

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 813**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05793904 .3**

96 Fecha de presentación: **08.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1791948**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Método de cultivo y cultivo de células madre embrionarias**

30 Prioridad:
08.09.2004 US 608040 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

73 Titular/es:
**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 WALNUT STREET, P.O. BOX 7365
MADISON, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:
**THOMSON, James, A. y
LUDWIG, Tenneille**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 813 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

Medio de cultivo y cultivo de células madre embrionarias.

Antecedentes de la invención

5 Las células madre se definen como células capaces de diferenciarse en otros muchos tipos de células diferenciadas. Las células madre embrionarias son células madre procedentes de embriones que son capaces de diferenciarse en la mayoría, si no todos, de los tipos celulares diferenciados de un cuerpo adulto. Las células madre se describen como pluripotenciales, lo que hace referencia a su capacidad para diferenciarse en múltiples tipos celulares. Un tipo de célula precursora pluripotencial de gran interés para la comunidad investigadora es la célula madre embrionaria humana, nombrada en este documento célula ES, que es una célula precursora embrionaria derivada de una fuente
10 embrionaria humana. Las células madre embrionarias humanas son de gran interés científico porque son capaces de proliferar indefinidamente en medios de cultivo y así son capaces, al menos en principio, de proporcionar células y tejidos que permitan reemplazar tejidos humanos defectuosos. La existencia de células madre embrionarias humanas en cultivos ofrece el potencial de cantidades ilimitadas de células y tejidos humanos para su empleo en una gran variedad de procedimientos terapéuticos de ayuda para la salud humana. Se prevé que en el futuro los
15 células madre embrionarias humanas se reproducirán y se orientarán a diferenciarse en distintos linajes de forma que se desarrollen células o tejidos diferenciados que puedan trasplantarse en seres humanos con fines terapéuticos. Las células madre embrionarias humanas y las células diferenciadas que pueden derivarse de ellas son también herramientas muy potentes para el estudio de los sistemas celulares y de desarrollo humanos.

20 Se han descrito las técnicas básicas para crear y cultivar células madre embrionarias humanas. Las técnicas descritas previamente funcionan, pero muchos de los procedimientos usados actualmente para cultivar células madre embrionarias humanas tienen limitaciones e inconvenientes. Una de las limitaciones presenta una objeción especial. La mayoría de las líneas de células madre embrionarias humanas existentes han sido, en mayor o menor grado, expuestas directamente a células de ratón o a un medio en el que se han cultivado previamente células de ratón. Por parte de la prensa, se prestó gran atención al hecho de que se encontrasen algunas células ES humanas de líneas celulares existentes que exhiben el residuo siálico Neu5Gc, residuo que no es sintetizado normalmente por
25 células humanas. Las técnicas originales para la generación y el cultivo de células madre embrionarias humanas requerían del uso de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés Mouse Embryonic Fibroblast) como una capa alimentadora en la que los células madre embrionarias humanas podían ser cultivadas. Las células alimentadoras de fibroblastos actúan, a través de un mecanismo que no se comprende completamente todavía, de forma que fomentan que las células madre permanezcan en un estado indiferenciado. Posteriormente, se descubrió que este mismo efecto podía conseguirse si las células madre se exponían a "medios acondicionados". Un medio acondicionado es un medio de cultivo de células madre en el que las células alimentadoras, como las MEFs, habían sido cultivadas previamente. Ya sea porque las células alimentadoras proporcionaban un factor al
30 medio o porque eliminaban un factor del medio, el resultado es que el medio acondicionado puede utilizarse para cultivar células madre sin diferenciación. Ya sea por las características del cultivo, el crecimiento directo de células ES humanas en células alimentadoras murinas, o por el uso de un medio acondicionado, surge la preocupación de que uno o más agentes infecciosos, como un virus, podrían transmitirse de las células de ratón a los células ES humanas. Si uno de los objetivos de los cultivos de células madre embrionarias humanas es crear tejidos que en última instancia puedan trasplantarse a un cuerpo humano, es sumamente deseable que las células madre nunca
40 hayan sido expuestas a células de otras especies o a medios que hayan sido utilizados para cultivar células de otras especies. En consecuencia, definir las condiciones de cultivo que permitirán la proliferación y el cultivo de células madre embrionarias humanas sin la capa alimentadora de fibroblastos, es de gran interés en el desarrollo continuo de técnicas para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas.

45 Un rasgo característico de células madre embrionarias humanas en el cultivo es que si las condiciones están por debajo de las óptimas, las células tienden a diferenciarse. Es fácil inducir a los células ES humanas a diferenciarse aunque existe la necesidad de mantener los células ES en un cultivo en estado indiferenciado. La mayoría de las condiciones de cultivo llevan a cierto grado de diferenciación no deseada, particularmente en torno a la periferia de la colonia de células ES en crecimiento. Aunque los células ES pueden cultivarse con cierto grado de diferenciación no deseada, el objetivo es definir unas condiciones de cultivo que permitan al cultivo permanecer tan indiferenciado
50 como sea posible, es decir con el mínimo de células diferenciadas posible. El solicitante cree que se han utilizado estándares especialmente restrictivos para definir las condiciones de cultivo indefinido para cultivos de células ES indiferenciadas.

