(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 500 917**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/027	(2006.01)
A61K 35/54	(2006.01)
C12N 5/0735	(2010.01)
C12N 5/071	(2010.01)
G01N 33/50	(2006.01)
C12N 15/85	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2001** **E 10005766 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2221363**

(54) Título: **Sistema para la selección específica de células y del estado de desarrollo de células madre embrionarias diferenciantes no humanas, células germinales embrionarias no humanas y células madre adultas**

(30) Prioridad:

27.12.2000 DE 10065352
27.07.2001 DE 10136702

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2014

(73) Titular/es:

AXIOGENESIS AG (100.0%)
NATTERMANNALLEE 1 GEBÄUDE S20
50829 KÖLN, DE

(72) Inventor/es:

FLEISCHMANN, BERND;
BOHLEN, HERIBERT;
HESCHELER, JÜRGEN y
KOLOSSOV, EUGEN

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

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).

ES 2 500 917 T3

DESCRIPCIÓN

Sistema para la selección específica de células y del estado de desarrollo de células madre embrionarias diferenciantes no humanas, células germinales embrionarias no humanas y células madre adultas

[0001] La presente invención se refiere a células madre embrionarias recombinantes, células de la línea germinal embrionaria y células madre adultas que contienen un gen para una proteína detectable que no daña la célula, así como un gen de resistencia, métodos para la preparación de las células, así como otras realizaciones.

[0002] La cardiomiogénesis de células madre embrionarias (ES) diferenciantes en cultivo se sugirió como una fuente ilimitada de células del músculo cardiaco para el transplante en sustitución de la terapia de tejido cardiaco dañado irreversiblemente (Klug et al., 1996). Uno de los obstáculos principales para la implementación práctica de esta estrategia es el rendimiento relativamente bajo de células del músculo cardiaco derivadas de ES diferenciadas, que constituyen normalmente no más de un 1-3% de la población global de células de ES diferenciantes (Muller M. y col., 2000).

[0003] Además, las aún existentes células donantes ES no diferenciadas plantean una potencial amenaza para el receptor en las etapas posteriores de la diferenciación con respecto al desarrollo de tumores. Por lo tanto, el objetivo de desarrollar un método de selección eficaz y altamente específico es considerado como un hito en la terapia celular de los trastornos cardiacos.

[0004] Ya se ha demostrado anteriormente que se puede seleccionar de manera satisfactoria una población enriquecida en células del músculo cardiaco a partir de células ES modificadas genéticamente que se transfectan de manera estable con un transgén de un gen con resistencia a fármacos de aminoglicósido-fosfato-transferasa (α-MHC-Neo) controlado por un promotor α de la cadena pesada de la miosina del corazón (Klug et al., 1996). Este trabajo también mostró los potenciales problemas para el desarrollo de esta estrategia en un procedimiento eficaz a gran escala:

a) Se llevó a cabo el tratamiento con un fármaco selectivo (G418) en un cultivo adherente de células ES diferenciantes, mientras que desde el punto de vista de la efectividad, así como la viabilidad tecnológica, la estrategia óptima sería la aplicación del fármaco selectivo directamente sobre la suspensión de agregados de cuerpos embrioides (cuerpos embrioides = EB) - células ES (Wobus et al., 1991).

b) Los experimentos posteriores con respecto a la introducción de células seleccionadas genéticamente en el corazón de animales receptores se convierten en significativamente más complicados por el trabajo para demostrar el destino de las introducciones en ausencia de marcadores de viabilidad específicos para células donantes.

[0005] El documento DE –A-19727962 describe células madre embrionarias de mamíferos no humanos que se transfectan de manera estable con una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína fluorescente que no daña a la célula, donde dicha secuencia de ADN se encuentra bajo el control de un promotor dependiente de la célula y/o del desarrollo (Kolosov et al., 1998). Dichas células ES recombinantes muestran las siguientes desventajas:

1. Aunque se puede disponer de tipos de células específicas *in vivo* con este método, no obstante, es difícil la purificación de estas células teñidas de manera vital. Por un lado, esto se puede explicar por el hecho de que las células de interés (por ejemplo, cardiomiocitos) representan sólo aproximadamente el 1-3% de las células generadas en EB. Por otro lado, los métodos de purificación de células (por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia, FACS) son perfectamente adecuados para células inmunológicas. En la purificación, sin embargo, de, por ejemplo, los cardiomiocitos, muchas células perecen o son dañadas irreversiblemente.

2. Además, resultó que con el método de purificación con higromicina en EB emplacados, las células no resistentes a higromicina son difíciles de extraer incluso después de 7-14 días de la selección. A pesar de la utilización de higromicina como marcador de selección de antemano, apareció una generación de tumores. Esto se aplica de manera similar a una selección con neomicina.

[0006] Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema nuevo para tanto la selección como la extracción de células, respectivamente, a partir de un cultivo diferenciador de células madre embrionarias, células de la línea germinal embrionarias y células madre adultas que evitan los problemas mencionados anteriormente. Como “sistema” se entiende una combinación de métodos de selección, células y utilización de las células y métodos particularmente en el campo médico, tal como se describe en la presente solicitud. Este objetivo se consigue mediante el método de la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen en las reivindicaciones después de la reivindicación 1.

[0007] Se describe un sistema para la selección específica de célula y/o el desarrollo de células madre embrionarias diferenciantes, células de la línea germinal embrionaria y células madre adultas mediante la aplicación combinada de genes de resistencia (a fármacos) y genes informadores detectables bajo el control común de un promotor específico de célula y/o desarrollo. Sin embargo, las células madre embrionarias humanas y las células de la línea germinal embrionaria humana, así como su uso en el método de la invención se excluyen explícitamente del alcance de la invención.

[0008] La presente invención se ilustra en primer lugar en general y posteriormente mediante ejemplos basados en la selección genética de células cardiacas de un cultivo diferenciante de células madre embrionarias que se transfectan con dos tipos de vectores. Se enfatiza que la invención no se limita a estas realizaciones particulares, sino que es aplicable a los 3 tipos de células derivadas de la capa germinal, es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo y células derivadas de las mismas debido a la pluripotencia de las células madre y las células de la línea germinal, respectivamente. Un experto en la materia es capaz de variar la invención en el alcance de las reivindicaciones adjuntas teniendo en cuenta la siguiente descripción y su conocimiento general.

[0009] Según la presente invención, la información para por lo menos un gen de resistencia y para por lo menos un gen informador detectable que codifica una proteína fluorescente que no daña las células se introduce en las células madre embrionarias, las células de la línea germinal embrionaria y células madre adultas. La información para ambos genes puede estar disponible distribuida en uno o dos vectores. Lo importante es que la expresión del gen para la proteína detectable, por ejemplo, fluorescente, así como para el gen de resistencia se encuentre bajo control de uno y el mismo promotor.

[0010] Según la presente invención, los promotores se seleccionan entre promotores específicos de células y promotores específicos del desarrollo. Los promotores específicos de células y tejidos, respectivamente, se refieren a aquellos que son activos en poblaciones de células específicas y tejidos específicos, respectivamente. Según la presente invención, los promotores que se utilizan son activos en células del músculo cardiaco (cardiomiocitos).

[0011] Ejemplos adicionales para promotores específicos de tejido con aquellos, que son activos en células gliales, células hematopoyéticas, células neuronales, preferiblemente células neuronales embrionarias, células endoteliales, células de cartílago o células de la epidermis, así como células β que secretan insulina. “Específico de tejido” se incluye bajo el término de “específico de célula”.

[0012] Algunos ejemplos de promotores específicos del corazón son: Nkx-2.5 (específico para cardiomiocitos muy tempranos y células precursoras mesodérmicas, respectivamente, (Lints et al., 1993); α-actina cardiaca humana (específica para el tejido cardiaco, (Sartorelli et al., 1990), MLC-2V (específico para células del músculo cardiaco ventricular (O’Brien et al., 1993) y WO-A-96/16163).

[0013] Algunos ejemplos de promotores no específicos del corazón son: PECAM1, FLK-1 (endotelio), nestina (células precursoras neuronales), promotor 1 de tirosina hidroxilasa (neuronas dopaminérgicas), α-actina de músculo liso, miosina de músculo liso (músculos lisos), α1-fetoproteína (endodermo), cadena pesada de músculo liso (promotor mínimo de SMHC (específico para músculos lisos, (Kallmeier et al., 1995).

[0014] El término promotor específico del desarrollo se refiere a promotores que son activos durante ciertos puntos de tiempo durante el desarrollo. Algunos ejemplos de dichos promotores son el promotor β-MHC que se expresa durante el desarrollo embrionario en el ventrículo del ratón y es suplantado por el promotor α-MHC en la fase perinatal. NKx2.5, un promotor durante el desarrollo temprano del mesodermo/corazón, factor natriurético atrial, un marcador del corazón embrionario prematuro, con la excepción del estimulador que se subregula también en etapas del desarrollo posterior, Flk-1, un promotor específico de endotelio que es activo durante la vasculogénesis inicial, segmento de intrón 2 del gen de nestina que se expresa en células precursoras neuronales (neuronas embrionarias y células gliales embrionarias) y células gliales adultas (parcialmente aún capaces de dividirse) (Lothian y Lendahl, 1997).

[0015] Según la presente invención, el promotor se refiere a una región de secuencia de ADN que controla la transcripción de un gen. Comprende en una realización por lo menos una secuencia mínima que se localiza en dirección 5’ del codón de inicio y comprende el sitio de unión para la ARN polimerasa para el inicio de la transcripción. La secuencia mínima se puede complementar por secciones de ADN funcionales adicionales, particularmente potenciadores. También son aplicables elementos reguladores que se localizan en las regiones de intrón y se podrían localizar en dirección 3’ del gen a transcribir. En ese caso, se puede controlar la velocidad de transcripción, por ejemplo, mediante otros elementos potenciadores, que por sí mismos no presentan actividad. También se pueden utilizar construcciones de promotores, donde se utiliza un elemento activo no constitutivo per se (potenciador de proteína de choque térmico) con un segmento potenciador del gen que deriva del intrón.

[0016] En una realización adicional de la invención, se utilizan promotores específicos del desarrollo que permiten la selección de, por ejemplo, células mesodérmicas. Los elementos promotores aplicables que controlan la transcripción del gen de resistencia y del gen para la proteína detectable, son NKx2.5, ANF y promotores de

braquiuria. Después de la detección de las células que expresan la proteína detectable, que pueden ser células mesodérmicas si, por ejemplo, se utilizaba un promotor específico mesodérmico, se añade el agente de selección apropiado para el gen de resistencia y se seleccionan las células precursoras mesodérmicas. Mediante la transcripción de los genes para la proteína detectable y del gen de resistencia controlado por un elemento promotor común, se pueden eliminar células no diferenciadas, por ejemplo, células madre pluripotentes embrionarias, de una manera altamente específica y, de este modo, la posibilidad de un desarrollo posterior de tumores se reduce considerablemente. Las células mesodérmicas obtenidas de esta manera se pueden implementar en el tejido respectivo y diferenciarse posteriormente ahí, por ejemplo, después de la implantación en un área cardiaca predañada en células cardiacas. Por un lado, esta estrategia permite la producción de grandes cantidades de células precursoras prepurificadas y por el otro lado una diferenciación posterior después de la implantación bajo condiciones nativas.

