245

```

25 <210> 2

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una población celular que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1, dicho método comprende los pasos de:
cultivar una población de células humanas pluripotentes en presencia de activina A exógena; y
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en donde la activina A exógena se elimina de la población celular antes de cultivar la población celular en presencia de ácido retinoico.
- 10 3. Un cultivo celular que comprende células humanas de endodermo definitivas negativas para PDX1 y activina A, que comprende además células humanas de endodermo positivas para PDX1, en el que dichas células humanas de endodermo positivas para PDX1 son células multipotentes que pueden diferenciarse en células, tejidos u órganos derivados de la porción anterior del tubo digestivo.
- 15 4. El cultivo celular según la reivindicación 3, que comprende además ácido retinoico.
- 20 5. El método o cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que dichas células humanas de endodermo positivo para PDX1 son células humanas de endodermo del intestino anterior positivas para PDX1.
- 25 6. El método o cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 5, en el que dicha población celular o cultivo celular que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1 comprende al menos 5%, al menos 10%, al menos 25% o al menos 50 % de células humanas de endodermo positivas para PDX1.
- 30 7. El cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la expresión de PDX1 es mayor que la expresión de un marcador seleccionado del grupo que consiste en alfa-fetoproteína (AFP), SOX7, SOX1, ZIC1 y NFM en al menos 2% de las células humanas, según lo determinado por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa.
- 35 8. El cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 5 y 7, en el que dicha población celular que comprende células humanas de endodermo positivas para PDX1 comprende además células alimentadoras humanas, en donde al menos el 2% de las células humanas distintas de dichas células alimentadoras humanas son células de endodermo PDX1-positivas.
