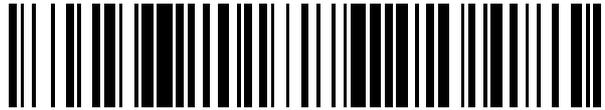


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 105**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2002 E 02756367 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1412481**

54 Título: **Células mesenquimatosas y osteoblastos procedentes de células madre embrionarias humanas**

30 Prioridad:

06.07.2001 US 303732 P

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

26.06.2015

73 Titular/es:

**ASTERIAS BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
230 Constitution Drive
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**XU, CHUNHUI y
THIES, R. SCOTT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 539 105 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células mesenquimatosas y osteoblastos procedentes de células madre embrionarias humanas

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención se refiere a un medio de cultivo y un entorno de crecimiento para obtener osteoprogenitores y/u osteoblastos, utilizando condiciones de cultivo especiales y técnicas de selección.

ANTECEDENTES

La medicina regenerativa es una iniciativa nueva importante en la industria biotecnológica. Se están desarrollando métodos para producir cultivos de células especializadas cuyo uso se propone para promover la reparación tisular y la curación de enfermedades para las cuales las pautas terapéuticas previas son insatisfactorias.

10 Un área de interés emergente es el uso de células cultivadas para reforzar o reparar los tejidos óseos. Existen varios informes publicados de células progenitoras de osteoblastos y células madre mesenquimatosas en desarrollo.

15 Las patentes de los EE. UU. 5 691 175, 5 681 701 y 5 693 511 (Fundación Mayo) describen células osteoblásticas fetales humanas normales inmortalizadas que expresan un mutante sensible a la temperatura del antígeno T grande del virus del simio 40. La patente de los EE. UU. 5 972 703 (Michigan) publica composiciones de células precursoras óseas que no son hematopoyéticas y que se pueden diferenciar en osteoblastos tras la exposición a un factor de crecimiento óseo y depositan calcio en la matriz extracelular. La patente de los EE. UU. 6 200 602 (DuPuy Orthopaedics) publica el aislamiento de células precursoras óseas o de cartílago a partir de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas y propone su uso en la regeneración del hueso y el cartílago.

20 La publicación de patente internacional WO 95/22611 (Michigan) publica métodos para transferir ácidos nucleicos a células óseas *in situ* para estimular las células progenitoras óseas. Se exploran los genes osteotrópicos y de colágeno de tipo II para su uso para promover el crecimiento, reparación y regeneración óseos en un modelo en animales. La publicación de patente internacional WO 99/39724 (Oregón) propone tratar defectos óseos con células progenitoras de osteoblastos. Las células se podrán transformar para expresar una proteína morfogenética ósea tal como BMP-2.

25 J.E. Aubin (*J. Cell Biochem. Supl.* 30/31:73, 1998) revisa el tema de las células madre óseas. Los osteoprogenitores primitivos y madre y los precursores mesenquimatosos relacionados contribuyen al reemplazo de los osteoblastos en el recambio óseo y en la curación de las fracturas. El artículo formula la hipótesis de que el fenotipo de los osteoblastos maduros es heterogéneo con subpoblaciones de osteoblastos que expresan subconjuntos de los marcadores de osteoblastos conocidos, lo que da lugar a la posibilidad de múltiples rutas de diferenciación paralelas y diferentes reservas de progenitores.

30 Joyner *et al.* (*Bone* 21:1, 1997) publican la identificación y enriquecimiento de células osteoprogenitoras humanas utilizando un anticuerpo monoclonal específico de la etapa de diferenciación. Se seleccionó un anticuerpo particular por su reactividad con cultivos de médula y ubicación inmunohistoquímica en tejidos fetales en regiones celulares progenitoras adyacentes a las células osteoblásticas. En la inmunoprecipitación con anticuerpos inmovilizados sobre una superficie sólida, el anticuerpo seleccionó unidades formadoras de colonias estromales (CFU-F, por sus siglas en inglés). Thies *et al.* (*Endocrinology* 130:1318, 1992) publican que la proteína 2 morfogenética ósea induce la diferenciación osteoblástica en una línea de células estromales, e incrementa la actividad fosfatasa alcalina de manera dependiente de la dosis sin afectar a la proliferación celular.

40 Liechty *et al.* (*Nature Med.* 6:1282, 2000) publican que las células madre mesenquimatosas humanas (MSC, por sus siglas en inglés) se injertan y muestran una diferenciación específica del sitio después del trasplante en el útero en ovejas. Se obtuvo una población de MSC por aspiración en la cresta ilíaca de donantes humanos normales y se trasplantó en ovejas antes del desarrollo de la competencia inmunológica. Las células se injertaron y permanecieron en múltiples tejidos durante 13 meses. El artículo publica que experimentaron diferenciación específica del sitio en condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, células estromales de médula ósea y estroma tímico.

45 La patente de los EE. UU. 5 908 784 (Case Western Reserve) se refiere a la obtención de MSC humanas tomando células de médula ósea, cultivándolas en medio BGJ_b con suero bovino fetal e identificándolas utilizando un anticuerpo monoclonal. La inducción de condrocitos *in vitro* conlleva poner en contacto un sedimento de células empaquetadas con un agente condroinductor. La patente de los EE. UU. 5 486 359 (Osiris Therapeutics) publica el aislamiento de células madre mesenquimatosas humanas que se pueden diferenciar en hueso, cartílago, músculo o estroma medular. La publicación de patente internacional WO 97/40137 (Osiris) propone un sistema para la regeneración y aumento de hueso utilizando células madre mesenquimatosas. Las composiciones comprenden MSC o células de médula ósea fresca con un material cerámico o biopolímero reabsorbible.

50 No está claro si alguna de las preparaciones celulares ejemplificadas en estas publicaciones se puede producir en cantidades suficientes para su comercialización masiva como una composición terapéutica para la reparación ósea.

Células madre pluripotentes indiferenciadas de origen embrionario

Un área diferente de investigación médica trata sobre células madre que no están dedicadas a producir una progenie de ningún linaje particular. Varios descubrimientos recientes han generado expectativas sobre líneas celulares embrionarias que podrán convertirse en una fuente de células y tejidos útiles en medicina regenerativa para una amplia variedad de afecciones degenerativas. Las células madre embrionarias se describen como pluripotentes debido a que se consideran capaces de diferenciarse en varios tipos celulares (R.A. Pedersen, *Scientif. Am.* 280(4):68, 1999).