[0017] De manera similar, es posible seleccionar células endodérmicas o ectodérmicas mediante promotores específicos endodérmicos o ectodérmicos.

[0018] Algunos ejemplos de células mesodérmicas son todos los tipos de células musculares (músculo cardiaco, músculo esquelético y células de músculo liso), células hematopoyéticas y células endoteliales. Algunos ejemplos de células ectodérmicas son células de la piel, neuronas y células gliales; ejemplos de células endodérmicas son células epiteliales del tracto gastrointestinal.

[0019] Mediante los promotores específicos para los tipos de células mencionados anteriormente y el uso del método según la presente invención y las células según la presente invención, tiene lugar un desarrollo altamente específico en estas células y tejidos endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos, respectivamente, donde la expresión del gen informador y el gen de resistencia controlado por uno y el mismo promotor asegura un nivel máximo de seguridad porque se eliminan, por un lado, las células madre embrionarias pluripotentes no diferenciadas y, por otro lado, también otros tipos de tejidos.

[0020] Según la presente invención, el gen informador codifica una proteína fluorescente. Dichas proteínas fluorescentes que no dañan las células son conocidas per se. Según la presente invención, se puede utilizar la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa Aequorea victoria (descrita en los documentos WO-A-95/07463, WO-A-96/17675 y WO-A-85121 191) y sus derivados “GFP azul” (Heim et al., Curr. Biol. 6(2): 178-182 (1996)” y “GFP Redshift” (Muldoon et al., Biotechniques 22(1): 162-167 (1997)). Se prefiere particularmente la Proteína Verde Fluorescente Potenciada (EGFP). Realizaciones adicionales son las proteínas amarilla y cian fluorescentes (YFP, CFP). Se conocen más proteínas fluorescentes por los expertos en la materia y se pueden utilizar según la presente invención siempre que no dañen las células. La detección de las proteínas fluorescentes tiene lugar a través de métodos de detección de fluorescencia conocidos per se.

[0021] Alternativamente a las proteínas fluorescentes, particularmente en aplicaciones in vivo, también se pueden utilizar otras proteínas detectables, particularmente epítopos de estas proteínas. También se puede utilizar el epítopo de proteínas, aunque pueden dañar la células per se, pero aquellos epítopos que no dañan las células. Preferiblemente, se refiere a epítopos localizados en la superficie celular que permiten una detección sencilla, por ejemplo, mediante marcaje por fluorescencia y métodos de obtención de imágenes (partículas magnéticas), respectivamente, en combinación con anticuerpos. Estas proteínas y sus epítopos, respectivamente, se seleccionan para aplicaciones in vivo, preferiblemente, de manera que son inmunológicamente compatibles al huésped, lo que significa que no inducen al rechazo. También se aplican preferiblemente epítopos de proteínas transgénicos que no están unidos a cascadas de señales intracelulares, particularmente epítopos de superficie de CD8 o CD4. Un ejemplo adicional son epítopos de receptores. Es importante con respecto a estas proteínas y sus epítopos, respectivamente, que aún estén presentes, es decir que no se expresen en la célula, por ejemplo, la célula cardiaca, que se obtuvo mediante la diferenciación y selección a partir de células madre y células de la línea germinal, respectivamente, transfectadas con un vector según la presente invención. Se puede utilizar cualquier proteína que no se exprese en la célula diferenciada y seleccionada, por ejemplo la célula cardiaca o epítopos transgénicos que son detectables específicamente, y de este modo, no se expresan en la célula seleccionada. Estas proteínas y epítopos se denominan marcador celular, gen de marcador celular o genes informadores, respectivamente. La detección de estas proteínas y epítopos detectables, respectivamente, puede resultar, por ejemplo, de anticuerpos que se unen específicamente a estas proteínas y epítopos detectables, respectivamente, y que se pueden identificar, por ejemplo, mediante métodos mediados por fluorescencia o procedimientos de obtención de imágenes. Un ejemplo son los anticuerpos de la superficie celular conjugados a fluorescencia anti-CD8 y anti-CD4 y componentes de anticuerpos conjugados a partículas ferromagnéticas, respectivamente. Como técnica adicional para la purificación, que permite los mayores grados de pureza, es aplicable la clasificación celular. Habiendo ya altamente enriquecido las células diferenciadas deseadas después de la adición de los agentes de selección, por ejemplo, del antibiótico puromicina, las células se pueden purificar adicionalmente mediante la clasificación MACS hasta un 99%.

[0022] Las células madre embrionarias o adultas y las células de la línea germinal embrionaria están disponibles en una realización preferida de la invención en forma de agregados que son conocidos per se como cuerpos embrioides. La figura 4 muestra un protocolo para obtener cuerpos embrioides. La preparación tiene lugar

preferiblemente con el método de la “gota colgante” o mediante cultivo de metilcelulosa (Wobus et al., Differentiation (1991) 48, 172-182).

[0023] Alternativamente, se pueden utilizar matraces de rotación (cultivos de agitación) como método de cultivo. Por lo tanto, las células ES no diferenciadas se introducen en cultivos de agitación y se mezclan permanentemente según un procedimiento establecido. Por lo tanto, se introducen 10 millones de células ES en 150 ml de medio con FCS al 20% y se agitan constantemente con una velocidad de 20 rpm, donde la dirección del movimiento de agitación cambia regularmente. 24 horas después de la introducción de las células ES, se añaden 100 ml de medio extra con suero e inmediatamente después 100-150 ml del medio se intercambia cada día (Wartenberg et al., 2001). Bajo estas condiciones de cultivo, se pueden obtener grandes cantidades de células derivadas de células ES, es decir, cardiomiocitos, células endoteliales, neuronas, etc. dependiendo de la composición del medio. Las células se seleccionan mediante el gen de resistencia aún en el cultivo de agitación o después de emplacar.

[0024] Alternativamente, los EB diferenciados en la gota colgante podrían no emplacarse, sino que simplemente se mantendrían en suspensión. Incluso bajo estas condiciones, se podría observar experimentalmente una progresión de la diferenciación. Sin embargo, se observó sorprendentemente que la aplicación del gen de resistencia condujo a una tinción mucho más rápida de los no cardiomiocitos y que los cardiomiocitos restantes empezaron posteriormente a latir espontáneamente. Este hallazgo experimental indica claramente que los cardiomiocitos no necesitan señales específicas del tejido circundante para su supervivencia y que además los cardiomiocitos seleccionados con puromicina son funcionalmente intactos. El lavado por arrastre de los no cardiomiocitos también se facilita claramente, ya que con mezclado mecánico solo y la adición de una concentración baja de enzima (por ejemplo, colagenasa, tripsina), se consigue una suspensión de células individuales con un fácil lavado por arrastre de los no cardiomiocitos.

[0025] Las células madre embrionarias derivan de mamíferos, particularmente preferentemente de roedores, por ejemplo, ratones, ratas o conejos. Las células ES particularmente preferidas son células D3 (Doetschmann et al., 1985) (Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27 (1985)), células R1 (Nagy et al., PNAS (1995)), células E14 (Handyside et al., Roux. Arch. Develop. Biol. 198, 48 (1989)), células CCE (Bradley et al., Nature 309, 255 (1985)) (naturalmente se pueden utilizar otras células ES que ya se conocen o desarrollarán en el futuro) y células P19 (éstas son células derivadas de teratocarcinoma con características limitadas (Mummery et al., Dev. Biol. 109, 402 (1985)).

[0026] En una realización más preferida, se utilizan células madre embrionarias de primates, tal como se describe por Thomson, J. A. et al., 1995.

[0027] Esto también se refiere a células madre humanas que, sin embargo, están excluidas del alcance de la invención.

[0028] La preparación de estas células madre embrionarias ya está establecida (Thomson JA et al., 1998). El estado de las células madre se puede determinar mediante diferenciación in vitro en tipos de células diferentes y la propagación y separación en varias fases.

[0029] De manera alternativa a las células madre embrionarias también son adecuadas células de línea germinal embrionaria (EG) (Shambott MJ et al., 1998), que se obtienen de un embrión temprano y se pueden cultivar y diferenciar como células madre embrionarias en la siguiente fase. Esto también se refiere a células madre humanas que, sin embargo, están excluidas del alcance de la invención.

[0030] La presente invención también es aplicable a células madre adultas. Se hace referencia a la literatura de Anderson et al., 2001, Gage, F.H., 200 y Prockop, D.J., 1997, donde se describen la extracción y cultivo de estas células.

[0031] Los genes de resistencia son conocidos per se. Ejemplos de éstos son genes de resistencia a antibióticos de nucleósidos y aminoglicósidos, por ejemplo, puromicina (puromicin-N-acetiltransferasa), estreptomicina, neomicina, gentamicina o higromicina. Más ejemplos de genes de resistencia son la deshidrofolatoreductasa, que confiere una resistencia contra un conjunto de antibióticos, por ejemplo, contra vinblastina, doxorubicina y actinomicina D. Se prefiere particularmente una construcción que confiera resistencia a puromicina. Los términos gen de resistencia y gen de resistencia a fármaco o sustancia activa se utilizan de manera sinónima en la presente invención y se refieren a, por ejemplo, un gen que codifica una resistencia a antibiótico en cada caso. También se pueden utilizar otros genes que codifican resistencias a fármacos y sustancias activas, respectivamente, por ejemplo, el gen de DHFR.

[0032] En lugar del gen de resistencia, se pueden utilizar otros genes marcadores seleccionables, que permiten una selección específica de las células que contienen una construcción de la invención y que se pueden aplicar in vivo, sin afectar a la supervivencia de los pacientes. Los genes adecuados están disponibles para el experto en la materia.

[0033] En el primer ejemplo, los genes para la proteína detectable y el gen de resistencia se localizan en dos construcciones diferentes. La utilización de dos vectores diferentes, donde el gen de resistencia se localiza en el primer vector y el gen informador en el segundo vector, por ejemplo, EGFP, donde ambos son controlados por un promotor específico de células y tejido, respectivamente, o específico del desarrollo, por ejemplo, mediante el promotor α-MHC, demuestra las múltiples ventajas descritas en la presente solicitud, que son adecuadas para ciertos objetivos. Sin embargo, experimentos adicionales mostraron que este sistema también está sorprendentemente asociado con ciertas desventajas, concretamente con la formación de células, aunque resistentes contra el gen de resistencia, pero que contienen subclones celulares en las mismas, que no expresan el gen informador, por ejemplo, EGFP, por tanto son, por ejemplo, EGFP negativa. Dichos subclones podrían ser una fuente potencial para teratocarcinomas, ya que no todas las células no específicas, también, por ejemplo, los no cardiomiocitos, son eliminados incluso en la aplicación del antibiótico. Esto podría conducir potencialmente a la supervivencia de células ES de proliferación rápida que pueden formar tumores.