- 40 9. El cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que dicha población celular comprende además células seleccionadas del grupo que consiste en células endodérmicas viscerales, células endodérmicas parietales, células neurales y una combinación de dichas células en una cantidad inferior al 5% del número total de células presentes en la población celular.
- 10 10. El cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que dicha población celular comprende además un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en FGF-10, FGF-4, activina B y combinaciones de dichos factores.
- 15 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o 5 a 6, que comprende además proporcionar activina B a dichas células humanas pluripotentes.
- 20 12. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una célula de dicha población de células pluripotentes comprende al menos una copia de un ácido nucleico bajo el control del promotor PDX1, dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) o un fragmento del mismo biológicamente activo.

Diferenciación de Células β por pasos

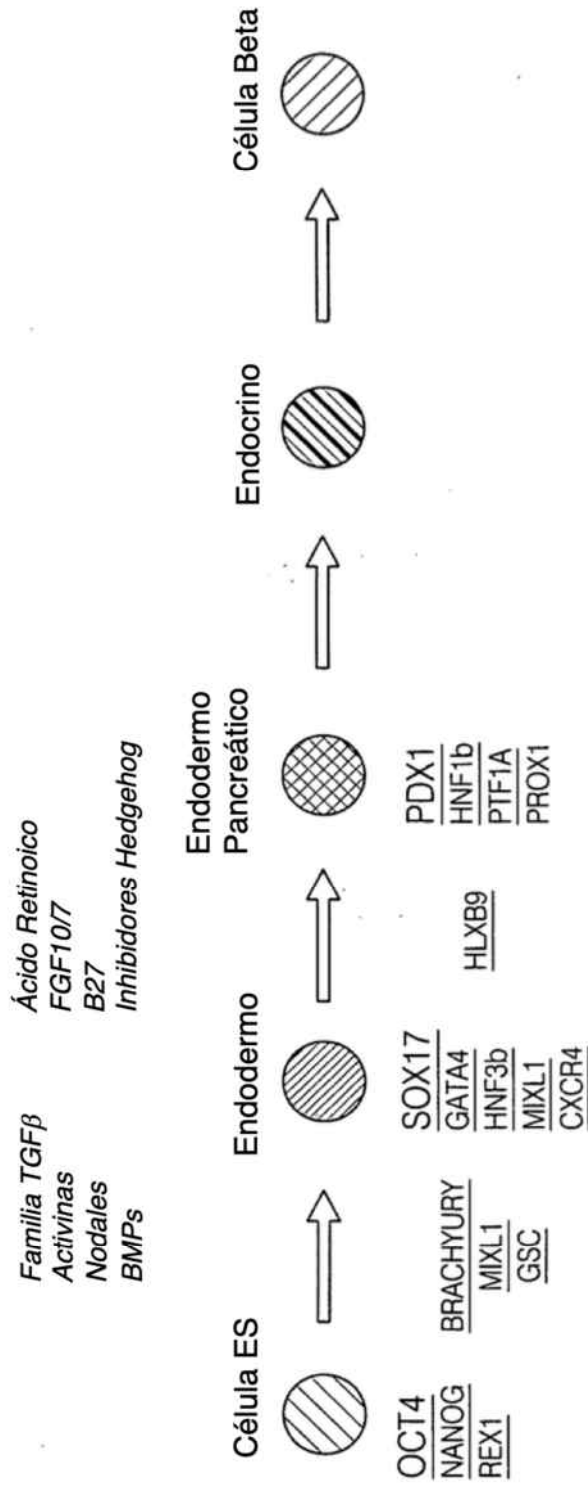


FIG. 1

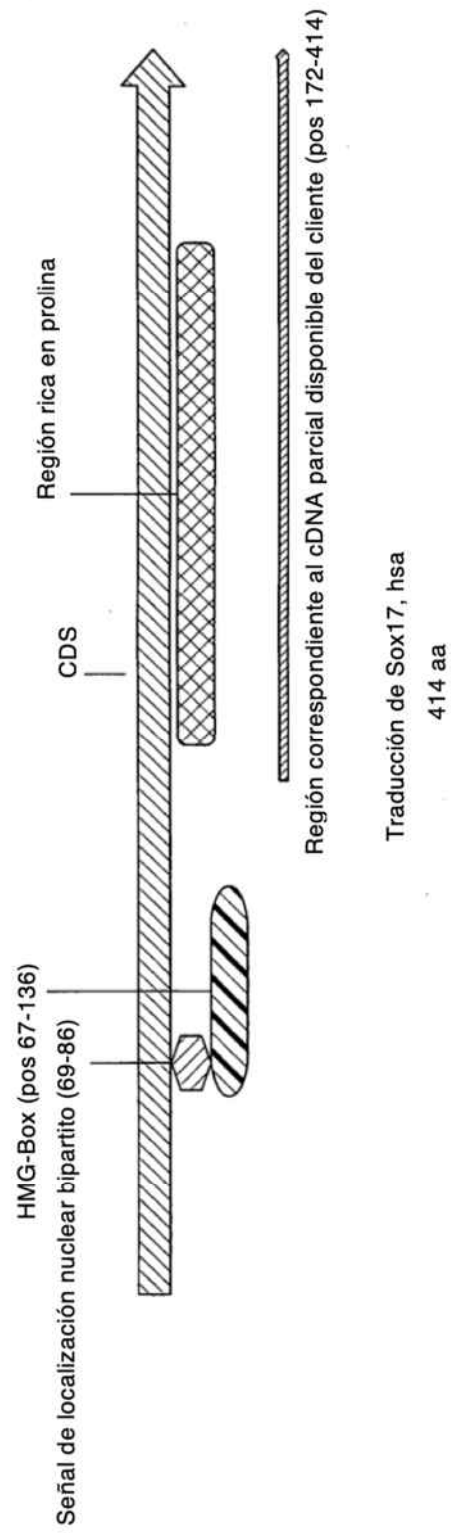