Se realizó un trabajo inicial con células madre embrionarias utilizando cepas de ratón endogámico como modelo (revisado en Robertson, *Meth. Cell Biol.* 75:173, 1997; y Pedersen, *Reprod. Fertil. Dev.* 6:543, 1994). Sin embargo, comparadas con las células ES de ratón, las células pluripotentes de monos y seres humanos han mostrado ser mucho más frágiles y no responden a las mismas condiciones de cultivo. Los factores que afectan a su persistencia en el cultivo y su diferenciación posterior son considerablemente diferentes. Tan solo recientemente, se han realizado descubrimientos que permiten que las células embrionarias de primates se cultiven *ex vivo*.

Thomson *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995) fueron los primeros en cultivar con éxito células madre embrionarias de primates, utilizando monos rhesus y titís como modelo. Posteriormente obtuvieron líneas de células madre embrionarias humanas (hES) a partir de blastocistos humanos (*Science* 282:114, 1998), cocultivándolas con fibroblastos embrionarios de ratón para favorecer su mantenimiento y crecimiento. Gearhart y colaboradores obtuvieron líneas de células germinales embrionarias humanas (hEG) a partir de tejido de gónadas fetales (Shamblott *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998), también favorecidas por células alimentadoras. Tanto las células hES como las hEG tienen las características que se han buscado durante tanto tiempo de las células madre pluripotentes: son capaces de una proliferación continua *in vitro* sin diferenciarse, retienen un cariotipo normal y retienen la capacidad de diferenciarse para producir varios tipos de células adultas.

Geron Corporation ha desarrollado entornos para el cultivo tisular novedoso que permiten la proliferación continua de células madre pluripotentes en un entorno esencialmente exento de células alimentadoras. Remítase a la patente australiana AU 729377 y a la publicación de patente internacional WO 01/51616. La posibilidad de cultivar células madre en un entorno exento de células alimentadoras proporciona un sistema en el que las composiciones celulares se pueden producir fácilmente que cumple los requisitos reglamentarios para la terapia en seres humanos.

Con el fin de convertir en realidad el potencial de las células madre pluripotentes en la gestión de la enfermedad y salud humanas, es necesario ahora desarrollar nuevos métodos para convertir estas células en poblaciones de tipos tisulares terapéuticamente importantes.

COMPENDIO

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, se proporciona un medio de cultivo para obtener osteoprogenitores y/u osteoblastos a partir de células madre embrionarias humanas (hES) o su progenie, que comprende BMP4, dexametasona y ácido ascórbico o uno de sus análogos. El medio de cultivo puede comprender además beta-glicerofosfato.

Esta invención proporciona un medio de crecimiento o entorno de crecimiento para la producción eficaz de células osteoprogenitoras y/u osteoblastos que se han diferenciado a partir de células madre embrionarias humanas (hES).

Una población celular o una célula aislada que prolifera en un cultivo *in vitro* se podrá obtener diferenciando células madre embrionarias humanas (hES) en dicho medio de cultivo. Las poblaciones celulares pueden comprender al menos ~10%, ~30% o ~60% de células mesenquimatosas de varios tipos, cuyas características se enumeran en otro punto de esta descripción. Por ejemplo, los osteoblastos y sus precursores podrán expresar osteocalcina, colágeno de tipo 1 y fosfatasa alcalina. Los osteoblastos maduros podrán expresar osteocalcina y ser capaces de formar una matriz extracelular que comprende calcio.

Estas células se obtienen a partir de una línea de células madre embrionarias humanas (hES), y de esta manera comparten el mismo genoma que la línea a partir de la cual se obtuvieron, con cualesquiera alteraciones genéticas inducidas. Si se desea, las células se pueden alterar genéticamente para incrementar la capacidad proliferativa: por ejemplo, con un vector de expresión para la transcriptasa inversa de la telomerasa. Las células también se pueden alterar genéticamente para expresar una proteína morfogénica ósea.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un entorno de crecimiento que comprende un medio de cultivo de acuerdo con el primer aspecto de la invención y una estructura de soporte.

Estas y otras realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

DIBUJOS

La Figura 1 es una reproducción de microfotografías que muestran la expresión del marcador detectada por inmunocitoquímica en células madre embrionarias humanas (hES) indiferenciadas. Los cultivos se cultivaron de

acuerdo con métodos convencionales en células alimentadoras embrionarias de ratón o en un entorno exento de células alimentadoras que comprende matrices extracelulares Matrigel® o laminina en medio acondicionado. Las células hES cultivadas en un cultivo exento de células alimentadoras tienen marcadores fenotípicos similares a los de hES cultivadas en una capa alimentadora de fibroblastos de ratón primarios.

5 La Figura 2 muestra características de una línea celular humana designada HEF1 que se diferenció a partir de hES. El cuadro A es una copia de una microfotografía de contraste de fase que muestra que la línea celular HEF1 tiene las características morfológicas de los fibroblastos. El cuadro B (debajo) es una copia de los resultados de un ensayo TRAP, que muestran que las células HEF1 transducidas con un vector retroviral para la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT) adquirieron actividad telomerasa.

10 La Figura 3 es una reproducción de microfotografías que muestran la expresión de marcadores de líneas celulares que se han sometido a un método de diferenciación para generar células osteoprecursoras y osteoblastos. Se reemplazó el medio de cultivo con medio de inducción de osteoblastos (OIM, por sus siglas en inglés) y a continuación se diferenciaron durante 11 días. Se preparó el OIM a partir de medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas y se suplementó con dexametasona 0.1 μ M, ácido 2-fosfatoascórbico 5 μ M, β -glicerofosfato 10 mM y 100 ng/mL de BMP-4. Las células utilizadas fueron la línea celular de hES H1, la línea celular diferenciada obtenida a partir de hES telomerizada HEF1, células madre mesenquimatosas humanas y fibroblastos BJ5ta.