[0034] En los experimentos llevados a cabo, se observó que efectivamente las células con EGFP negativa pueden sobrevivir incluso después de la exposición a puromicina durante hasta 15 días. Una posible razón para esta observación es que los dos vectores utilizados se introdujeron en la célula en una doble transfección. A continuación, estos vectores se integran al azar en el genoma huésped, parcialmente en sitios diferentes del genoma nativo y, por tanto, se encuentran bajo la influencia de genes diferentes y sus secuencias de control, que poseen diferentes actividades de transcripción.

[0035] Por lo tanto, en una realización adicional de la presente invención (ejemplo 2) el gen informador y el gen de resistencia se dispusieron en una construcción de vector bajo el control de un promotor. En el presente Ejemplo 2, el cassette de resistencia a puromicina (Pac), así como el gen informador EGFP, se tomaron ambos bajo un control común del promotor específico de tejido α-MHC. La ventaja principal de este sistema es una incidencia muy baja de células resistentes que no son específicas de célula, tejido o desarrollo. Por ejemplo, la probabilidad de aparición de células resistentes a puromicina que no sean células cardiacas es muy baja. Esto parece ser debido al hecho de que el cassette Pac y el gen EGFP se integran en un sitio o pocos sitios en el genoma huésped y, por tanto, no están sometidos a la influencia de las diferentes condiciones de actividad de la estructura génica primaria y secundaria, respectivamente. Mediante la selección posterior de los clones obtenidos, es posible obtener un sistema celular prácticamente puro. Esta evaluación tiene lugar utilizando la expresión de EGFP. En este aspecto, cabe señalar de nuevo que EGFP, α-MHC y Pac son realizaciones de ejemplo de la presente invención. Un experto en la materia podría hacer modificaciones teniendo en cuenta las alternativas descritas en la solicitud anterior.

[0036] La introducción de la construcción o construcciones de vectores en las células madre embrionarias tiene lugar de forma conocida, por ejemplo, mediante transfección, electroporación, lipofección o con la ayuda de vectores virales.

[0037] Para la selección de células ES transfectadas de manera estable contienen las construcciones de vectores un gen marcador seleccionable adicional, el cual confiere, por ejemplo, resistencia contra un antibiótico, por ejemplo, neomicina. Naturalmente, se pueden utilizar también otros genes de resistencia conocidos, por ejemplo, los genes de resistencia descritos anteriormente asociados con los genes que codifican la proteína fluorescente. El gen de selección para la selección de células ES transfectadas de manera estable se encuentra bajo el control de un promotor diferente del que regula el control de la expresión de la proteína detectable. A menudo, se utilizan promotores constitutivamente activos, por ejemplo, el promotor PGK.

[0038] La utilización de un segundo gen de selección es importante para la capacidad de llegar a identificar los clones transfectados de manera satisfactoria (la eficacia es relativamente baja). De otro modo, existiría una mayoría asfixiante de células ES no transfectadas y durante la diferenciación, por ejemplo, no se podrían detectar células positivas de EGFP.

[0039] Después de la transfección, las construcciones se integran de manera estable en el ADN nativo. Después de la activación de señales intracelulares que son específicas de las células y/o específicas del desarrollo, el promotor se activa y se expresa la proteína detectable, así como el (primer) gen de resistencia. No sólo es posible detectar las células ES, por ejemplo, mediante su emisión de fluorescencia bajo excitación de fluorescencia, sino que también estas células que se encuentran bajo el control del promotor específico de las células y/o específico del desarrollo se puede seleccionar a la vez y de manera muy específica. Con este método que ha de considerarse elegante, es posible un enriquecimiento elevado de células específicas en una etapa de desarrollo particular o son típicas para un tejido específico. Un ejemplo particularmente importante en la presente invención es el enriquecimiento de cardiomiocitos derivados de células ES. Cabe mencionar las siguientes ventajas de ejemplo:

1. El control del gen de resistencia, así como el gen específico del desarrollo y/o específico de las células bajo uno y el mismo promotor asegura una selección eficaz y rápida de, por ejemplo, las células específicas de tejido, como, por ejemplo, las células cardiacas. Mediante análisis FACS, se pudo observar que se eliminaron casi el 99% de las células no específicas del corazón. Este alto grado de pureza para un tipo de células específico en una población celular altamente heterogénea de

cuerpos embrioides es también una herramienta adecuada no sólo para pruebas farmacológicas para sustancias tóxicas, para el cribado de fármacos, efectos embriotoxicológicos, cribado de factores de proliferación celular en la diferenciación, sino también ofrece la posibilidad de preparar poblaciones de células altamente purificadas para aplicaciones terapéuticas para la sustitución de un tejido y la generación de muestras de tejido in vitro (bioingeniería), respectivamente.

2. Aunque el método de diferenciación utilizado preferiblemente según la presente invención con la "gota colgante" permite poblaciones de células con características de diferenciación relativamente estables en el emplacado, no obstante, los cuerpos embrioides muestran claras diferencias en el punto de tiempo de inicio de la diferenciación, es decir, del latido espontáneo. Mediante la expresión de, por ejemplo, el gen de fluorescencia, se obtiene una información fiable sobre el inicio de la diferenciación, por ejemplo, la cardiomiogénesis, y la adición de los medios de selección tiene lugar ajustado en el tiempo después del inicio de la transcripción a partir del promotor específico de las células o específico del desarrollo. La combinación según la presente invención de un gen que codifica una proteína detectable, por ejemplo fluorescente, con un gen de selección, donde ambos genes se encuentran bajo el control de un promotor, permite, por tanto, un control exacto en el tiempo de la adición de un medio de selección dependiendo de la etapa de diferenciación de las células, donde la etapa de diferenciación se puede establecer por el técnico mediante la expresión de la proteína fluorescente. Bajo condiciones in vivo la utilización del gen informador no es crítica, ya que no se podía detectar de ninguna manera. Sin embargo, es importante en las pruebas experimentales del método (muy importante para el establecimiento de métodos de purificación, así como métodos quirúrgicos), aunque potencialmente no aplicable para fines terapéuticos debido a su potencial antigenicidad. Alternativamente, particularmente para fines terapéuticos, es adecuada la utilización de un epítopo transgénico, el cual no está unido a una cascada de señales intracelulares (por ejemplo, CD8 o CD4) y se encuentra bajo el control del promotor específico de célula y tejido, respectivamente. Con la ayuda de esta técnica, se podrían obtener preparaciones de cardiomiocitos altamente purificados después del enriquecimiento en puromicina mediante clasificación MACS después del enriquecimiento con, por ejemplo, gradiente de percoll; además, las células transgénicas se podrían identificar in vivo e in vitro mediante anticuerpos de la superficie celular anti-CD8 (anti-CD4) conjugados fluorescentes. A la vez, se puede obtener el enriquecimiento cuantitativo más elevado posible de los tipos de células deseados. La adición del medio de selección al azar, independientemente de la información sobre la diferenciación celular, conduciría a la destrucción prematura de las células precursoras o a sólo un pequeño número de células terminalmente diferenciadas.

3. Se asume que en la diferenciación de las células ES en tipos de células específicos, particularmente en el medio natural de los órganos respectivos, los procesos son particularmente eficaces, ya que en el área que rodea al órgano, existen más factores presentes que inducen la diferenciación específica de tejido de las células ES. De hecho, se pudo demostrar en nuestros experimentos de transplante que sin lesión tisular (ausencia de factores de diferenciación) no se puede observar un crecimiento interior ni la diferenciación de las células del músculo cardiaco embrionario transplantado. Además, después del transplante en un área de crioinfarto se puede observar la generación significativamente aumentada de músculo cardiaco utilizando células madre embrionarias no diferenciadas (in vitro sólo de un 3 a un 5%, *in vivo* mucho más eficaz, pero con la generación de tumores). Debido a la sensibilidad elevada de las células ES sin el gen de resistencia por los anticuerpos, el método de la presente invención se puede utilizar para introducir las células ES transgénicas proporcionadas por la presente invención en el órgano respectivo in vivo o in vitro, en el que tiene lugar una diferenciación muy eficaz, por ejemplo en células cardiacas. Después de varias semanas, se añade a continuación el medio de selección y todas las células derivadas de células ES son sistemáticamente eliminadas con la excepción de aquellas que transportan el gen de resistencia. Con esta estrategia se puede esperar una generación más eficaz de tejido sin el riesgo asociado del desarrollo de tumor. Es crucial para el sistema desarrollado en la presente invención que el gen de resistencia a antibiótico y el gen informador se encuentren bajo el control del mismo promotor. La razón de esto es que el gen informador indica el punto en el tiempo del inicio de la diferenciación específica de célula y específica del desarrollo, respectivamente, por ejemplo, de la diferenciación en el corazón; es decir, una parte principal de las células cardiacas tempranas ya se han formado y aún son proliferativas. En este punto en el tiempo, se genera el gen de resistencia a antibiótico y, de este modo, todas las células son eliminadas después de la adición del anticuerpo, a excepción de las células que expresan el gen de resistencia, por ejemplo, también para los cardiomiocitos. En el documento DE 19727962 se utilizaron diferentes promotores, de manera que no se produjo esta sincronización y, por lo tanto, la selección era ineficaz.

[0040] En lugar de una doble transfección, se puede construir un vector que contiene un IRES, en que uno y el mismo promotor, por ejemplo, el promotor α-MHC, impulsa el gen informador y el gen de resistencia al antibiótico y,

por tanto, es suficiente una única transfección.

[0041] Un objetivo importante de la presente invención es naturalmente no sólo la aplicabilidad in vitro, sino particularmente la aplicabilidad in vivo de células diferenciadas proporcionadas por el método según la presente invención, particularmente de células cardiacas. Para descartar que durante un transplante, por ejemplo, células madre pluripotentes o células de la línea germinal que se pueden desarrollar en células tumorales entren en el paciente, las células de una realización de la presente invención pueden hacerse más sensibles para los genes de resistencia mediante la sobreexpresión, por ejemplo, utilizando un promotor Oct-4. Esto reducirá adicionalmente la probabilidad de que las células pluripotentes sobrevivan al ataque del agente de resistencia.

[0042] En una realización adicional de la presente invención, las células se pueden manipular adicionalmente, de manera que no se forman tejidos específicos. Esto puede tener lugar, por ejemplo, mediante la inserción de elementos represores, por ejemplo, un elemento represor inducible de doxiciclina. De este modo, se puede excluir una posible contaminación de las células diferenciadas deseadas con células pluripotentes potencialmente tumorigénicas.

[0043] En una realización adicional, se pueden seleccionar células con una alta velocidad de división mediante la elección de un promotor adecuado, por ejemplo, el promotor de β-actina de pollo y de este modo, reduce además la posibilidad de supervivencia de células pluripotentes.

[0044] En una realización preferida, se utilizaron dos tipos de vectores para transfectar de manera estable células madre embrionarias y para seleccionar células cardiacas específicamente de un cultivo diferenciador de células madre embrionarias:

1. el gen de resistencia para puromicina controlado por el promotor α-MHC del corazón (α-MHC-pur);
2. el gen para la proteína verde fluorescente potenciada controlado por el promotor α-MHC del corazón (Proteína Verde Fluorescente potenciada =EGFP) (α-MHC-EGFP).