FIG. 2

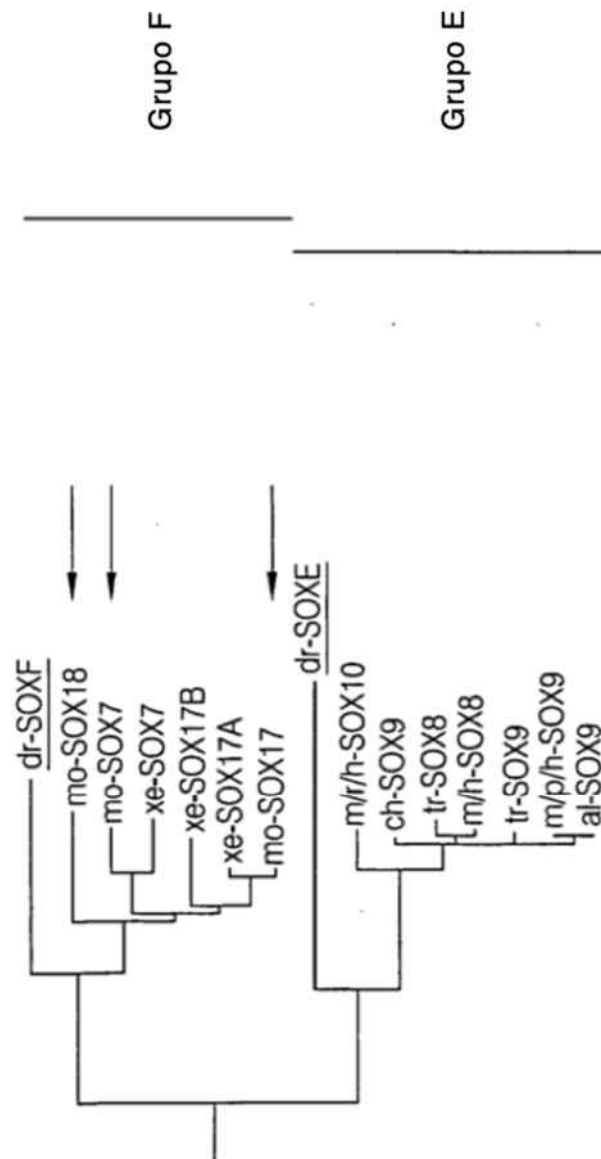


FIG. 3

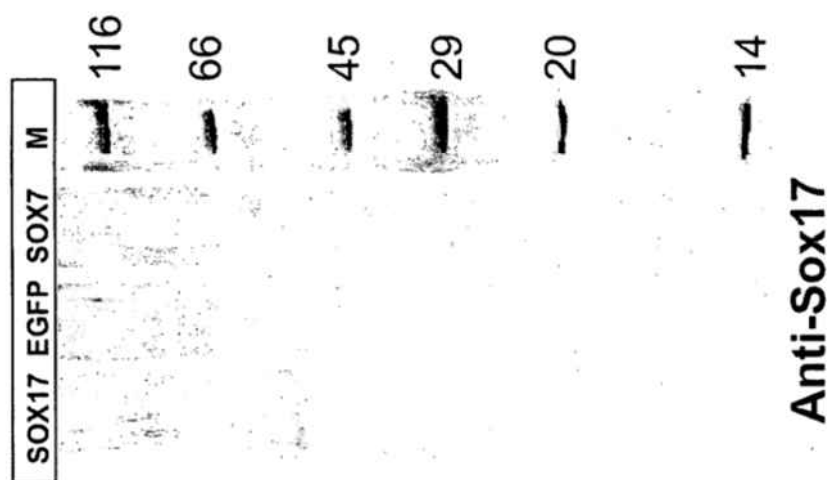


FIG. 4

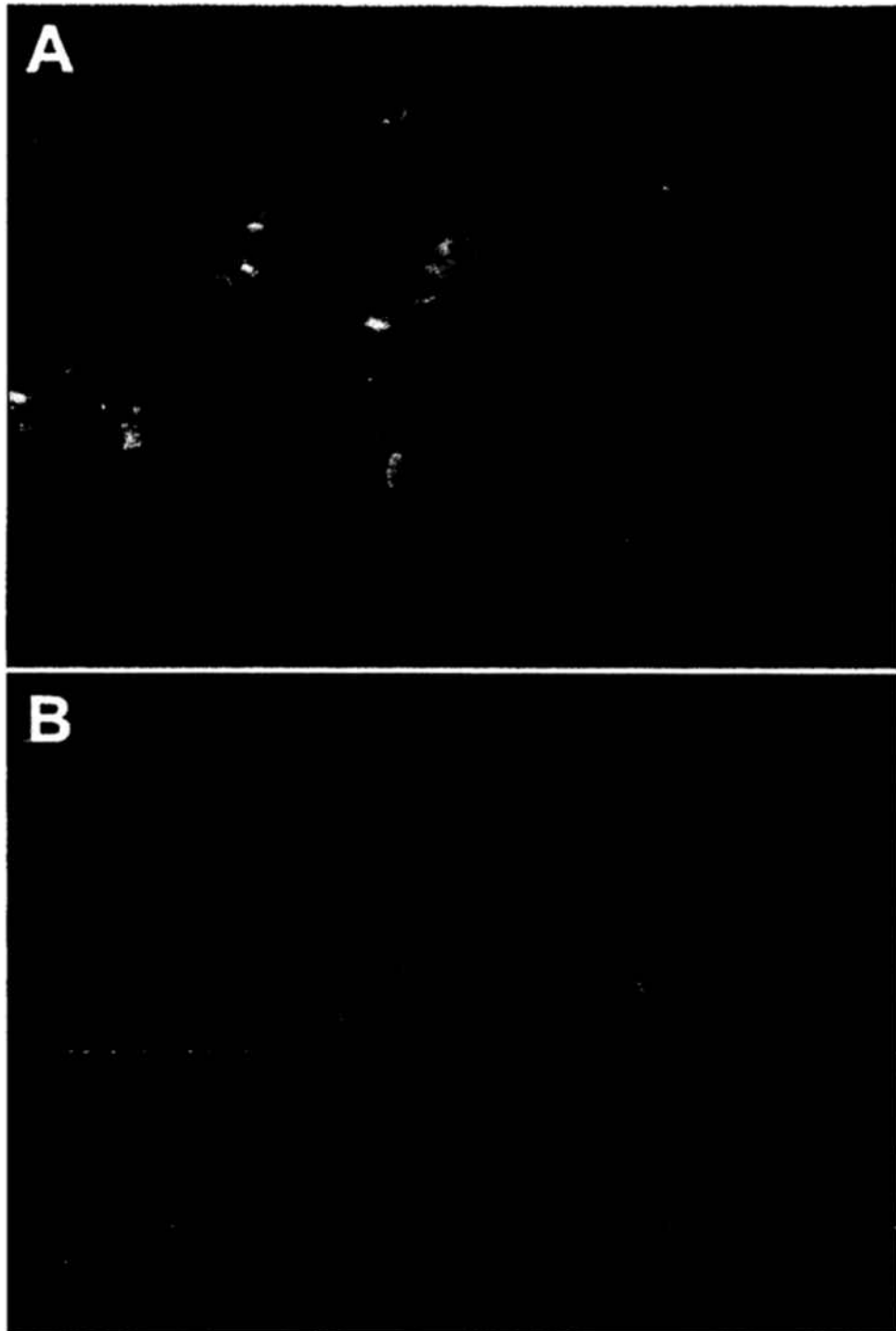


FIG. 5

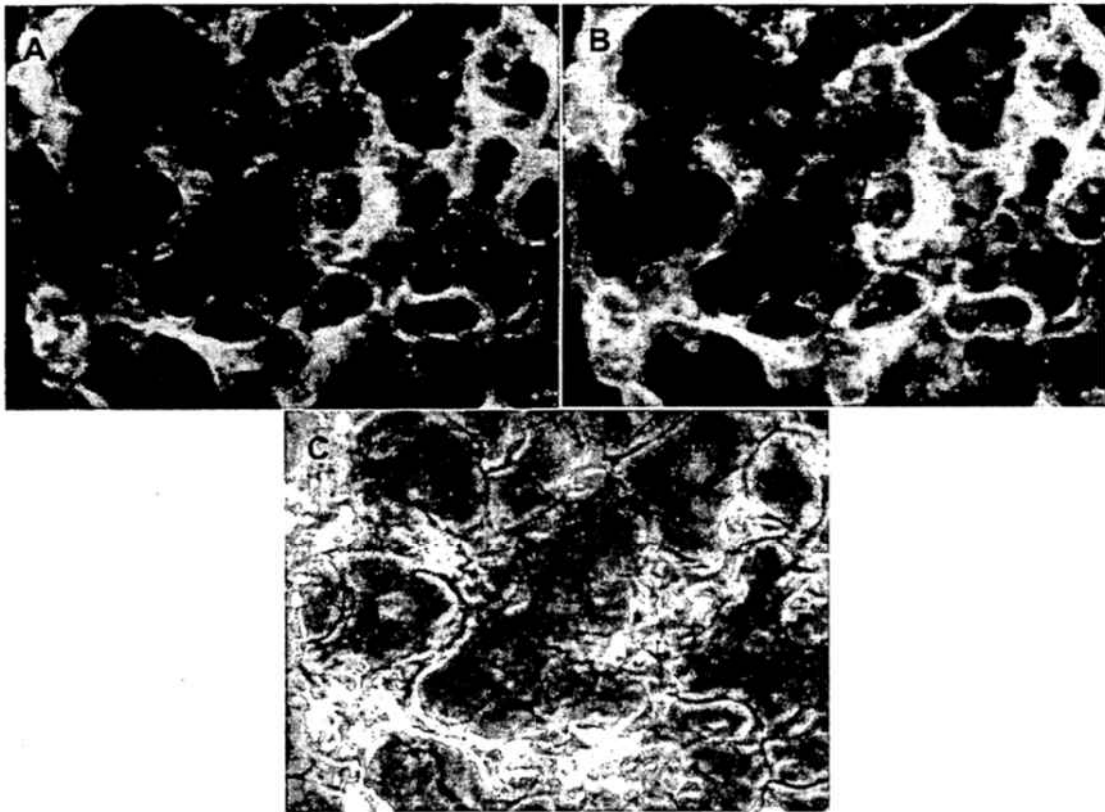


FIG. 6

Células positivas para anti-Sox17

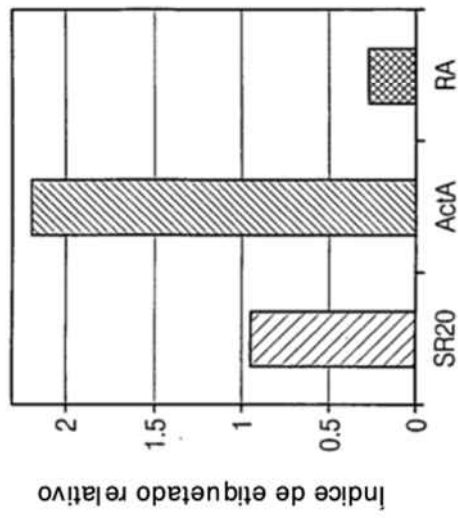


FIG. 7B

Expresión del gen Sox17

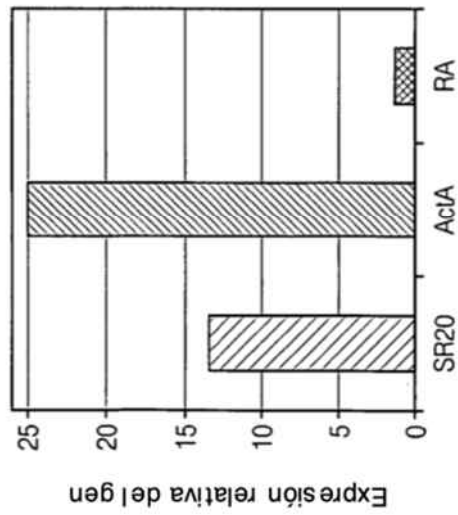


FIG. 7A

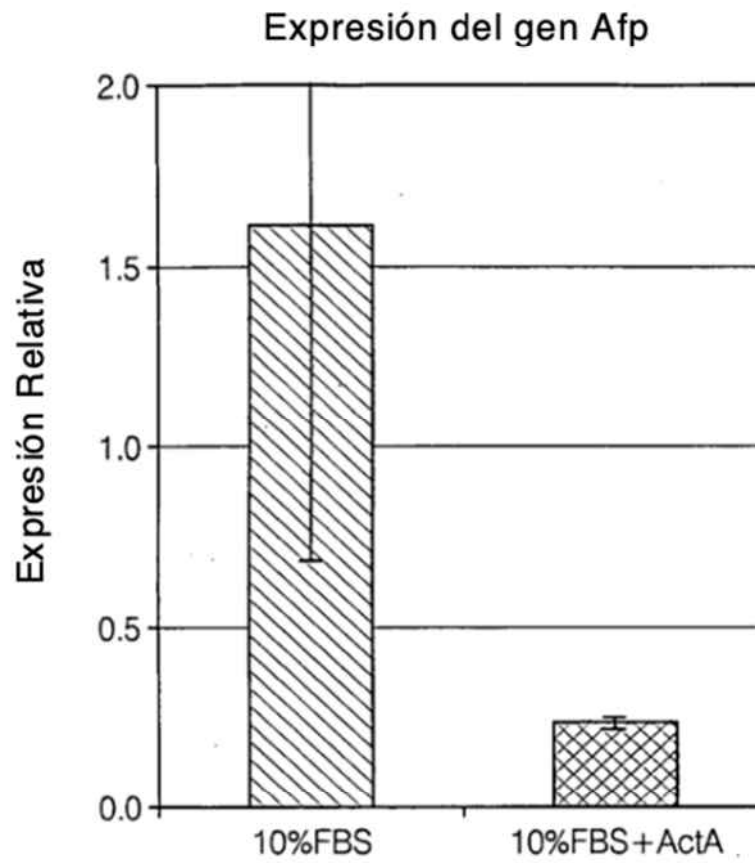


FIG. 8A

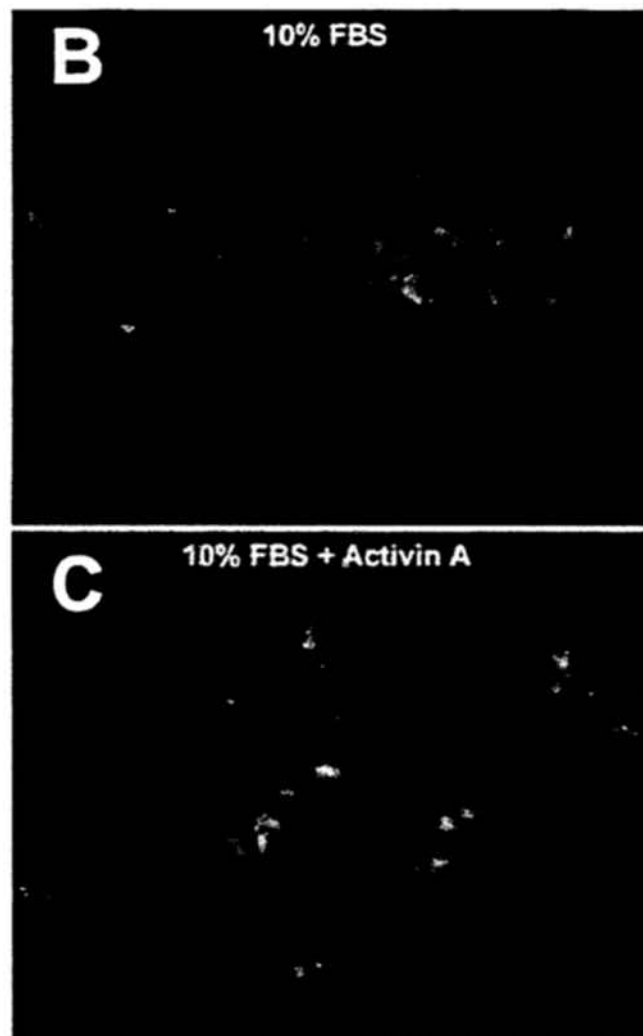


FIG. 8

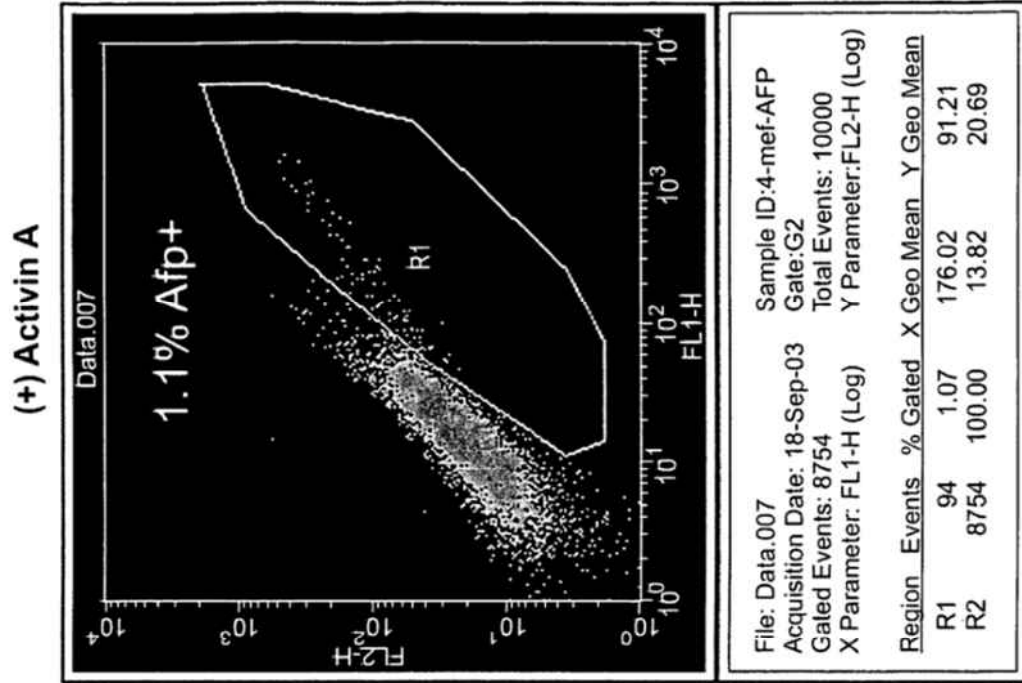


FIG. 9B

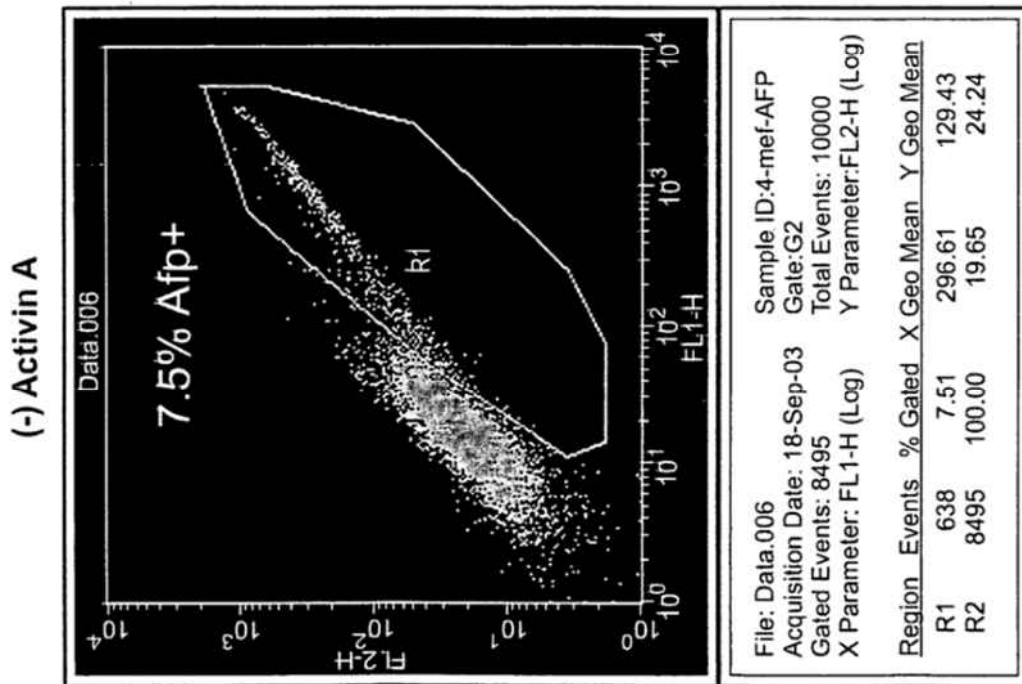


FIG. 9A

6.8-fold
difference

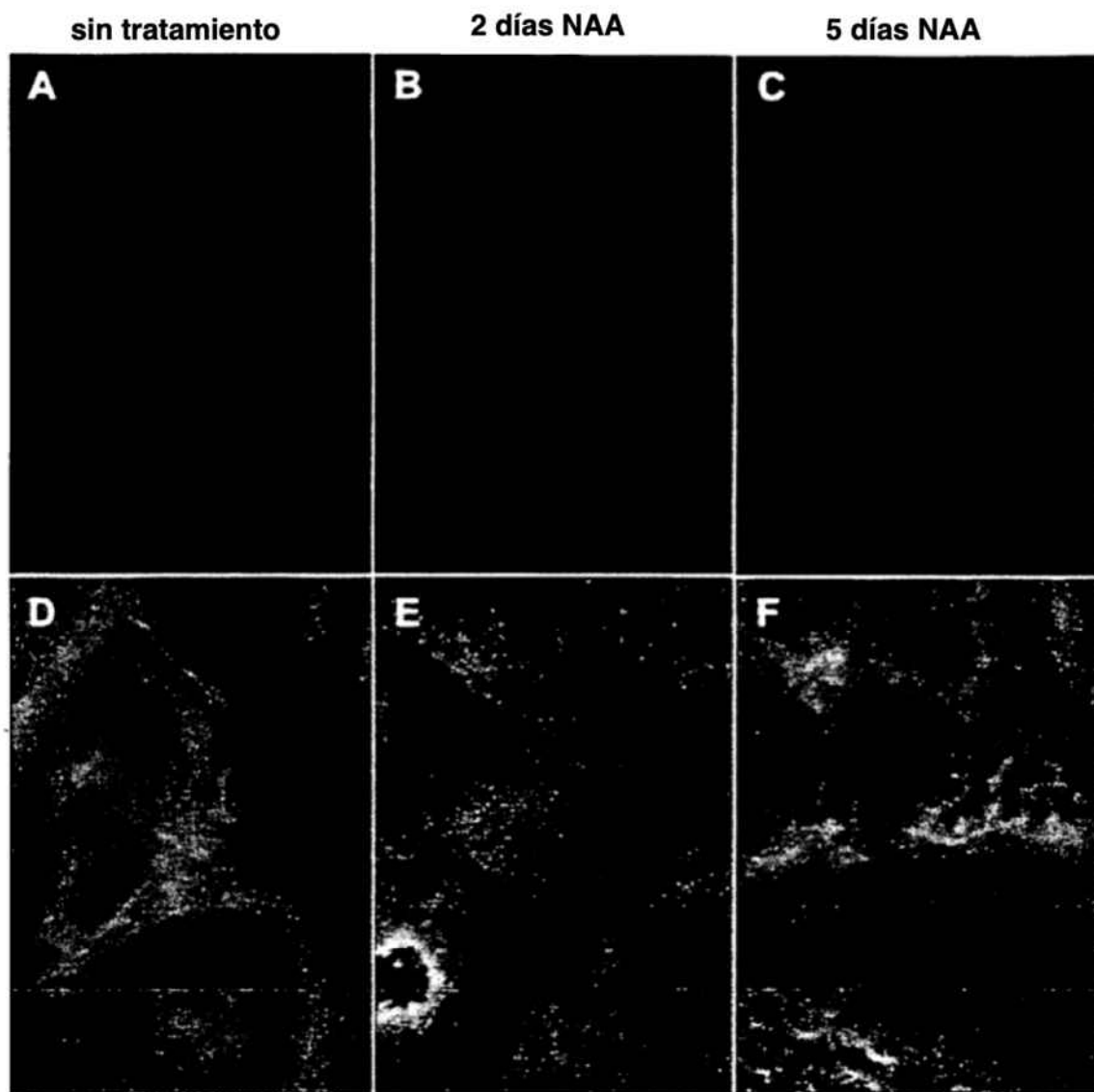


FIG. 10

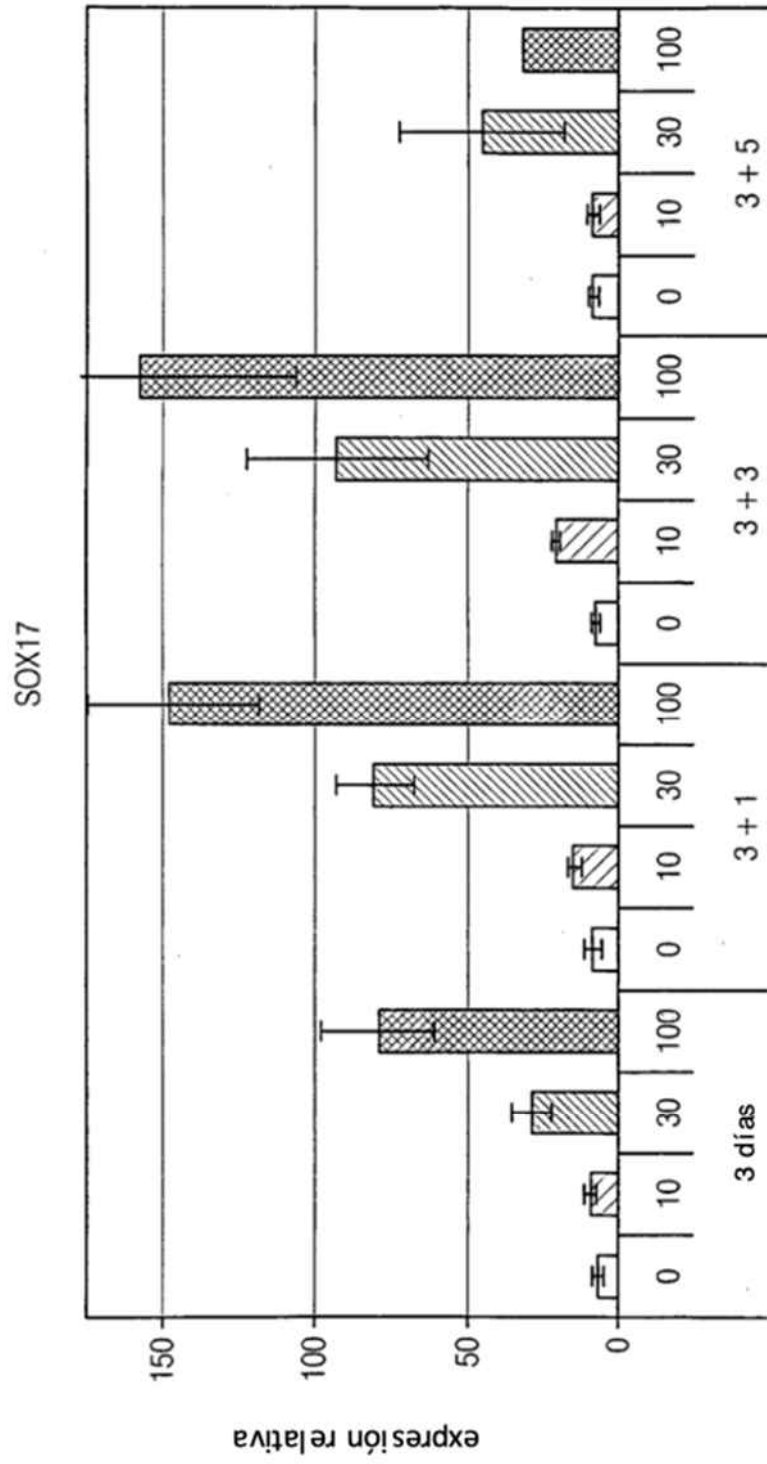


FIG. 11

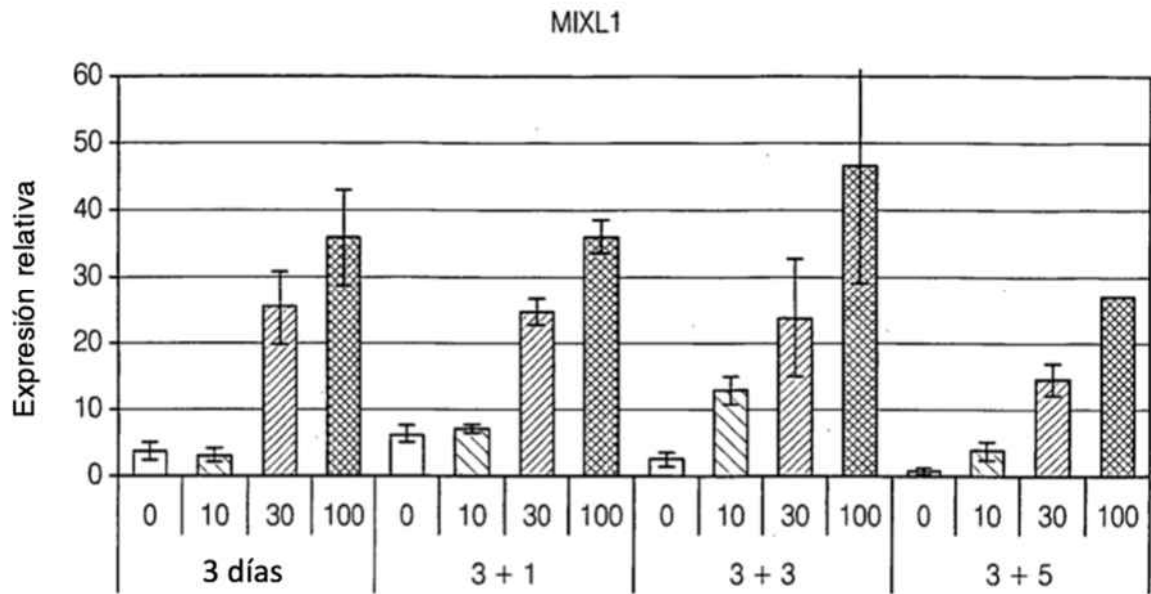


FIG. 12A

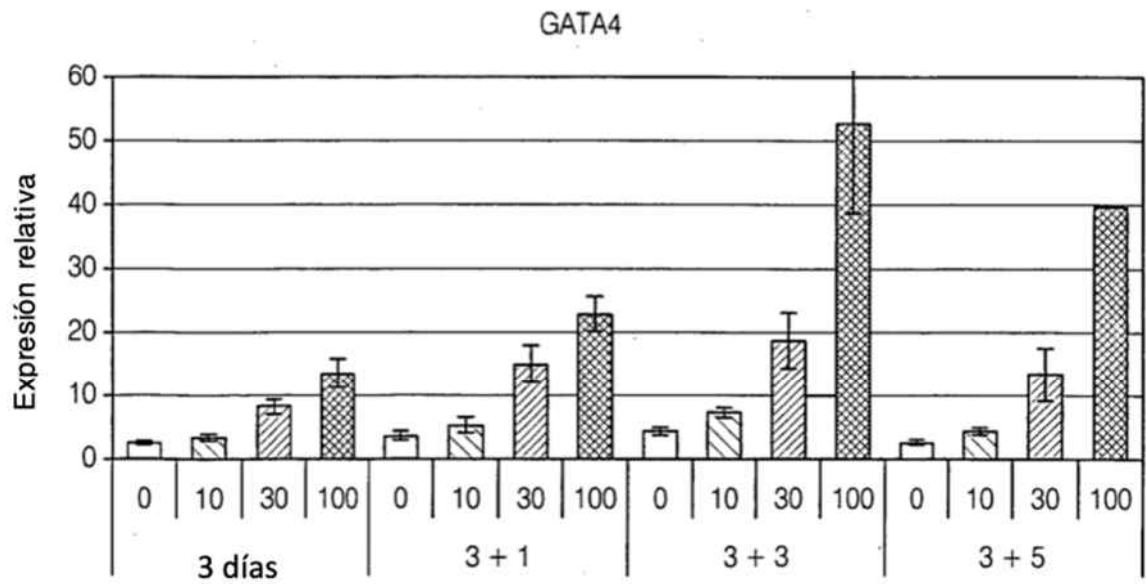


FIG. 12B

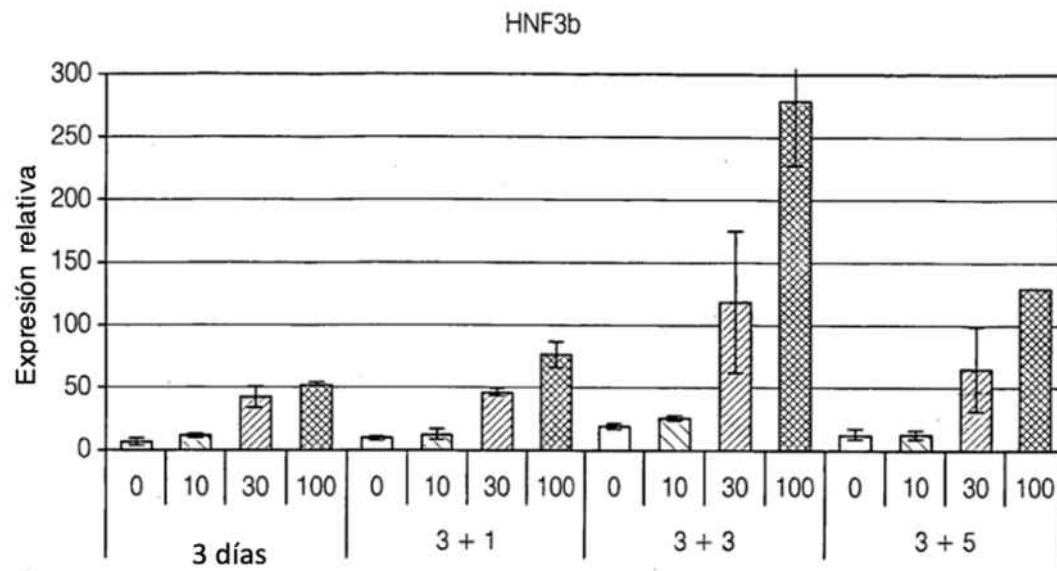


FIG. 12C

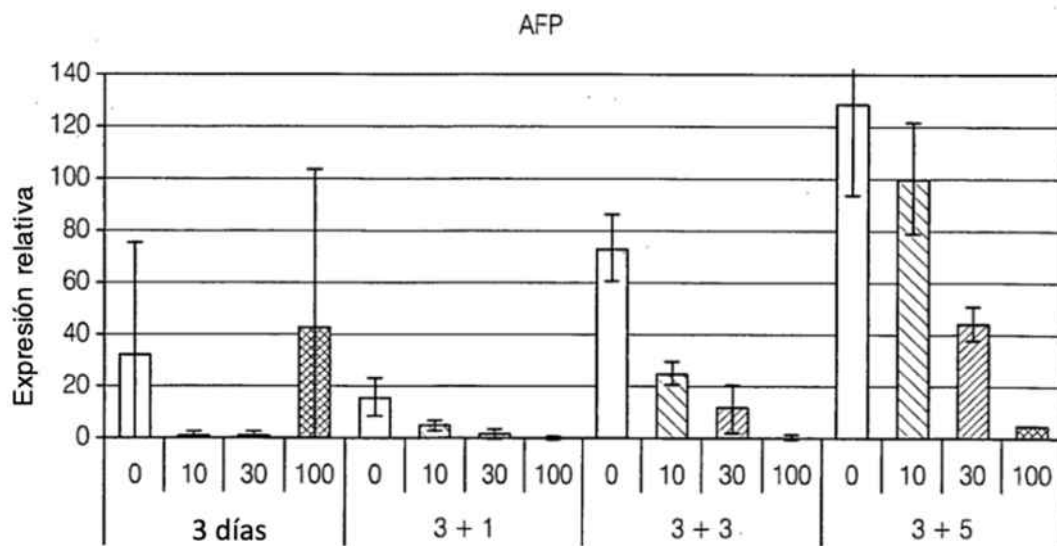


FIG. 13A

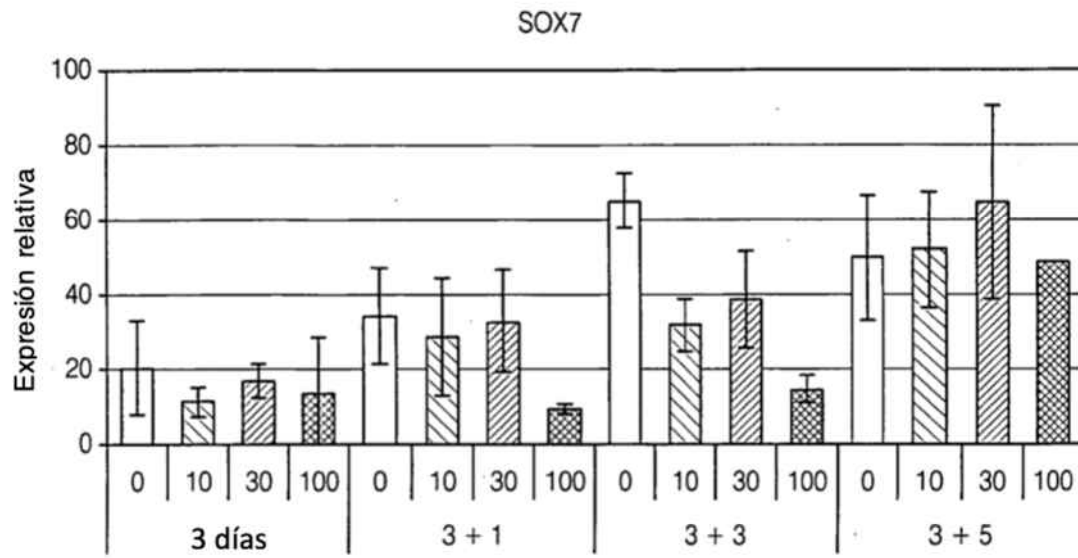


FIG. 13B

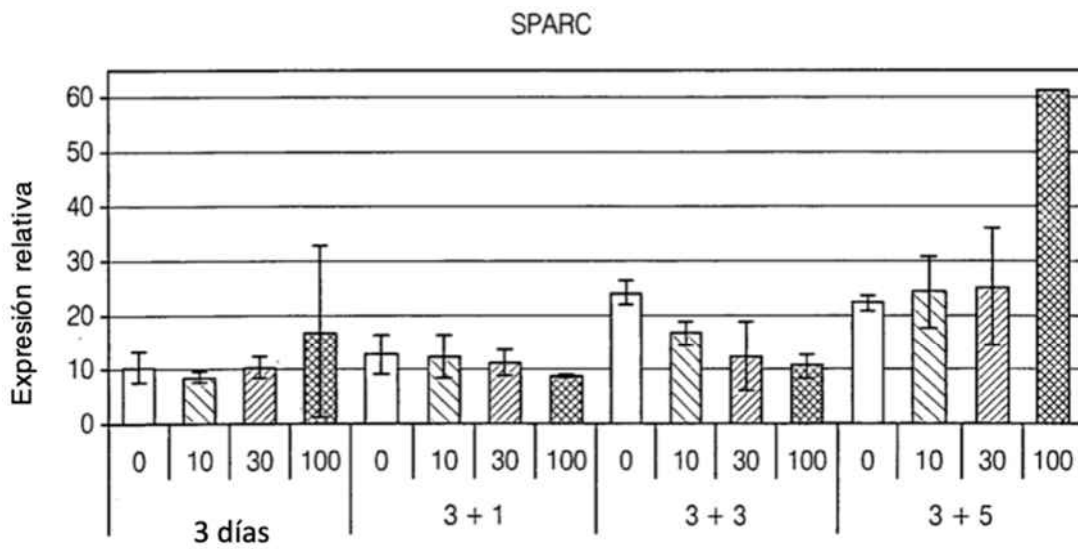


FIG. 13C

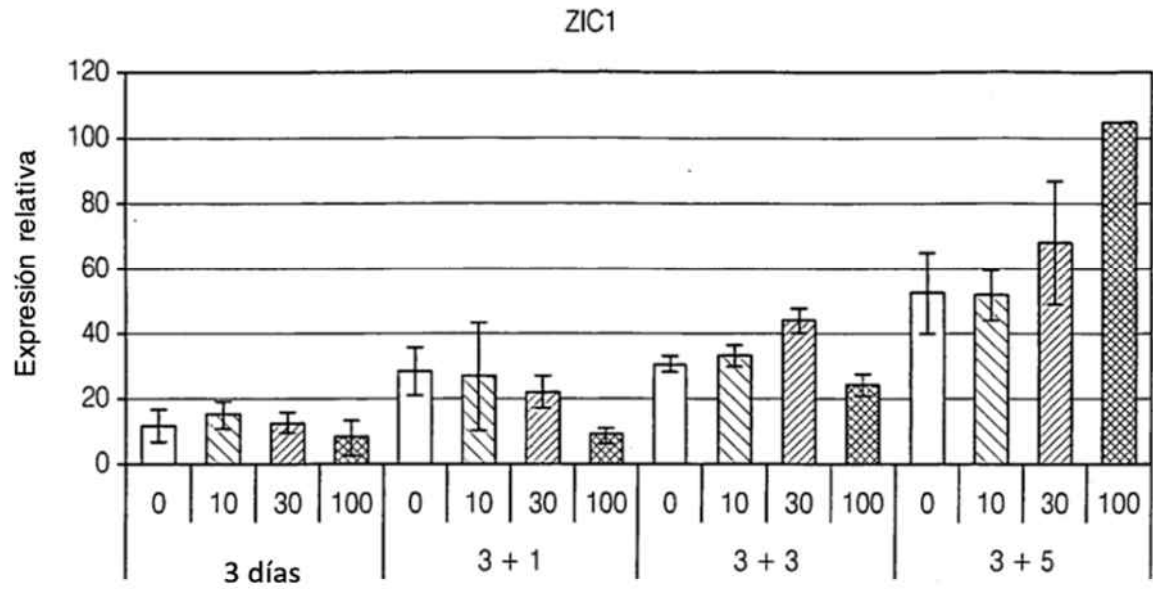


FIG. 14A