55 Varias formulaciones de medios de cultivo permiten que los células ES permanezcan indiferenciadas durante cierto tiempo, pero este estado falla a menudo en automantenerse. En particular, el solicitante ha definido el crecimiento de células ES humanas desde un estado de siembra inicial en un recipiente de cultivo hasta la confluencia en el mismo recipiente de cultivo como un pase. El solicitante ha encontrado varias formulaciones de medios que permiten el cultivo de células ES humanas en uno o dos pasos sin diferenciación estricta, pero posteriormente las células se diferencian rápidamente durante pases sucesivos. El solicitante entiende que para que un medio de cultivo verdaderamente permita la proliferación indefinida de células ES humanas sin diferenciación, en ausencia de medios
60 acondicionados o células de fibroblastos alimentadoras, debe demostrarse que el medio puede mantener el cultivo

de células ES humanas en un estado sustancialmente uniforme e indiferenciado durante al menos cinco pases. También es importante que los cultivos permanezcan relativamente homogéneos e indiferenciados durante el periodo de cultivo y mantengan todas las características significativas de las células ES humanas.

5 El estado de diferenciación de un cultivo de células madre puede evaluarse más fácilmente valorando las características morfológicas de las células. Las células madre indiferenciadas tienen una morfología característica, es decir son células pequeñas y compactas con bordes celulares claramente definidos, una morfología que puede verse fácilmente mediante el examen de un cultivo de células madre en el microscopio. En cambio, las células que se han diferenciado aparecen más grandes y más difusas, con bordes poco definidos. Aunque algunas células diferenciadas pueden, y normalmente lo hacen, aparecer en el margen de las colonias de células indiferenciadas, el cultivo óptimo de células madre es aquel que prolifera en el recipiente de cultivo con un número mínimo de células que parezcan estar diferenciadas en la periferia del cultivo. Con experiencia, se puede evaluar visualmente con gran exactitud el estado de diferenciación y salud de los cultivos de células ES humanas. Un marcador bioquímico que se utiliza para seguir el estado indiferenciado de las células ES es el factor de transcripción Oct4, que se considera el marcador más fiable de estado indiferenciado de las células ES, y que es uno de los primeros marcadores que se pierde cuando las células indiferenciadas comienzan a diferenciarse.

Breve compendio de la invención

20 La presente invención proporciona un método para cultivar células madre embrionarias humanas en un estado indiferenciado en una matriz sin la necesidad de células alimentadoras o de un medio acondicionado, donde dicho método comprende la etapa de cultivar las células madre embrionarias humanas en un medio en ausencia de células alimentadoras y de medio acondicionado, en que el medio de cultivo comprende sales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, un factor de crecimiento de fibroblastos, factor beta de transformación del crecimiento y al menos dos de los ácidos gamma amino butíricos, ácido piperólico y litio o un sustituto del litio que estimule la vía de señalización del Wnt en cantidades suficientes para mantener células madre embrionarias humanas en estado indiferenciado durante múltiples pases sucesivos por cultivo.

25 La presente invención también está dirigida a un cultivo celular in vitro que comprende en un recipiente de cultivo: células madre embrionarias humanas, una matriz en la que las células madre puedan crecer; y un medio de cultivo, en que el medio de cultivo comprende sales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor beta de transformación del crecimiento y al menos dos de los ácidos gamma amino butíricos, ácido piperólico y litio o un sustituto del litio que estimule la vía de señalización de Wnt en cantidades suficientes para mantener células madre embrionarias humanas en estado indiferenciado durante pases múltiples por cultivo, en el que el medio esté libre de células alimentadoras y que nunca haya sido expuesto a células alimentadoras.

La invención también proporciona un cultivo de la presente invención en el que al menos el 90% de las células madre embrionarias humanas son positivas para la transcripción del factor Oct4 durante múltiples pases por cultivo.

35 La invención proporciona también un medio para cultivar células madre embrionarias humanas, donde el medio comprende sales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, un factor de crecimiento de fibroblastos, factor beta de transformación del crecimiento y al menos dos de los ácidos gamma amino butíricos, ácido piperólico y litio o un sustituto del litio que estimule la vía de señalización de Wnt en cantidades suficientes para mantener células madre cultivadas en estado indiferenciado durante múltiples pases por cultivo.

40 Es un objeto de la presente invención definir condiciones de cultivo a largo plazo para células madre embrionarias humanas que eviten el uso o la exposición a células y proteínas animales, ya sean procedentes de células alimentadoras o del medio acondicionador en el que las células se cultivan.

Es otro objeto de la presente invención definir condiciones de cultivo para células madre embrionarias humanas que sean lo más concretas posible, al mismo tiempo que se mantiene en el cultivo la proporción máxima posible de células en estado indiferenciado.

45 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán aparentes a partir de la siguiente memoria descriptiva.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

50 La Fig. 1 presenta datos de trabajos experimentales descritos en la memoria más adelante, que muestran que los componentes del medio reducen la proporción de células diferenciadas en el cultivo de células madre embrionarias humanas que crecen en él.