[0045] La novedad de la presente invención consiste en la aplicación combinada de un gen de resistencia (por ejemplo, pur), así como, por ejemplo, un gen informador fluorescente vivo (por ejemplo, EGFP) bajo el control de uno y el mismo promotor, preferiblemente el promotor específico de corazón (por ejemplo, α-MHC). Dicha estrategia muestra una combinación de las siguientes ventajas que facilitan la selección genética, por ejemplo, para células de músculo cardiaco derivadas de ES:

i) Monitorizar la diferenciación de células madre embrionarias, por ejemplo, la diferenciación en el corazón de etapas de desarrollo muy tempranas mediante la detección de un indicador específico, por ejemplo, la fluorescencia específica del corazón (Kolossov et al., 1998).

ii) Optimización del tiempo para el inicio de la aplicación del fármaco mediante la definición de la fluorescencia como indicador de, por ejemplo, la actividad del promotor de α-MHC, que controla el gen de resistencia.

iii) control visual de los procesos de la selección de fármaco mediante la monitorización en vivo de la proporción entre las fracciones celulares fluorescentes y no fluorescentes. La viabilidad de una estimación cuantitativa del nivel de enriquecimiento de tipos de células específicas mediante Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS).

iv) La utilización preferida del gen para pur bajo el control de un promotor, preferiblemente un promotor específico del corazón, permite la selección específica del corazón altamente eficaz por puromocina en cultivos adherentes, así como cultivos en suspensión de células ES diferenciantes, ya que la puromicina tiene un efecto tóxico más rápido y más fuerte sobre células no resistentes que otros agentes de selección conocidos, por ejemplo, G418 e higromicina.

A diferencia de otros genes de resistencia a antibióticos, la presente selección altamente eficaz y muy rápida por puromicina fue sorprendente. Además, fue una observación totalmente desconocida para las células ES.

v) La posibilidad de monitorizar el destino de las células seleccionadas introducidas después del transplante mediante la simple aplicación de, por ejemplo, detección por fluorescencia de EGFP. Esto es de importancia fundamental para el establecimiento de nuevas técnicas quirúrgicas.

[0046] La presente invención contiene diversos aspectos que teniendo en cuenta el estado de la técnica podrían no esperarse con una expectación de éxito razonable.

1. En primer lugar, fue sorprendente la simplicidad con la que las células ES se podrían transfectar de manera doble. Nuestros experimentos demostraron que en la mayoría de clones transfectados tuvo lugar una transfección eficaz con ambas construcciones.

2. Además, resultó ser crucial para la eficacia de la resistencia a antibióticos que el agente de selección se añada durante la fase temprana de la diferenciación, particularmente de la diferenciación de las células cardiacas. De este modo, aparentemente aumenta la eficacia de, por ejemplo, la cardiomiogénesis in vitro, muy probablemente debido a las señales negativas de liberación de las células circundantes. La fase temprana se refiere a 2-4 días después de emplacar, particularmente en el método de gota colgante con el emplacado, una etapa que aún muestra patrones tempranos con respecto a la proliferación (las células aún son proliferativas), así como la expresión de canales iónicos (si el canal aún se expresa en todos los cardiomiocitos, todos los tipos de células incluyendo células ventriculares expresan este canal iónico y late espontáneamente) y su regulación (inhibición basal del influjo de Ca^{2+} tipo L mediante agonistas muscarinérgicos del sistema de monóxido de nitrógeno).

3. También fue sorprendente la acción altamente eficaz de puromicina que condujo a la eliminación en un 99% de todos los no cardiomiocitos en 12-24 horas.

4. La ventaja crucial de la presente invención es la posibilidad de la selección también de los EB no emplacados y en cultivos de agitación, respectivamente, ya que aquí las células muertas se pueden lavar sin problemas y, de este modo, se pueden obtener por primera vez cultivos específicos de tipos de células puras de células ES. Parcialmente, la eliminación de células no vitales se mejora mediante digestión enzimática (por ejemplo, tripsina, colágeno). La eficacia de este método se podría validar adicionalmente por cardiomiocitos en EB no emplacados, que empiezan a contraerse de nuevo cuando se encuentran en una red celular.

[0047] En una realización adicional de la presente invención, las células madre embrionarias se transfectan de manera estable con dos grupos de sistemas de selección de vectores. El primer vector contiene la información para una primera proteína detectable que no daña las células, por ejemplo, fluorescente, y/o para un primer gen de resistencia y ambos genes se encuentran bajo el control de un primer promotor específico de células o específico del desarrollo, que está unido operativamente con los genes mencionados anteriormente. Un segundo vector contiene la información para una segunda proteína detectable que no daña las células, por ejemplo, fluorescente, y/o para un segundo gen de resistencia y ambos genes se encuentran bajo el control de un segundo promotor específico de células o específico del desarrollo, que a su vez está unido operativamente con estos genes. Alternativamente a la electroporación, se puede realizar también una transfección altamente eficaz con virus o también con lipofección.

[0048] Vale la pena mencionar en particular con respecto al transplante satisfactorio en el corazón la selección in vitro de células precursoras mesodérmicas. Estas células se seleccionan según el procedimiento mencionado anteriormente mediante preferiblemente elementos intercambiadores de promotores de braquiuria, Nkx2.5 y ANF que expresan genes fluorescentes y de resistencia y posteriormente son seleccionados y transplantados. En lugar de genes fluorescentes, se pueden utilizar naturalmente otros genes que expresan las proteínas detectables descritas anteriormente. Este procedimiento es perfectamente adecuado para producir una mayor cantidad de células precursoras purificadas, que, por ejemplo, después de la implantación en un miocardio lesionado se diferencian bajo factores de diferenciación nativos in situ en células cardiacas sin peligro.

[0049] Además, esta estrategia es perfectamente adecuada para analizar diferentes agentes activos/factores de diferenciación in vitro que diferencian las células precursoras mesodérmicas en los tipos de células especializadas diferentes (es decir, células inmunológicas, células de músculo liso y esquelético, así como células endoteliales). Por lo tanto, el sistema es perfectamente adecuado para analizar factores de diferenciación, agentes farmacológicos y en cualquier caso agentes activos (es decir, sustancias toxicológicas, toxinas ambientales, agentes químicos de uso diario, para el análisis de los efectos toxicológicos teratogénicos/embrionarios y para farmacología).

[0050] Además, aparte de la diferenciación y selección in vitro se estableció un procedimiento completamente nuevo para la regeneración de tejido. Por un lado, se explota la ventaja de que en un tejido dañado se liberan factores nativos (por ejemplo, en el área de infarto del corazón), que influyen positivamente en la diferenciación de células cardiacas. Por lo tanto, por ejemplo, se generan células madre embrionarias transgénicas, donde por un lado, por ejemplo, particularmente el gen de resistencia a puromicina, se encuentra bajo el control de, por ejemplo, el promotor α-MHC (α-MHC-puromicina) para excluir la posibilidad de generación de un tumor. Adicionalmente, se utiliza el elemento tk impulsado por poxvirus. Por lo tanto, las células madre embrionarias se transfectan por triplicado con un promotor expresado de manera general (por ejemplo, promotor β-actina de pollo) y el elemento anti-tk bajo el control del promotor α-MHC. Posteriormente, las células ES diferenciantes transgénicas se inyectan en el área cardiaca dañada. Los factores intrínsecos inducen un desarrollo muy eficaz en el corazón de células ES in vivo a diferencia de la capacidad de diferenciación in vitro. Después de 14-21 días, se seleccionan de manera selectiva todos los no cardiomiocitos mediante la aplicación sistemática combinada de los agentes de resistencia, por ejemplo, puromicina y gancyclovir girostático. Mediante esta selección combinada, se evita la potencial supervivencia de células ES no diferenciadas y el riesgo de tumorigenicidad. Además, se consigue un desarrollo

considerablemente más eficaz del músculo cardiaco.

[0051] La presente invención se ilustra a continuación mediante ejemplos y figuras adjuntas. Las figuras muestran:

Figura 1: Imágenes microscópicas luz de transmisión/fluorescente combinadas de EB emplacados que derivan de células ES transgénicas con pα-MHC-pur, en el día 10 (A), 11 (B), 12 (C) y 14 (D) del desarrollo después de los días 1, 2, 3 o 5 del tratamiento con puromicina.

Figura 2: Imágenes microscópicas luz de transmisión/fluorescente combinadas de un cultivo en suspensión de EGFP de pα-MHC-pur/EB de pα-MHC-pur en el día 19 del desarrollo después de 10 días de tratamiento con puromicina.

Figura 3: (A) perfil FACS de los EB de 16 días de vida disociados que derivan de células ES transgénicas con pα-MHC-EGFP. Todos los EB contenían un conjunto amplio de células del músculo cardiaco latentes y fluorescentes. Las células positivas en EGFP (M1) constituyen menos de un 1% de toda la población de células.

(B) perfil FACS de los EB de 22 días de vida disociados que derivan de células ES cotransfectadas con pα-MHC-EGFP y pα-MHC-pur después de 13 días de tratamiento con puromicina. Las células positivas en EGFP (m1) constituyen del 42 al 45% de toda la población de células.

Figura 4: Protocolo para la preparación de cuerpos embrioides.

Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores

[0052] El vector que contiene el fragmento de 5,5 kb regulador de los Genes α-MHC Maus se proporcionó por el Dr. J. Robbins (Children Hospital Medical Center, Cincinnati, USA) (Gulick et al., 1991).

[0053] El fragmento se cortó a partir del vector con BamHI y SalI, dispuesto con extremos romos y clonado en el sitio SmaI del sitio de clonación múltiple del vector pEFGP-1 (contiene la secuencia codificante para EGFP, la versión potenciada de GFP y el cassette Neo para la resistencia de G418) (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA). La orientación “cola a cabeza” del promotor con respecto a la secuencia codificante de EGFP en el vector resultante se controló y confirmó mediante restricción con EcoRI.

[0054] La parte codificante del gen Pur (fragmento HindIII-SalI) se unión por el extremo romo en la secuencia codificante de pα-MHC-EGFP en lugar de la secuencia codificante de EGFP cortada por BamHI-AfIII (unión de los extremos romos). La alineación y orientación correctas en el vector resultante pα-MHC-Pur se confirmaron, respectivamente, por restricciones SmaI y ClaI-StuI.

Métodos de cultivo celular, transfección y selección

[0055] Todas las etapas de la propagación y selección de clones de células ES se llevaron a cabo en el medio de propagación de células ES que consistía en el siguiente: Medio DMEM rico en glucosa complementado con:

aminoácidos no esenciales (0,1 mM), L-glutamina (2 mM), penicilina y estreptomicina (5 μg/ml),β-mercaptoetanol (0,1 mM), LIF (ESGRO™) (500 u/ml), suero de ternera fetal (FCS) (15% v/v).