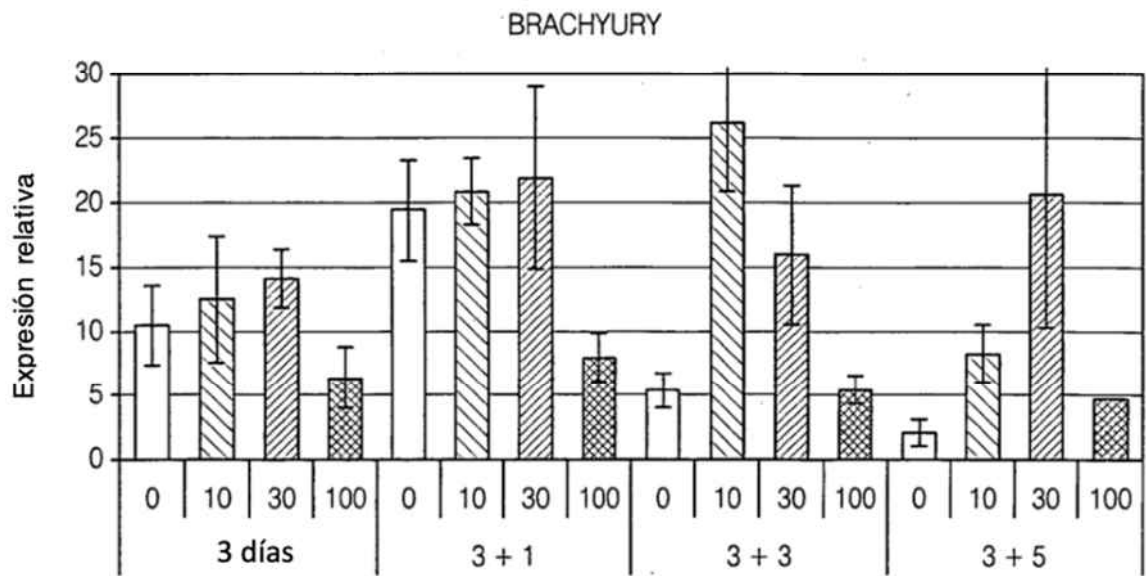


FIG. 14B

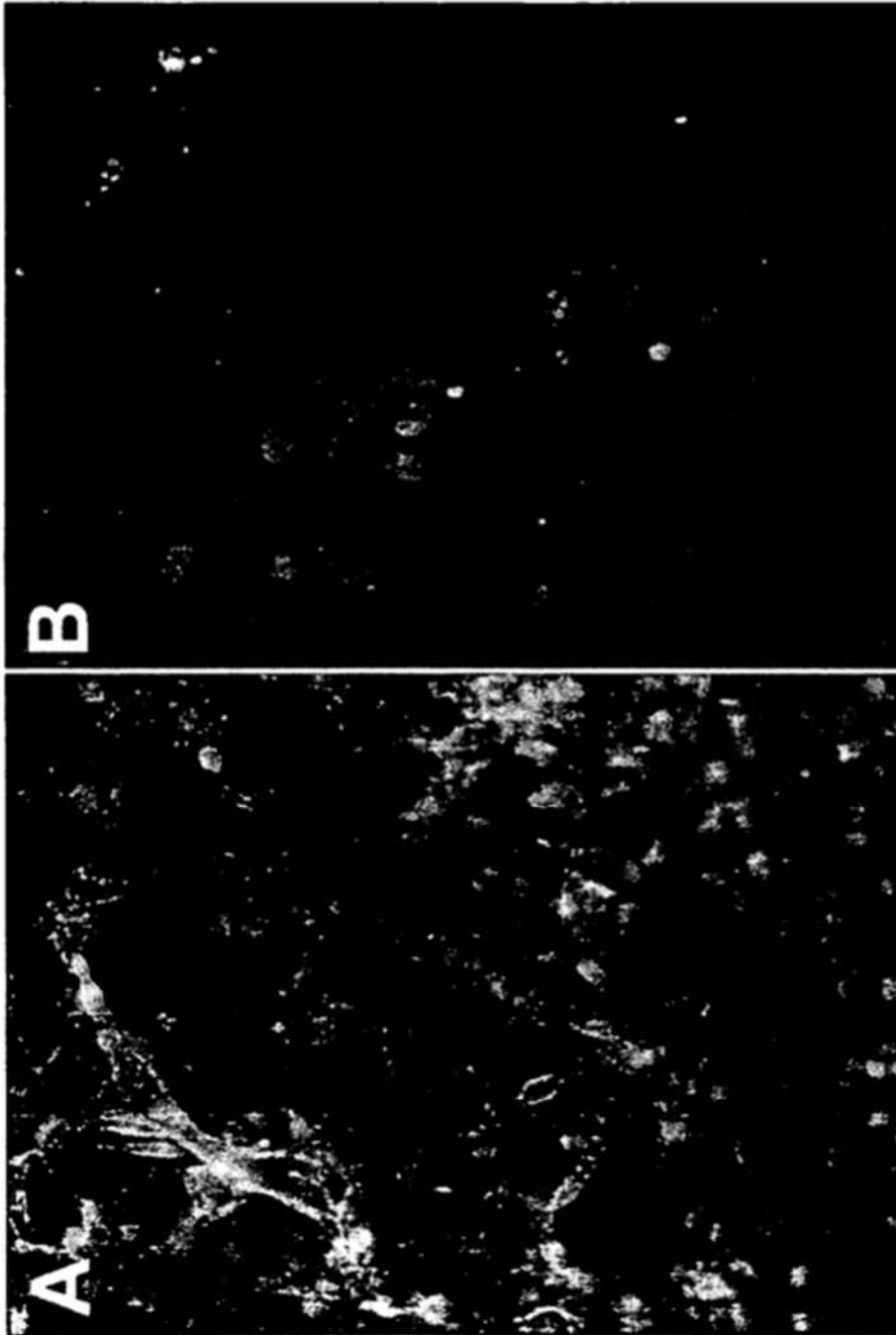


FIG. 15

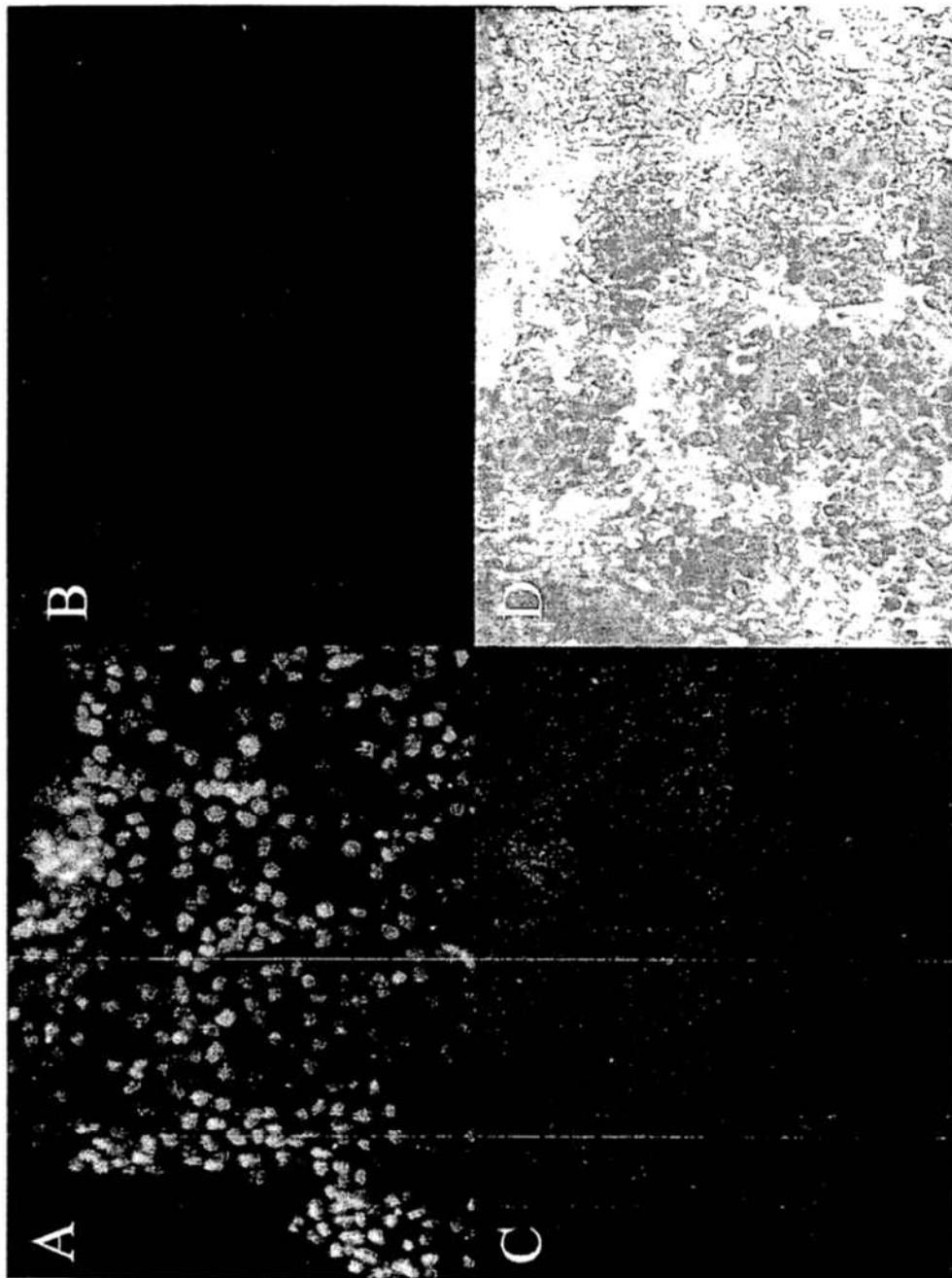
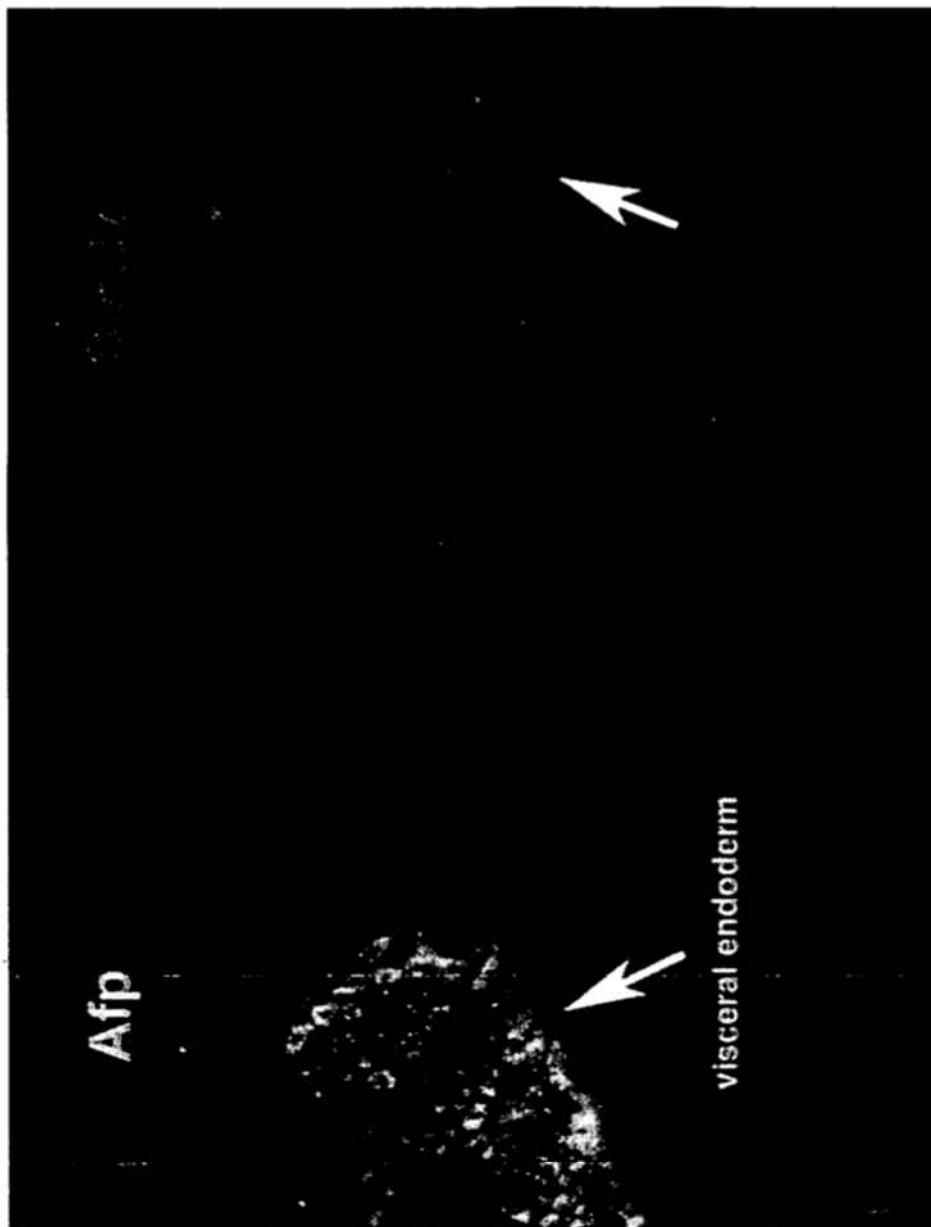


FIG. 16



Familia de Moléculas Tgf β

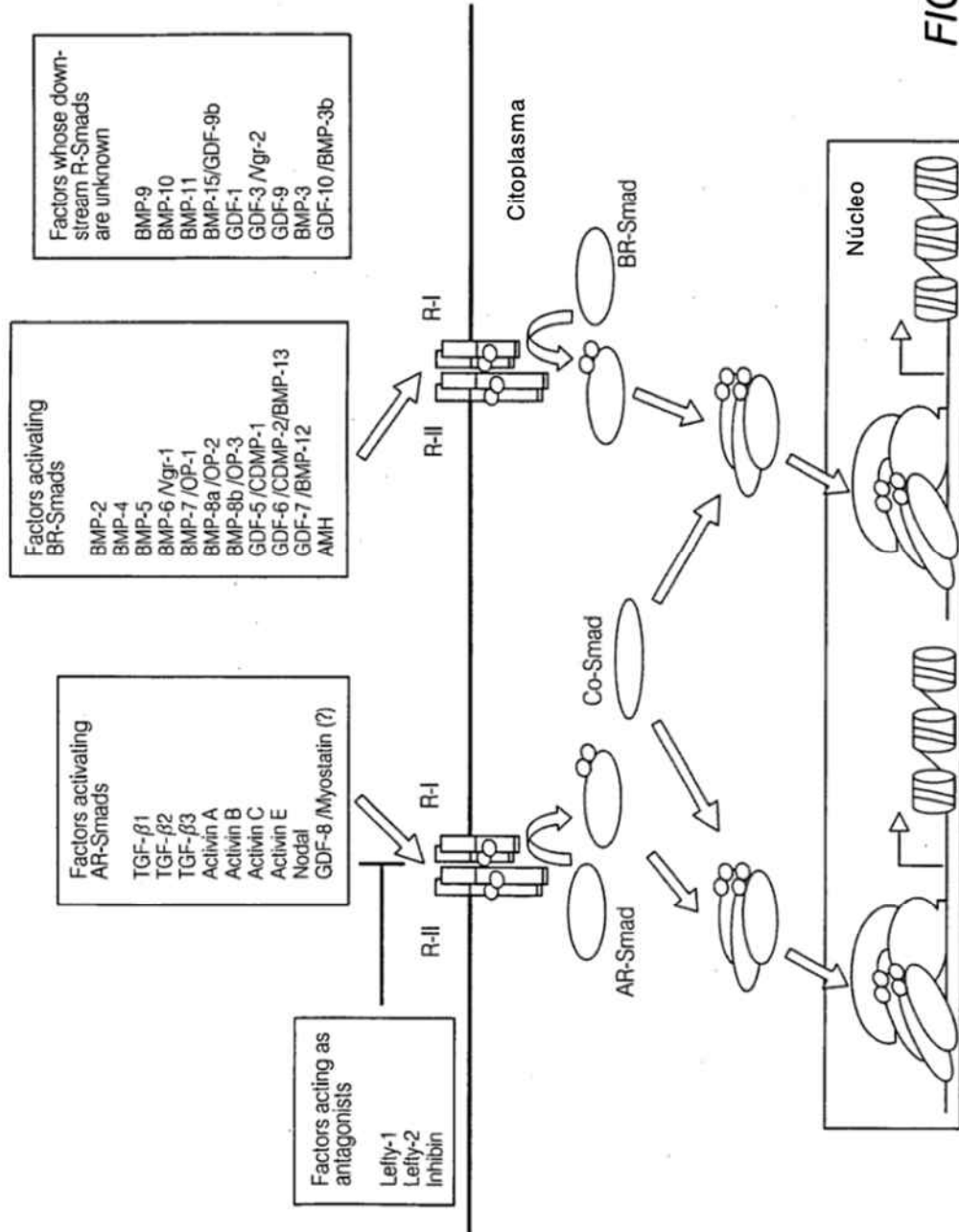


FIG. 18

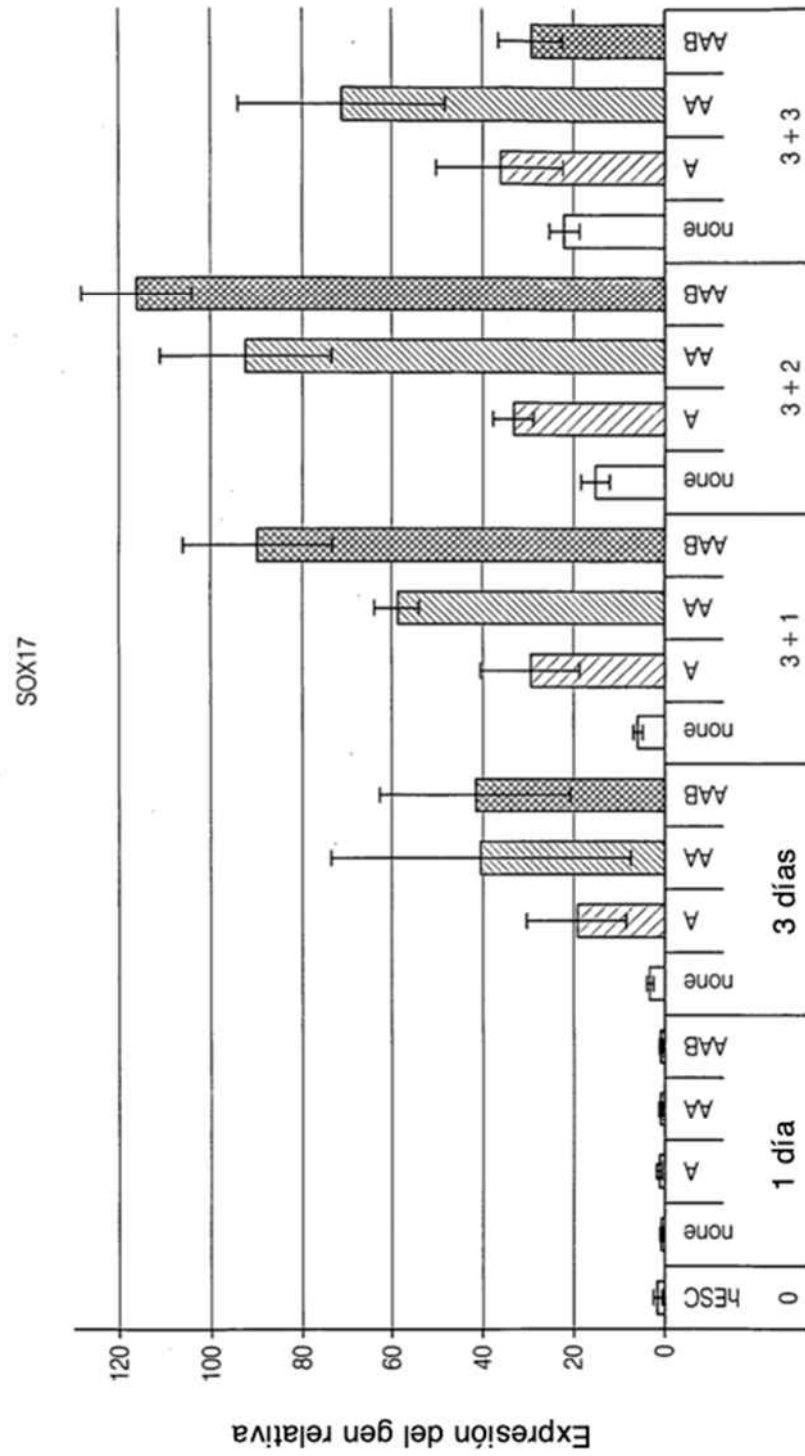


FIG. 19

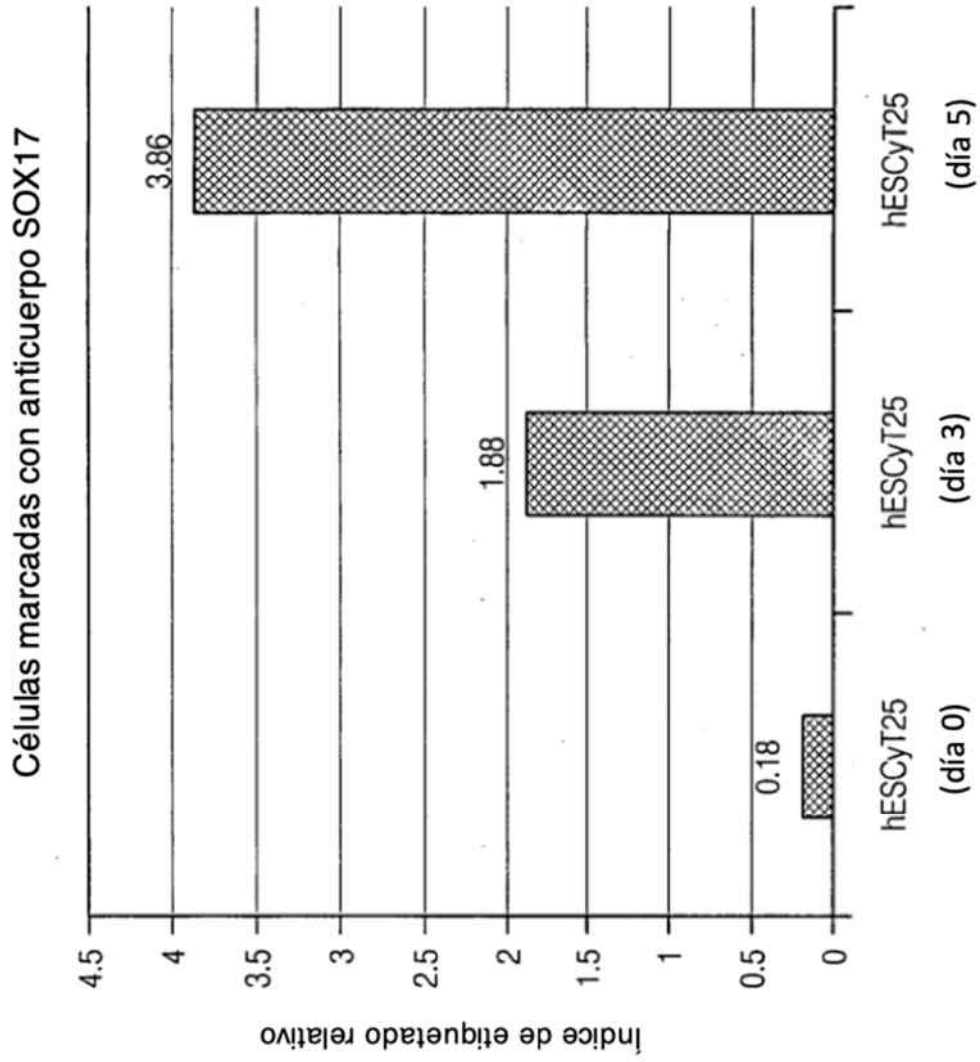


FIG. 20

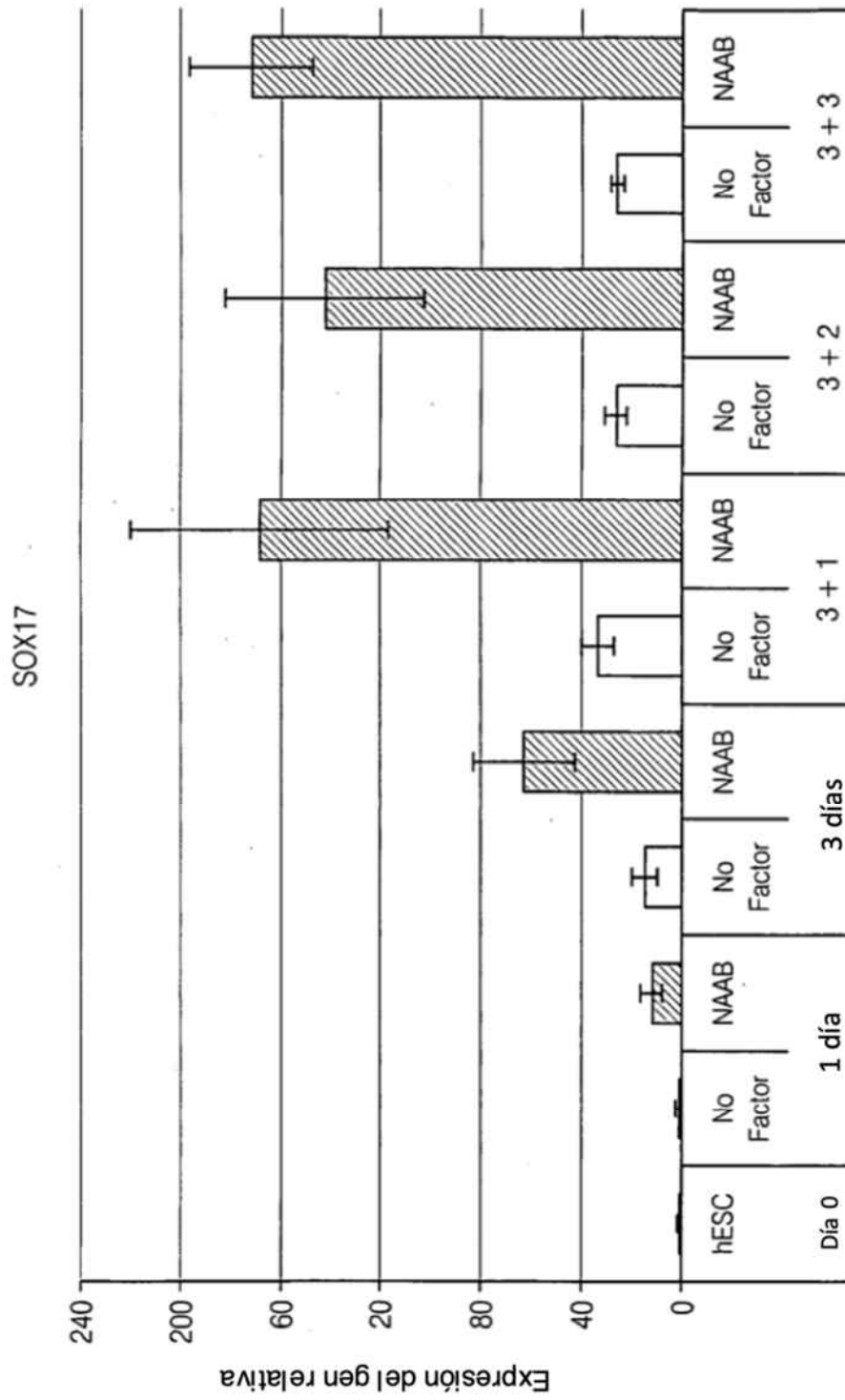


FIG. 21

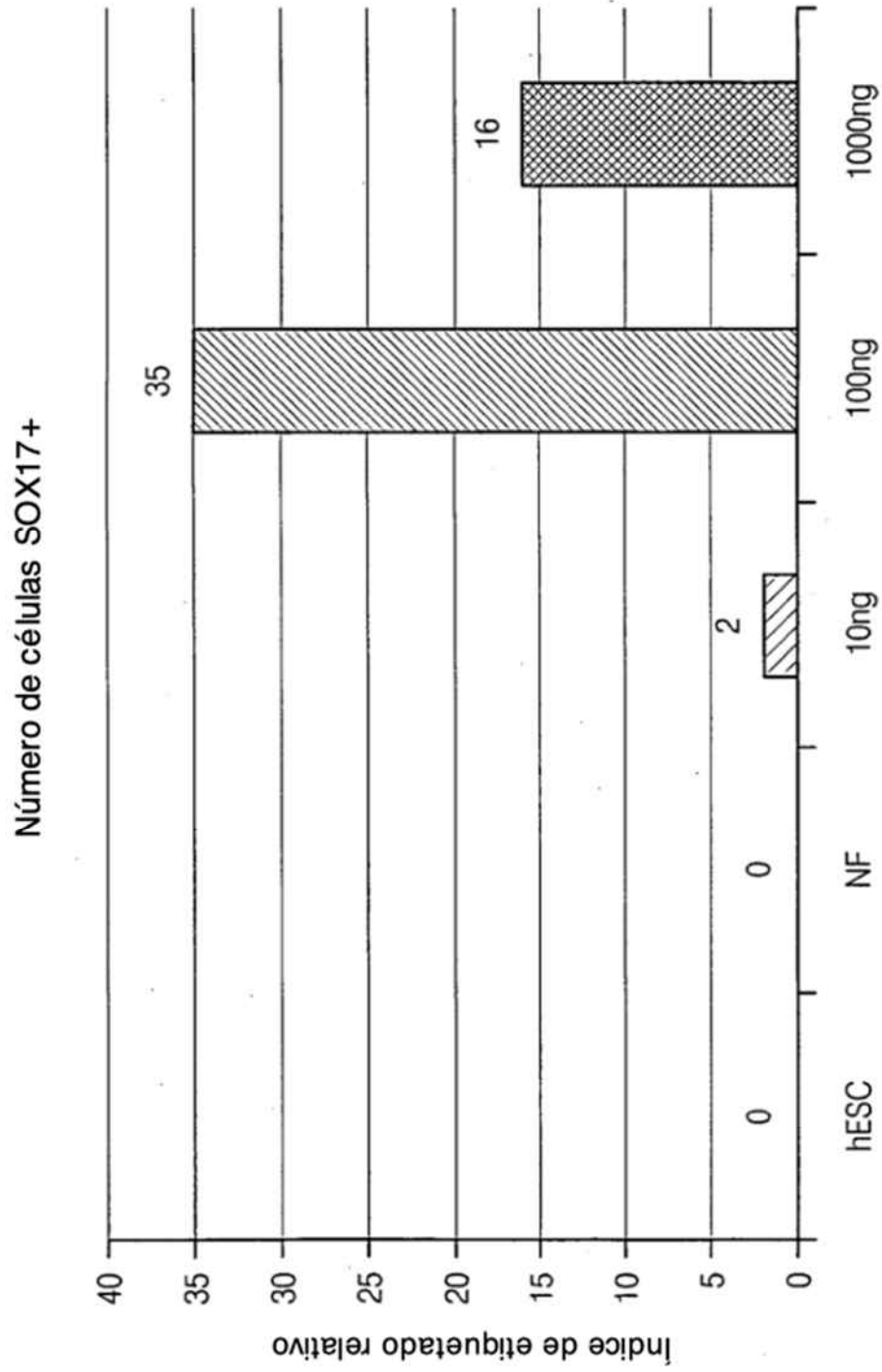


FIG. 22

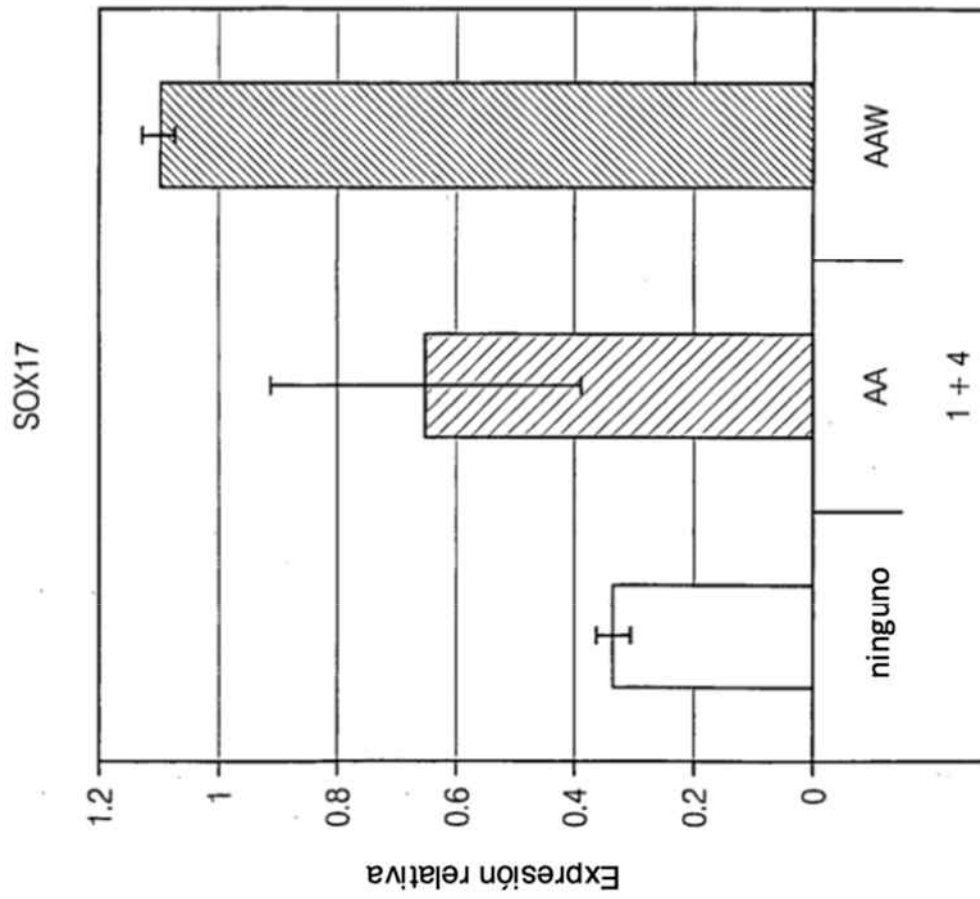


FIG. 23

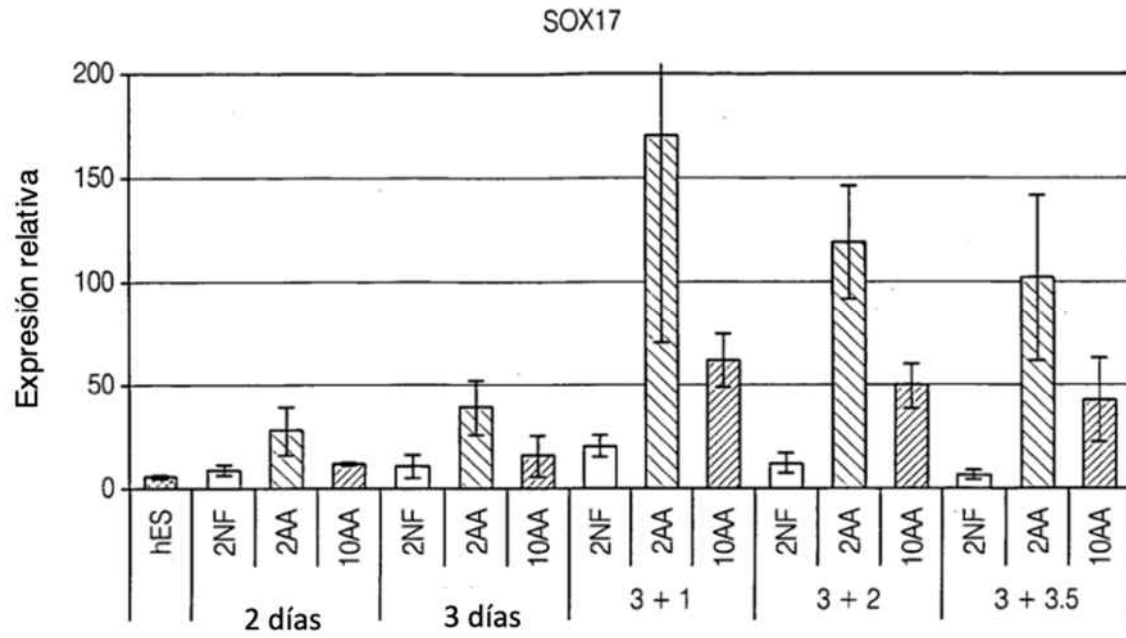


FIG. 24A

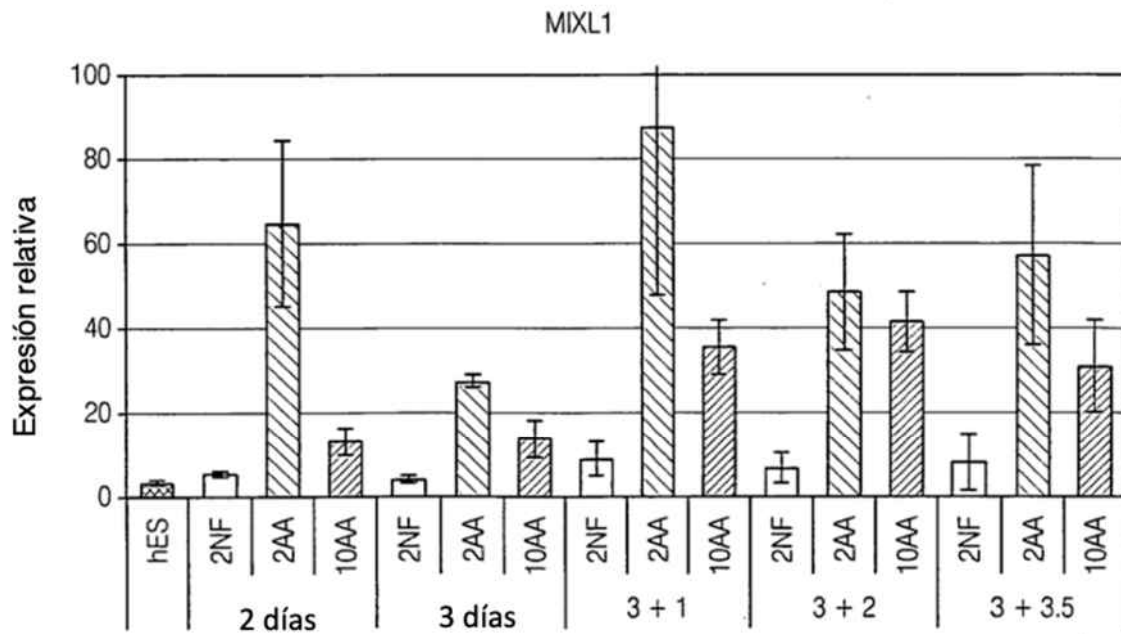


FIG. 24B

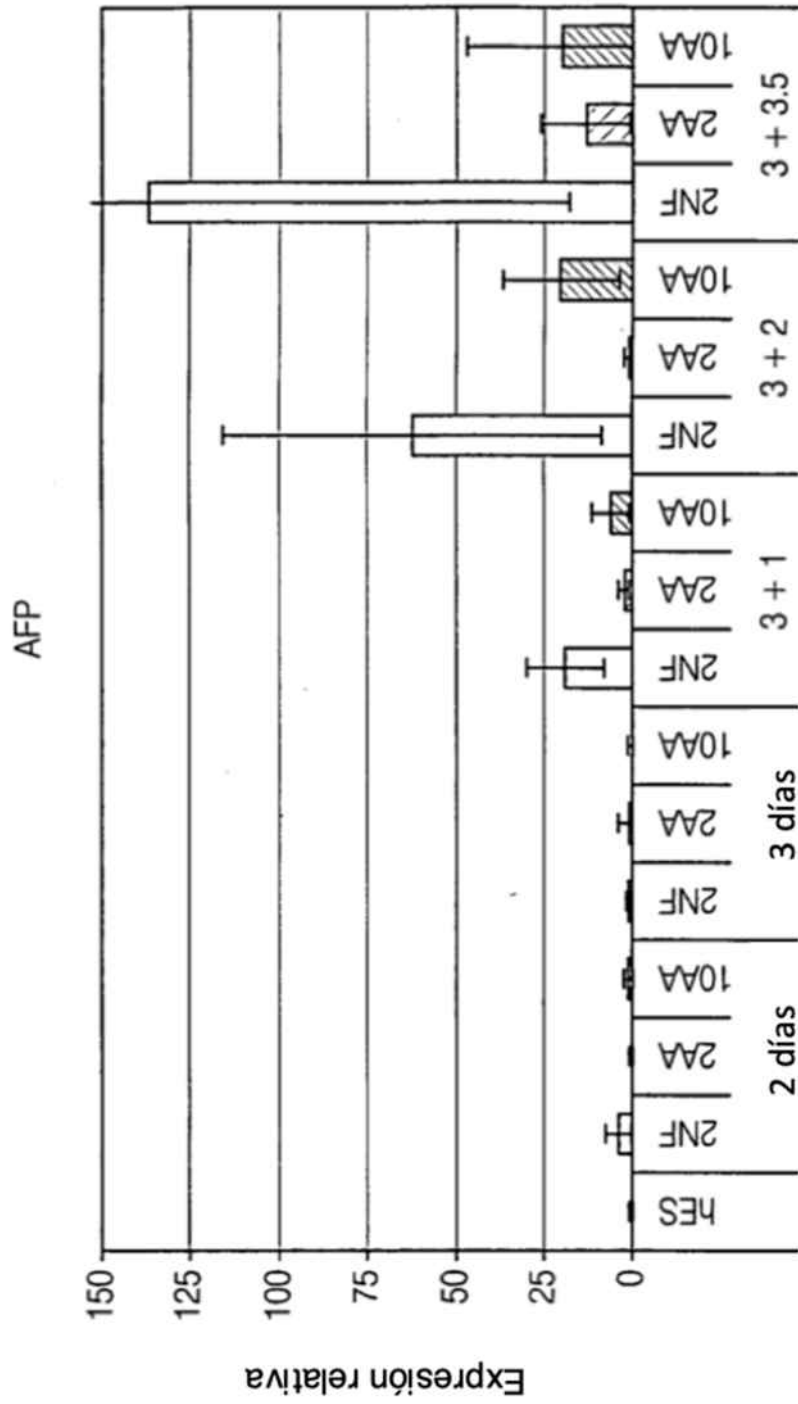


FIG. 24C

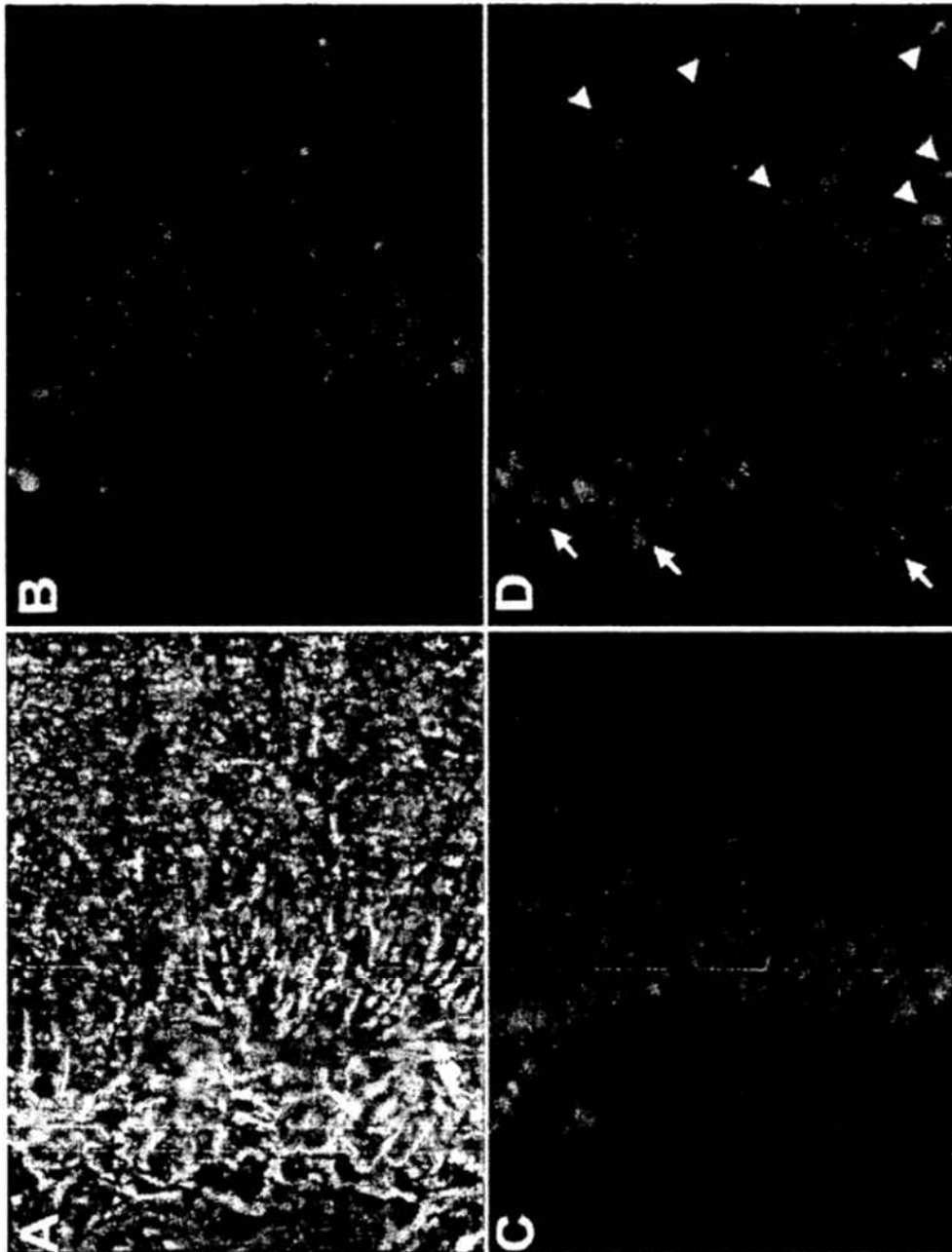


FIG. 25

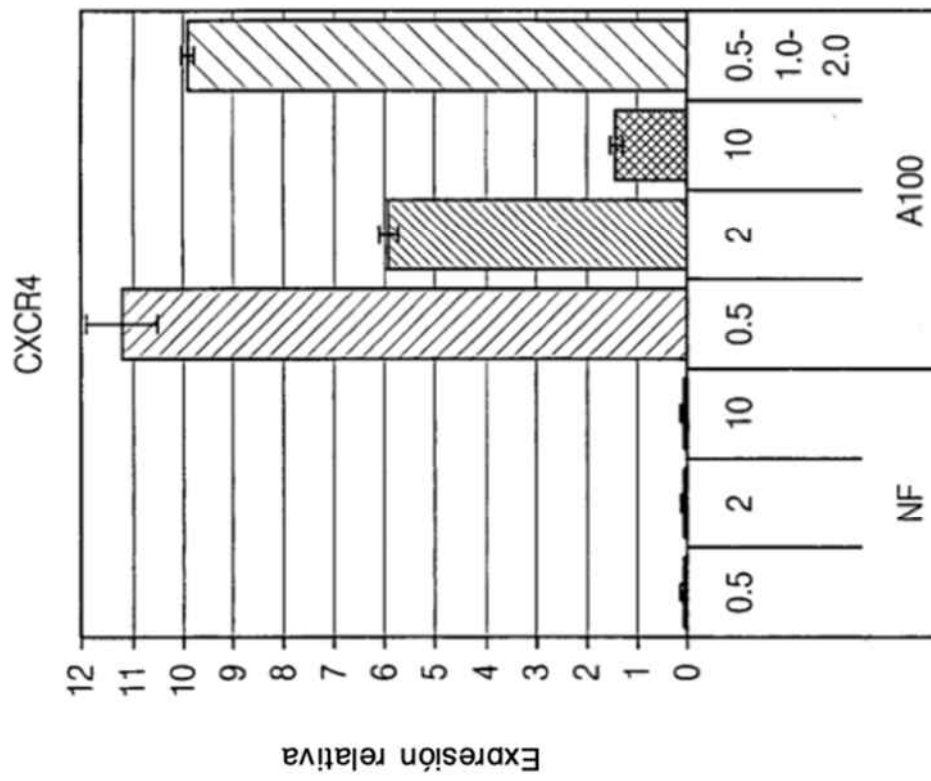


FIG. 26

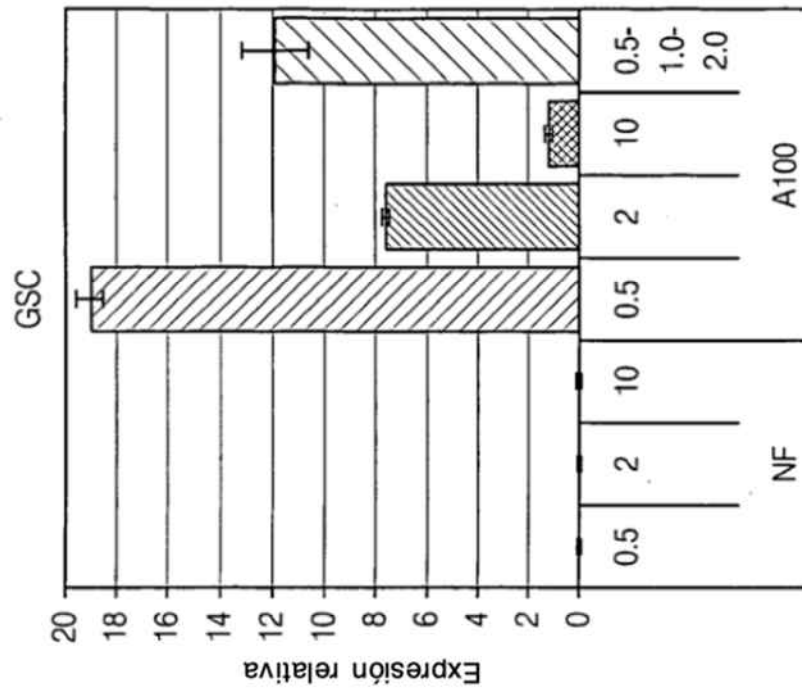


FIG. 27A

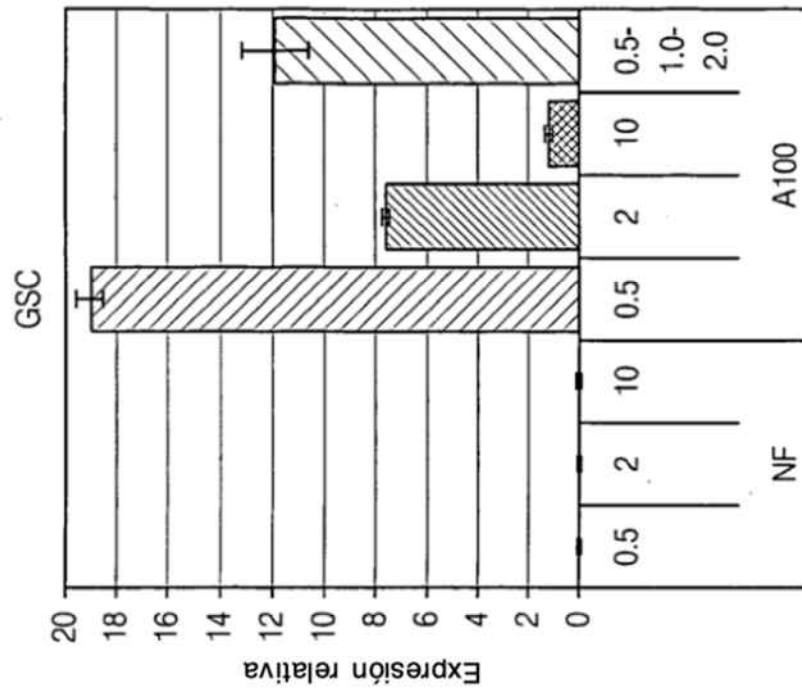


FIG. 27B

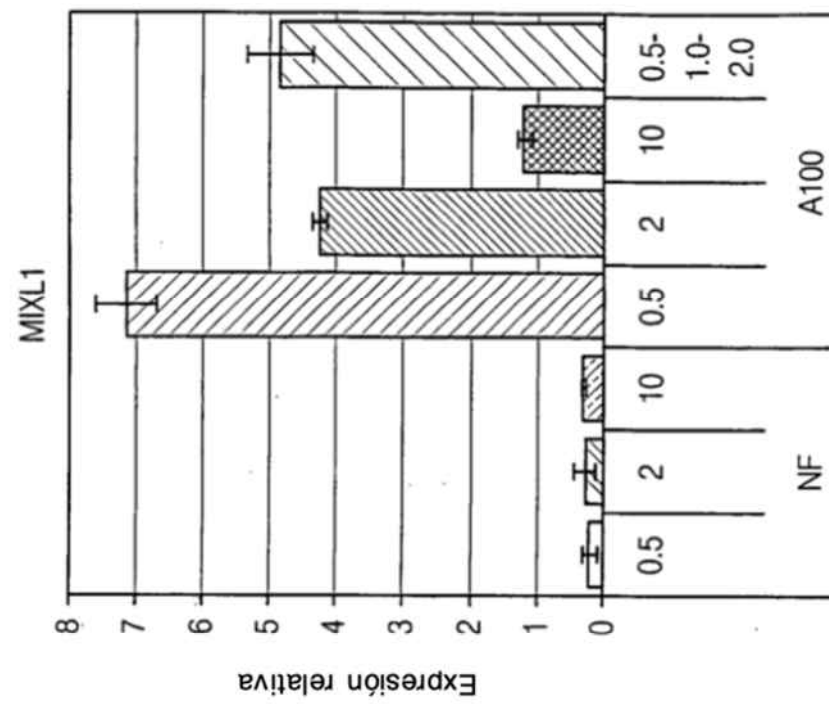


FIG. 27D

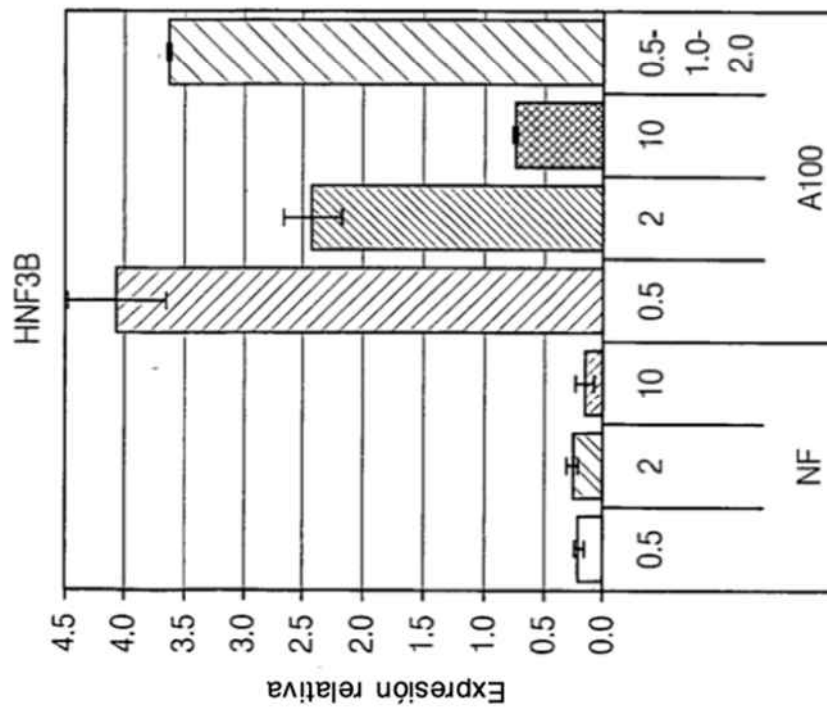


FIG. 27C

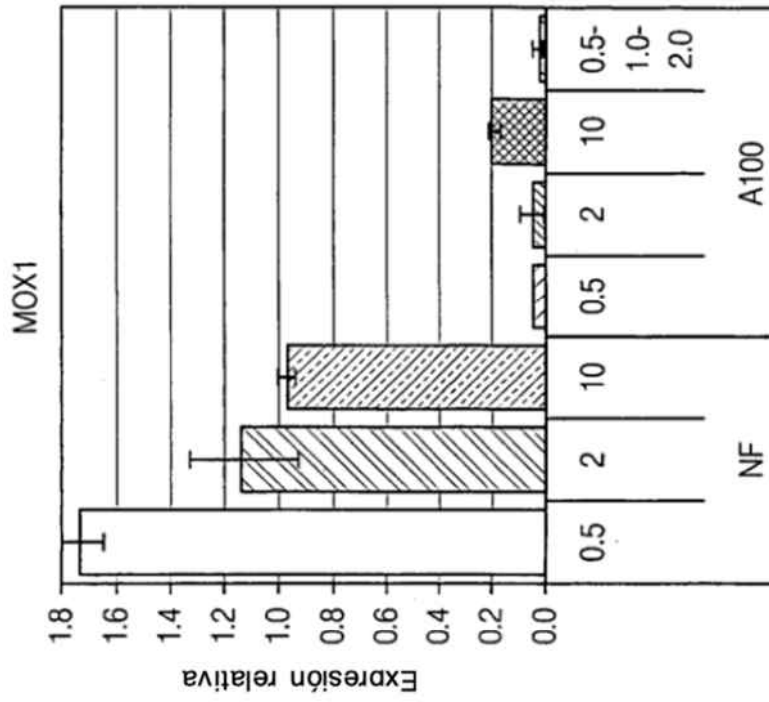


FIG. 28B

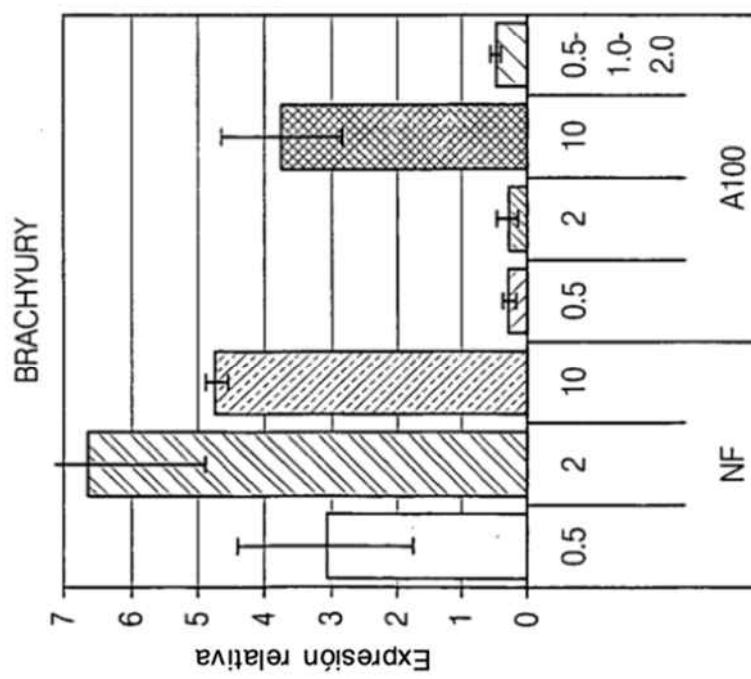


FIG. 28A