Los cuadros A y B muestran los resultados inmunocitoquímicos de los marcadores osteocalcina y colágeno-1. El cuadro C muestra la tinción de la actividad fosfatasa alcalina. Estos rasgos son característicos de las células del linaje de osteoblastos e indican que tanto las células hES como las células HEF1 generan osteoblastos cuando se someten a un protocolo de diferenciación apropiado *in vitro*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta invención proporciona la tecnología que se puede utilizar para obtener osteoprogenitores y/u osteoblastos que participan en el recambio y reparación óseos.

Si se permite que las células pPS se diferencien de una manera no dirigida, se obtiene una población heterogénea de células que expresan marcadores para varios tipos tisulares diferentes (WO 01/51616; Shambloft *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:113, 2001. Un desafío significativo en la utilización de células pPS con objetivos terapéuticos, o para estudiar tipos celulares particulares *in vitro*, es obtener poblaciones celulares que comprendan una subpoblación sustancial que tenga características relativamente uniformes. Ninguno de los artículos revisados en la sección de antecedentes de esta descripción expone o sugiere un método para obtener osteoblastos o sus precursores a partir de células madre embrionarias de cualquier especie.

En la actualidad se ha descubierto que se pueden obtener poblaciones sustancialmente homogéneas de células del linaje mesenquimatoso cultivando células embrionarias pluripotenciales en condiciones optimizadas para células de este tipo. El Ejemplo de referencia 2 (posteriormente) describe como se pueden diferenciar células madre embrionarias humanas (hES) en una línea de células mesodérmicas tempranas. Se provocó que las células hES formaran cuerpos embrioides, que se colocaron en placas a continuación en condiciones adecuadas para seleccionar una línea de células que porta características fenotípicas de células mesodérmicas. La línea celular aislada se transdujo a continuación con transcriptasa inversa de la telomerasa, para incrementar la capacidad de proliferación. Esta línea celular tiene la capacidad de autorrenovación, y de formar una progenie de varios tipos celulares mesenquimatosos maduros.

En el Ejemplo de referencia 3, se provocó a su vez que la línea celular mesenquimatosas se diferenciara en células del linaje de osteoblastos, identificadas mediante la tinción de la osteocalcina del colágeno-1 y la actividad de la fosfatasa alcalina. El ejemplo de referencia 3 también describe cómo las células que tienen características de osteoblastos también se pueden obtener directamente cultivando células embrionarias humanas (hES) en un entorno de cultivo apropiado. Específicamente, se cultivaron las células durante 11 días en un medio de crecimiento para células mesenquimatosas comercializado suplementado con dexametasona 0.1 μ M, ácido 2-fosfatoascórbico 5 μ M, β -glicerofosfato 10 mM y 100 ng/mL de BMP-4.

Ciertas poblaciones celulares obtenidas utilizando un medio de cultivo o entorno de crecimiento de esta invención contienen una proporción elevada de osteoblastos y sus precursores. No se sabe si las condiciones del cultivo inducen a las células hES a adoptar un fenotipo de osteoblasto, si promueven la excrecencia de células de este tipo o si inhiben el crecimiento de otros tipos celulares - ciertamente, es bastante posible que varios de estos mecanismos actúen conjuntamente para el enriquecimiento en células del tipo deseado. Desde luego, el mecanismo responsable de provocar el enriquecimiento en células de linaje de osteoblastos tiene interés, pero no es necesario entender el mecanismo para llevar a la práctica la invención.

Las propiedades funcionales y la uniformidad destacables de las células producidas de acuerdo con este sistema las hacen valiosas para desarrollar nuevas modalidades terapéuticas y como una herramienta para estudiar tejidos mesenquimatosos *in vitro*.

Definiciones

Las "células madre pluripotentes de primates" prototipo (células pPS) son células pluripotentes obtenidas a partir de cualquier tipo de tejido embrionario (tejido fetal o prefetal), y tienen la característica de ser capaces de producir, en las condiciones apropiadas, una progenie de diferentes tipos celulares que son derivados de todas las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) de acuerdo con una prueba aceptada en la técnica estándar, tal como la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas, o la capacidad de formar células identificables de todas las tres capas germinales en un cultivo tisular.

En la definición de células pPS se incluyen células embrionarias de varios tipos, ejemplificadas por células madre embrionarias humanas (hES), descritas por Thomson *et al.* (Science 282:1145, 1998); células madre embrionarias procedentes de otros primates, tales como células madre de Rhesus (Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995), células madre de tití (Thomson *et al. Biol. Reprod.* 55:254, 1996) y células germinales embrionarias humanas (hEG) (Shamblo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998). La expresión también incluye otros tipos de células pluripotentes. Están incluidas cualesquiera células obtenidas de primates que sean capaces de producir una progenie y que sean derivados de todas las tres capas germinales, sin importar si se obtienen a partir de tejido embrionario, tejido fetal o de otras fuentes. Las células pPS no se obtienen a partir de una fuente maligna. Es deseable (pero no siempre necesario) que las células sean cariotípicamente normales.

Se describen los cultivos de células pPS como "indiferenciados" cuando una proporción sustancial de células madre y sus derivados en la población presentan características morfológicas de células indiferenciadas, donde estas se distinguen claramente de las células diferenciadas de origen embrionario o adulto. Los expertos en la técnica reconocen fácilmente las células pPS indiferenciadas y estas aparecen normalmente en las dos dimensiones de una vista microscópica en colonias de células con relaciones nucleares/citoplasmáticas elevadas y nucleolos prominentes. Se sobreentiende que las colonias de células indiferenciadas dentro de la población a menudo estarán rodeadas por células vecinas que están diferenciadas.

A efectos de esta divulgación, una "célula mesenquimatosa" puede ser una célula diferenciada totalmente o una célula precursora proliferativa dedicadas a formar células de un tejido mesenquimatoso tal como el hueso, tejido dental, cartílago, tendón, estroma de la médula ósea, el linaje hematopoyético o músculo. Las células madre mesenquimatosas están incluidas en la expresión, ya que son células totalmente diferenciadas (pos-mitóticas) y células competentes en la replicación más dedicadas tales como células precursoras de osteoblastos. Todas las células mesenquimatosas tienen la propiedad de estar totalmente diferenciadas en el linaje mesenquimatoso o estar restringidas a formar una progenie del linaje mesenquimatoso o sus precursores. No forman células endodérmicas o ectodérmicas a menos que se sometan a transferencia nuclear o se reprogramen de otra manera.