[0056] Ambos vectores, pα-MHC-EGFP y pα-MHC-Pur se linealizaron mediante HindI-II-Restrictasa antes de la cotransfección mediante electroporación de las células ES (línea D2). Condiciones de electroporación:

Células: 4 a 5 x 10^6 en 0,8 ml de PBS (libre de Ca^{2+}, Mg^{2+})
Vector-ADN: 20-40 μg;
Cuveta de electroporación: 0,4 cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA);
Electroporador: Gene Pulser ™ (Bio-Rad Laboratories);
Condiciones de impulso eléctrico: 240 V, 500 μF.

Después del impulso eléctrico, la suspensión celular se enfrió en hielo durante 20 minutos y, a continuación, se transfirió en una placa de petri de calidad de tejido de 10 cm con una capa de suministro de fibroblastos resistentes a G418 en 10 ml de medio de propagación de células ES. 2 días más tarde, se añadió Geneticin G418 (GibcoBRL), 300 μg/ml para la selección de células resistentes a G418. El medio con G418 (300 μg/ml) se intercambió cada dos días. Después de una selección de 8-10 días, aparecieron colonias resistentes a fármacos. Se extrajeron las colonias, se tripsinizaron por separado en una solución de tripsina/EDTA al 0,1% y se emplacaron en placas de 48 pocillos con una capa de suministro de fibroblastos resistentes a G418 en un medio de propagación de células ES y G418 (300 μg/ml). Después de 2-4 días de crecimiento, los clones de células ES se tripsinizaron posteriormente y se

propagaron en placas de 24 pocillos y después en placas de petri de tejido de 5 cm. G418 (300 μg/ml) y la capa de suministro de fibroblastos resistentes a G418 estaban presentes en todas las etapas de la propagación de clones de células ES.

Diferenciación de células ES y selección específica en el corazón

[0057] Todas las etapas del protocolo de diferenciación se llevaron a cabo en "un medio de diferenciación" que consistía en todos los componentes del "medio de propagación de células ES" mencionado previamente, a excepción de LIF, y en el que el FCS al 15% se sustituyó por FCS al 20%. Después de la propagación, los clones de ES resistentes a G418 se tripsinizaron y resuspendieron en un "medio de diferenciación" hasta una concentración final de 0,020 a 0,025 x 10^6 células/ml. Posteriormente, se formaron las gotas colgantes mediante la disposición de 20 μl de esta suspensión (400 a 500 células) en las tapas de las placas de petri bacterianas (Greiner Labortechnik, Alemania). Después de 2 días de incubación a 37°C y CO_2 al 5%, las células ES formaron agregados o "cuerpos embrioides" que se lavaron en placas de petri bacterianas con medio de diferenciación y se incubaron durante 5 días adicionales. Después de esto, los cuerpos embrioides se emplacaron por separado en placas de calidad de tejido de 24 pocillos precondicionados con gelatina en un medio de diferenciación. En experimentos paralelos, se dejaron un conjunto de cuerpos embrioides en suspensión, donde se trataron como los emplacados.

[0058] En todas las fases de crecimiento, diferenciación y selección por fármaco, se monitorizaron los EB bajo microscopio de fluorescencia utilizando un conjunto de filtros FITC (Zeiss, Jena, Alemania).

[0059] En experimentos habituales, la aplicación del fármaco puromicina selectivo (1-2 μg/ml) se inició en el día 9-10 del desarrollo cuando se monitorizó la fluorescencia de la primera EGFP. El medio con la sustancia activa se intercambió cada 2-3 días.

Análisis FACS

[0060] Para el análisis FACS, se lavaron de 10 a 20 cuerpos embrioides de diferentes etapas de desarrollo y selección con PBS y, a continuación, se disociaron en una suspensión de células individuales mediante tratamiento con tripsina durante 2-3 minutos (120 μl de solución tripsina/EDTA). Posteriormente, se añadieron 1 ml de DMEM + FCS al 20% de la suspensión de células individuales. Después de la centrifugación (1000 upm) durante 5 minutos, las células se resuspendieron en 0,5 a 1,0 ml de PBS que contenía Ca^{2+} (1 mM) y Mg^{2+} (0,5 mM).

[0061] La expresión de GFP de células de diferente edad derivadas de células madre embrionarias se determinó con un citómetro de flujo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, BRD) que se equipó en un láser de ion argón de 488 nm (15 mW). Las células se resuspendieron en PBS (pH 7,0, BSA al 0,1%) hasta una concentración de 5 x 10^5 células/ml y, a continuación, se analizaron con el FACSCalibur™ con un mínimo de 10.000 células viables que se extrajeron para cada muestra. La fluorescencia emitida de la GFP se midió a 530 nm (filtro de banda de FITC). El "gating" en vivo se llevó a cabo mediante la adición de yoduro de propicio (2 μg/ml) a las muestras inmediatamente antes de la medición. Las células necróticas con una tinción positiva de yoduro propicio (PI) (filtro de banda de 885 nm) mostraron una señal de dispersión lateral (SSC) más elevada en comparación con células negativas en PI viables. Se excluyeron las células no viables de los posteriores análisis dejando que pasaran las células con señales SSC bajas. Las células ES no transfectadas de la línea celular D3 se utilizaron como controles negativos. Se realizaron los análisis utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson).

RESULTADOS

[0062] Las células ES que eran transgénicas con respecto a los vectores pαMHC-EGFP y pαMHC-pur se cultivaron y utilizaron en el protocolo de diferenciación en el corazón. Todos los clones analizados no mostraron fluorescencia de EGFP microscópicamente verificada en el estado de las células ES y después de formar EB hasta el día de emplacado (7 días después de la formación de gotas "colgantes"). Entre el primer y segundo día después del emplacado (EB de 8-9 días de vida), aparecieron las primeras áreas fluorescentes de EGFP que normalmente empezaban a latir espontáneamente un día después. De manera destacada, la amplia mayoría de células EB fuera de los grupos latentes no mostraron un nivel de fluorescencia microscópicamente medible, indicando una especificidad en tejido elevada de la expresión de EGFP durante la cardiomiogénesis de células ES.

[0063] Después de la aplicación de puromicina (habitualmente empezando en el día 9-10 del desarrollo), se detectaron los primeros cambios significativos en la morfología de los EB emplacados en las 12 horas (mediante un sistema de monitorización de largo plazo) del día siguiente. El crecimiento celular que rodeaba los grupos latentes de las células fluorescentes en EGFP se redujo bruscamente y la intensidad de latido del grupo que se había liberado del crecimiento de células circundantes se intensificó inesperadamente (figura 1A). Durante los siguientes dos días, estos cambios progresaron y mostraron una seria destrucción de masas celulares no fluorescentes, así como la comparación de grupos fluorescentes en el corazón con actividades contráctiles intensas (figura 1B,C). Ya en el día 1 del tratamiento con puromicina, algunos de los cuerpos embrioides habían dispuesto de las células no fluorescentes circundantes visualmente y parecían grupos aislados, latentes y fluorescentes (figura 1D). Incluso

después de 4 días de desarrollo y después de 18 días de tratamiento con puromicina, estos grupos aislados mostraron aún una actividad contráctil intensa, mientras que en sus equivalentes no tratados esta actividad se detuvo habitualmente en el día 17 a 20 del desarrollo.

[0064] La mayor fluorescencia de EGFP, así como la actividad contráctil sostenida, se monitorizó en cuerpos tratados con puromicina en cultivo en suspensión en comparación con los equivalentes no tratados. Después de más de 3 semanas de desarrollo y dos semanas de tratamientos con puromicina, la suspensión de cuerpos embrioides contenía cuerpos embrioides intensamente fluorescentes y contráctiles, de los cuales algunos presentaban tal como se observaba y de manera colectiva grupos fluorescentes latentes (figura 2). Estos resultados muestran claramente que los cardiomiocitos se pueden mantener vivos sin las células circundantes y se diferencian. El latido espontáneo muestra además la integridad funcional de las células musculares del corazón seleccionadas. Sin embargo, la ventaja fundamental era la rapidez de la selección con puromicina que conducía a una destrucción del 99% de todos los no cardiomiocitos durante 12-24 horas después de la aplicación.

[0065] El análisis FACS demostró una efectividad elevada de la selección con puromicina de las células ES transgénicas utilizadas. Mientras que las células fluorescentes en EGFP representan solamente aproximadamente el 1% de la población total de células de células no tratadas que contenían un vector pαMHC-EGFP, el tratamiento con puromicina de células madre embrionarias diferenciantes que eran transgénicas con respecto a los vectores pαMHC-EGFP, así como a los vectores pαMHC-pur, condujo a un enriquecimiento del 42-45% de la población celular por células fluorescentes de EGFP (figura 3). Un simple cálculo muestra que ya un 97-99% de toda la población de células no cardiogénicas murió de manera eficaz durante el tratamiento con puromicina del cultivo en suspensión de células ES transgénicas. La fracción aún existente de células fluorescentes no resistentes a puromicina o débilmente resistentes a la misma (figura 3) se podía explicar por la actividad no específica del promotor pαMHC en algunas de las células no cardiogénicas. Dicha fracción se eliminó mediante una concentración más elevada de puromicina o mediante métodos de clasificación FACS.

Ejemplo 2

[0066] Se utilizó como vector inicial pIRES2-EGFP (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Este vector contiene un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) del virus de encefalomiocarditis entre el sitio de clonación múltiple (MCS) y el gen de EGFP. Esto permite que el gen de resistencia a puromicina, así como el gen de EGFP, se traduzcan por separado a partir de un único ARNm bicistrónico.

[0067] Se introdujeron extremos romos en el vector pIREs2-EGFP con las enzimas de restricción AseI y ECO47III y se volvieron a unir con el fin de eliminar el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IV). El vector resultante se digirió con SmaI y se unió con el cassette αMHC-pur que se había cortado del vector αMHC-pur descrito anteriormente mediante SacI y ClaI. La orientación correcta del vector pαMHC-IREs-EGFP obtenido (pα-PIG) se verificó mediante la digestión con SacI/SmaI.

[0068] Las células ES (línea celular D3) se transfectaron con pα-PIG; la siguiente selección de G418, la propagación y diferenciación de los clones estables obtenidos se llevó a cabo tal como se ha descrito ya en el ejemplo 1.

[0069] Después de llevar a cabo el protocolo de diferenciación estándar, se pudieron mostrar grupos latentes de células del corazón positivas en EGFP entre el día 8 y 9 del desarrollo donde se añadió puromicina 5 μg/ml. Después de los primeros tres a cuatro días del tratamiento con puromicina, los cuerpos embrioides (EB) contenían principalmente grupos de células cardiacas que latían intensamente y eran positivas en EGFP; las células no cardiacas se desprendieron y se eliminaron cuando se cambió el medio. El mismo resultado se pudo conseguir dejando crecer completamente los EB en un cultivo en suspensión y llevando a cabo el tratamiento de resistencia con el antibiótico. Un análisis FACS mostró un enriquecimiento de por lo menos el 70% (citometría de flujo utilizando EGFP como lectura) en el cultivo celular obtenido de este modo. La disposición del gen informador y el gen de resistencia en un vector bajo el control de un promotor, preferiblemente en combinación con un IRES, es por tanto, excelentemente adecuado para la producción de células madre embrionarias diferenciadas que están libres tanto como sea posible de células madre no diferenciadas. Lo mismo se aplica naturalmente a células de la línea germinal y células madre adultas, respectivamente, y no sólo a células madre embrionarias. En particular, se pudo mostrar mediante este ejemplo que se puede conseguir una especificidad de tejido extraordinariamente elevada para células cardiacas que se desarrollan a partir de células ES.