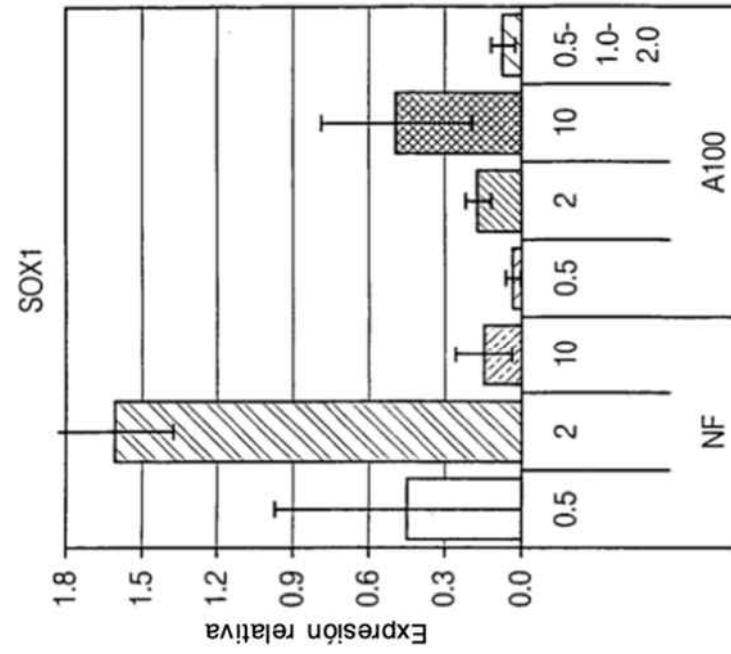


FIG. 28D

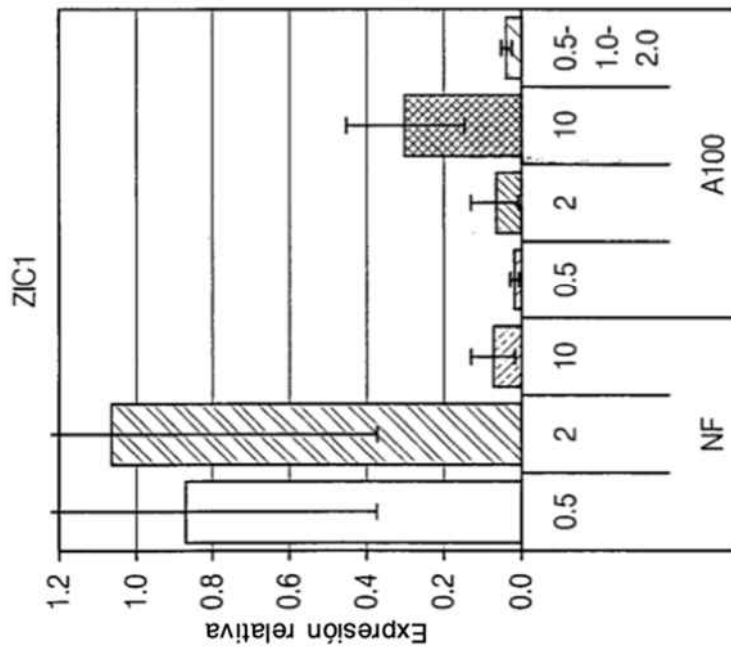


FIG. 28C

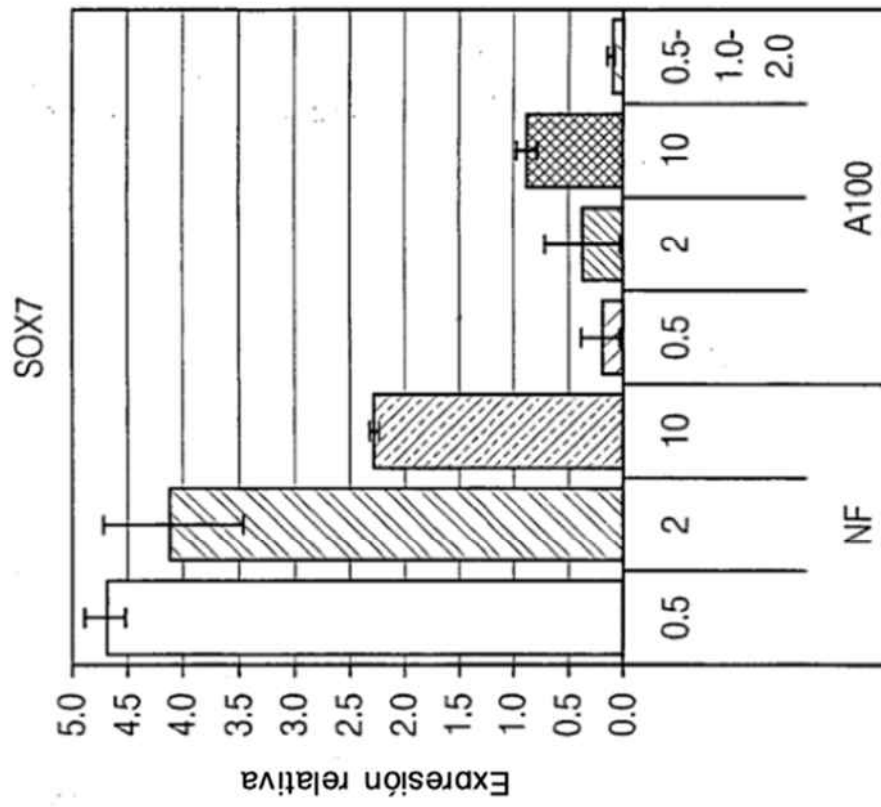


FIG. 28E

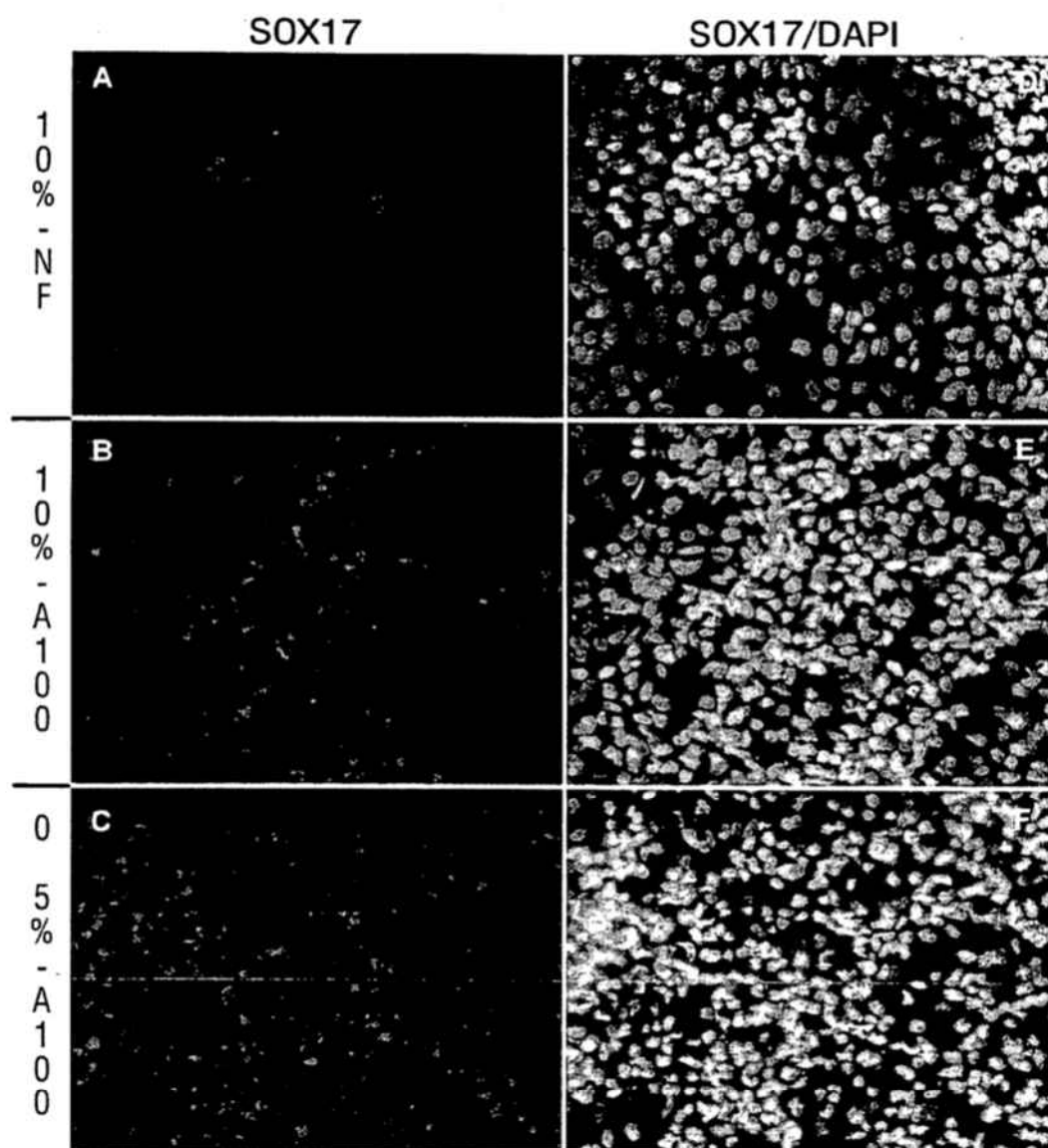


FIG. 29

FIG. 30A

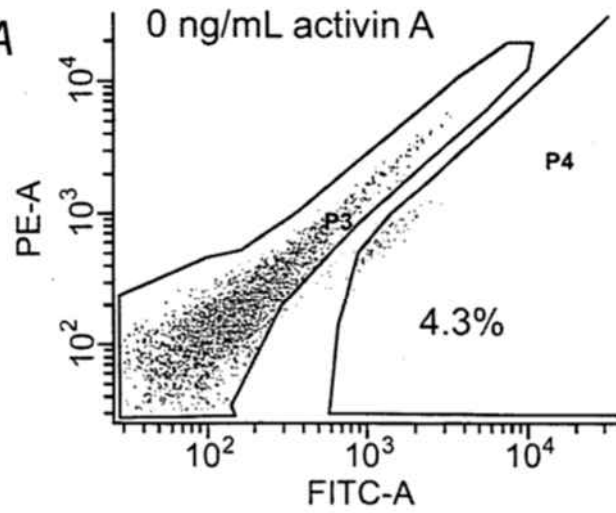


FIG. 30B

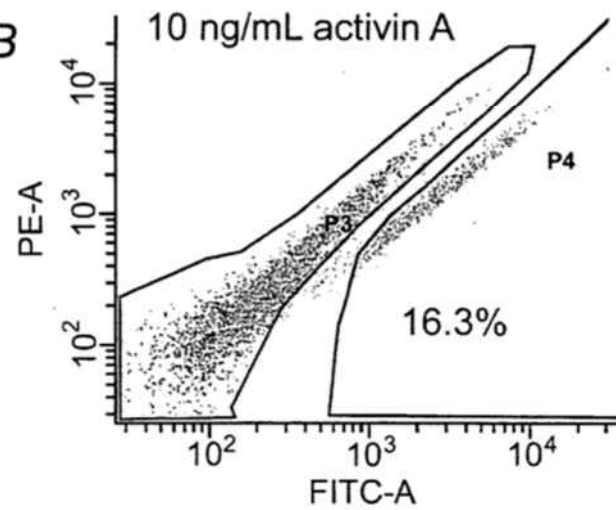
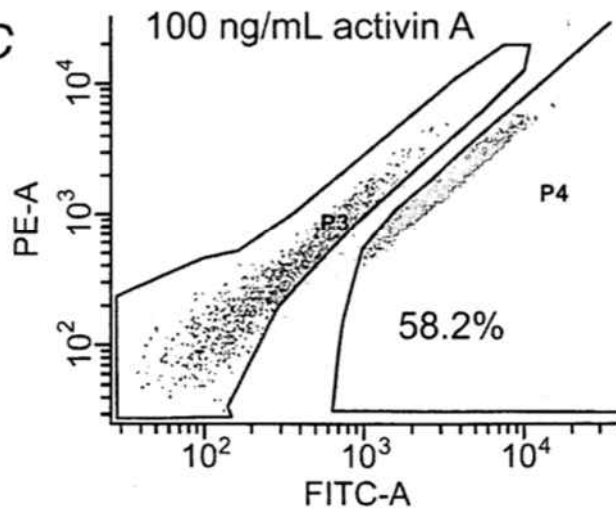


FIG. 30C



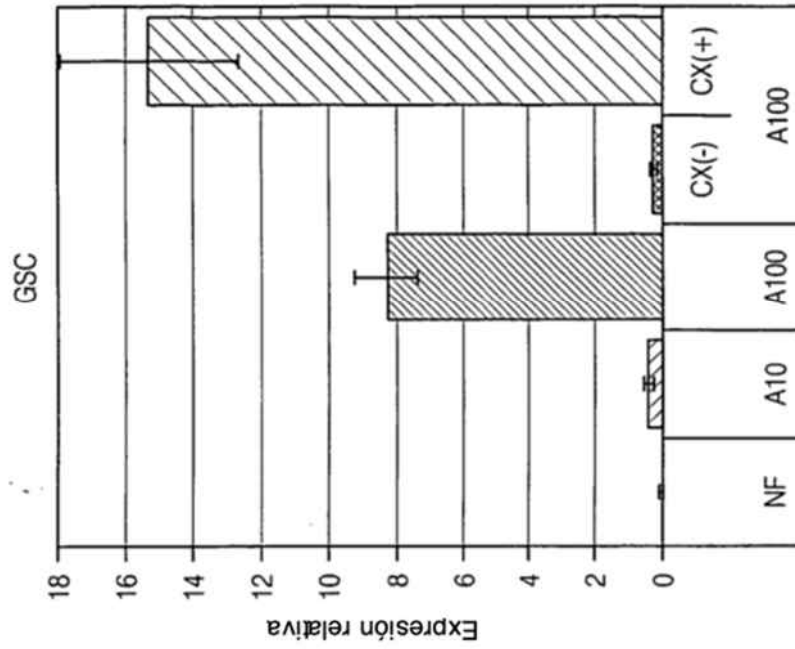


FIG. 31A

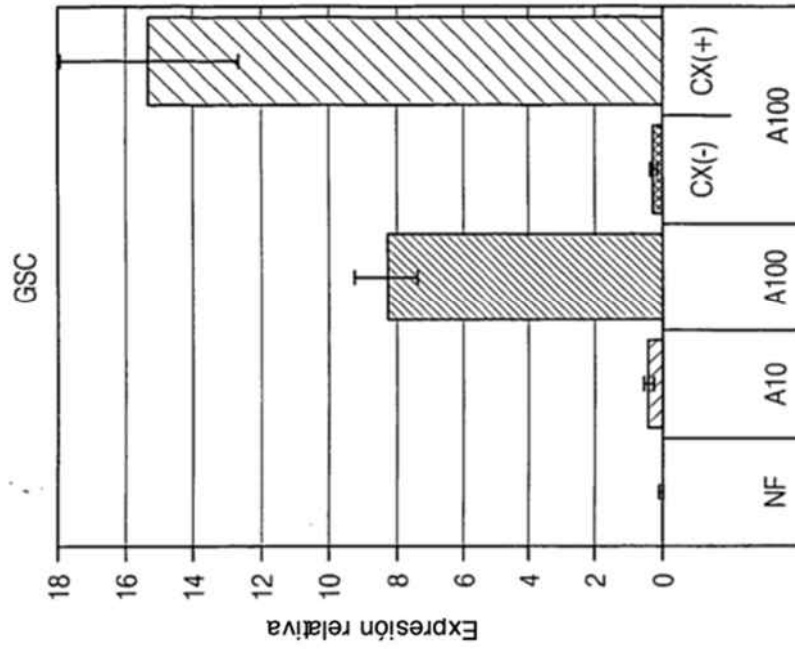


FIG. 31B

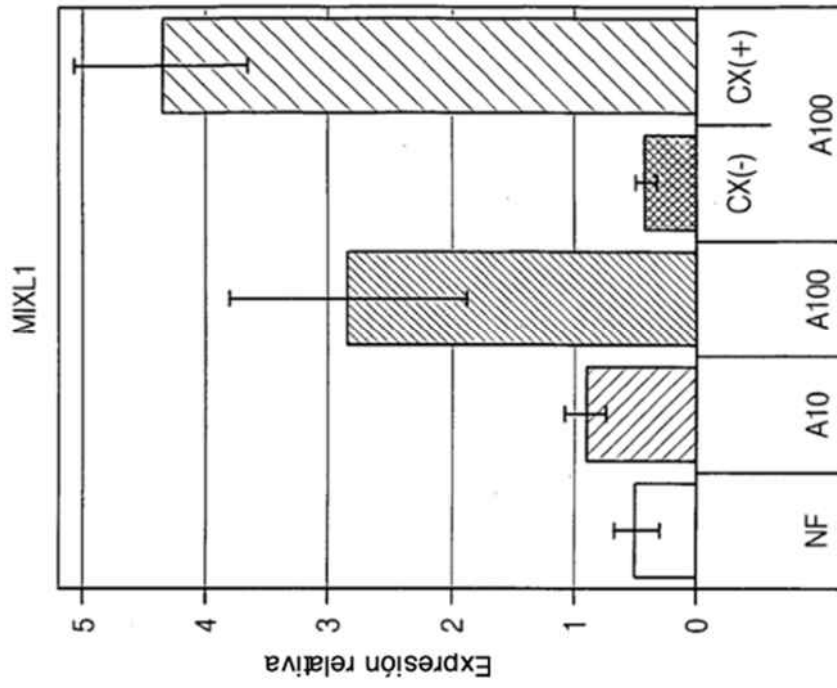


FIG. 31D

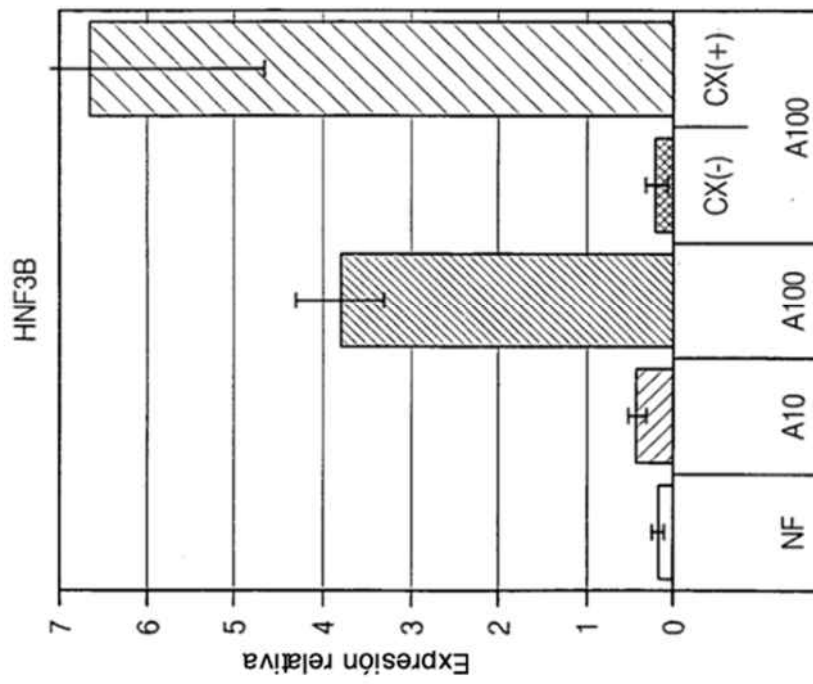


FIG. 31C

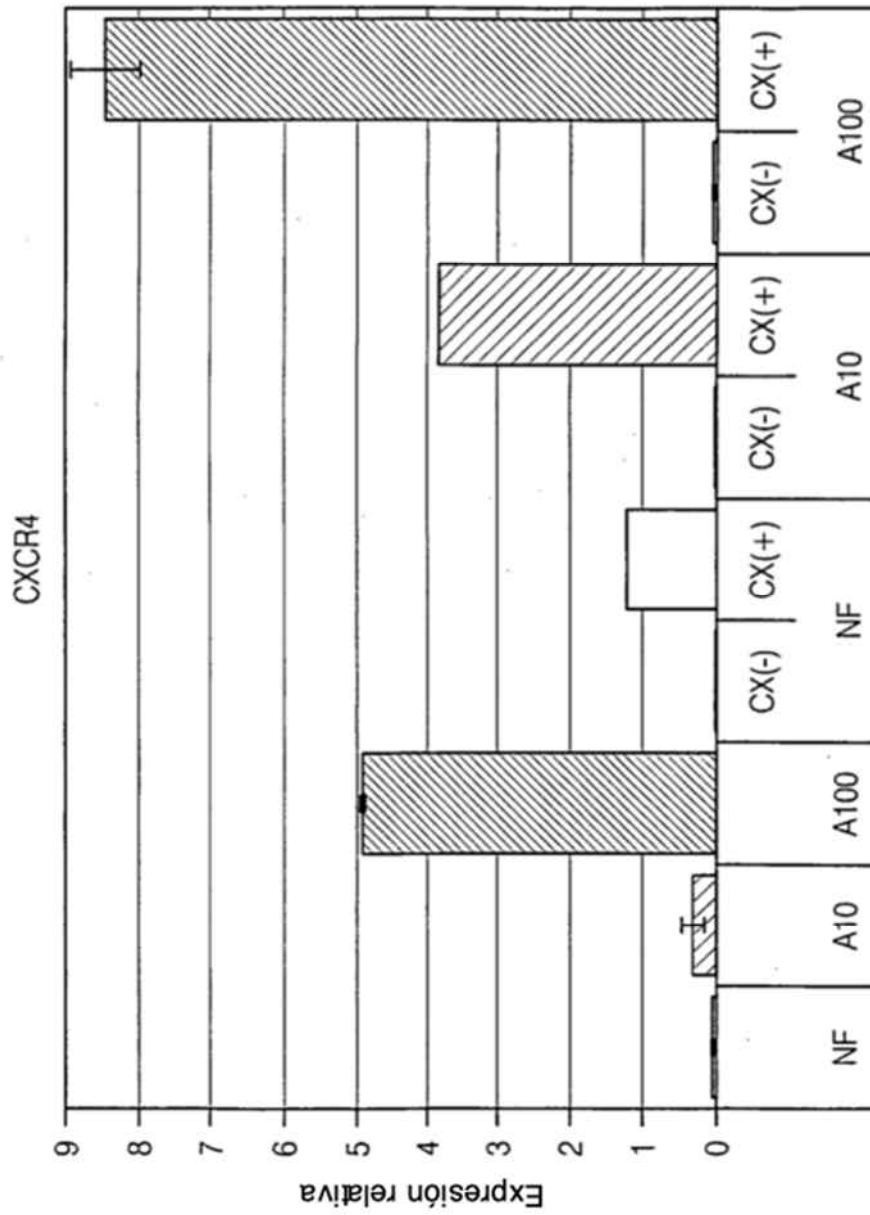


FIG. 32

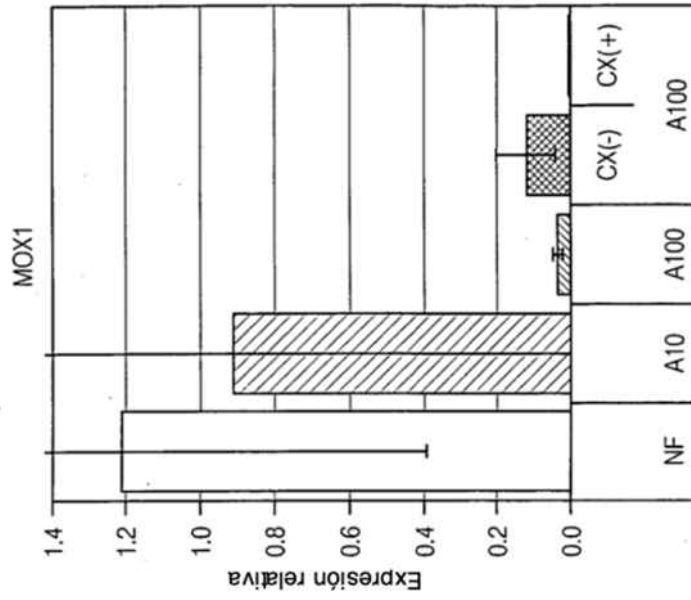


FIG. 33B

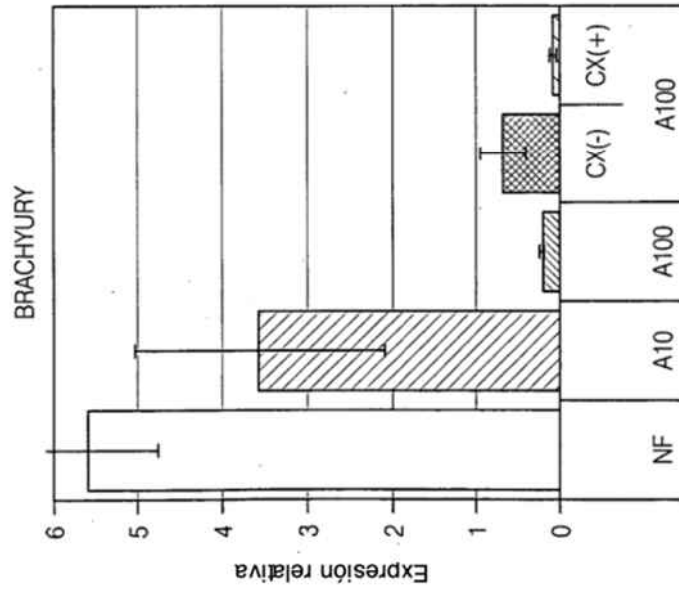


FIG. 33A

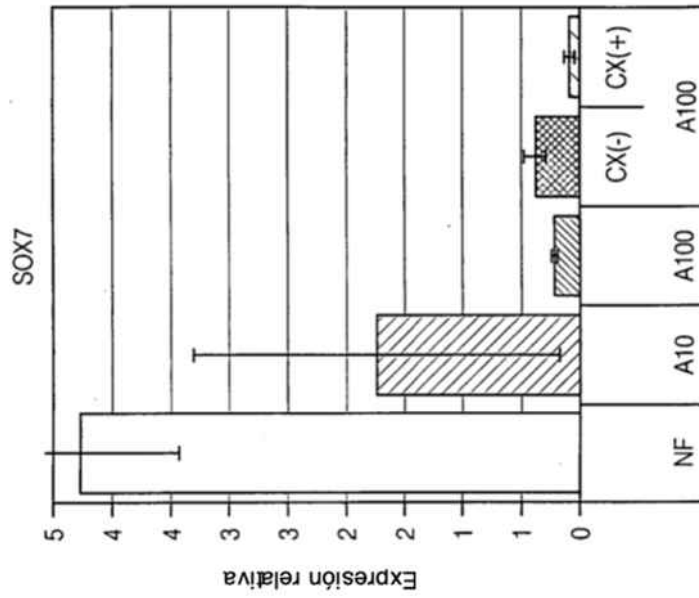


FIG. 33D

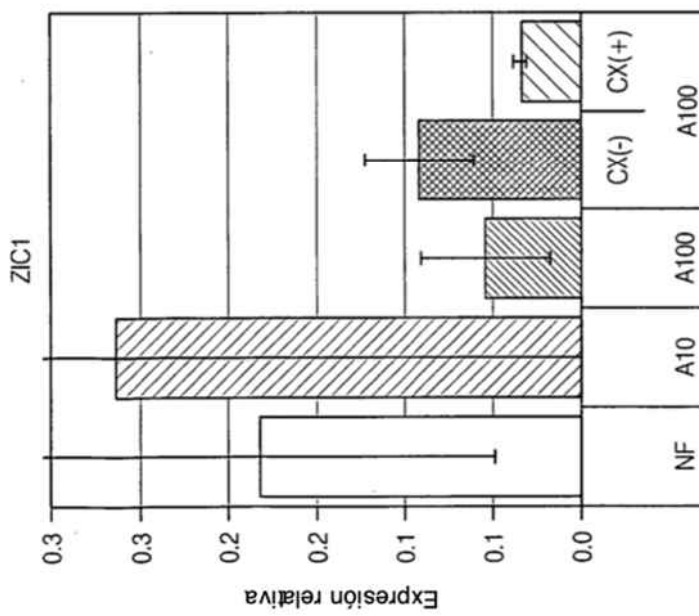


FIG. 33C

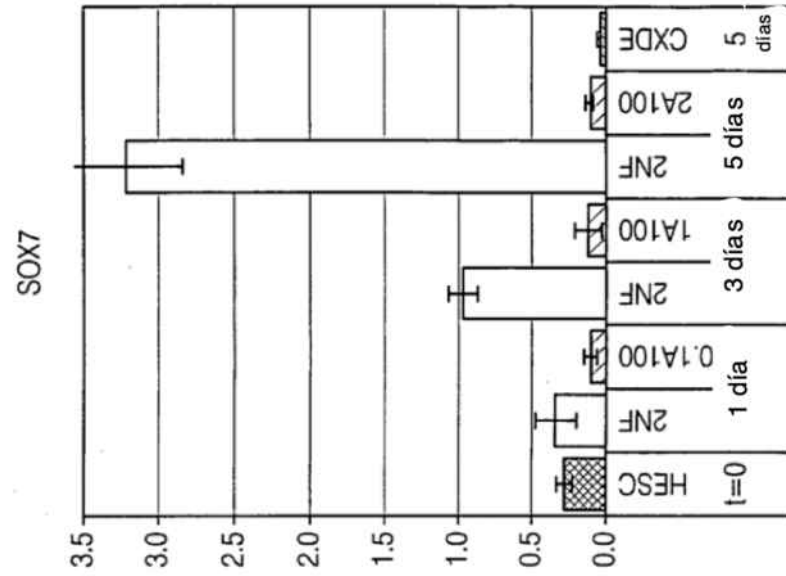


FIG. 34B

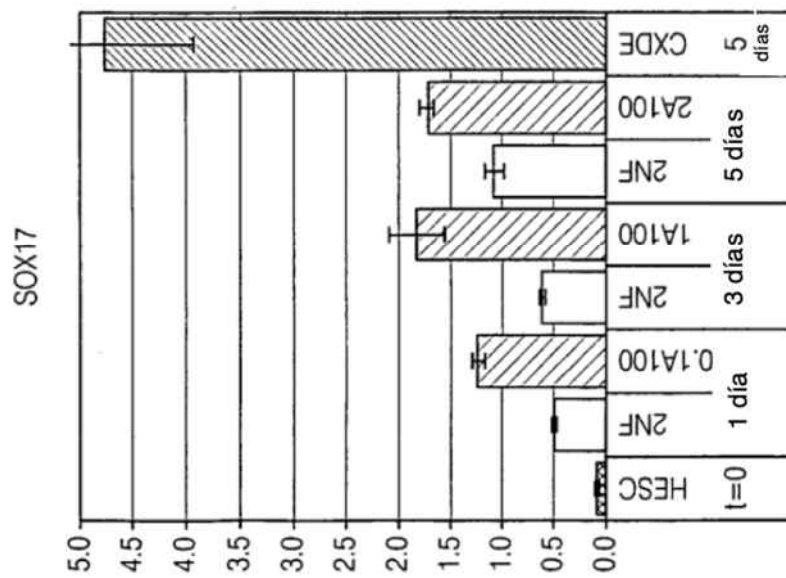


FIG. 34A

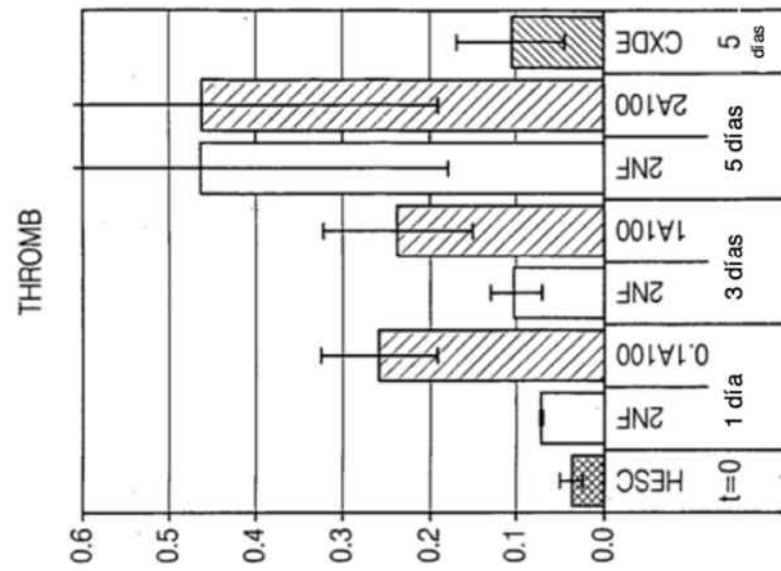


FIG. 34D

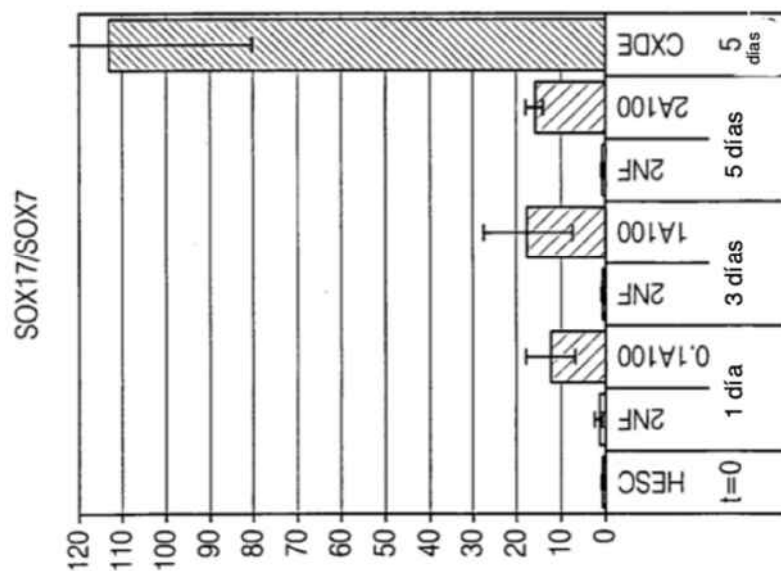


FIG. 34C

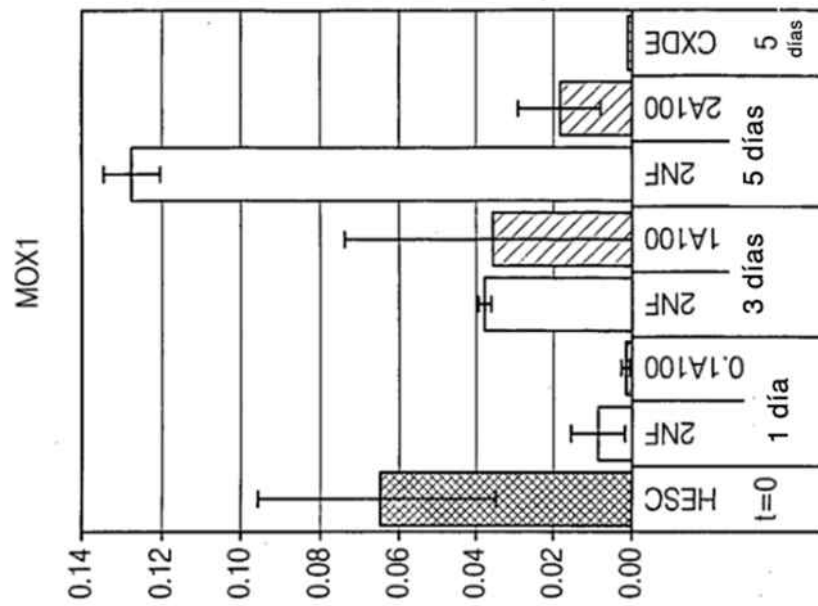


FIG. 34F