En el contexto de la ontogenia celular, el adjetivo "diferenciado" es un término relativo. Una "célula diferenciada" es una célula que ha evolucionado más en la ruta de desarrollo que la célula con la que se está comparando. Por lo tanto, las células madre embrionarias pluripotentes se pueden diferenciar en células precursoras restringidas a un linaje (tales como una célula madre mesenquimatosa), las cuales a su vez se pueden diferenciar en otros tipos de células precursoras avanzando más en la ruta de diferenciación (tal como un precursor de osteoblastos) y a continuación en una célula diferenciada en su etapa final, que desempeña una función característica en un cierto tipo tisular y podrá o no podrá mantener la capacidad de proliferar adicionalmente.

Un "agente de diferenciación" tal y como se utiliza en esta divulgación, se refiere a uno de una colección de compuestos que se utilizan en sistemas de cultivo de esta invención para producir células diferenciadas del linaje mesenquimatoso (incluidas las células precursoras y células totalmente diferenciadas). No se pretende imponer ninguna limitación al modo de acción del compuesto. Por ejemplo, el agente podrá ayudar en el proceso de diferenciación induciendo o ayudando en un cambio de fenotipo, promoviendo el crecimiento de las células con un fenotipo particular o retrasando el crecimiento de otras, o actuando conjuntamente con otros agentes mediante mecanismos desconocidos.

A menos que se indique explícitamente lo contrario, las técnicas descritas en la presente se pueden ejercer sin restricciones en cualquier tipo de célula progenitora capaz de diferenciarse en hueso.

Las "células alimentadoras" o "alimentadoras" son una expresión y un término utilizados para describir un tipo de células que se cultivan conjuntamente con células de otro tipo para proporcionar un entorno en el cual puedan crecer las células del segundo tipo. Se dice que las poblaciones de células de pPS están "esencialmente exentas" de células alimentadoras si las células se han cultivado durante al menos un ciclo tras una división en la cual no se añaden células alimentadoras para favorecer el crecimiento de las pPS.

Un "entorno de crecimiento" es un entorno en el que las células de interés proliferarán, se diferenciarán o madurarán *in vitro*. Los rasgos de este entorno incluyen el medio en el que las células se cultivan, cualesquiera factores de crecimiento o factores inductores de la diferenciación que puedan estar presentes, y una estructura de soporte (tal como un sustrato en una superficie sólida) si está presente.

Se dice que una célula está "genéticamente alterada" cuando se ha trasferido un polinucleótido al interior de la célula mediante cualquier medio adecuado de manipulación artificial o cuando la célula es una progenie de la célula

alterada originalmente que ha heredado el polinucleótido. A menudo el polinucleótido comprenderá una secuencia que se puede transcribir que codifica una proteína de interés, la cual hace posible que la célula exprese la proteína con un nivel elevado. Se dice que la alteración genética es "heredable" si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.

5 El término "anticuerpo" tal y como se utiliza en esta divulgación se refiere tanto a un anticuerpo monoclonal como policlonal. El alcance del término engloba deliberadamente no solo moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también tales fragmentos y derivados de moléculas de inmunoglobulina (tales como constructos Fv monocatenarios, diacuerpos y constructos de fusión) que se puedan preparar mediante técnicas conocidas en la técnica y que mantengan la especificidad de unión al anticuerpo deseada.

10 Técnicas generales

Para una explicación más detallada de las técnicas descritas en la presente, el técnico puede remitirse a los manuales y revisiones habituales en biología celular, cultivo celular y embriología.

15 Con respecto al cultivo tisular y células madre embrionarias, el lector podrá desear remitirse a *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (E.J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P.M. Wasserman *et al.* eds., Academic Press 1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro* (M.V. Wiles, *Meth. Enzymol.* 225:900, 1993); *Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P.D. Rathjen *et al.*, *Reprod. Fertil. Dev.* 10:31, 1998).

20 Los principios generales de preparación y cultivo de células óseas y de la reparación de lesiones óseas se pueden consultar en *Bone: The Osteoblast and Osteocyte* (B.K. Hall, CRC Press 1990); *Differentiation and Morphogenesis of Bone* (B.K. Hall ed., CRC Press 1994); *Principles of Bone Biology*, (J.P. Bilezikian *et al.* eds., Academic Press 1996); y *The Cellular and Molecular Basis of Bone Formation and Repair* (V. Rosen & S. Thies, R.G. Landes Co. 1995). Otras lecturas de interés incluyen *The Bone People* (K. Hulme, Viking Press 1986); y *Bone Appetit* (B.E. Romano, West Coast Media Group 1998).

25 Los métodos de genética molecular e ingeniería genética se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a Ed. (Sambrook *et al.*, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 3.^a Edición (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987 & 1995); y *Recombinant DNA Methodology II* (R. Wu ed., Academic Press 1995). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genérica a los que se hace referencia en esta divulgación se pueden adquirir de proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y ClonTech.

30 Fuentes de células madre

Células madre embrionarias

35 Las células madre embrionarias se han aislado a partir de blastocistos de miembros de la especie de los primates (Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995). Las células madre embrionarias humanas (hES) se pueden preparar a partir de células de blastocistos humanos utilizando las técnicas descritas por Thomson *et al.* (patente de los EE. UU. 5 843 780; *Science* 282:1145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133 ff., 1998) y Reubinoff *et al.*, *Nature Biotech.* 18:399,2000. Los tipos celulares equivalentes a las células hES incluyen sus derivados pluripotentes, tales como células de tipo ectodermo primitivas (EPL, por sus siglas en inglés), tal como se expone sucintamente en WO 01/51610 (Bresagen).