Validez del protocolo de selección con puromicina

[0070] El método de selección con puromicina se analizó posteriormente en un modelo de ratón análogo, donde se simuló una lesión del corazón y, de este modo, se podía validar. Para este objetivo, se utilizó un modelo de transplante de ratón en el que se inyectaron células madre embrionarias o células cardiacas obtenidas mediante diferenciación in vitro de células ES (10.000 – 100.000 células) en un receptor, cuyo corazón estaba parcialmente dañado por un tratamiento a baja temperatura. El desarrollo de tumores se examinó morfológicamente en todo el

ratón, en el corazón aislado y en muestras en placa de tejido; estos exámenes se llevaron a cabo en diferentes puntos de tiempo después de la operación durante un periodo de dos días hasta dos meses. Esta estrategia permite una evaluación exacta del potencial tumor de las diferentes preparaciones celulares. Al inyectar células ES no diferenciadas en la criolesión (100.000 células) se desarrollaron grandes tumores en los ratones. 10 días después de la operación, los animales murieron de estos tumores. Sin embargo, también se desarrollaron tumores cuando las células ES se diferenciaron in vitro en células cardiacas y las áreas de latido, que son típicas para cardiomiocitos derivados de células ES, se separaron, se aislaron y se inyectaron en los ratones de 10.000 a 50.000 células de los mismos. Esto demuestra el alto potencial tumoral de las células madre embrionarias en el corazón y las elevadas exigencias que deben cumplirse en un método de selección altamente específico.

[0071] En el siguiente experimento, las células ES transgénicas, que se transfectaron de manera estable con una construcción de la invención (gen informador y gen de resistencia bajo el control de un promotor en un vector), se sometieron a un tratamiento con puromicina durante cinco a siete días después de mostrar la expresión de EGFP. En una amplia serie de pruebas de más de 25 ratones tratados quirúrgicamente que se habían sometido al criotratamiento en el corazón descrito anteriormente, no se pudo observar un desarrollo de los tumores incluso después de varios meses si estas células derivadas de células ES resistentes a puromicina (10.000 a 50.000 células) se inyectaban en el área cardiaca de ratones lesionados (construcciones de doble transfección). De hecho, fue satisfactoria la identificación de células después del transplante y se pudo demostrar claramente que las células se podían transplantar de manera satisfactoria y que se diferenciaban en cardiomiocitos terminalmente diferenciados. Estos experimentos muestran claramente la capacidad de la técnica descrita según la presente invención para enriquecerse de manera eficaz de las células diferenciadas in vitro y para obtener una población que no contenga ninguna célula ES no diferenciada. Considerando la elevada tumorigenicidad mostrada aquí por parte de las células derivadas de células ES en el corazón, esta eficacia es particularmente destacable.

CONCLUSIONES

[0072]

1. Se prepararon clones de células madre embrionarias transgénicas estables que se cotransfectaron con los vectores de expresión pαMHC-EGFP y pαMHC-pur.

2. El tratamiento con puromicina de las células madre embrionarias transgénicas durante la diferenciación in vitro mostró una eficacia elevada de la selección cardioespecífica en comparación con el tratamiento con higromicina de líneas celulares ES con pαMHC-Hyg generadas previamente (datos no mostrados).

3. Las células diferenciadas seleccionadas mostraron un grado más elevado de viabilidad y longevidad morfológica y funcional que sus equivalentes no tratados, lo que sugiere que la estrategia de selección genética libera de manera eficaz a las células madre embrionarias diferenciantes de la influencia negativa de las células circundantes.

4. El uso combinado de genes informadores de fluorescencia y genes de resistencia a fármacos in vivo bajo un promotor común específico del tipo de célula permitió la monitorización exhaustiva y la cuantificación de todo el procedimiento, incluyendo la diferenciación y la selección específica del tipo de células. Las células resultantes son aplicables a experimentos de transplante adicionales lo que permite la monitorización de las células introducidas.

4. La estrategia presentada se puede aplicar a cualquier selección específica del tipo de célula en un sistema de diferenciación de células ES si se identifica y clona un promotor altamente específico para el tipo de células respectivo o una etapa específica del desarrollo. En principio, el sistema permite el uso combinado de dos promotores diferentes con las respectivas dos proteínas fluorescentes in vitro coloreadas, por ejemplo, las versiones de EGFP amarilla (EYEP) y cian (azul) (ECFP), y dos genes de resistencia a fármacos. Dicha estrategia podría incrementar la selectividad y eficacia de todo el procedimiento.

[0073] Las células madre embrionarias proporcionadas por la presente invención, preferiblemente cuerpos embrioides, se pueden utilizar para pruebas toxicológicas de sustancias, por ejemplo, metales pesados y agentes farmacéuticos (véase también la lista anterior). Para este objetivo, se utilizan cultivos de células madre embrionarias utilizando construcciones de doble vector y se añaden agentes de selección después del inicio de la diferenciación habitual celular (detección de la fluorescencia). Después de la purificación celular o ya durante el cultivo de células ES, se añaden las diferentes sustancias a analizar al cultivo celular y en diferentes puntos de tiempo, se miden las células individuales fluorescentes y la fluorescencia global, respectivamente, mediante diferentes métodos de lectura (por ejemplo, citometría de flujo, lector de fluorescencia) en comparación con los controles.

[0074] Las células madre embrionarias proporcionadas por la presente invención se pueden utilizar para la generación de mamíferos no humanos transgénicos con una expresión específica de las células o específica del

desarrollo de la proteína fluorescente. Aquí se introducen las células ES descritas de la presente invención en los blastocitos de mamíferos no humanos. En la próxima etapa, los blastocitos se transfieren a madres sustitutas como quimeras, que se vuelven homocigóticos por retrocruzamiento y, de este modo, se generan mamíferos no humanos transgénicos.

[0075] En una realización adicional de la presente invención, se utilizan células madre embrionarias transgénicas en forma de una composición farmacéutica para transplante. Para este objetivo, se necesitan cultivos derivados de células madre embrionarias altamente purificados, ya que se sabe que la contaminación con células madre proliferantes no diferenciadas conduce a la generación de tumores. Por consiguiente, el método descrito en la presente invención es perfectamente adecuado para obtener cultivos específicos derivados de células ES altamente purificadas que son ideales para el transplante (Klug. et al., 1996).

[0076] Finalmente, debe destacarse de nuevo que la presente invención ilustrada anteriormente mediante células madre embrionarias también es aplicable a células de línea germinal embrionarias y a células madre adultas.

[0077] La presente invención da a conocer un sistema para la selección específica de las células y específica del desarrollo de células madre embrionarias y de adulto diferenciantes o células de la línea germinal embrionaria mediante el uso combinado de genes de resistencia e informadores detectables bajo el control común de un promotor específico de las células y/o del desarrollo.

[0078] Las células madre embrionarias y células de la línea germinal humanas, así como su utilización en el método de la invención están explícitamente excluidas del alcance.

Referencias:

[0079] Anderson, D.J., Gage, F.H., y Weissmann, I.L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? Nat. Med. 7, 393-395.

[0080] Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt, W., y Kemler,R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27-45.

[0081] Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433-1438.

[0082] Heim,R. y Tsien,R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr. Biol. 6, 178-182.

[0083] Kallmeier,R.C., Somasundaram,C., y Babij,P. (1995). A novel smooth muscle-specific enhancer regulates transcription of the smooth muscle myosin heavy chain gene in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 270, 30949-30957.

[0084] Klug,M.G., Soonpaa,M.H., Koh,G.Y., y Field,L.J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin. Invest. 98, 216-224.

[0085] Kolossov,E., Fleischmann,B.K., Liu,Q., Bloch,W., Viatchenko-Karpinski,S., Manzke,O., Ji,G.J., Bohlen, H., Addicks,K., y Hescheler,J. (1998). Functional characteristics of ES cellderived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. J Cell Biol 143, 2045-2056.

[0086] Lints,T.J., Parsons,L.M., Hartley,L., Lyons,I., y Harvey,R.P. (1993). Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants [published erratum appears in Development 1993 Nov;119(3):969]. Development 119, 419-431.

[0087] Lothian,C. y Lendahl,U. (1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. Eur J Neurosci. 9, 452-462.

[0088] Muldoon,R.R., Levy,J.P., Kain,S.R., Kitts,P.A., y Link,C.J., Jr. (1997). Tracking and quantitation of retroviral-mediated transfer using a completely humanized, redshifted green fluorescent protein gene. Biotechniques 22, 162-167.

[0089] Muller M, Fleischmann B.K., Selbert S, Ji G.J., Endl E, Middeler G, Mueller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus, H. A., y Franz, W. M. Selection of ventricularlike cardiomyocytes from ES cells in vitro. FASEB J . 2000. Ref Type: In Press

[0090] O'Brien,T.X., Lee,K.J., y Chien,K.R. (1993). Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 5157-5161.

[0091] Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 276, 71-74.

[0092] Sartorelli,V., Webster,K.A., y Kedes,L. (1990). Muscle-specific expression of the cardiac alpha-actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Sp1. Genes Dev. 4, 1811-1822.

[0093] Shamblott MJ, Axelmann J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, y Gearhart JD (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 13726-13731.

[0094] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, y Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-1147.

[0095] Wartenberg,M., Donmez,F., Ling,F.C., Acker,H., Hescheler,J., y Sauer,H. (2001). Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. FASEB J 2001. Apr;15. (6.):995. -1005. 15, 995-1005.

[0096] Wobus,A.M., Wallukat,G., y Hescheler,J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation. 48, 173-182.

DE19727962 (1999)
WO9616163 (1996)
WO9507463 (1995)
WO9627675 (1996)
WO95121191 (1995)

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener células diferenciadas o células madre que se diferencian en un tipo de célula específico, que comprende:
(a) introducir en células madre, excepto células madre embrionarias humanas, por lo menos uno o dos vectores que contienen secuencias de ADN que contienen la información para por lo menos un gen informador que codifica una proteína fluorescente que no daña las células y por lo menos un gen de resistencia;
en el que ambas secuencias de ADN se encuentran bajo el control del mismo promotor específico de célula y/o del desarrollo que está unido operativamente a dichos genes;
(b) cultivar las células en condiciones que permiten la diferenciación en el tipo de célula deseado;
(c) detectar la expresión de dicho gen informador;
(d) añadir un agente selectivo para la selección de aquellas células que expresan el gen informador y el gen de resistencia;
(e) obtener las células diferenciadas o diferenciantes que se desarrollan a partir de dichas células madre en un tipo de célula específico bajo el control del promotor específico de célula y/o desarrollo.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que las células diferenciadas son células de mamífero, preferiblemente de primate o roedores, particularmente de ratones, ratas o conejos o son de origen humano.