La Fig. 2 presenta una representación gráfica de datos que muestran que el medio con matriz de proteínas humanas da como resultado células ES humanas cultivadas que no exhiben un resto de ácido siálico de origen no humano.

La Fig. 3 es una representación gráfica de datos que muestran el alto grado de células indiferenciadas en el cultivo de células precursoras humanas.

La Fig. 4 es una representación gráfica de datos que muestran que el medio descrito en esta memoria da como resultado un crecimiento robusto de cultivos de células madre.

Descripción detallada de la invención

5 Ahora se han identificado múltiples condiciones de cultivo y medios que sustentan el cultivo indefinido y la proliferación robusta de células madre embrionarias humanas en estado indiferenciado y también en ausencia tanto células alimentadoras como de medio acondicionado. El desarrollo de estos medios y condiciones de cultivo hace posible la derivación y el mantenimiento de líneas de células ES humanas en condiciones definidas y controladas sin exposición directa o indirecta a células animales de cualquier tipo. Se ha demostrado que estos medios permiten la proliferación de células ES humanas indiferenciadas a través de múltiples pases, al menos cinco, lo que es una firme evidencia de que estos medios sustentarán dichos cultivos indefinidamente.

10 Un medio definido y humanizado para la proliferación de células ES humanas normalmente incluye sales, vitaminas, una fuente de glucosa, minerales y aminoácidos. Para complementar el medio y proporcionar condiciones que permitan el crecimiento celular, inicialmente el medio de cultivo de células madre incluía suero procedente diversas fuentes. También se ha informado previamente de que la adición de un factor de crecimiento de fibroblastos además de un aditivo de sustitución del suero permitirá el cultivo de células ES humanas sin suero. El sustituto del suero puede ser un producto comercial disponible distribuido para ese propósito o puede ser una mezcla formulada de proteína, tal como albúmina sérica, vitaminas, minerales, una transferrina o un sustituto de transferrina, e insulina o un sustituto de la insulina. Este componente sustitutivo puede complementarse con selenio. En la presente invención se prefiere que, para cultivar células ES humanas, se utilice un sustituto definido del suero en lugar del suero procedente de cualquier fuente, con el fin de evitar las problemas de variación de los componentes del suero y de utilizar un medio lo más definido posible. La solicitante ha definido un medio suficiente, y todos los componentes del medio expuesto en esta memoria se presentan en la Tabla 1 que se presenta a continuación, la tabla enumera todo los componentes del medio desarrollado por el solicitante, designado como TeSR1, por concentración de dichos componentes. El medio TeSR1 se compone de una base DMEM/DF12, complementada con albúmina sérica humana, vitaminas, antioxidantes, minerales traça, lípidos específicos, y factores de crecimiento clonados.

15 Para evitar la necesidad de una capa alimentadora de fibroblastos, que anteriormente se consideraba necesaria para mantener los células ES humanas en un estado indiferenciado, en esta memoria se describe que la combinación del uso de mayores concentraciones de FGF (10 a 1000 ng/ml) junto con el uso de GABA (ácido gamma amino butírico), ácido pipercolico (PA), litio (LiCl) y factor beta de transformación del crecimiento (TGF β), permitirá que un medio sustente el crecimiento de células madre indiferenciadas. Se ha encontrado que la combinación estos aditivos es suficiente para mantener indefinidamente el cultivo de células ES humanas en estado indiferenciado sin exposición ya sea a células alimentadoras o a medios acondicionados. Se ha demostrado que estos aditivos son suficientes. No obstante, no todos ellos pueden ser necesarios en todas las formulaciones de medios de cultivo. Por eliminación selectiva de estos aditivos, uno o más de estos componentes puede excluirse del medio de cultivo dando como resultado cultivos de células ES humanas que crecerán también aunque con una pérdida de pureza del estado indiferenciado en dichos cultivos. Estos cultivos pueden o no permanecer estables durante múltiples pases. No obstante, queda claro que la combinación es suficiente para permitir una variedad de medios que sustenten el cultivo a largo plazo y la proliferación de células ES humanas indiferenciadas a través de un número indefinido de pases, sin usar células alimentadoras o medio acondicionado.

20 En el reconocimiento subjetivo previo realizado por el solicitante sobre estos factores de crecimiento individuales, elegidos porque los receptores son expresados por los células ES humanos, se identificaron varios factores como poseedores de efectos positivos sobre la proliferación indiferenciada. De estos factores, bFGF, LiCl, ácido γ - aminobutirico (GABA), ácido pipercolico, y TGF β fueron incluidos finalmente en el medio TeSR1. Para cada una de las cuatro líneas celulares ensayadas, las tasa de proliferación y el porcentaje de células que mantienen la expresión de marcadores característicos de los células ES humanas fueron mayores en TeSR1 que en células control cultivadas en medio acondicionado con fibroblastos, y la eliminación de cualquiera de estos cinco factores redujo el rendimiento del cultivo. Algunos de estos datos se ilustran en la Fig. 1, que muestra que los cultivos sembrados en medios en los que se prescindie de cualquiera de estos constituyentes exhibieron un porcentaje menor de células que permanecían indiferenciadas cuando se comparan con cultivos que incluían la totalidad de estos cuatro constituyentes de medios. Observen que Oct4, SSEA-1, SSEA-4, Tra1-60 y Tra1-80 son marcadores celulares superficiales o factores de transcripción (Oct4) que se utilizan para seguir el estado de diferenciación de las células madre. La Fig. 4 ilustra experimentos similares en los que se demostró, tras múltiples pases, que la tasa de crecimiento de los cultivos era máxima cuando todos los constituyentes estaban presentes en el medio de cultivo.