40 Resumiendo, los blastocistos humanos se obtienen a partir de embriones humanos *in vivo* antes de la implantación. Como alternativa, se pueden utilizar embriones fertilizados *in vitro* (IVF, por sus siglas en inglés) o se pueden expandir embriones humanos unicelulares hasta la etapa de blastocisto (Bongso *et al.*, *Hum Reprod* 4: 706, 1989). Los embriones se cultivan hasta la etapa de blastocisto en medio G1.2 y G2.2 (Gardner *et al.*, *Fertil. Steril.* 69:84, 1998). Se retira la zona pelúcida de los blastocistos desarrollados mediante una exposición breve a pronasa (Sigma). Se aíslan las masas de células internas por inmunocirugía, en la cual se exponen los blastocistos a una dilución 1:50 de antisuero de células anti-bazo humano obtenido en conejo durante 30 min, a continuación se lavan durante 5 min tres veces en DMEM y se exponen a una dilución 1:5 del complemento de la cobaya (Gibco) durante 3 min (Solter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:5099, 1975). Después de dos lavados adicionales en DMEM, las células trofoectodérmicas lisadas se eliminan de la masa de células internas (ICM, por sus siglas en inglés) intactas pipeteando suavemente y las ICM se colocan en placas en capas de mEF alimentadoras.

50 Después de 9-15 días, las excrecencias derivadas de la masa de células internas se disocian en aglomeraciones, ya sea por exposición a solución salina de tampón fosfato (PBS) exenta de calcio y magnesio con EDTA 1 mM, ya sea por exposición a dispasa o tripsina o mediante disociación mecánica con una micropipeta; y a continuación se vuelven a colocar en placas en mEF en medio fresco. Las colonias en crecimiento que tienen una morfología indiferenciada se seleccionan individualmente mediante una micropipeta, se disocian mecánicamente en aglomeraciones y se colocan en placas nuevas. La morfología de tipo ES se caracteriza por colonias compactas con una relación de núcleos respecto a citoplasma elevada y nucleolos prominentes. Las células ES resultantes se

dividen de manera rutinaria a continuación cada 1-2 semanas mediante una tripsinización breve, exposición a PBS de Dulbecco (que contiene EDTA 2 mM), exposición a colagenasa de tipo IV (~200 U/mL; Gibco) o mediante selección de colonias individuales con una micropipeta. Tamaños de las aglomeraciones de aproximadamente 50 a 100 células son óptimos.

5 *Células germinales embrionarias*

Se pueden preparar células germinales embrionarias humanas (hEG) a partir de células germinales primordiales presentes en material fetal humano que se toma aproximadamente 8-11 semanas después del último periodo menstrual. Se describen métodos de preparación adecuados en Shamblo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998 y la patente de los EE. UU. 6 090 622.

10 Resumiendo, se lavan las crestas genitales con tampón isotónico, a continuación se colocan en 0.1 mL de tripsina al 0.05%/solución de EDTA sódica 0.53 mM (BRL) y se cortan en porciones de <math><1\text{ mm}^3</math>. A continuación el tejido se pipetea a través de una punta de 100 μL para desagregar en mayor grado las células. Se incuba a 37 °C durante ~5 min, a continuación se añaden ~3.5 mL de medio de crecimiento para EG. El medio de crecimiento para EG es DMEM, 4500 mg/L de D-glucosa, 2200 mg/L mM de NaHCO_3 ; suero bovino fetal adecuado para ES al 15% (BRL);
 15 glutamina 2 mM (BRL); piruvato de sodio 1 mM (BRL); 1000-2000 U/mL del factor inhibidor de la leucemia recombinante humano (LIF, Genzyme); 1-2 ng/mL de bFGF recombinante humano (Genzyme); y forskolina 10 μM (en DMSO al 10%). En una estrategia alternativa, se aíslan las células EG utilizando hialuronidasa/colagenasa/ADNasa. El primordio gonadal o las crestas genitales con mesenterios se diseccionan a partir del material fetal, se lavan las crestas genitales con PBS, a continuación se colocan en 0.1 mL de una solución de digestión HCD (0.01% de hialuronidasa de tipo V, 0.002% de ADNasa I, 0.1% de colagenasa de tipo IV, todos de Sigma, preparada en medio de crecimiento para EG). Se pica el tejido, se incuba durante 1 h o durante toda la noche a 37 °C, se resuspende en 1-3 mL de medio de crecimiento para EG y se coloca en una placa en una capa alimentadora.

25 Se prepararon placas de cultivo tisular de noventa y seis pocillos con una capa de células alimentadoras subconfluentes (p. ej., células STO, ATCC N.º CRL 1503) cultivadas durante 3 días en medio de crecimiento para EG exento de LIF, bFGF o forskolina, inactivado con 5000 rad de irradiación γ . Se añadieron a cada pocillo ~0.2 mL de una suspensión de células germinales primarias (PGC). Se realizó el primer pase después de 7-10 días en medio de crecimiento para EG, se transfirió cada pocillo a un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos que se había preparado previamente con fibroblastos de ratón STO irradiados. Las células se cultivan reemplazando diariamente el medio hasta que se observa una morfología celular coherente con la de las células EG, normalmente después de
 30 7-30 días o 1-4 pases.

Propagación de células pPS en un estado indiferenciado

Las células pPS se pueden propagar de manera continua en cultivo, utilizando condiciones de cultivo que promuevan la proliferación sin promover la diferenciación. Se prepara medio ilustrativo para ES que contiene suero con un 80% de DMEM (tal como Knock-Out DMEM, Gibco), 20% de suero bovino fetal definido (FBS, Hyclone) o suero para reemplazo (WO 98/30679), 1% de aminoácidos no esenciales, L-glutamina 1 mM y β -mercaptoetanol 0.1 mM. Justo antes de su uso, se añaden 4 ng/mL (WO 99/20741, Geron Corp.) de bFGF humano.

40 Convencionalmente, se cultivan las células ES en una capa de células alimentadoras, normalmente fibroblastos obtenidos a partir de tejido fetal o embrionario. Se recolectan los embriones de un ratón CF1 a los 13 días de gestación, se transfieren a 2 mL de tripsina/EDTA, se pican finamente y se incuban 5 min a 37 °C. Se añade FBS al 10%, se permite que sedimenten los desechos y se propagan las células en un 90% de DMEM, un 10% de FBS y glutamina 2 mM. Para preparar una capa de células alimentadoras, se irradian las células para inhibir la proliferación pero permitir la síntesis de factores que favorezcan a las células ES (~4000 rad de irradiación γ). Se recubren las placas con gelatina al 0.5% durante toda la noche, se colocan en placas con 375 000 mEF irradiadas por pocillo y se utilizan de 5 h a 4 días después de la colocación en placas. El medio se reemplaza con medio para hES fresco justo antes de sembrar las células pPS.