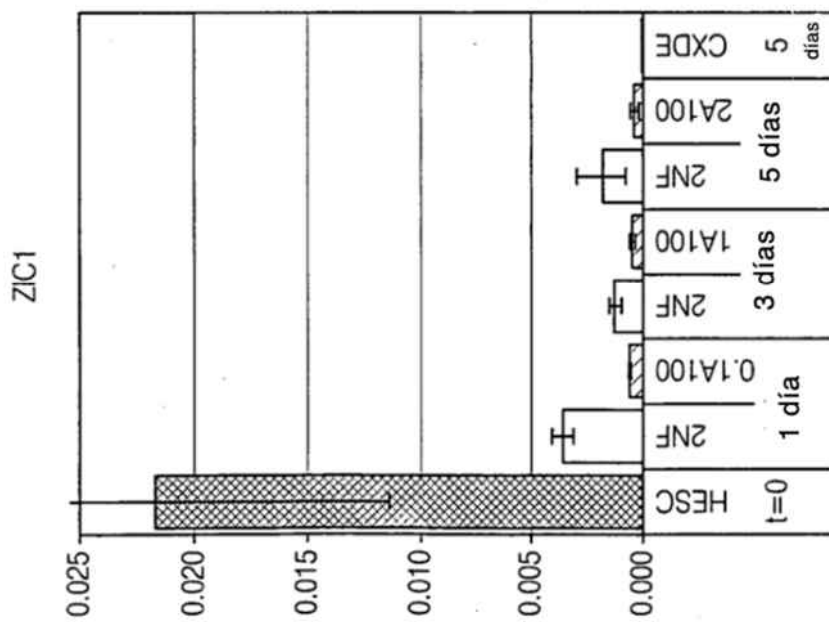


FIG. 34E

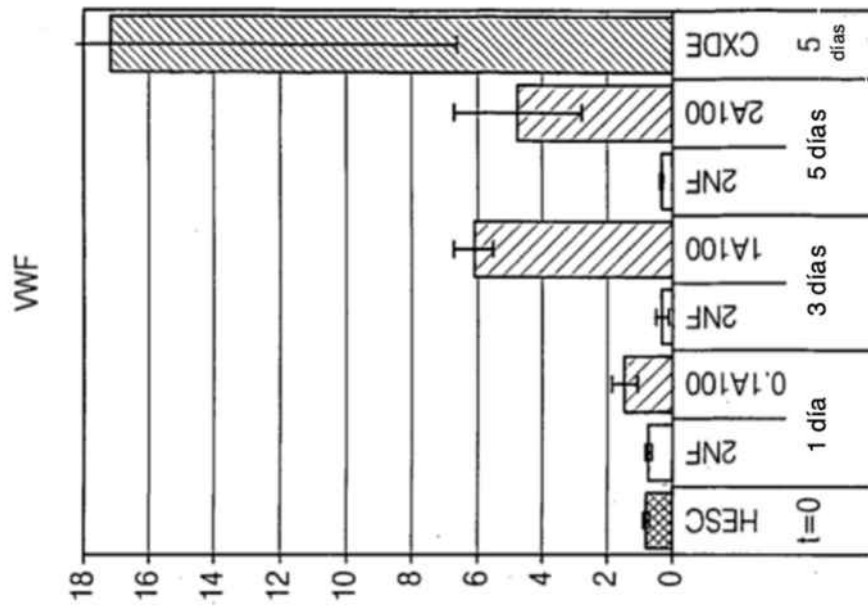


FIG. 34H

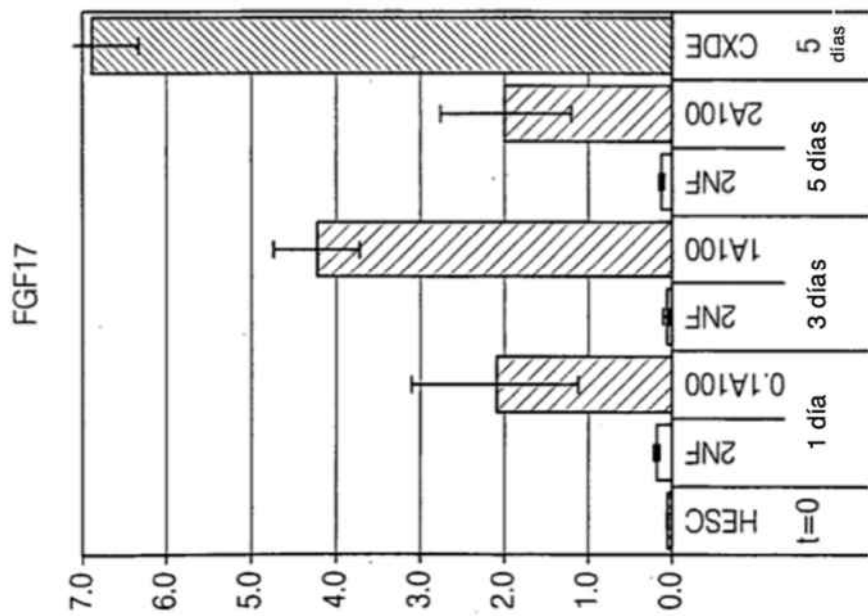


FIG. 34G

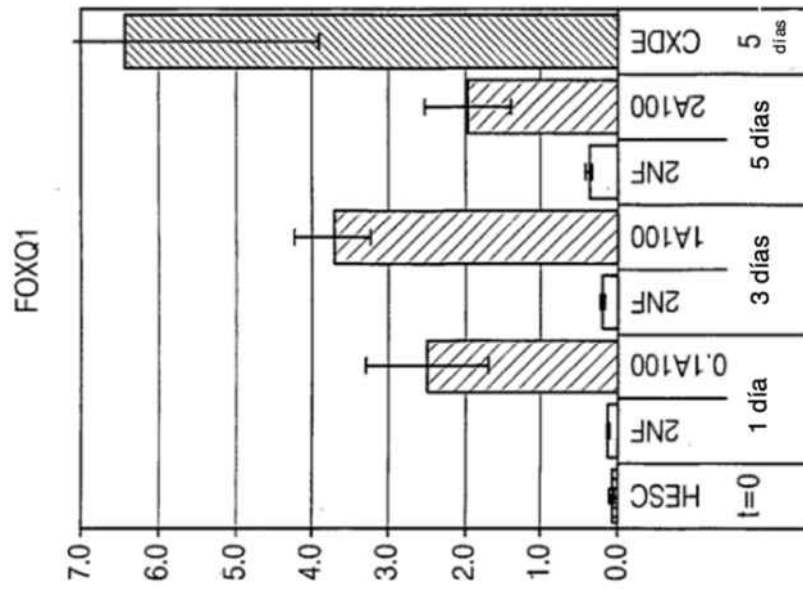


FIG. 34J

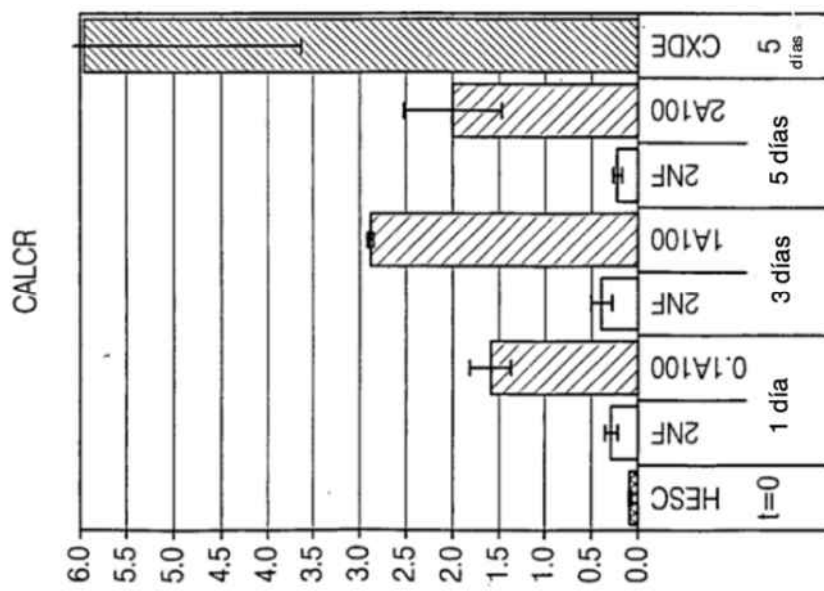


FIG. 34I

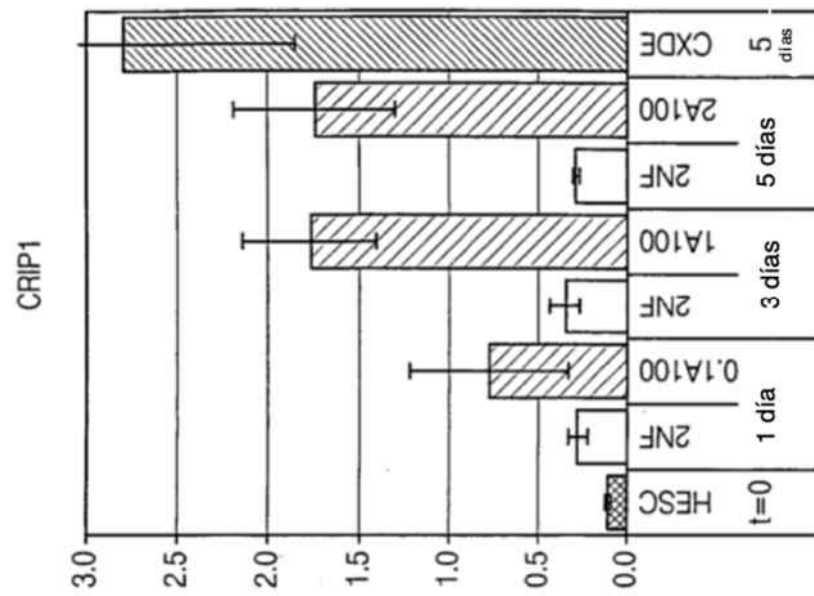


FIG. 34L

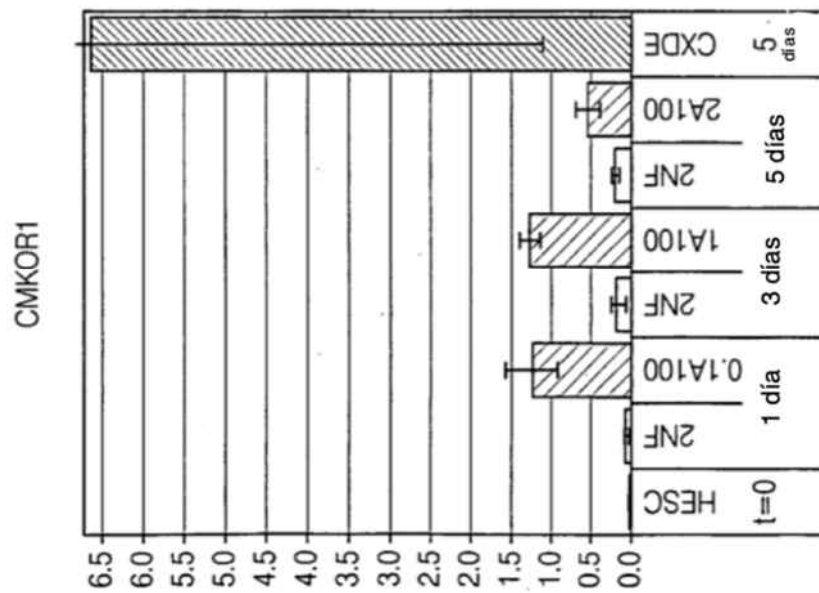


FIG. 34K

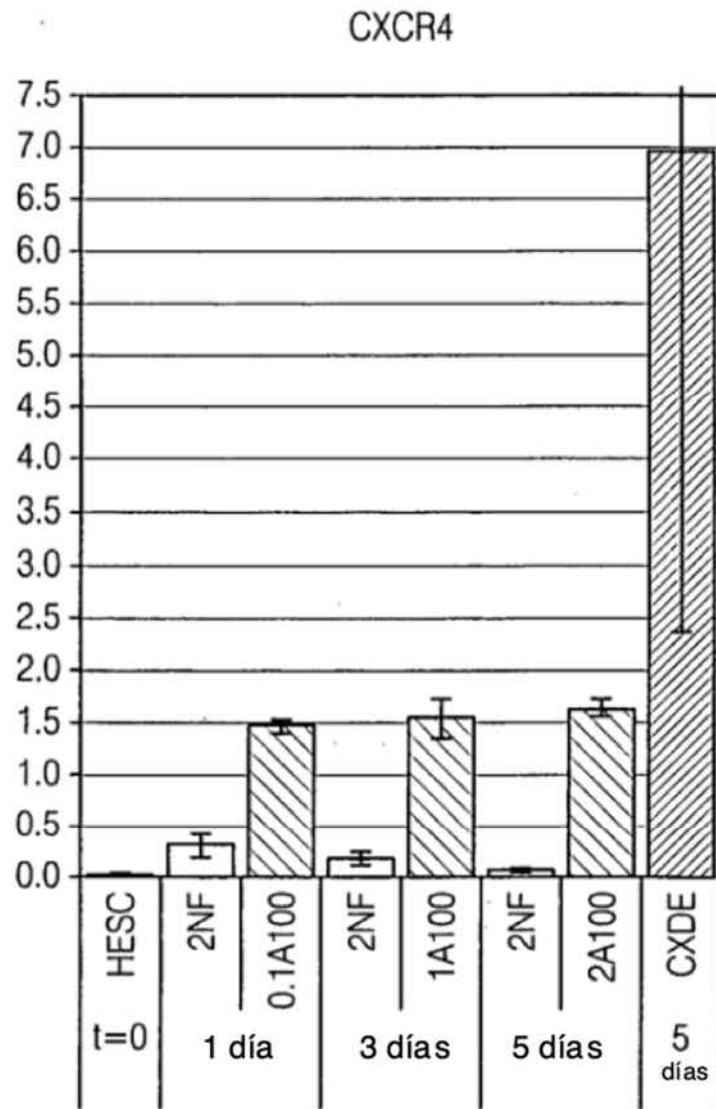


FIG. 34M

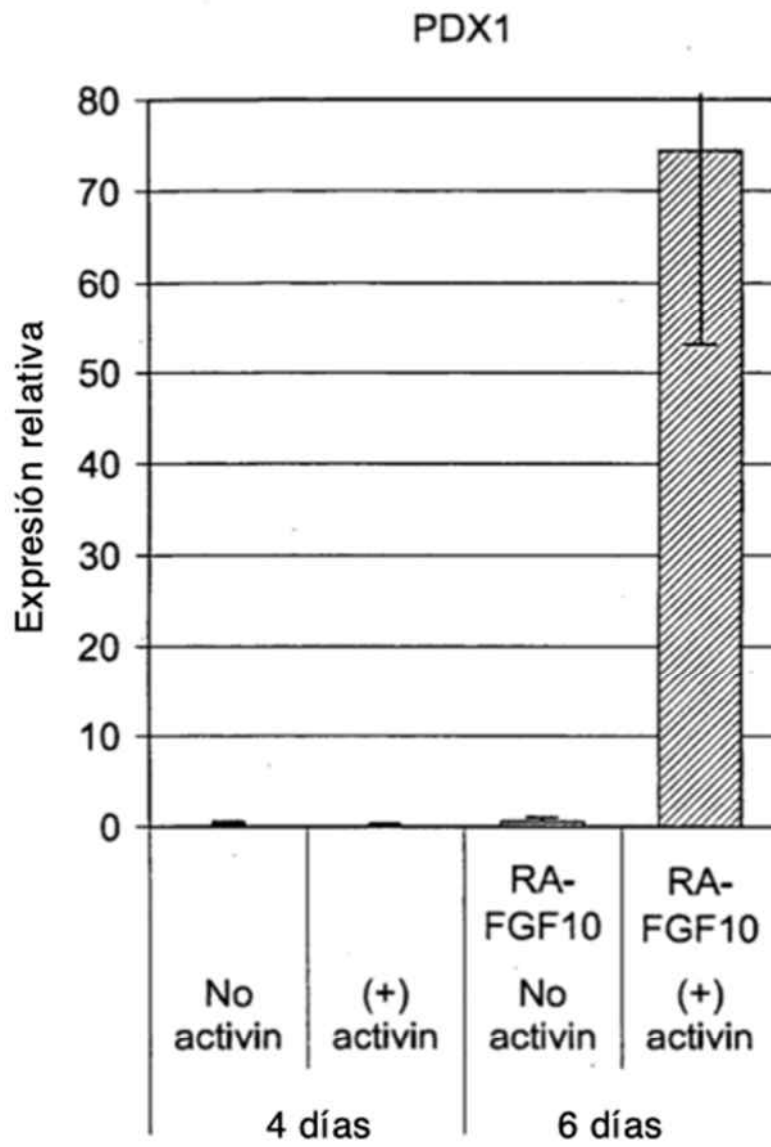


FIG. 35

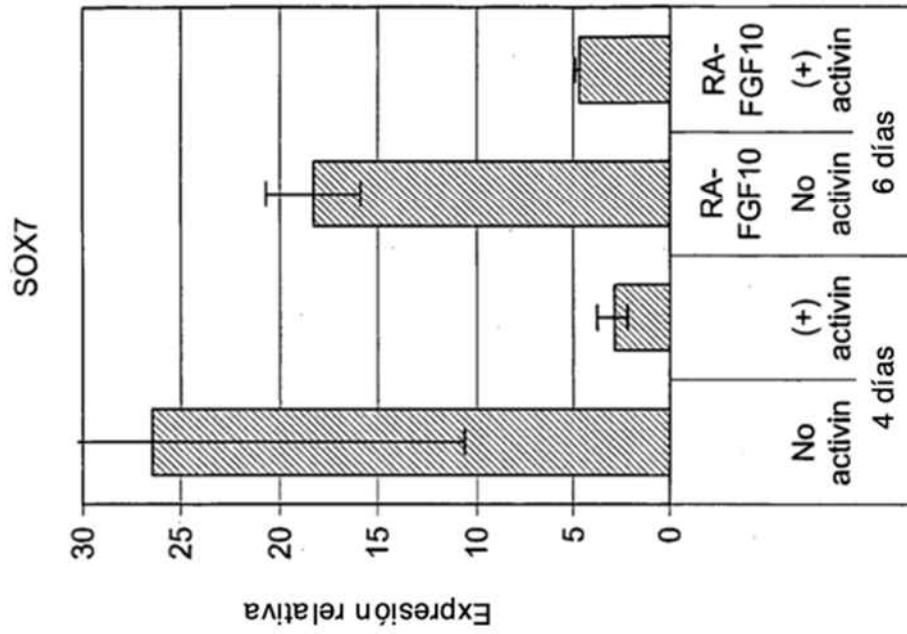


FIG. 36B

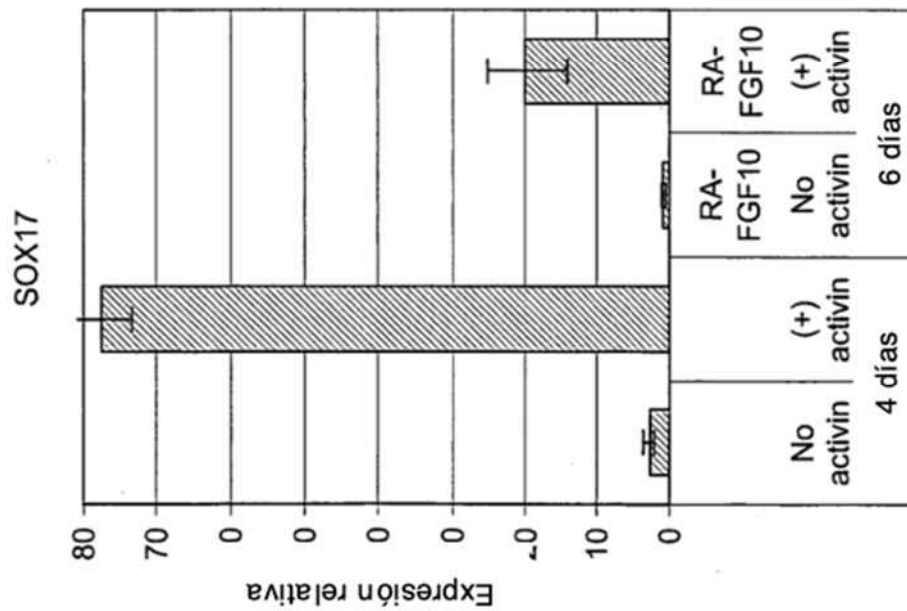


FIG. 36A

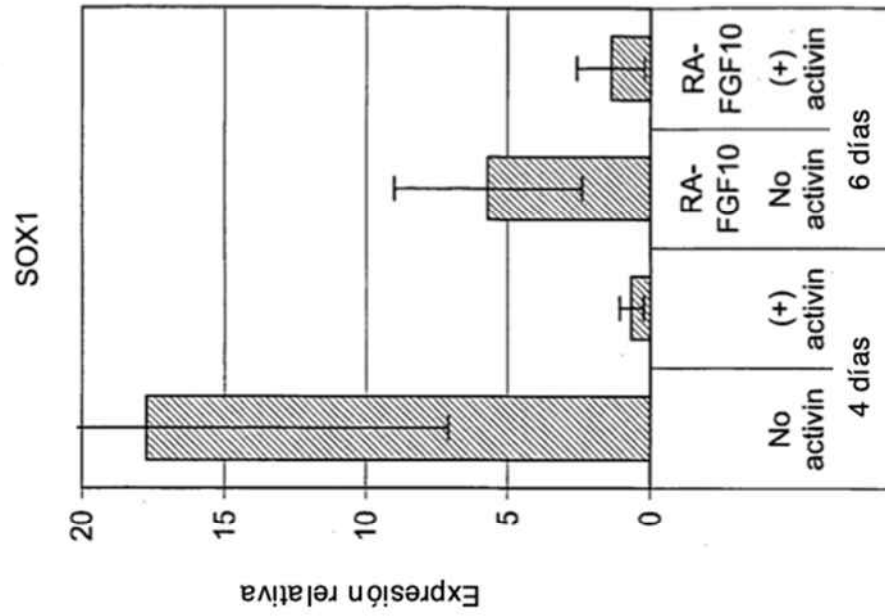


FIG. 36D

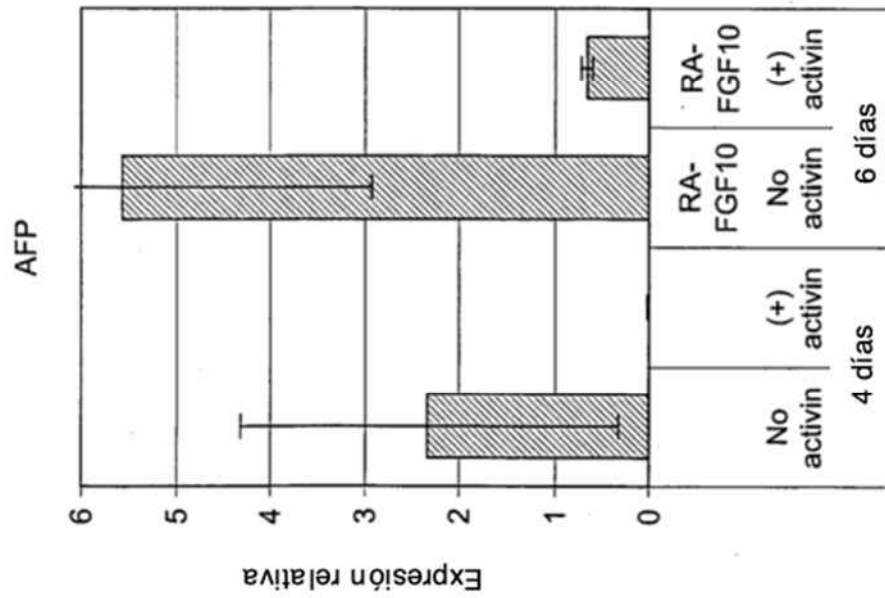


FIG. 36C

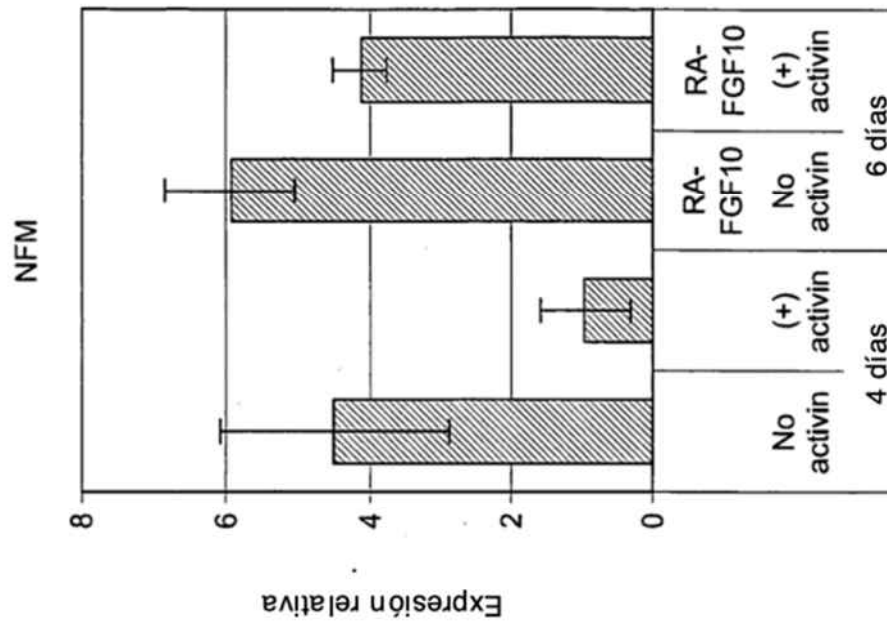


FIG. 36F

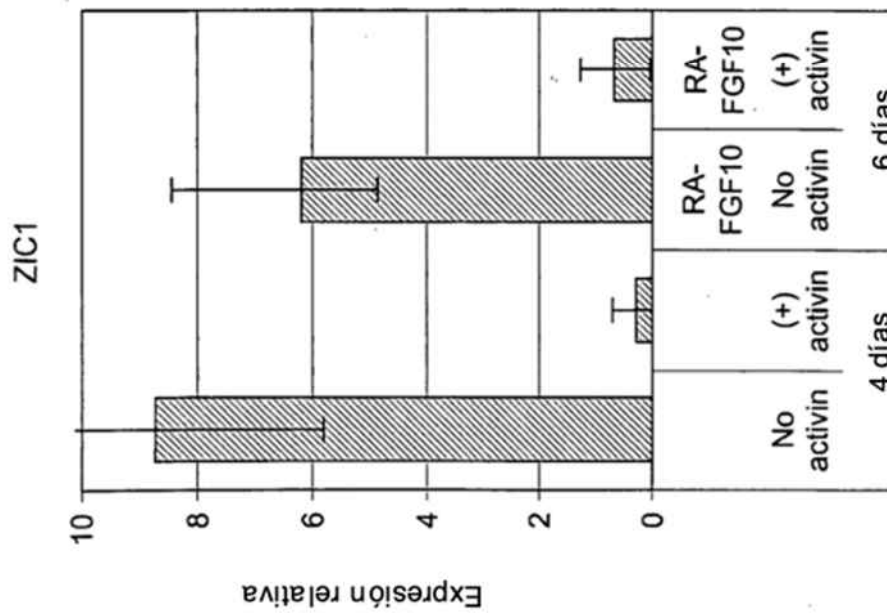


FIG. 36E

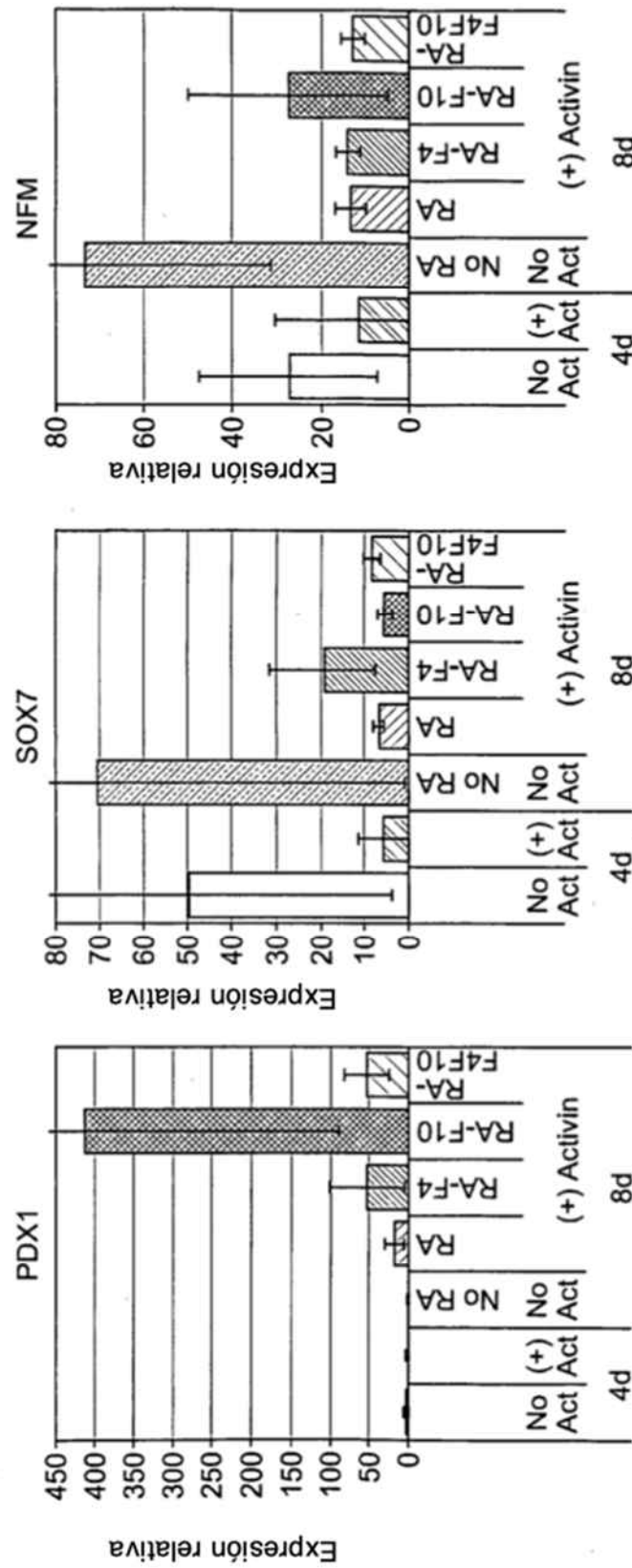
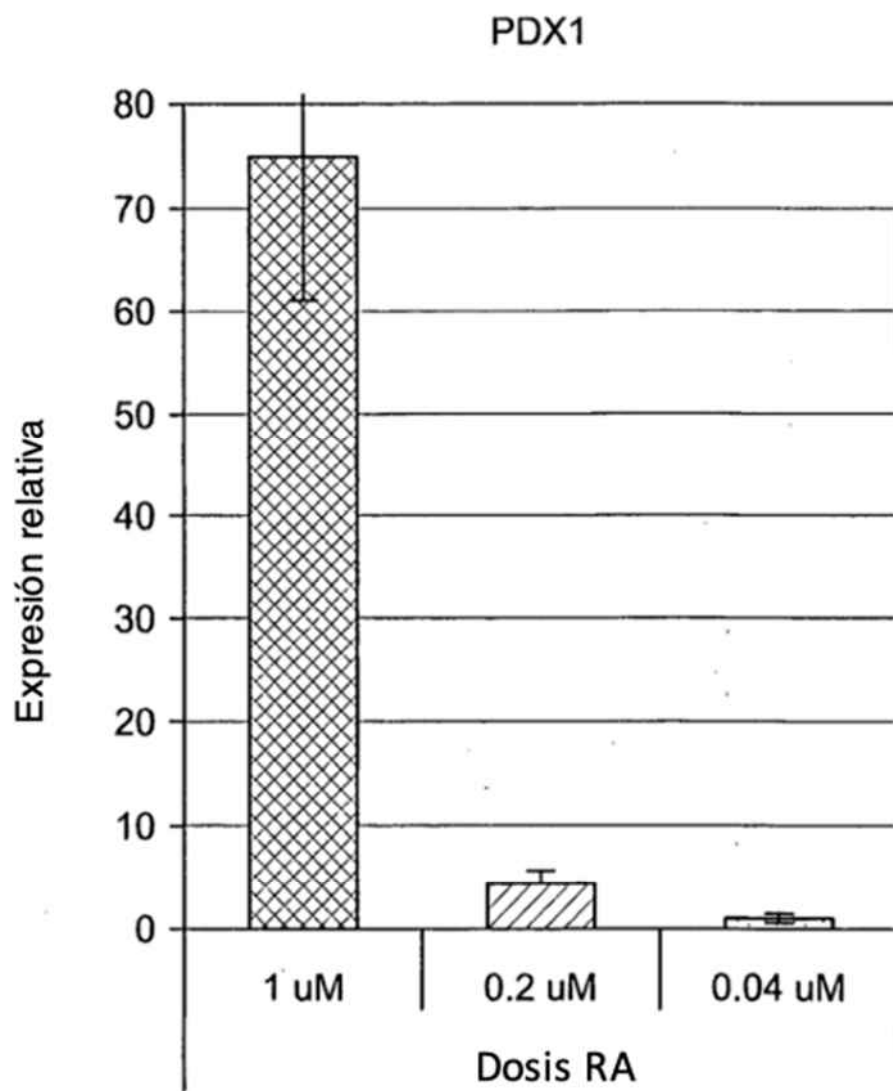


FIG. 37A

FIG. 37B

FIG. 37C

**FIG. 38A**

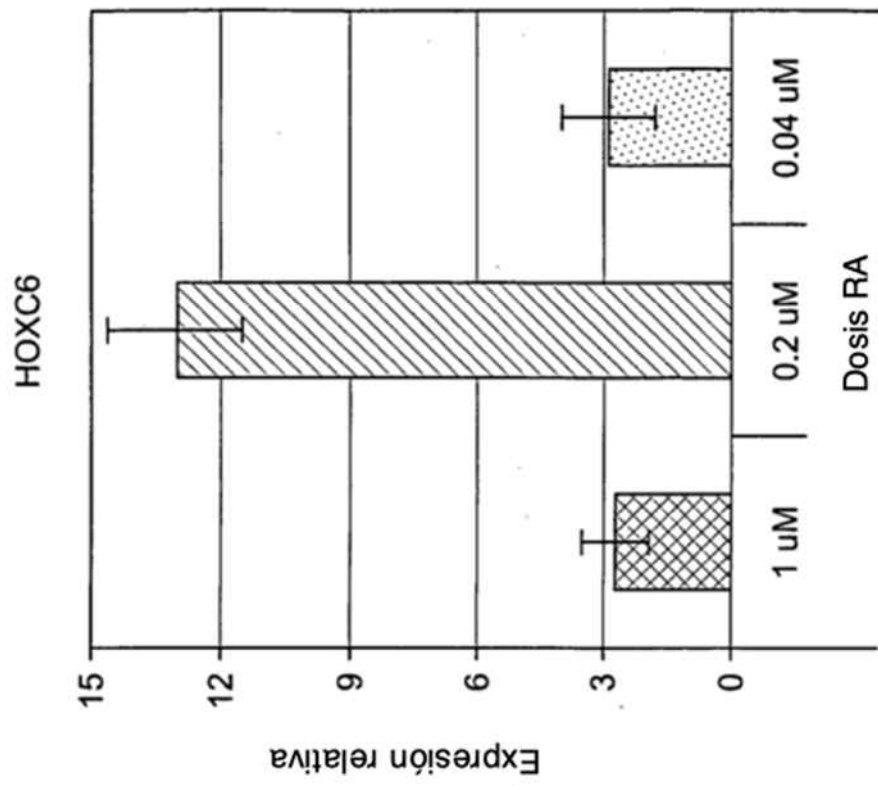


FIG. 38C

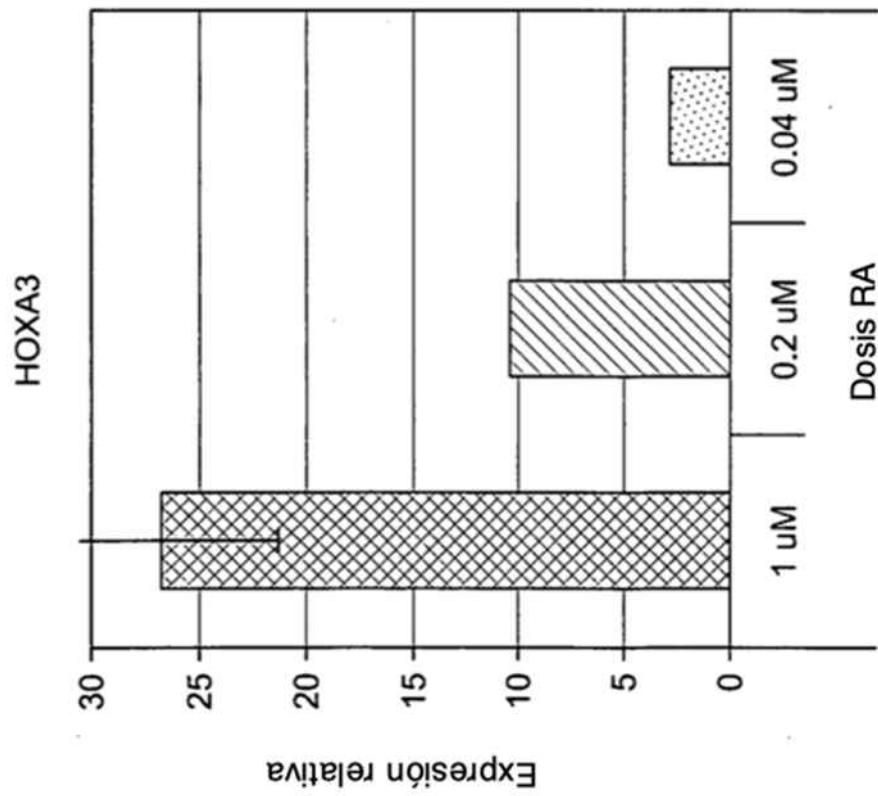


FIG. 38B

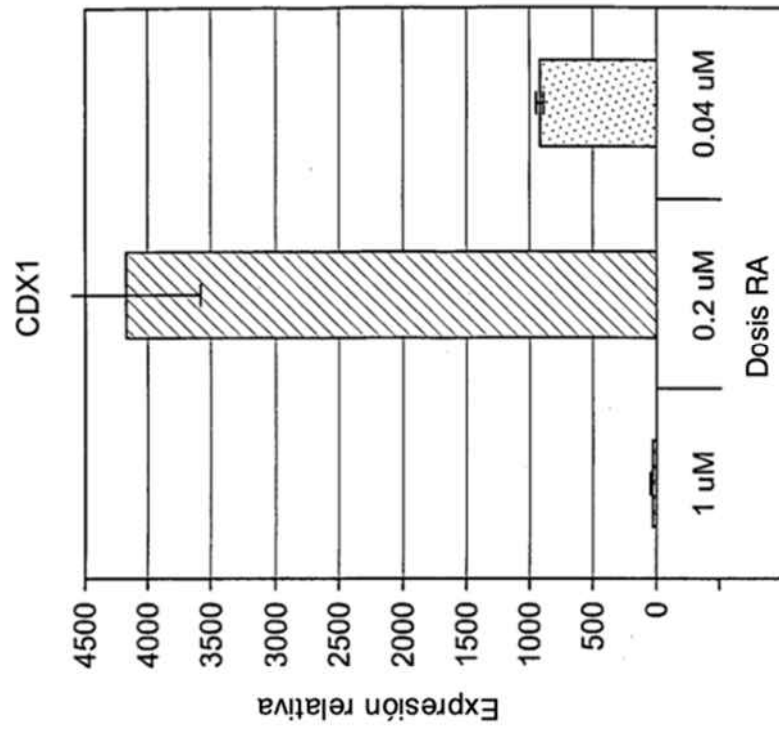


FIG. 38E

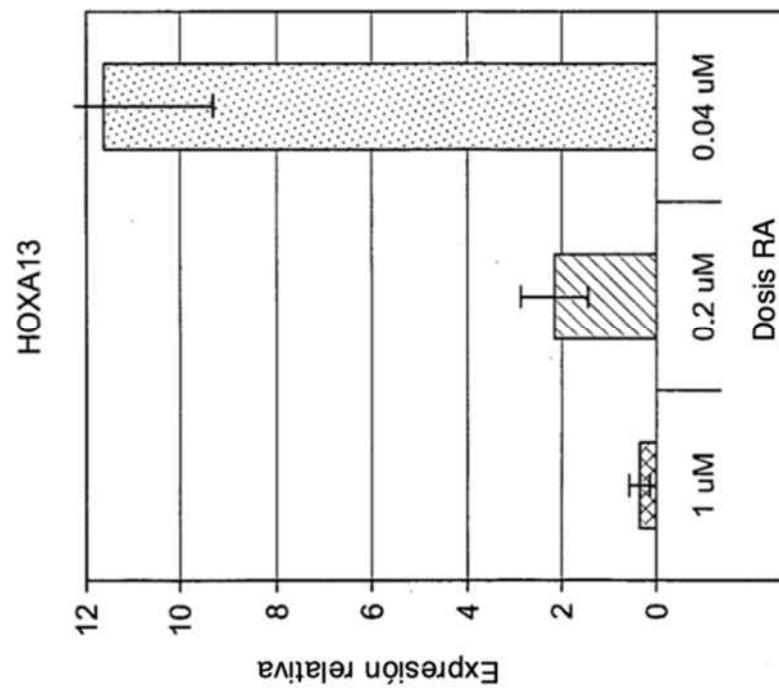