25 También es útil para las condiciones de cultivo de células ES humanas incluir una matriz biológica en el recipiente de cultivo. Un material de este tipo utilizado es MatrigelTM, una membrana basal artificial procedente de células de ratón, que se suministra como producto comercial libre de células de ratón. Otro material de origen humano, conocido también por utilizarse con el mismo fin, es la fibronectina, una glicoproteína humana que se utiliza en su forma insoluble para crear una matriz de fibras que sirve también como membrana basal para el cultivo de células ES. Para el solicitante una matriz de fibronectina a solas no resultó suficiente. No obstante, ahora también se ha descubierto que puede obtenerse un material matriz humano a partir de una combinación de proteínas matriz

humanas, colágeno IV, fibronectina, laminina, y vitronectina, y esta matriz basta para sustentar células ES humanas indefinidamente en un estado indiferenciado en el medio TeSR1.

5 A los aditivos para medios enumerados anteriormente se llegó tras una prueba metodológica realizada sobre 80 factores de crecimiento individuales. Aunque algunos de los aditivos, al menos durante algunos pases, parecían favorecer el crecimiento de células ES en cultivo, muchos no consiguieron mantener las células ES en estado indiferenciado en los pases sucesivos. El solicitante no consiguió identificar otras combinaciones de estos factores que dieran los resultados de los aditivos para medios descritos en los ejemplos que se dan a continuación. Con esto el solicitante no quiere decir que los constituyentes no estén sometidos a cierta variación. Por ejemplo, el litio se utiliza en el medio porque está sometido a la vía de señalización del Wnt. Los Wnts por sí mismos u otros estimulantes de esta vía, como la activina, podrían ser usados como equivalentes del LiCl, aunque el LiCl es probablemente el agente más económico para este propósito. Del mismo modo, se cree que el GABA interacciona con el receptor GABA, y la literatura científica incluye la identificación de varias moléculas que son agonistas de ese mismo receptor y podrían ser usadas en vez de GABA en el medio como un equivalente. Se cree también que PA interacciona igualmente con el receptor GABA. Aunque se ha encontrado que PA y GABA son útiles en el medio en las concentraciones utilizadas en la presente invención, se prevé que la concentración de cualquiera de estos constituyentes podría incrementarse drásticamente hasta valores que permitiesen prescindir de la necesidad de añadir el otro.

20 El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) en altas concentraciones (40 a 100 ng/ml) parece eliminar la necesidad de utilizar células alimentadoras. El FGF que se prefiere es FGF básico, también descrito como bFGF y FGF2, pero otros FGFs que incluyen al menos FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18 también serán suficientes para este propósito. Otros FGFs podrán funcionar también, incluso en concentraciones mayores.

25 La observación de que los cultivos de células madre embrionarias (ES) humanas se habían mantenido previamente en un estado indiferenciado sólo cuando se cultivaban en presencia de células alimentadoras de fibroblastos, o en un medio acondicionado, ha llevado a la especulación de que la liberación de fibroblastos en el medio es un factor que actúa para inhibir la diferenciación de células ES. No obstante, cualquiera que sea el efecto mediado por las células alimentadoras de fibroblastos en el medio de cultivo, ahora está claro que el medio descrito a continuación reemplazará este efecto. Los tres medios descritos a continuación son definidos, no contienen células animales, y permiten el cultivo a largo plazo de células ES humanas en un estado indiferenciado. Se presenta también un ejemplo de un medio de cultivo en el que las proteínas son todas humanas, para tener un medio "humanizado" y unas condiciones de cultivo que impidan cualquier objeción relativa a productos sub-celulares de origen animal.

Ejemplos

35 Los constituyentes del medio TeSR1, que se utilizó en todos los cultivos que se describen en esta memoria, salvo que se indique lo contrario, se recogen en la Tabla 1 que se presenta a continuación. Los experimentos preliminares del solicitante sugirieron que la proliferación de células ES humanas fue óptima a un pH de 7,2, una osmolaridad de 350 mOsmol, y una atmósfera con 10% CO₂/ 5% O₂. Estas condiciones se emplearon en todos los cultivos posteriores descritos en esta memoria.

40 Las células de las líneas humanas de células H1, H7, H9 y H14 proliferaron robustamente en su totalidad en TeSR1 durante 11, 7, 25 y 17 pases respectivamente (2-6 meses). Se confirmó que los cariotipos eran normales en la línea celular H14 tras 7 pases, y en H9 después de 8 y 21 pases. La formación de teratomas en H1 y H9 se confirmó tras 11 y 20 pases.