Los científicos de Geron han descubierto que las células pPS se pueden mantener como alternativa en un estado indiferenciado incluso sin células alimentadoras (WO 01/51616). El entorno para cultivos exentos de alimentadoras incluye un sustrato de cultivo adecuado, particularmente una matriz extracelular tal como Matrigel® o laminina. Las células pPS se colocan en placas con una densidad >15 000 células cm^{-2} (óptimamente de 90 000 cm^{-2} a 170 000 cm^{-2}). Normalmente, la digestión enzimática se detiene antes de que las células se dispersen completamente (es decir, de ~5 a 20 min con colagenasa IV). Las aglomeraciones de ~10-2000 células se colocan a continuación en placas directamente en el sustrato sin una dispersión adicional.

55 Los cultivos exentos de alimentadoras están favorecidos por medio nutriente acondicionado normalmente cultivando fibroblastos embrionarios de ratón primarios irradiados, fibroblastos de ratón telomerizados o células de tipo fibroblasto obtenidas a partir de células pPS. El medio se puede acondicionar colocando en placas alimentadoras con una densidad de ~5-6 $\times 10^4$ cm^{-2} en un medio exento de suero tal como KO DMEM suplementado con un 20% de suero para reemplazo y 4 ng/mL de bFGF. Se filtra a través de una membrana de 0.2 μm el medio que se ha

acondicionado durante 24 h, se suplementa con ~8 ng/mL más de bFGF y se utiliza para favorecer el cultivo de células pPS durante 1-2 días.

En el microscopio, las células ES se presentan con relaciones nucleares/citoplasmáticas elevadas, nucleolos prominentes y formación de colonias compactas con uniones celulares deficientemente discernibles. Las células ES de primates podrán expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA, por sus siglas en inglés) 3 y 4, y marcadores detectables utilizando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson *et al.*, *Science* 282:1145, 1998). Las células hES indiferenciadas también expresan normalmente Oct-4 y TERT, según se detectan por RT-PCR. La diferenciación de las células hES *in vitro* da como resultado normalmente la pérdida de estos marcadores (si están presentes) y el incremento de la expresión de SSEA-1.

10 Materiales y métodos para preparar células mesenquimatosas y osteoblastos

Se podrá utilizar un medio de cultivo o entorno de crecimiento de esta invención para cultivar, diferenciar o reprogramar células madre embrionarias humanas que estén enriquecidas en células con el fenotipo deseado (ya sea por excrecencia de las células deseadas o por inhibición o aniquilación de otros tipos de células).

15 La diferenciación se puede iniciar opcionalmente por formación de agregados o cuerpos embrioides: por ejemplo, por excrecencia de un cultivo de células pPS donantes o cultivando células pPS en suspensión en recipientes de cultivo que tengan un sustrato con propiedades de adhesión bajas que permite la formación de EB. Las células pPS se recolectan mediante una digestión con colagenasa breve, se disocian en agrupaciones y se colocan en placas de cultivo de células no adherentes. Los agregados se alimentan cada pocos días y a continuación se recolectan tras un periodo adecuado, normalmente 4-8 días. Como alternativa, o adicionalmente, el proceso de diferenciación se puede iniciar cultivando con un método de diferenciación no específico: por ejemplo, incluyendo ácido retinoico (RA) o sulfóxido de dimetilo (DMSO) en el medio de cultivo; o extrayendo a partir de la matriz extracelular normal en la cual se cultivan las células. Remítase a la patente de los EE. UU. 60/213 740 y a la publicación de patente internacional WO 01/51616.

25 La producción de poblaciones relativamente homogéneas de células mesenquimatosas, particularmente del linaje de osteoblastos, se puede lograr cultivando células pPS (ya sean indiferenciadas o después de que se haya iniciado la diferenciación) en un entorno de crecimiento que contenga factores beneficiosos para tales células, tales como uno o más de los siguientes:

- proteínas morfogénicas óseas, ejemplificadas por BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 y BMP-7
- TGF- β , ejemplificado por TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 y sus análogos y otros miembros de la superfamilia de TGF- β que se unen al receptor de TGF- β
- ligandos del receptor de la vitamina D. Un ejemplo es la 1,25-dihidroxitamina D3. Se conocen otros análogos (remítase, por ejemplo, a Tsugawa *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 23:66, 2000)

35 Se reconoce que el anticuerpo específico para los receptores de cualquiera de estos factores son ligandos funcionalmente equivalentes que se pueden utilizar en lugar de (o además de) los factores enumerados. Otros aditivos que se podrán utilizar incluyen:

- otros morfógenos, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos como FGF básico
- un glucocorticoide
- dexametasona u otro factor de maduración de osteoblastos de bajo peso molecular
- ácido ascórbico (o un análogo de este, tal como ácido 2-fosfatoascórbico) que es un cofactor para la hidroxilación de la prolina que ocurre durante el curso de la síntesis de colágeno
- β -glicerofosfato, u otro sustrato para la fosfatasa alcalina durante el proceso de mineralización
- una fuente de calcio (que podrá estar presente o no en una concentración suficiente en el medio basal)

45 Las células también pueden estar soportadas en un sustrato recubierto con un material apropiado propicio para el crecimiento del fenotipo celular deseado, o cultivadas en un medio que contenga los componentes de un material de ese tipo. Matrigel®, laminina, colágeno (especialmente colágeno de tipo I), glicosaminoglicanos, osteocalcina y osteonectina podrán ser todos ellos adecuados como una matriz extracelular, ellos solos o en diversas combinaciones. También son adecuados para cultivar células de linaje de osteoblastos los vidrios derivados de geles, geles de sílice y óxido de titanio derivado de un sol-gel (Saravanapavan *et al.*, *J. Biomed Mater. Res.* 54:608, 2001; Dieudonne *et al.*, *Biomaterials* 34:3041, 2002).