3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína fluorescente que no daña las células se selecciona entre Proteína Verde Fluorescente (potenciada) (EGFP y GFP), Proteína Roja Fluorescente (RFP), Proteína Azul Fluorescente (BFP), Proteína Amarilla Fluorescente (YFP), y Proteína Cian Fluorescente (CFP), en particular preferiblemente GFP.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gen de resistencia proporciona la resistencia contra un antibiótico de nucleósidos o un antibiótico de aminoglicósidos, preferiblemente una resistencia a puromocina.

5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el promotor es un promotor específico para células mesodérmicas, preferiblemente células cardíacas, neuronas, células gliales, células hematopoyéticas, células endoteliales, células de músculo liso; células ectodérmicas, preferiblemente neuronas; células endodérmicas, preferiblemente células endoteliales; o en particular, preferiblemente, células de músculo esquelético, células de cartílago o fibroblastos.

6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el promotor está unido a secuencias de ADN funcionales adicionales, en particular secuencias potenciadoras o secuencias represoras o secuencias IRES.

7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células se cultivan en una suspensión y/o como agregados celulares, preferiblemente en forma de cuerpos embrioides.

8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células contienen un gen de resistencia adicional para la selección de aquellas células que se transfectan de manera estable con una o dos construcciones de vectores, cuyo gen de resistencia es diferente del primer gen de resistencia, en el que preferiblemente la selección de aquellas células que contienen el vector comprende, antes de la etapa (b), añadir un agente selectivo para seleccionar células transfectadas de manera estable.

9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se utiliza puromicina como agente selectivo para seleccionar aquellas células que expresan el gen informador y/o en el que las células seleccionadas se someten a clasificación celular para enriquecimientos adicionales.

10. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además obtener un cultivo celular.

11. Método para el análisis toxicológico de sustancias o el control del uso de un agente farmacéuticamente activo con las siguientes etapas:
(a) obtener un cultivo celular según la reivindicación 10;
(b) introducir sustancias en dicho cultivo celular, cuyos efectos tóxicos o no tóxicos o el uso como agente farmacéuticamente activo deben analizarse;
(c) analizar cuantitativa y/o cualitativamente la fluorescencia de las células obtenidas de este modo y comparar dichas células con las células que se cultivaron sin la sustancia a analizar.

12. Método para generar mamíferos quiméricos no humanos que muestran la expresión específica del tipo de célula y del tipo de desarrollo de un gen informador y un gen de resistencia que comprende:
(a) obtener células, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
(b) inyectar las células obtenidas en blastocitos de mamíferos no humanos; y
(c) transferir los blastocitos a madres sustitutas.

Figura 1

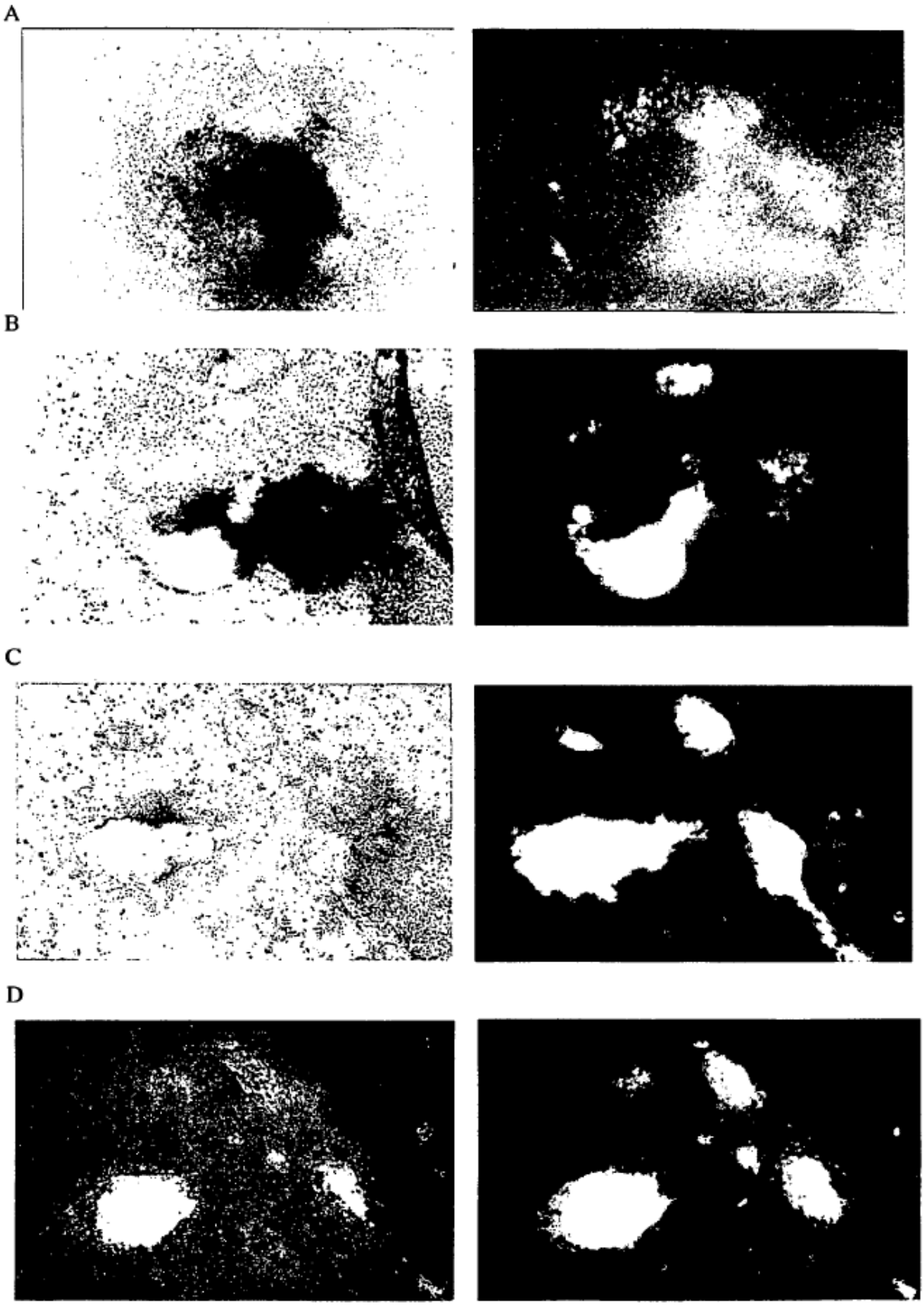
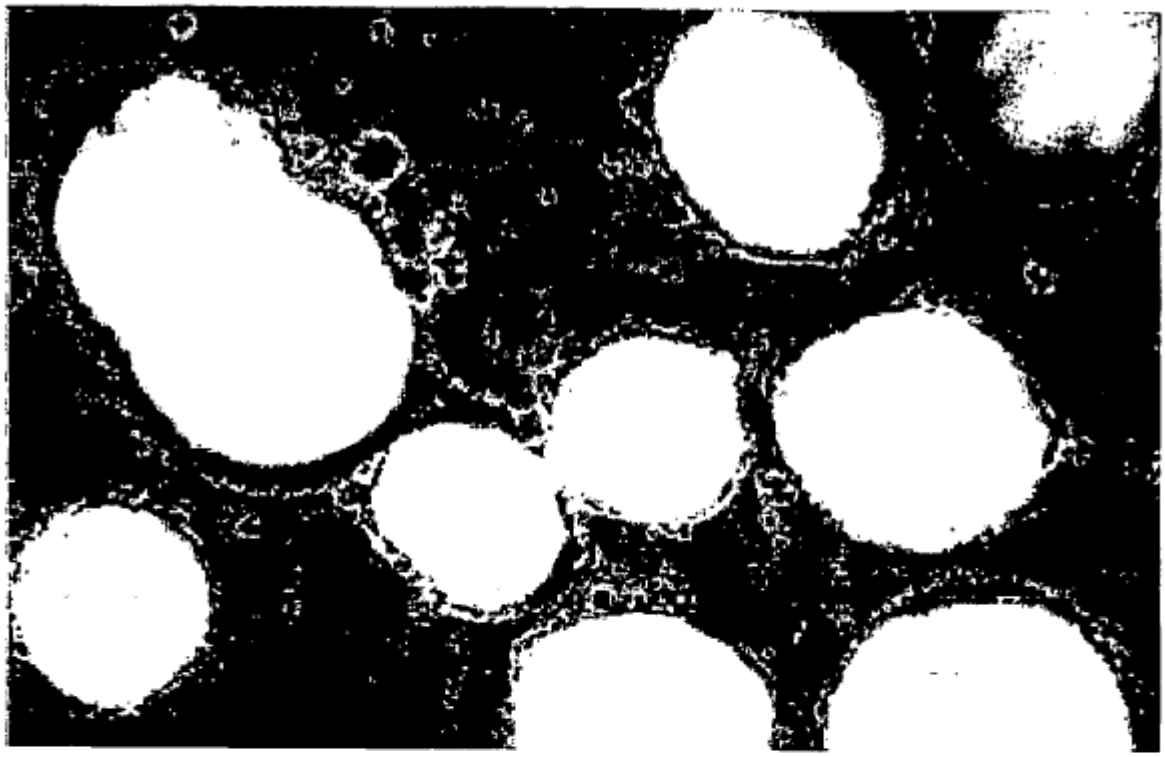