45 Se ha sugerido que los cultivos de células ES previos están por debajo del óptimo debido a la presencia de Neu5Gc, un ácido siálico no sintetizado por seres humanos. Debido a que los componentes de la matriz humana, colágeno, fibronectina, laminina y vitronectina eliminaron el producto animal final de las condiciones de cultivo para células ES humanas del TeSR1, el solicitante ensayó si el Neu5Gc había sido eliminado de las líneas celulares de células ES humanas durante el cultivo en este medio. El solicitante confirmó la presencia de Neu5Gc en células ES humanas cultivadas en un medio acondicionado con fibroblastos, descubrió una cantidad reducida pero detectable en células cultivadas con TeSR1 en Matrigel, y no pudo detectar Neu5Gc en células ES cultivadas en TeSR1 utilizando los cuatro componentes de la matriz humana. Estos datos se ilustran en la Fig. 2. De esta forma, las células ES cultivadas en TeSR1 y en una matriz de proteínas humanas no exhiben los restos de ácido siálico no humanos encontrados en células alimentadoras murinas

50 Para ensayar las condiciones de las colonias de células ES y la idoneidad del cultivo para el mantenimiento a largo plazo de cultivos de células ES humanas, el medio TeSR1 se comparó con la mejor condición de cultivo previa, que para el solicitante es el uso de un medio acondicionado. Se encontró que el medio TeSR1 era capaz de mantener los células ES humanas en un estado indiferenciado de forma que el 90% de las células continuaron dando positivo para Oct 4 incluso tras el cultivo a largo plazo. Los resultados de este ensayo se presentan en el gráfico de la Fig. 3. Éste representa el primer caso conocido en el que cualquier medio libre de alimentador y medio acondicionado ha mantenido un nivel de crecimiento indiferenciado de células ES humanas en una extensión tal que más de un 90% de las células del cultivo permanecen indiferenciadas en todas las etapas.

ES 2 383 813 T3

5 La curva de crecimiento y el análisis por citometría de flujo (FACS) de células H1 cultivadas durante 3 pases se midió en medio TeSR1 y en medio TeSR1 en el que se habían eliminado cada uno de los siguientes componentes: TGFβ, PA, LiCl, GABA y bFGF. Para iniciar los cultivos, se sembraron 3×10^5 células de cada línea celular el día 0 del pase 1. Se contó el número de células de pocillos triplicados para evaluar la fijación (día 2-3) y el número de células finales del pase (día 6-7). La densidad inicial de siembra y los tiempos de muestreo se repitieron, cuando fue posible, durante 5 pases. El día 6 del pase 3 las células se analizaron por citometría de flujo (FACS) para detectar marcadores superficiales SSEA1, SSEA4, Tra 1-60 y Tra 1-80 y para el factor de transcripción Oct4. Estos datos se presentan gráficamente en la Fig.1. Dichos datos mostraron que las células ES humanas pueden cultivarse en medios que carecen de cada uno de estos componentes con el coste de alguna diferenciación indeseada de células en el cultivo, y que el máximo grado de indiferenciación del cultivo sólo puede obtenerse usando todos estos componentes. También se obtuvieron resultados similares con otras líneas celulares.

10 Se ensayó la pluripotencia de las líneas celulares de células ES mantenidas en medio TeSR1. Las células de las líneas celulares recientemente iniciadas WA01 y WA09, cultivadas en medio TeSR1 en matriz Matrigel durante 11 y 20 pases, fueron inyectadas, respectivamente, en ratones SCID beige. En los ratones, se desarrollaron teratomas que exhibían diferenciación compleja en 6-8 semanas tras la inoculación.

TABLA 1 Formulación completa del medio TeSR1

SALES INORGÁNICAS	mM	AMINOÁCIDOS	mM
Cloruro cálcico (Anhidro)	0, 8232	L-Alanina	0,1392
HEPES	11,76	Clorhidrato de L-Arginina	0,5488
Cloruro Magnésico (Anhidro)	0,2352	L-Asparagina-H2O	0,1392
Sulfato Magnésico (MgSO4)	0,319088	Ácido L-Aspártico	0,1392
Cloruro potásico (KCl)	3,26144	L-Cisteína-HCl-H2O	0,0784
Bicarbonato sódico (NaHCO3)	11,2112	L-Cisteína 2HCl	0,0784
Cloruro sódico (NaCl)	94,55824	Ácido L-glutámico	0,1392
Fosfato sódico, dibásico (Anhidro)	0,392	L-Glutamina	2,96
Fosfato sódico, monobásico (NaH2PO4-H2O)	0,355152	L-Histidina-HCl-H2O	0,1176
MINERALES TRAZA		L-Isoleucina	0,326144
Nitrato férrico (Fe(NO3)3-9H2O)	0,00009408	L-Leucina	0,353584
Sulfato férrico (FeSO4-7H2O)	0,001176	Clorhidrato de L-Lisina	0,391216
Sulfato de cobre (CuSO4-5H2O)	4,0768E-06	L-Metionina	0,090944
Sulfato de Zinc (ZnSO4-7H2O)	0,001176	L-Fenilalanina	0,16856
Metavanadato sódico NH4VO3	0,000056	L-Prolina	0,2176
Sulfato de Manganeso Mn SO4 H2O	1,00592E-05	L-Serina	0,296
Molibdato Amónico	1,00404E-05	L-Treonina	0,352016
NiSO4 6H2O	4,94861E-06	L-Triptófano	0,0346528
Metasilicato Sódico Na2SiO3 9H2O	0,004926108	L- Tirosina 2Na 2H2O	0,167776
SnCl2	5,32544E-06	L-Valina	0,354368
CdCl2	6,21931E-05		
CrCl3	9,41176E-06	VITAMINAS	
AgNO3	5,00296E-06	Ácido ascórbico	0,375
AlCl3 6H2O	2,4855E-05	Biotina	1,12112E-05