50 Las células pueden caracterizarse de acuerdo con varios criterios fenotípicos. Las células mesenquimatosas relativamente indiferenciadas se pueden reconocer por su forma de husillo o forma estrellada, ovoide mononuclear característica, con un núcleo de redondo a oval y unas fronteras celulares definidas de manera deficiente. Los

5 núcleos elongados ovales tienen normalmente nucleolos prominentes y una mezcla de hetero- y eucromatina. Estas células tienen un citoplasma pequeño pero muchas prolongaciones delgadas que parecen extenderse desde el núcleo. Normalmente, darán una tinción positiva para uno, dos, tres o más de los siguientes marcadores: CD106 (VCAM), CD166 (ALCAM), CD29, CD44, GATA-4 y fosfatasa alcalina, a la vez que serán negativos para los marcadores celulares del linaje hematopoyético (CD14 o CD45). Las células madre mesenquimatosas también podrán expresar STRO-1.

10 En las condiciones apropiadas, las células mesenquimatosas tempranas se pueden diferenciar adicionalmente en muchos tipos de células del tejido conectivo adultas tales como fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos, células reticulares o adipocitos. En consecuencia, se pueden identificar las células madre mesenquimatosas por su capacidad para formar una progenie de uno o más linajes mesenquimatosos especializados.

Los osteoblastos y las células precursoras óseas tendrán normalmente al menos una característica (normalmente al menos tres o cinco características) de la siguiente lista:

- una densidad comprendida entre ~ 1050 y $\sim 1090 \text{ g cm}^{-3}$
- 15 • ser positivas para osteonectina (positivas en osteoblastos y precursores)
- ser positivas para osteocalcina (específica de osteoblastos maduros)
- un diámetro celular de ~ 8 a $\sim 70 \mu\text{m}$
- una forma cuboidal
- un incremento en la producción de fosfatasa alcalina, especialmente en respuesta a la presencia de BMP
- 20 • ser positivas para el colágeno de tipo I (procolágeno) o para la vimentina
- ser positivas para los marcadores específicos de osteoblastos, tales como los receptores de BMP, receptores de PTH o CD105 (endoglina)
- evidencia de la capacidad de mineralizar el medio externo que la rodea o de sintetizar una matriz extracelular que contiene calcio

25 El lector experto sabrá que los condrocitos expresan normalmente colágeno de tipo II, agregano o proteoglicanos que se tiñen con azul alciano. En la forma madura, los condrocitos serán positivos para elastina, colágeno de tipo I, colágeno de tipo X u osteocalcina en menos de un 1%. Las poblaciones de células hematopoyéticas y sus precursores portarán marcadores tales como re CD45, CD34, CD13, AC133, hemoglobina, anticuerpo superficial y antígenos de histocompatibilidad de la clase II. En las circunstancias apropiadas, las células hematopoyéticas replicativas formarán colonias en un ensayo para unidades formadoras de colonias hematopoyéticas (CFU). Los cardiomiocitos y sus precursores expresarán normalmente troponina I cardíaca (c TnI), troponina T cardíaca (cTnT), factor natriurético atrial (ANF) y la cadena pesada de la miosina cardíaca alfa (MHC). Los fibroblastos tienen una morfología fácilmente identificable y expresan normalmente colagenasa I e inhibidor tisular de la metaloproteinasa I (TIMP-1). Las células del músculo estriado expresan proteínas contráctiles tales como la α -actina esquelética, cadenas ligera y pesada de la miosina esquelética y tropomiosina. MioD y miogenina son marcadores miogénicos tempranos. El tejido del ligamento y del tendón da una tinción positiva para colágeno de tipo I en una disposición de fibras unidireccional. Los progenitores de condrocitos y de tendón tempranos expresan normalmente escleraxis. Los adipocitos normalmente presentan una tinción positiva con aceite rojo O que muestra la acumulación de lípidos y expresan el receptor $\gamma 2$ activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR $\gamma 2$), lipasa de lipoproteína (LPL) y proteína de unión a ácidos grasos (aP2).

Los marcadores específicos del tejido se pueden detectar utilizando cualquier técnica inmunológica adecuada tal como inmunocitoquímica de flujo o adsorción por afinidad para los marcadores de la superficie celular, inmunocitoquímica (por ejemplo, de células fijadas o cortes tisulares) para los marcadores de la superficie celular o intracelulares, análisis por inmunoelectrotransferencia de extractos celulares y ensayo de inmunoadsorción enzimática, para extractos celulares o productos secretados en el medio. Se dice que la expresión de un antígeno por una célula es "detectable por el anticuerpo" si se unirá una cantidad significativamente detectable del anticuerpo al antígeno en un ensayo de citometría de flujo o inmunocitoquímico estándar, opcionalmente tras fijación de las células y opcionalmente utilizando un anticuerpo secundario u otro conjugado (tal como un conjugado biotina-avidina) marcados para amplificar el proceso de marcado.

50 La expresión de los productos génicos específicos del tejido también se puede detectar a nivel del ARNm mediante un análisis de Northern, análisis de hibridación de inmunotransferencia por puntos o por la reacción en cadena de la polimerasa iniciada por la transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando cebadores específicos de la secuencia en los métodos de amplificación estándar. Remítase a la patente de los EE. UU. 5 843 780 para los detalles de la técnica general, y a la publicación de patente internacional WO 99/39724 para cebadores de PCR específicos de

osteoblastos. Los datos de la secuencia para otros marcadores enumerados en esta divulgación se pueden obtener a partir de bases de datos públicas tales como GenBank (URL www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez). Se dice que la expresión a nivel del ARNm es detectable "de acuerdo" con uno de los ensayos descritos en esta divulgación si la utilización del ensayo en muestras celulares de acuerdo con procedimientos estándar en un experimento controlado típico da como resultado un producto de amplificación o hibridación claramente distinguible. La expresión de los marcadores específicos del tejido tal como se detecta al nivel del ARNm o de la proteína se considera positiva si el nivel está al menos 2 veces, y más preferentemente más de 10 o 50 veces, por encima del de las células de control, tales como una célula pPS u otro tipo celular no relacionado.