Figura 2



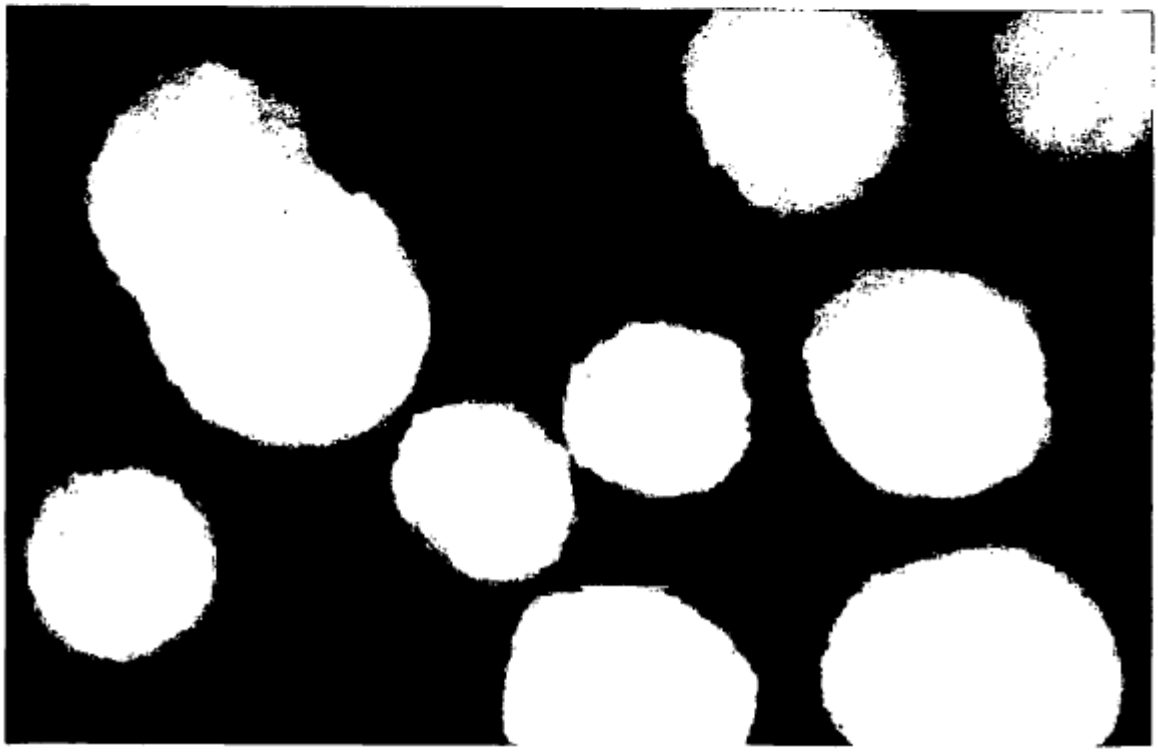
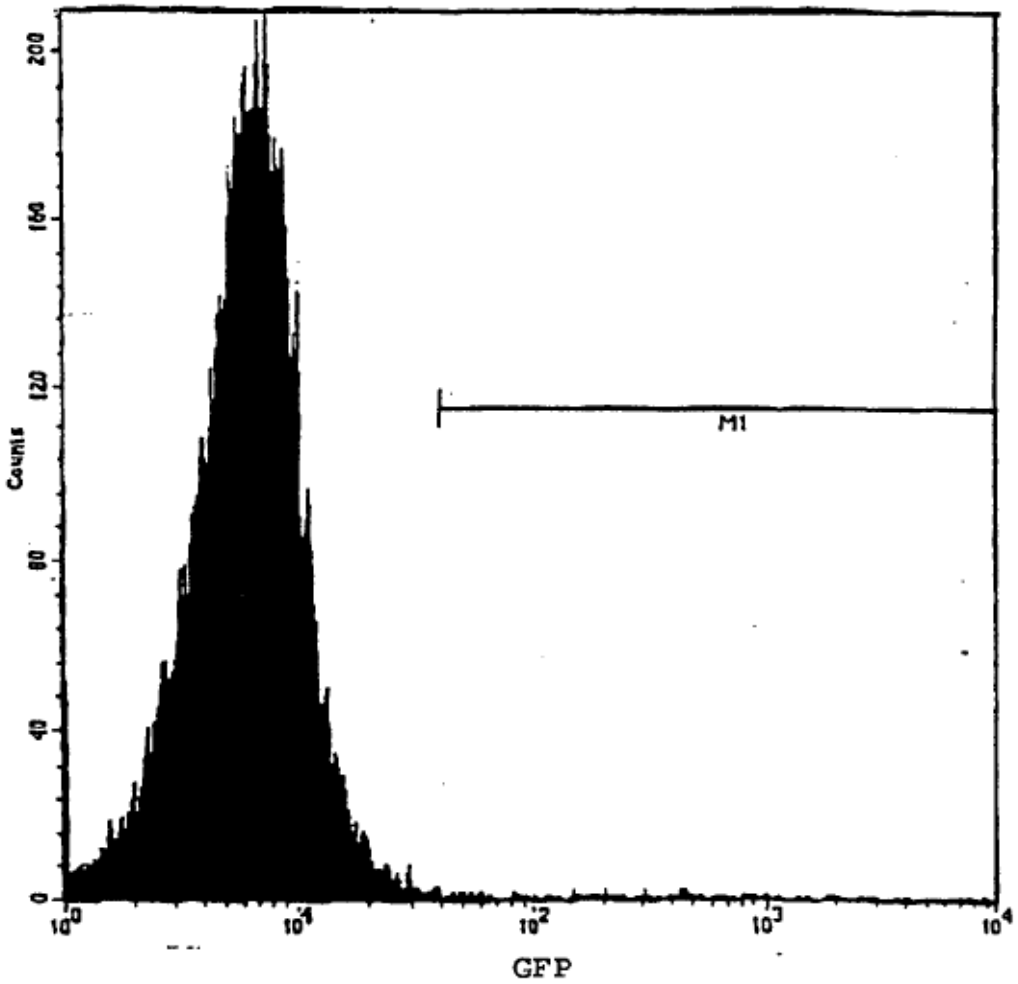
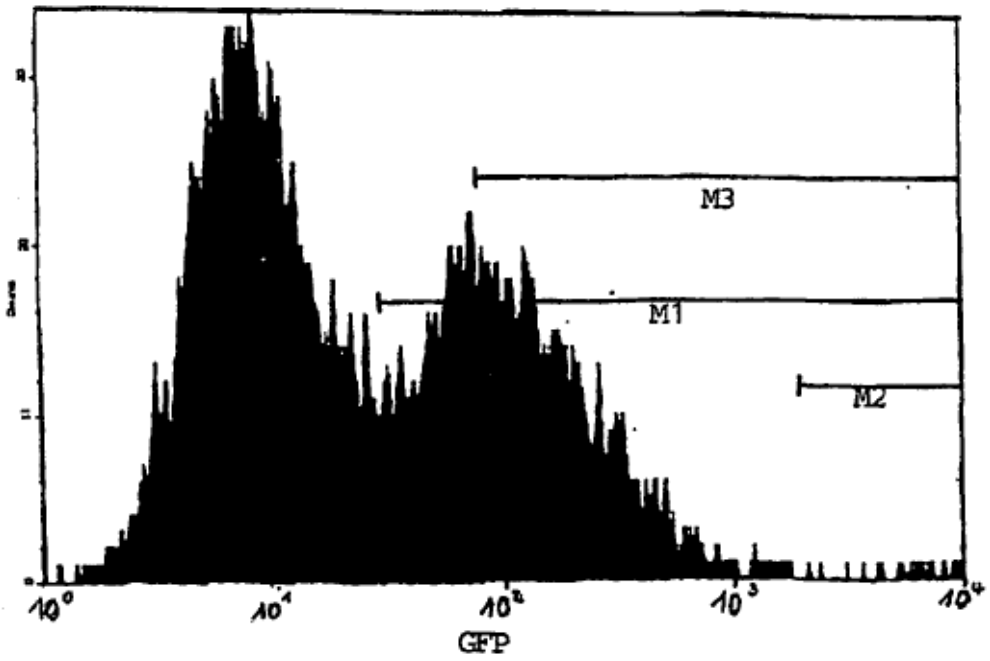


Figura 3

A


200
160
120
80
40
0
Counts
M1
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
GFP

B


M3
M1
M2
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
GFP

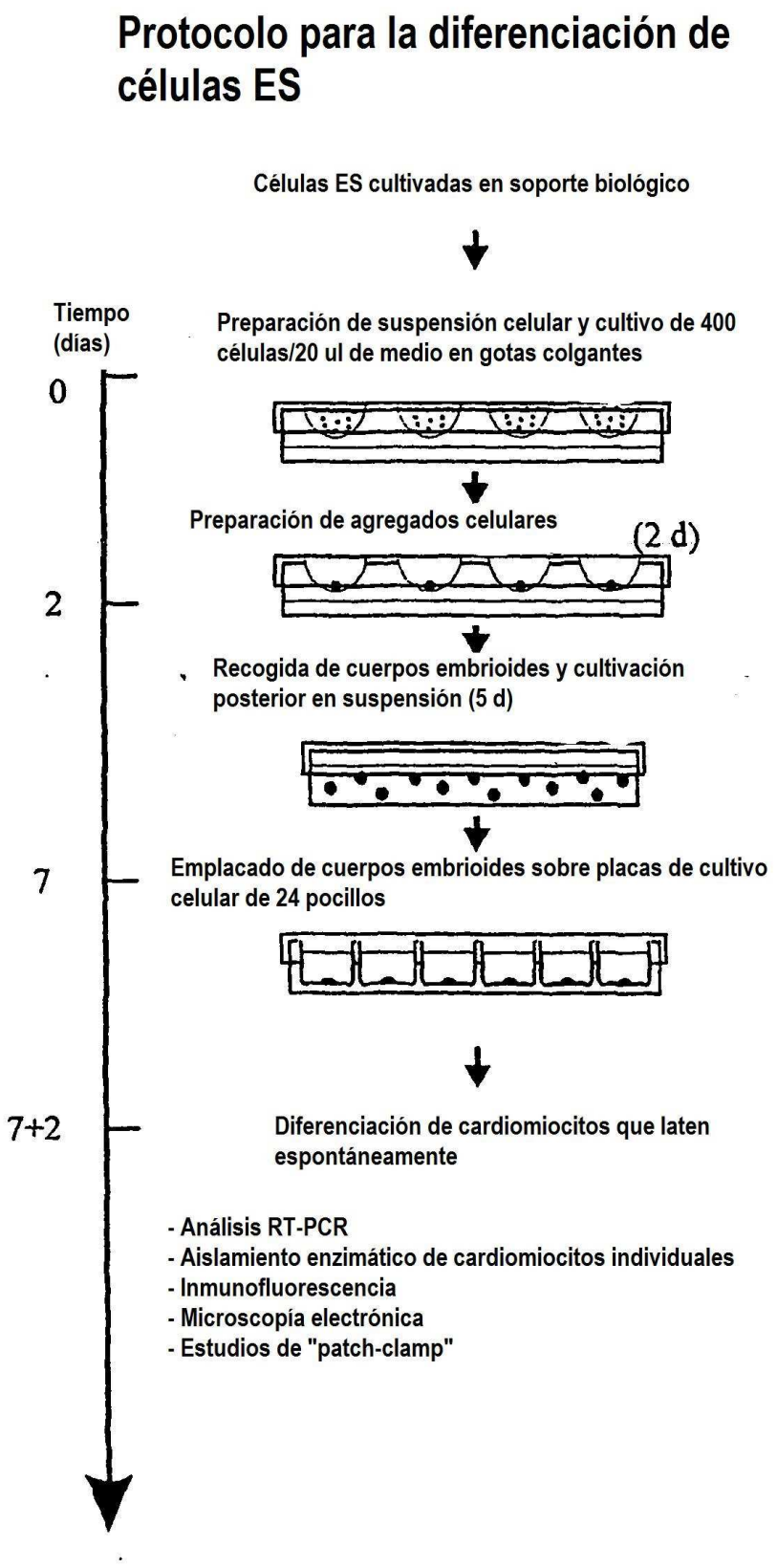

Protocolo para la diferenciación de células ES
Células ES cultivadas en soporte biológico
Tiempo (días)
0
Preparación de suspensión celular y cultivo de 400 células/20 ul de medio en gotas colgantes
Preparación de agregados celulares
(2 d)
2
Recogida de cuerpos embrioides y cultivación posterior en suspensión (5 d)
7
Emplacado de cuerpos embrioides sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos
7+2
Diferenciación de cardiomiocitos que laten espontáneamente
- Análisis RT-PCR
- Aislamiento enzimático de cardiomiocitos individuales
- Inmunofluorescencia
- Microscopía electrónica
- Estudios de "patch-clamp"

Figura 4