ES 2 383 813 T3

Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	4,99217E-05	Cloruro de Colina	0,0502544
CoCl ₂ 6H ₂ O	5,0021E-05	Pantotenato D-Calcio	0,0036064
GeO ₂	2,5337E-05	Ácido fólico	0,004704
KBr	5,0402E-06	i-Inositol	0,05488
KI	5,12048E-06	Niacinamida	0,012936
NaF	0,000500119	Clorhidrato de piridoxina	0,0076048
RbCl	5,00414E-05	Rivoflavina	0,004704
ZrOCl ₂ 8H ₂ O	9,0383E-05	Clorhidrato de Tiamina	0,02460217
		Vitamina B12	0,000392
FACTORES DE CRECIMIENTO			
GABA	0,979	SUSTRATOS ENERGÉTICOS	
Ácido piperónico	0,000984	D-Glucosa	13,72784
bFGF	5,80E-06	Piruvato sódico	0,392
LiCl	0,979		
TGF beta 1	2,35E-08	PROTEÍNAS	
LÍPIDOS		Insulina humana	0,0034438
Ácido linoléico	0,0070976	Holotransferrina humana	0,14
Ácido lipoico	0,00039984	Albumina sérica humana	199,7
Ácido araquidónico	0,001312		
Colesterol	0,0113798	OTROS COMPONENTES	
Acetato de DL-alfa tocoferol	0,02962	Glutación (reducido)	0,00592996
Ácido linoléico	0,007184	Hipoxantina Na	0,01176
Ácido mirístico	0,008758	Rojo Fenol	0,0159936
Ácido oleico	0,00708	Putrescina 2HCl	0,00039435 2
Ácido palmitoleico	0,007862	Timidina	0,001176
Ácido esteárico	0,00703	2-mercaptoetanol	0,1
		Selenio	0,00177304
		Pluronic F68	0,238
		Tween 80	0,3358

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para cultivar células madre embrionarias humanas en un estado indiferenciado sobre una matriz sin necesidad de células alimentadoras o medio acondicionado, método que comprende la etapa de cultivar células madre embrionarias humanas en un medio en ausencia de células alimentadoras y medio acondicionado, en que el medio comprende sales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, un factor de crecimiento de fibroblastos, factor de transformación del crecimiento beta y al menos dos de los ácidos gamma amino butíricos, ácido pipercolico y litio o un sustituto del litio que estimule la vía de señalización del Wnt en cantidades suficientes para mantener las células embrionarias humanas en un estado indiferenciado a través de pases de cultivo sucesivos múltiples.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo comprende un factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de al menos 40 ng/ml.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el medio de cultivo comprende un factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de al menos 100 ng/ml.
4. El método de las reivindicaciones 1, 2 y 3 en el que el medio de cultivo comprende transferrina e insulina.
- 15 5. Un medio de cultivo celular in vitro que comprende en un recipiente de cultivo:
 - células madre embrionarias humanas
 - una matriz en que las células madre pueden crecer; y
 - un medio de cultivo, medio de cultivo que comprende sales, vitaminas, amino ácidos, glucosa, un factor beta de crecimiento de fibroblastos y al menos dos de los ácidos gamma amino butíricos, ácido pipercolico y litio o un sustituto del litio que estimule la vía de señalización del Wnt en cantidades suficientes para mantener las células madre embrionarias humanas en un estado indiferenciado durante múltiples pases de cultivo, en que el medio está libre de células alimentadoras y nunca ha sido expuesto a células alimentadoras.
- 20 6. Un cultivo celular según la reivindicación 5, en que el medio comprende un factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de al menos 40 ng/ml.
- 25 7. Un cultivo celular según la reivindicación 6, en que el medio comprende un factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de al menos 100 ng/ml.
8. Un cultivo celular según las reivindicaciones 5, 6 o 7, en el que el medio también comprende proteínas seleccionadas del grupo que consiste en albúmina, insulina y transferrina.
9. Un cultivo celular según la reivindicación 8, en el que las proteínas son humanas.
- 30 10. Un cultivo celular según la reivindicación 9, en el que la insulina y la transferrina son proteínas recombinantes.
11. Un cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que las células madre embrionarias humanas son positivas en al menos un 90% para el factor de transcripción Oct4 tras pases de cultivo múltiples.
12. Un cultivo de células madre embrionarias humanas como el reivindicado en la reivindicación 11, en el que las células no exhiben el resto de ácido siálico Neu5Gc.
- 35 13. Un medio de cultivo de células madre embrionarias indiferenciadas, en que el medio comprende sales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor beta de transformación de crecimiento de fibroblastos y al menos dos de los ácidos gamma amino butíricos, ácido pipercolico y litio o un sustituto del litio que estimule la vía de señalización del Wnt en cantidades suficientes para mantener las células madre creciendo en el medio de cultivo en un estado indiferenciado a través de múltiples pases por cultivo.
- 40 14. El medio de la reivindicación 13, en la que el medio de cultivo además comprende proteínas seleccionadas del grupo que consiste en albúmina, insulina y transferrina.