FIG. 38D

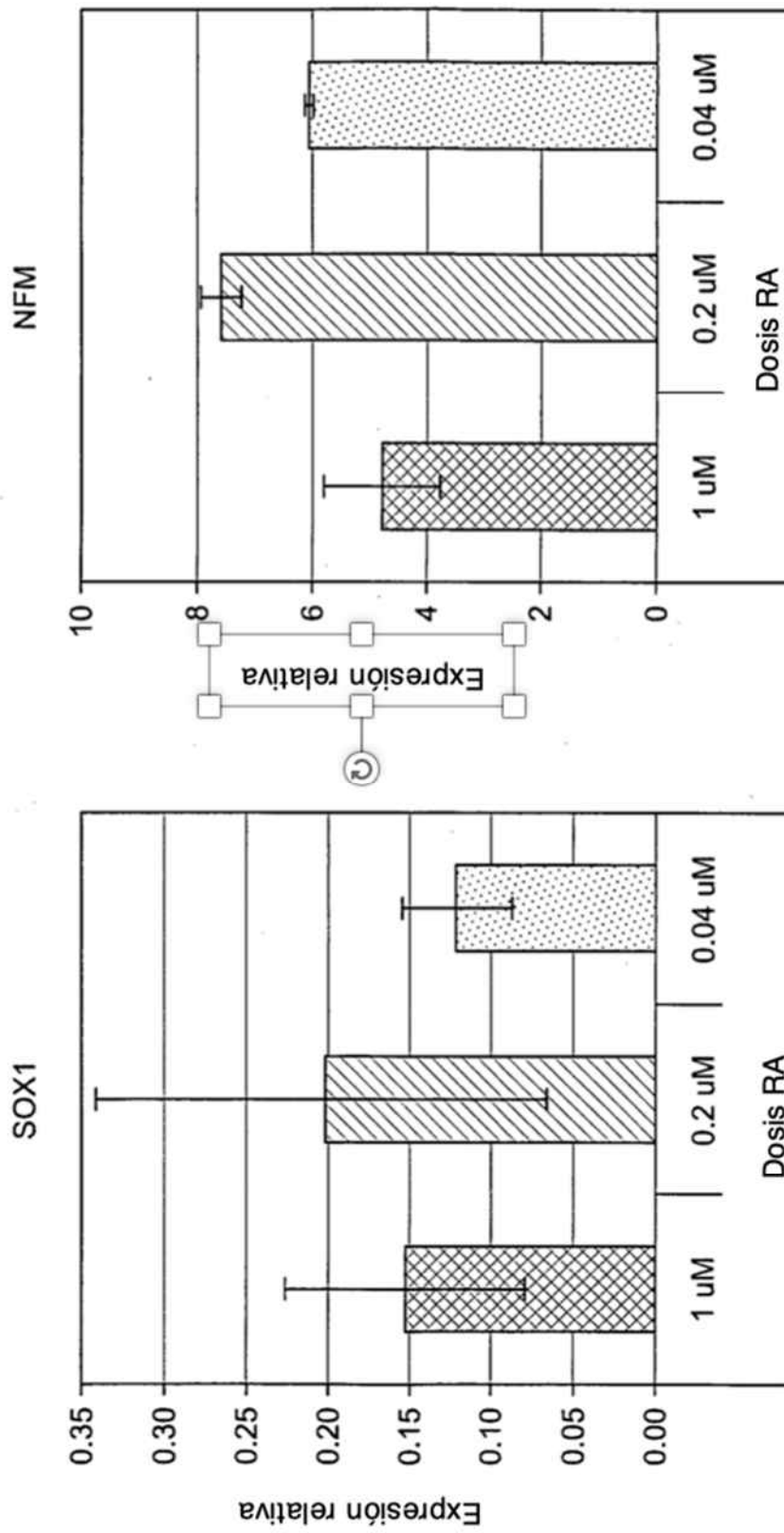


FIG. 38F

FIG. 38G

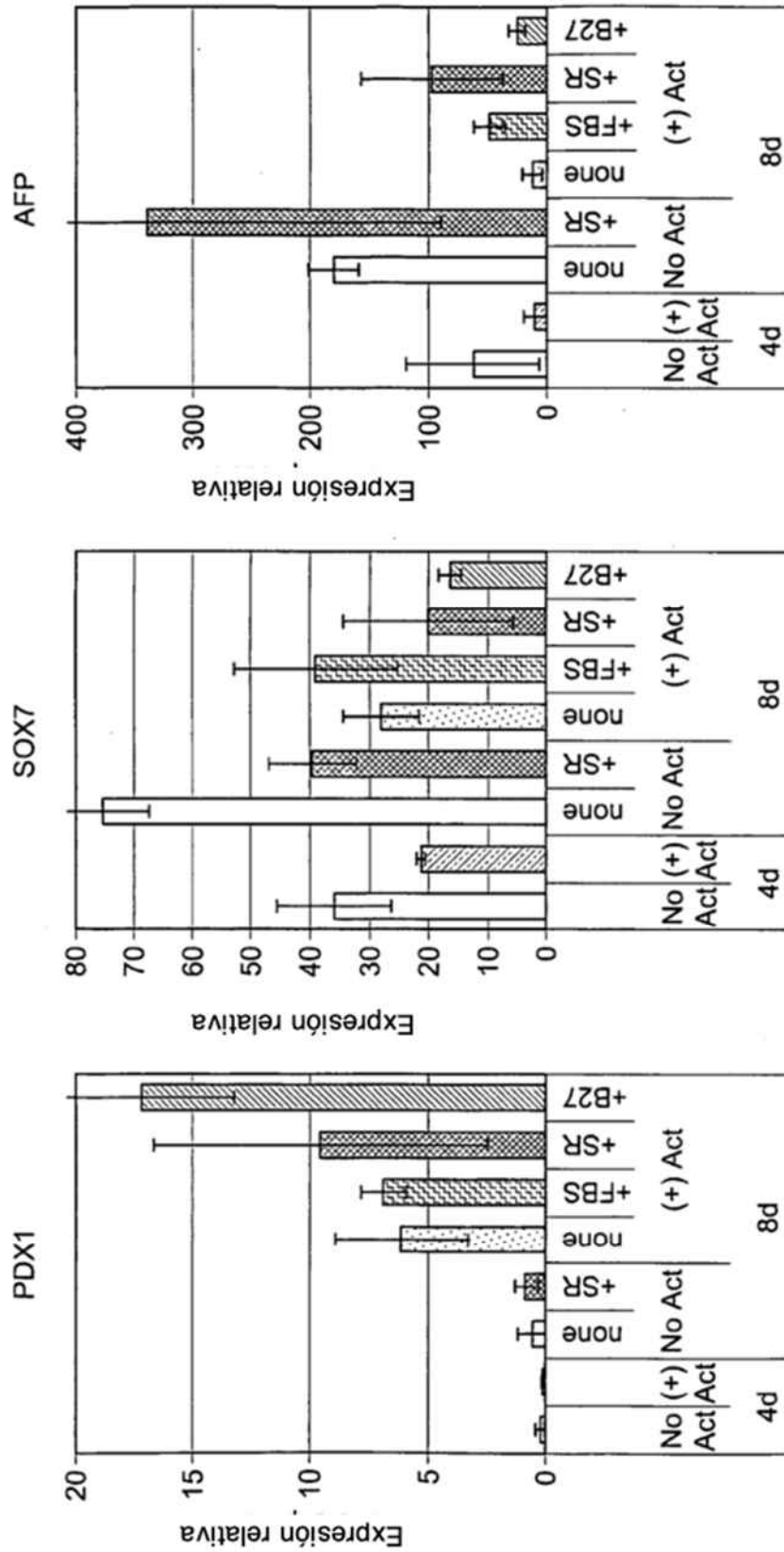


FIG. 39A

FIG. 39B

FIG. 39C

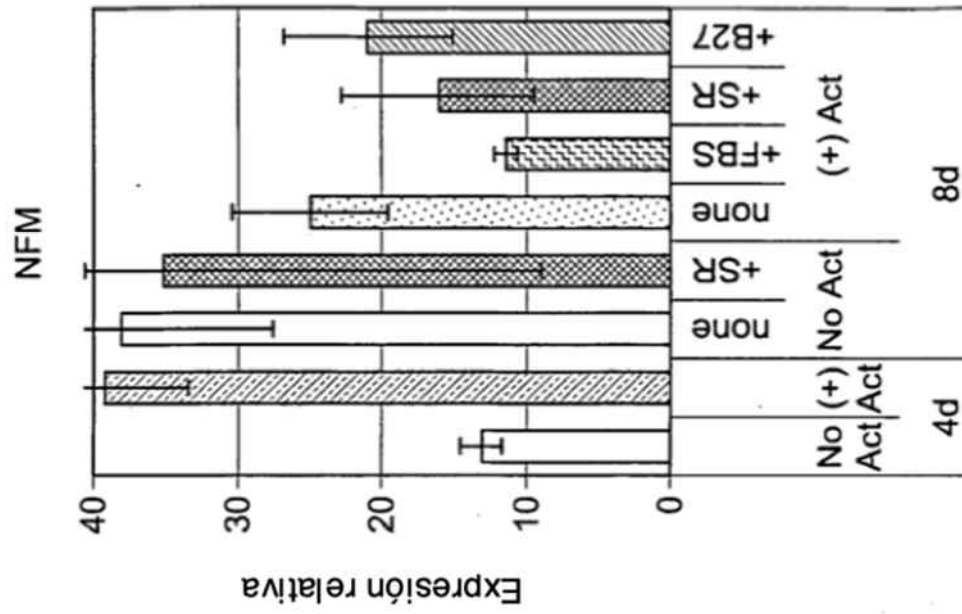


FIG. 39E

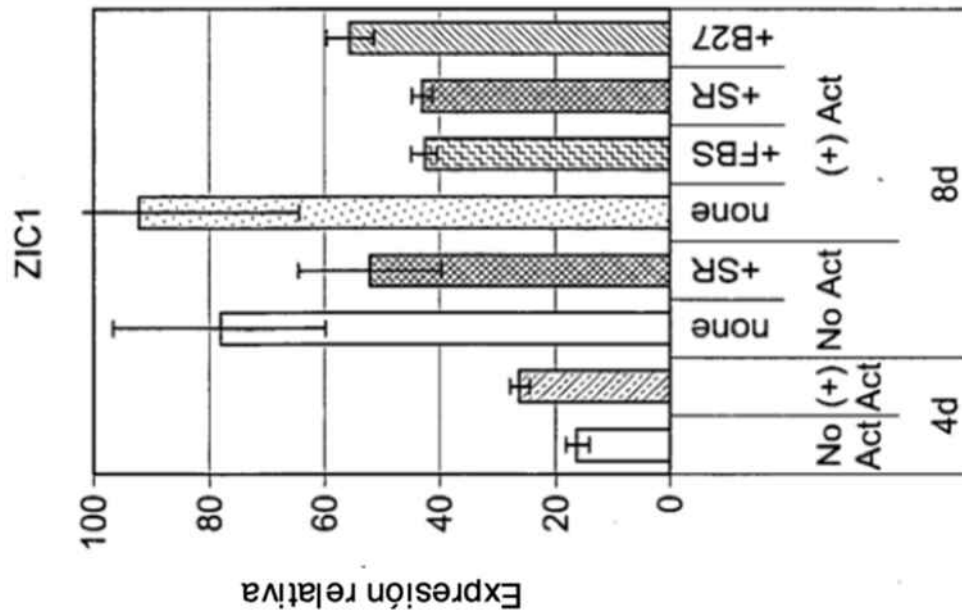


FIG. 39D

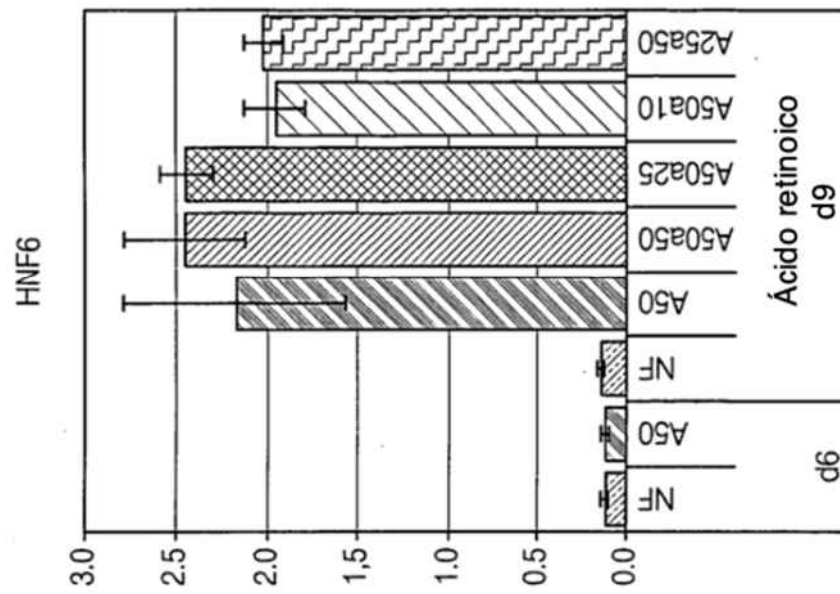


FIG. 40B

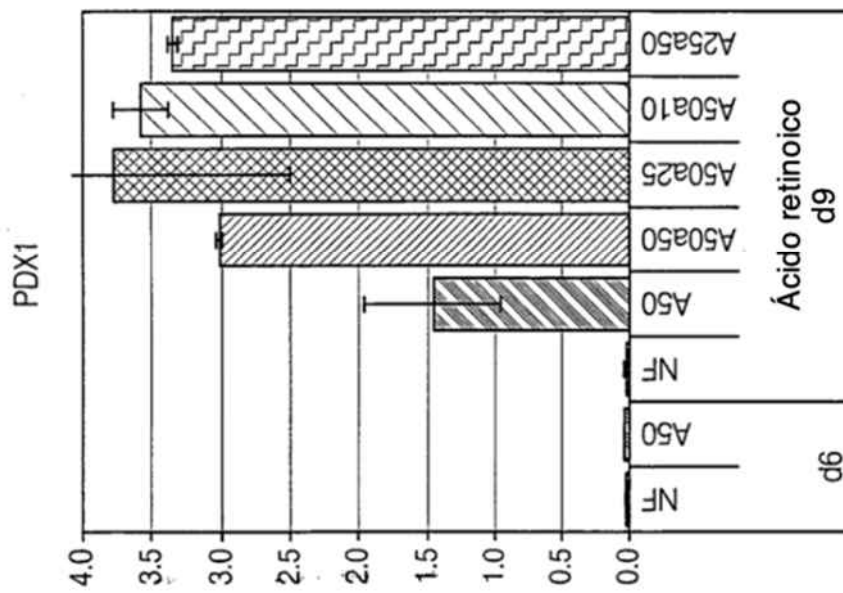


FIG. 40A

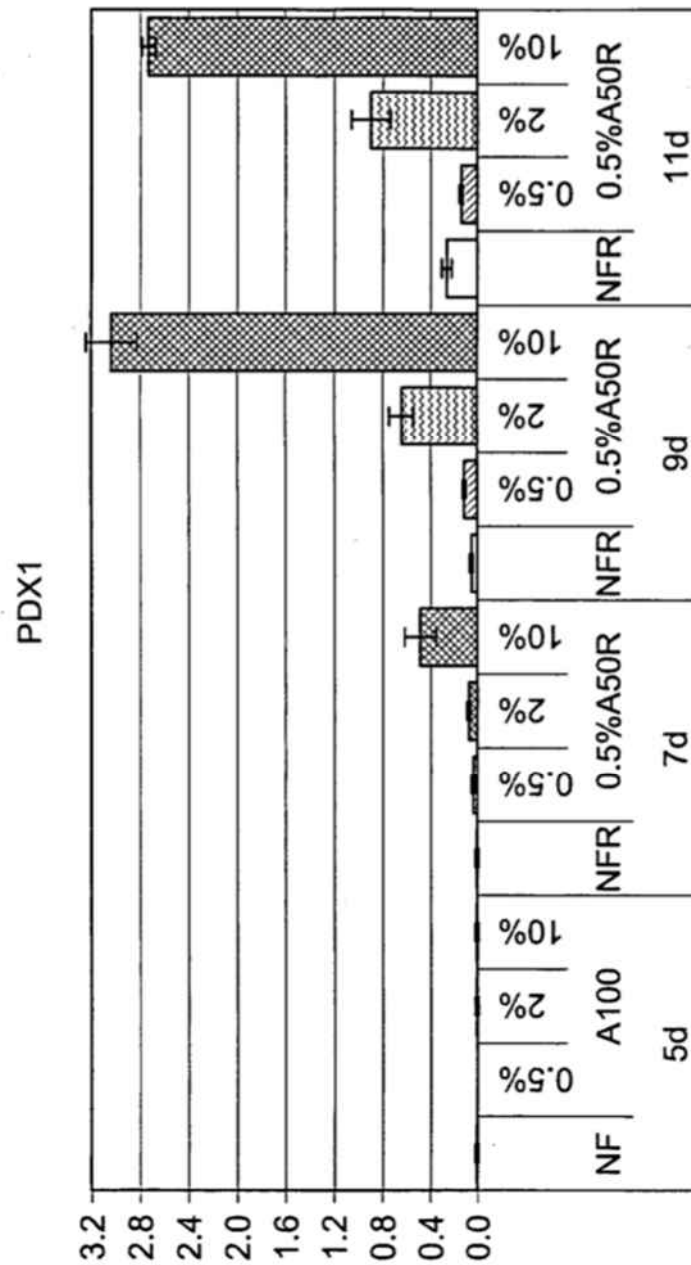


FIG. 41A

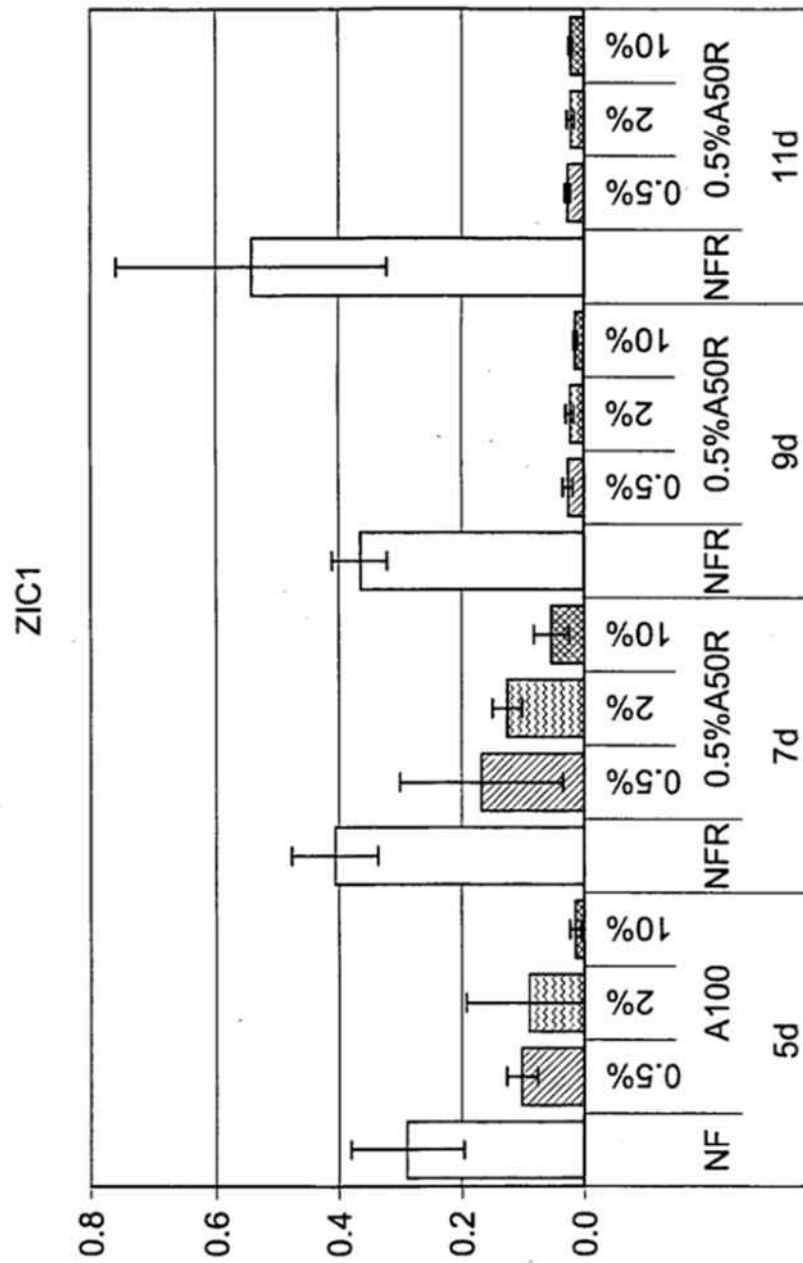


FIG. 41B

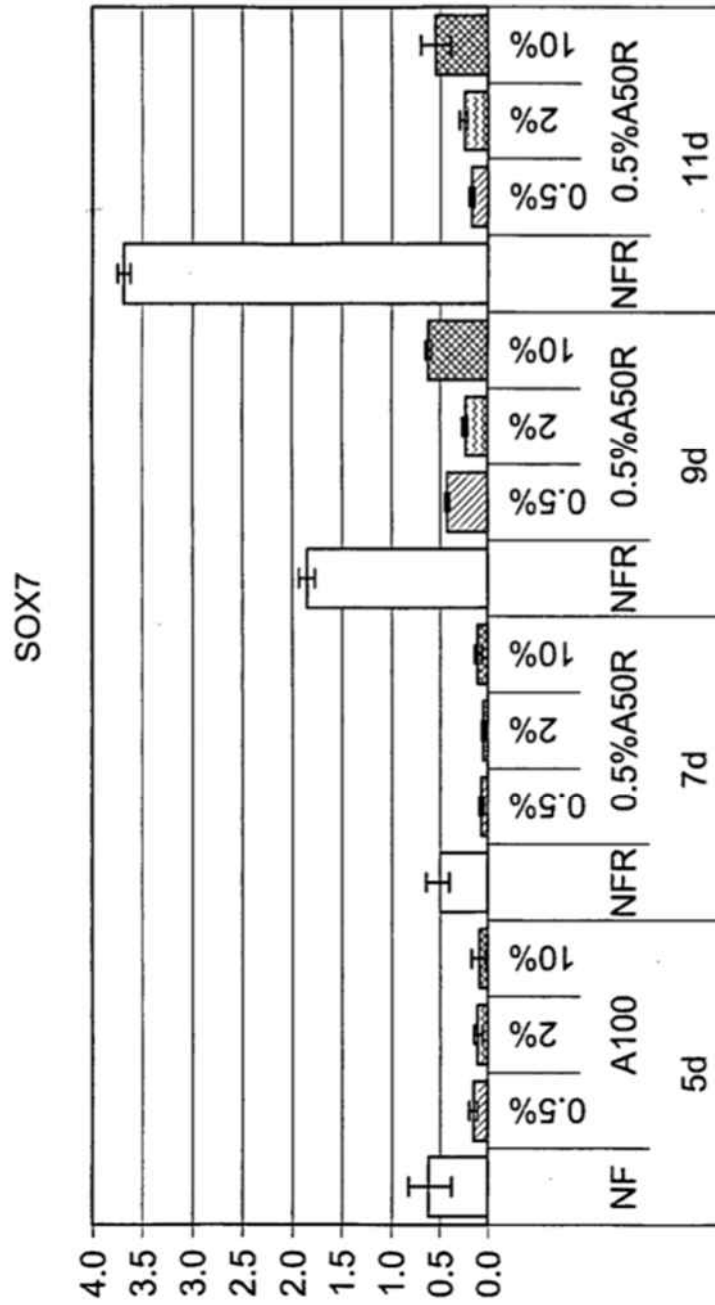


FIG. 41C

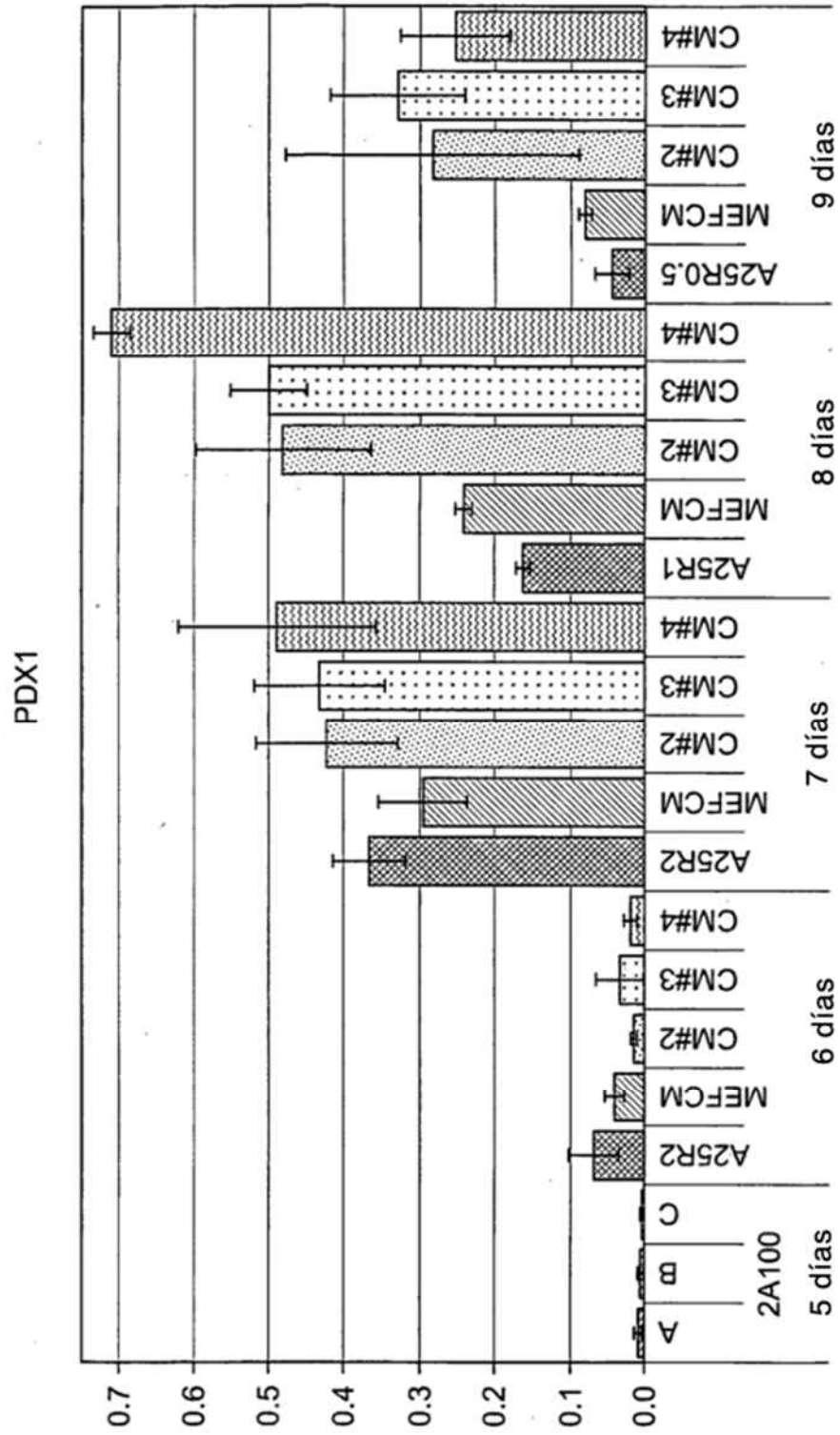


FIG. 42A

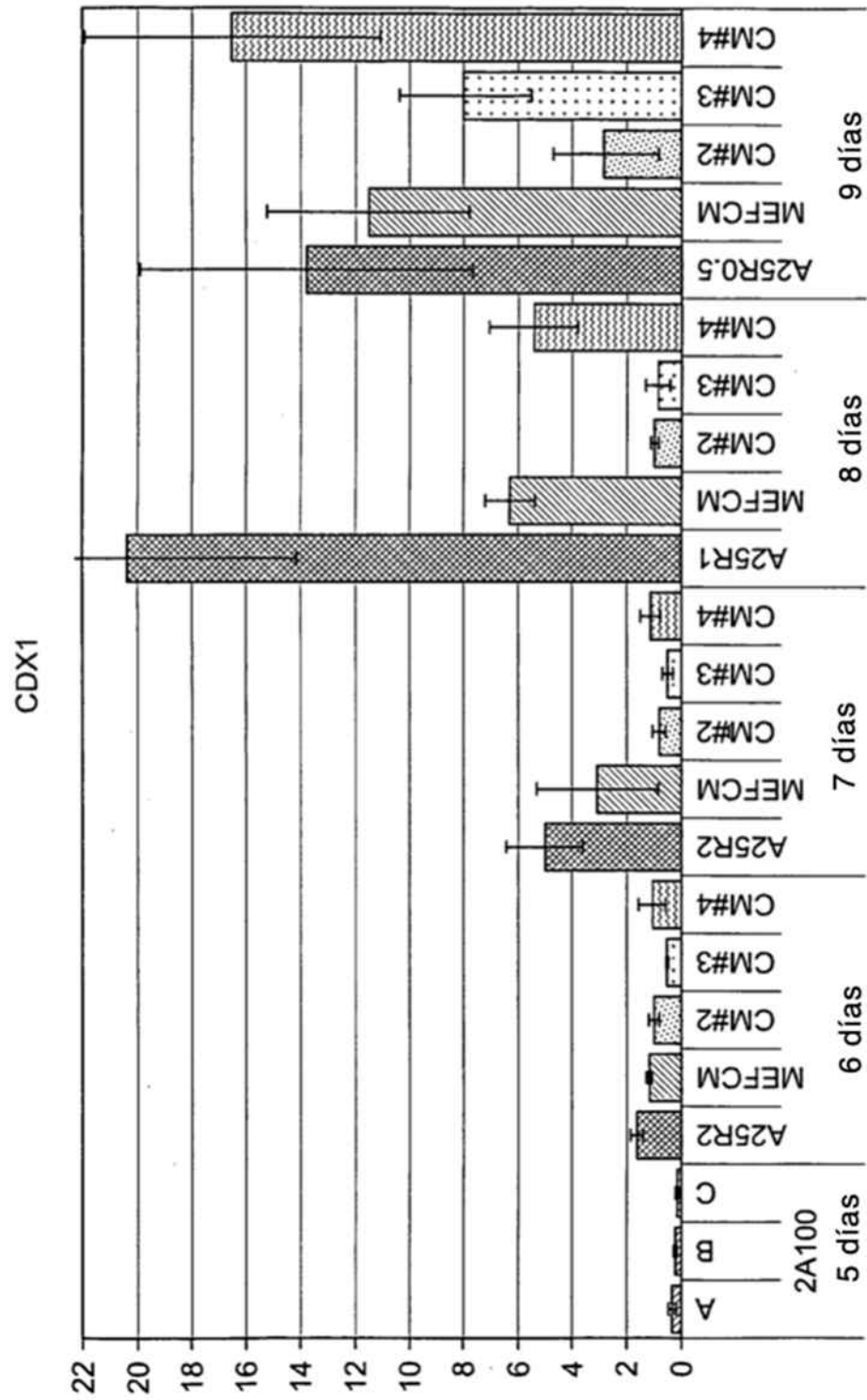


FIG. 42B

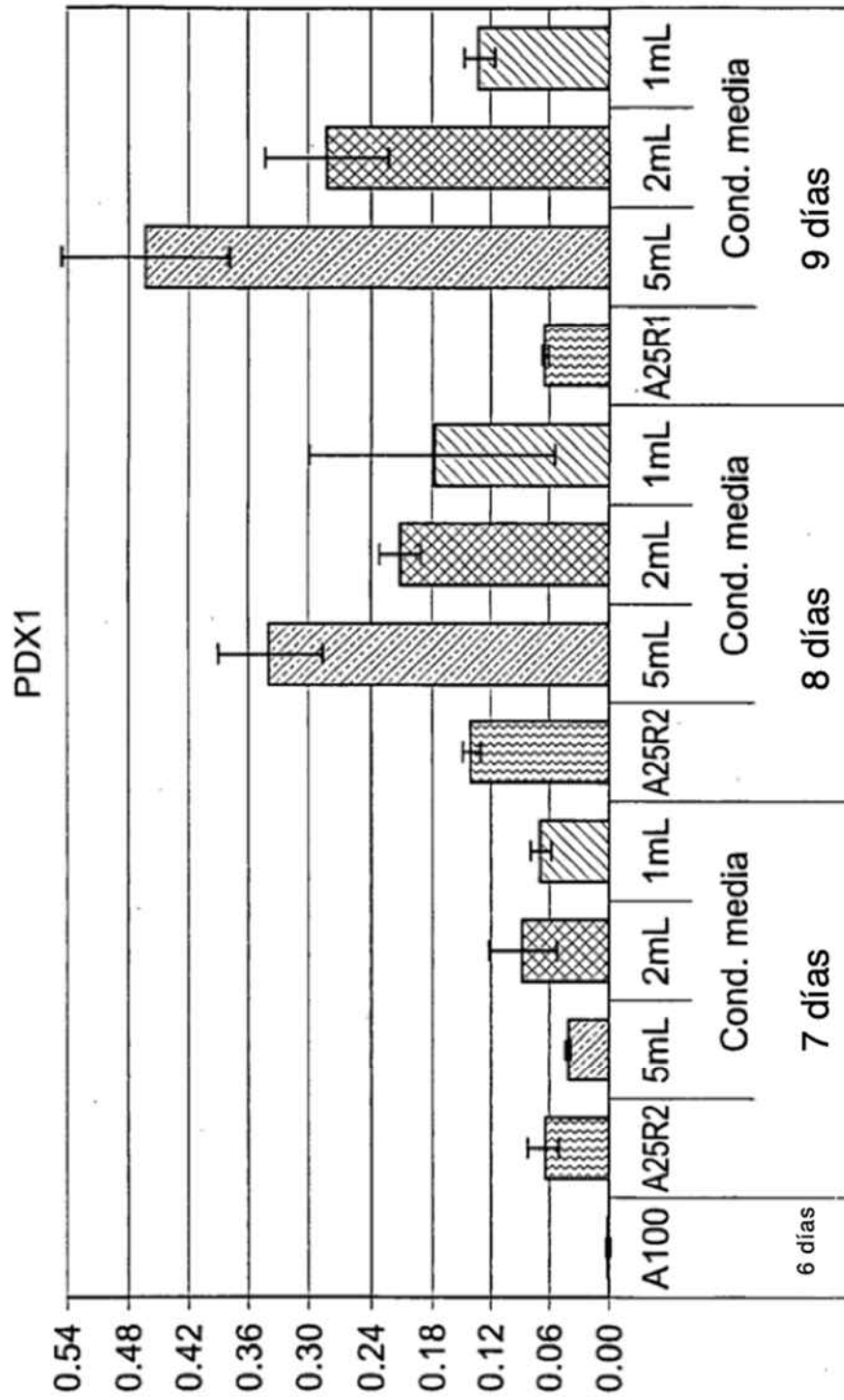


FIG. 43

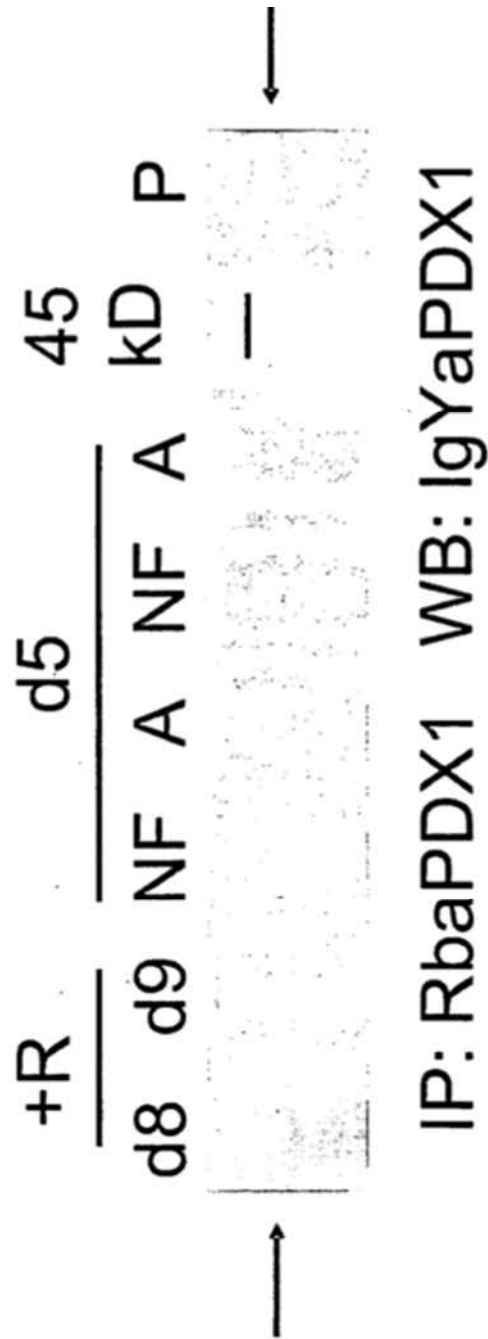


FIG. 44

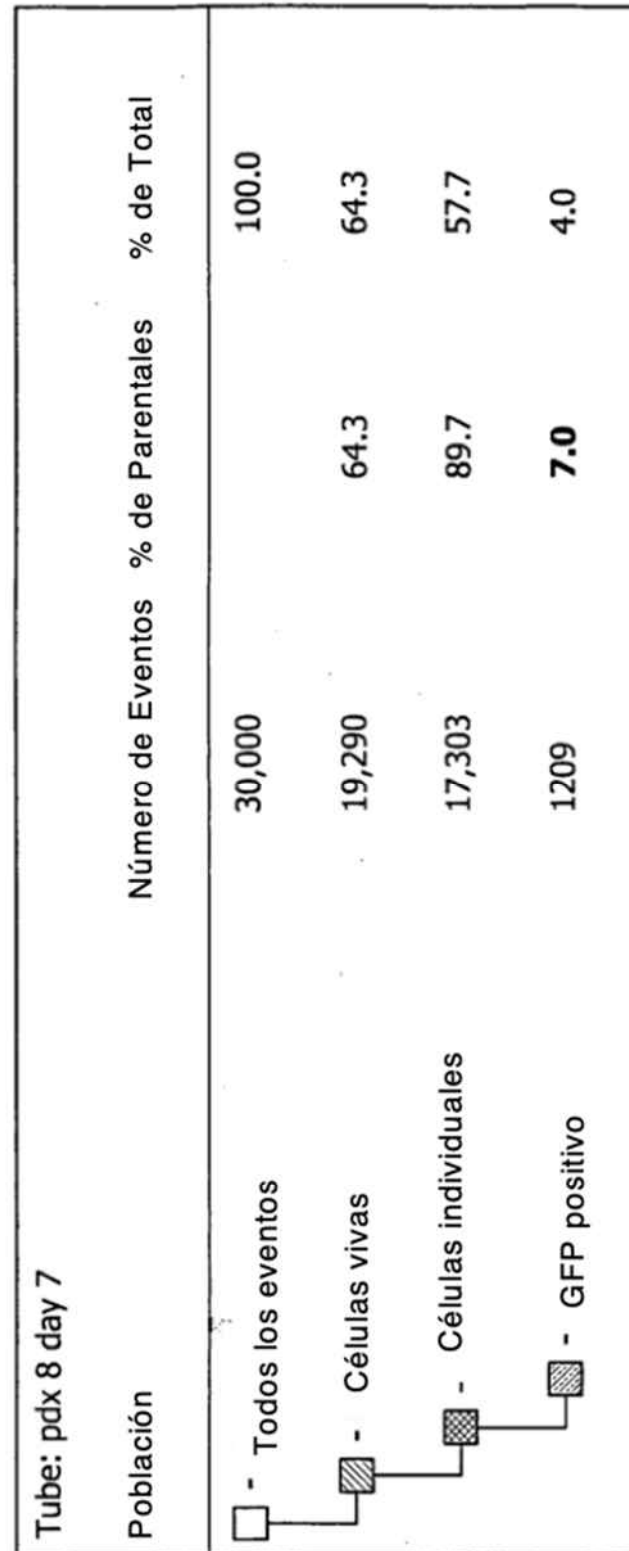


FIG. 45

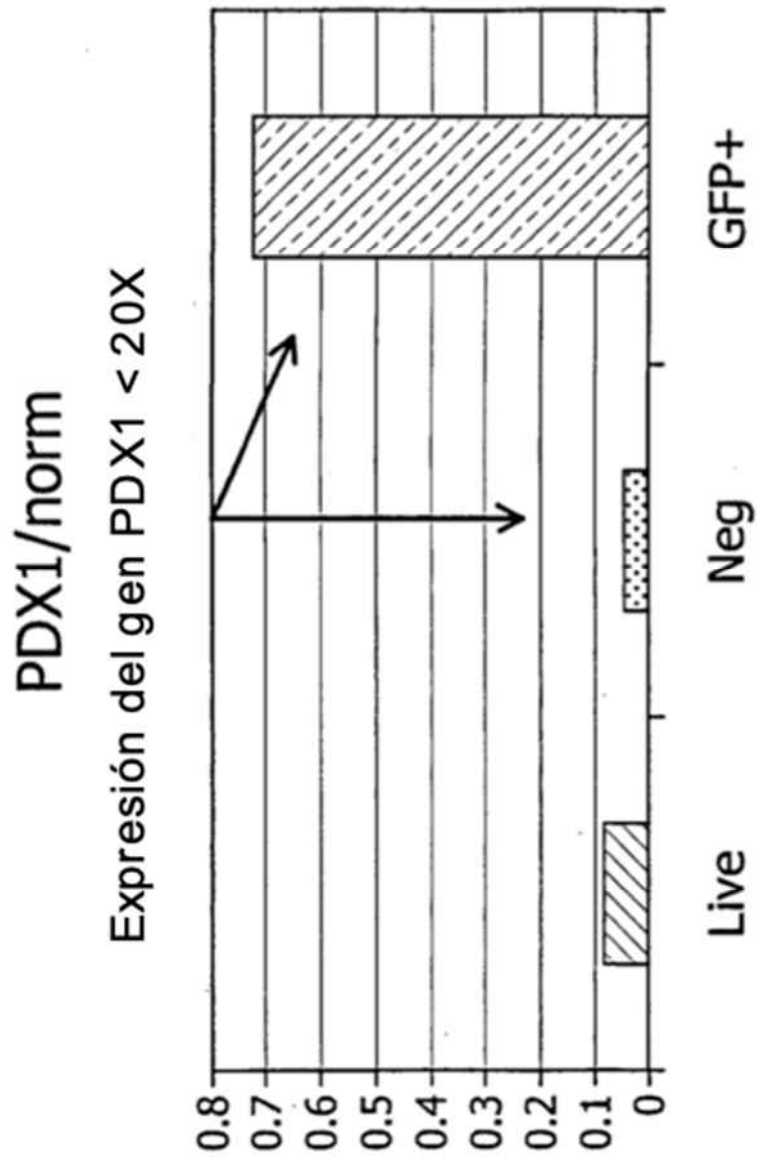


FIG. 46

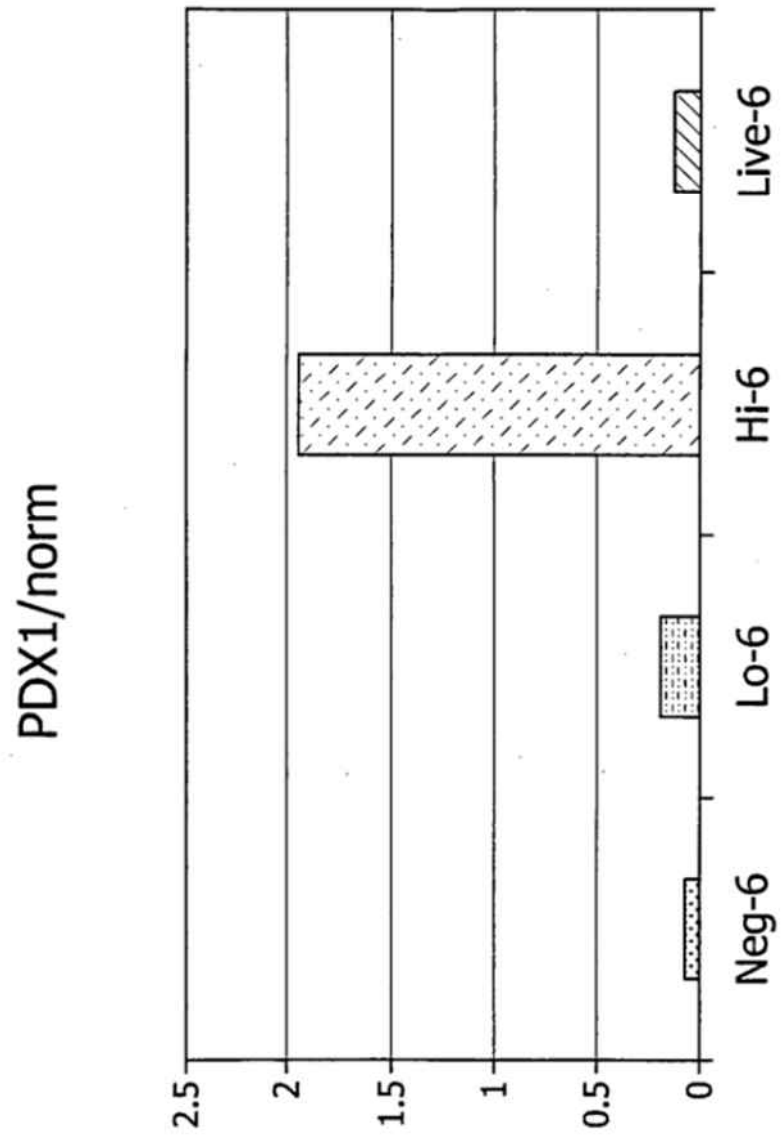


FIG. 47

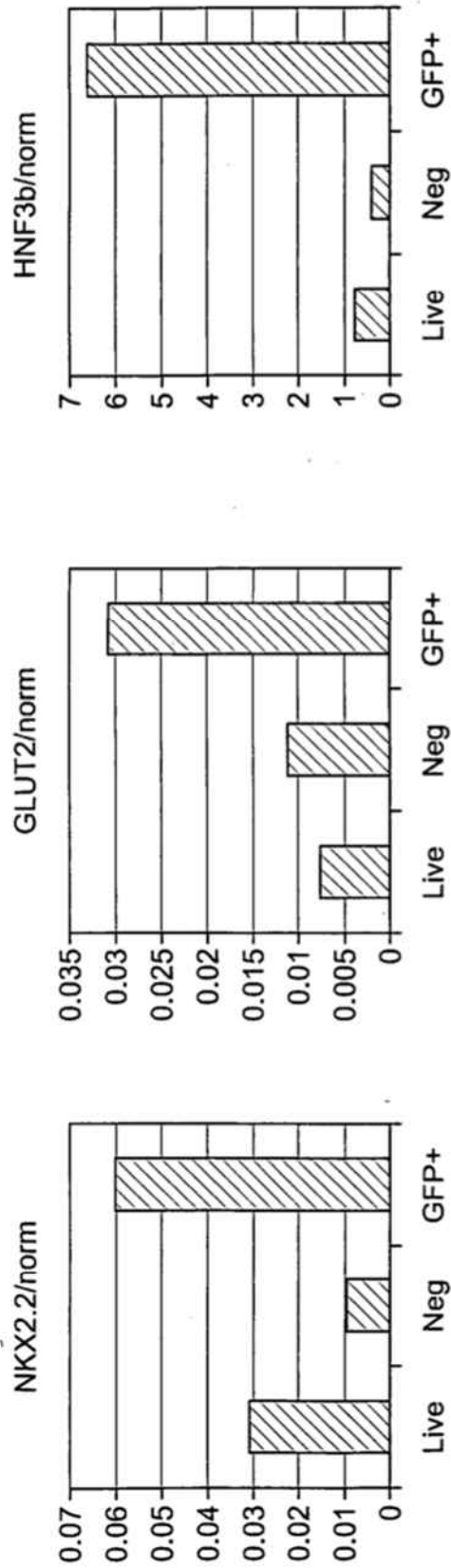


FIG. 48C

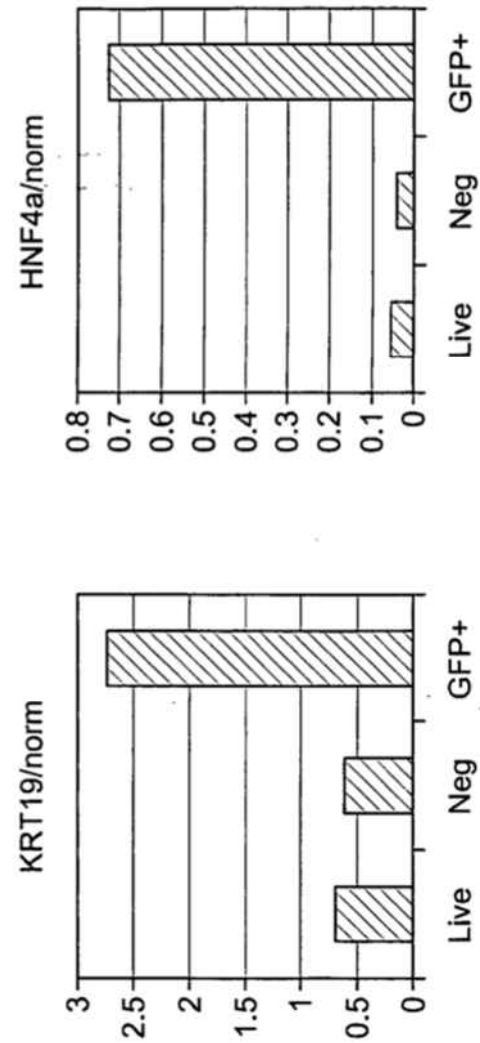


FIG. 48E

FIG. 48D

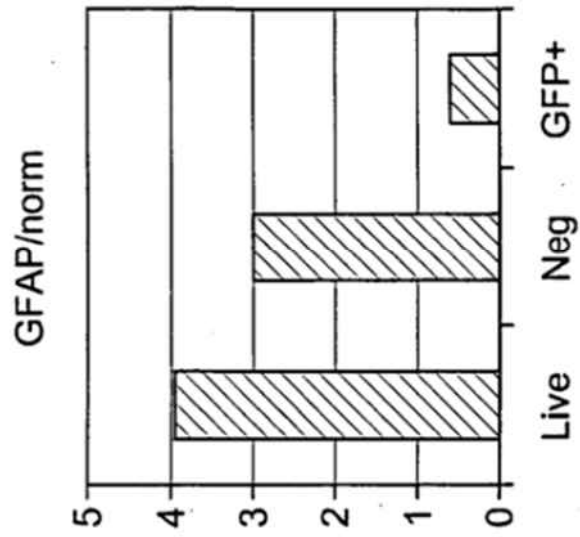


FIG. 49B

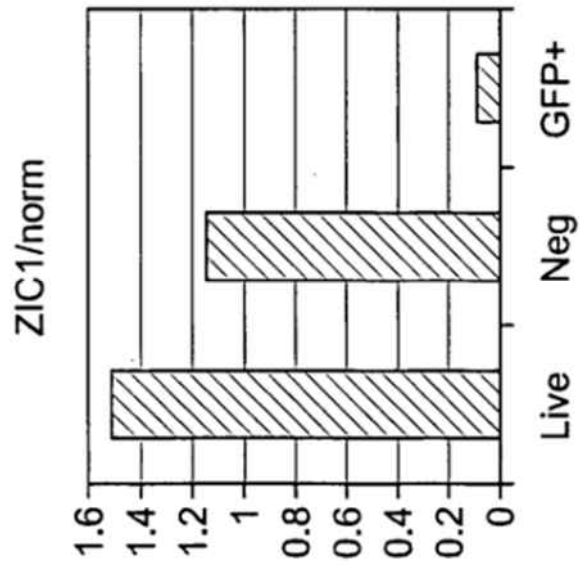


FIG. 49A