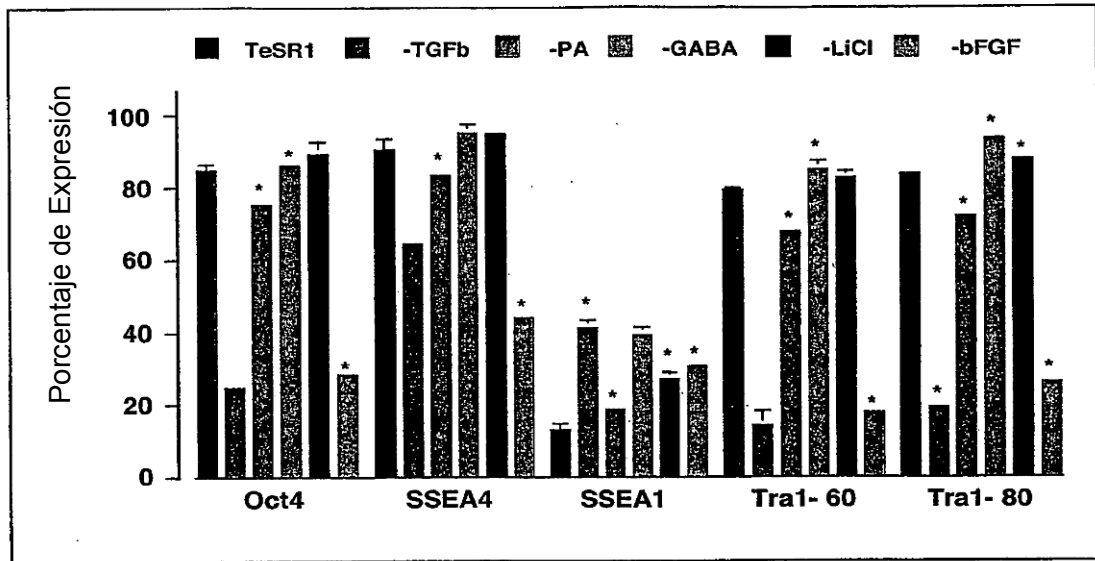


FIG 1

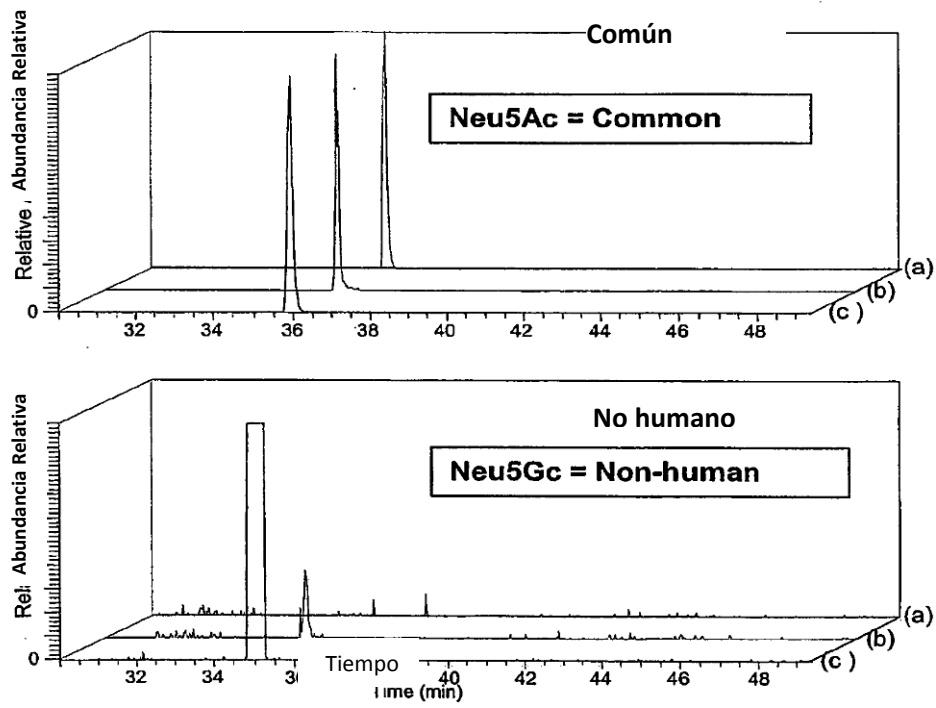


FIG 2

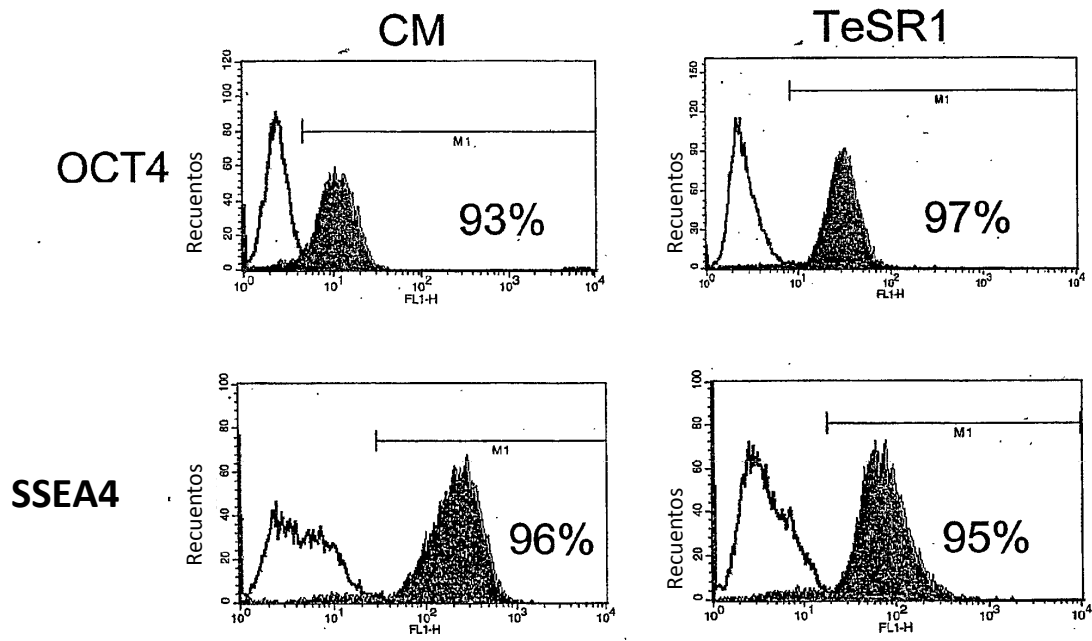


FIG 3

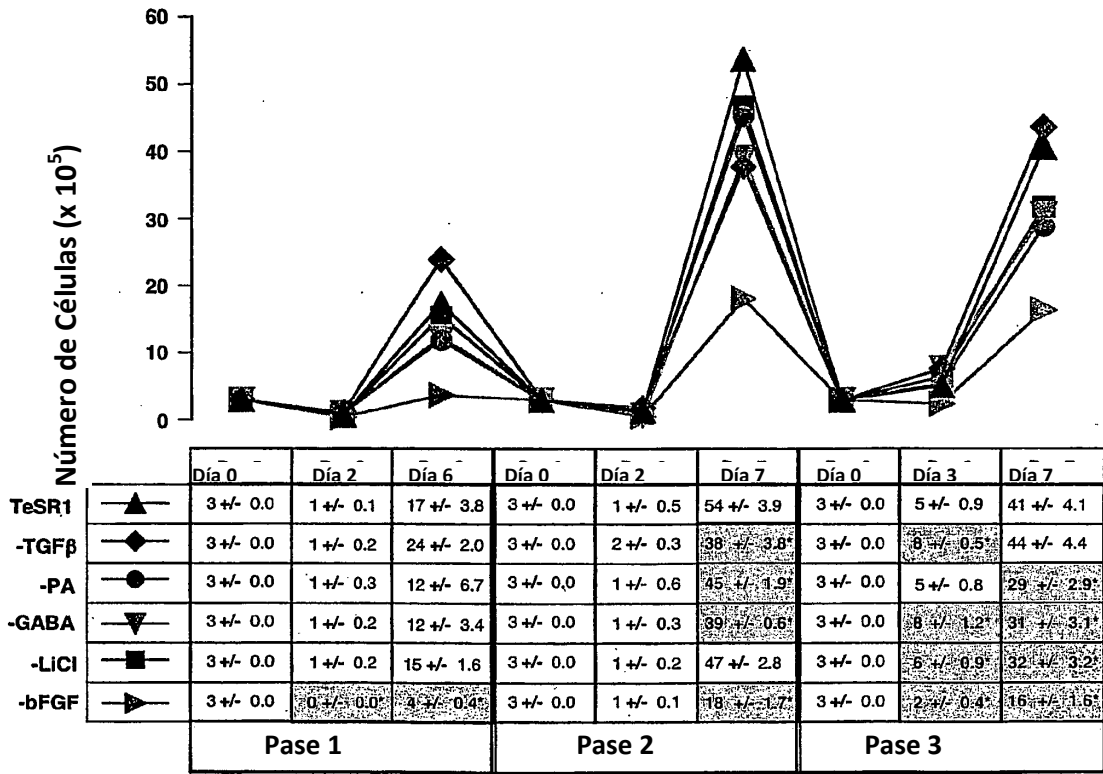


FIG 4