La presencia de actividad fosfatasa alcalina se puede detectar fijando las células con paraformaldehído al 4% y a continuación el revelado con Vector Red como sustrato, tal como lo describe el proveedor (Vector Laboratories, Burlingame CA). La acumulación de calcio dentro de las células y el depósito en las proteínas de la matriz se puede medir cultivando en $^{45}\text{Ca}^{++}$, lavando y cultivando de nuevo y determinando a continuación cualquier radioactividad presente dentro de la célula o depositada en la matriz extracelular (patente de los EE. UU. 5 972 703); o sometiendo a ensayo el sustrato del cultivo para determinar la mineralización utilizando un kit de ensayo de Ca^{++} (Sigma Kit n.º 587).

Una vez que se han identificado los marcadores en la superficie de las células con el fenotipo deseado, se pueden utilizar para la inmunoselección para enriquecer adicionalmente la población mediante técnicas tales como la inmunoprecipitación con anticuerpos inmovilizados sobre una superficie sólida o clasificación de células activadas por fluorescencia mediada por anticuerpos.

Alteración genética de células diferenciadas

Podrá ser deseable que las células tengan la capacidad de replicarse en ciertos cribados farmacológicos y aplicaciones terapéuticas y para proporcionar una reserva para la generación de células mesenquimatosas y osteoblastos. Las células de esta invención podrán estar telomerizadas opcionalmente para incrementar su potencial de replicación, ya sea antes o después de su evolución en células de un linaje de desarrollo restringido o células totalmente diferenciadas. Las células pPS que están telomerizadas podrán avanzar en la ruta de diferenciación descrita anteriormente; o las células diferenciadas se podrán telomerizar directamente.

Las células se telomerizan alterándolas genéticamente por transfección o transducción con un vector adecuado, recombinación homóloga u otra técnica apropiada, de modo que expresen el componente catalítico de la telomerasa (TERT), normalmente bajo el control de un promotor heterólogo que incremente la expresión de la telomerasa en mayor grado que lo que ocurre bajo el control del promotor endógeno. El componente catalítico de la telomerasa humana (hTERT), que se proporciona en la solicitud de patente internacional WO 98/14592, es particularmente adecuado. Para ciertas aplicaciones también se puede utilizar TERT de especies homólogas como el ratón (WO 99/27113). La transfección y expresión de la telomerasa en células humanas se describe en Bodnar *et al.*, *Science* 279:349, 1998 y Jiang *et al.*, *Nat. Genet.* 21:111, 1999. En otro ejemplo, se utilizan clones de hTERT (WO 98/14592) como una fuente de la secuencia codificante de hTERT y se empalma en un sitio EcoRI de un vector PBBS212 controlado por el promotor MPSV o en el sitio EcoRI de un vector retrovírico pBABE comercializado, controlado por el promotor LTR.

Las células pPS diferenciadas o indiferenciadas se alteran genéticamente utilizando sobrenadantes que contienen un vector a lo largo de un periodo de 8-16 h y a continuación se intercambian en medio de crecimiento durante 1-2 días. Las células alteradas genéticamente se seleccionan utilizando 0.5-2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puomicina y se cultivan de nuevo. Se pueden evaluar para determinar la expresión de hTERT por RT-PCR, actividad telomerasa (ensayo TRAP), tinción inmunocitoquímica para determinar hTERT o capacidad replicativa. Los siguientes kits de ensayo están comercializados para su uso en investigación: kit de detección de la telomerasa TRAPeZe® XL (Cat. s7707; Intergen Co., Purchase NY); y TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAplus (Cat. 2,013,89; Roche Diagnostics, Indianapolis IN). La expresión de TERT también se puede evaluar en el ARNm por RT-PCR. Está comercializado para su uso en investigación el kit de cuantificación LightCycler TeloTAGGG hTERT (Cat. 3,012,344; Roche Diagnostics). Las colonias que se están replicando continuamente se enriquecerán mediante un cultivo adicional en condiciones que favorezcan la proliferación y, opcionalmente, se pueden clonar las células con los fenotipos deseables por dilución limitante.

Las células pPS se pueden diferenciar en células mesenquimatosas multipotentes o dedicadas y alteradas genéticamente a continuación para expresar TERT.

Las células pPS se pueden alterar genéticamente para expresar TERT y diferenciar a continuación en precursores de osteoblastos o células totalmente diferenciadas. La modificación con éxito para incrementar la expresión de TERT se puede determinar mediante el ensayo TRAP o determinando si la capacidad replicativa de las células ha mejorado.

Dependiendo de la aplicación, también se podrán utilizar otros métodos de immortalización tales como la transformación de las células con ADN que codifica myc, el antígeno T grande del virus del simio 40 o MOT-2 (patente de los EE. UU. 5 869 243, solicitudes de patente internacional WO 97/32972 y WO 01/23555). La

transfección con oncogenes o productos oncovíricos es menos adecuada cuando las células se van a utilizar con fines terapéuticos. Las células telomerizadas tienen un interés particular cuando es conveniente tener células que pueden proliferar y mantener su cariotipo - por ejemplo, en el cribado farmacéutico y en los protocolos terapéuticos donde se administran células diferenciadas a un individuo con el fin de aumentar la función musculoesquelética.

- 5 Las células también se pueden alterar genéticamente con el fin de mejorar su capacidad de participar en la regeneración tisular o para suministrar un gen terapéutico a un sitio de administración. Se designa un vector utilizando la secuencia codificante conocida para el gen deseado, ligado operativamente a un promotor que es pan-específico o activo específicamente en el tipo celular diferenciado. Tienen un interés particular las células que están alteradas genéticamente para expresar una proteína morfogénica ósea tal como BMP-2 o BMP-4. Remítase a WO
10 99/39724. La producción de estos u otros factores de crecimiento en el sitio de administración podrá reforzar el efecto beneficioso de la célula administrada o incrementar la proliferación o actividad de células hospedadoras cercanas al sitio de tratamiento.

Uso de células madre mesenquimatosas, precursores de osteoblastos y células totalmente diferenciadas

- 15 Estas poblaciones celulares se pueden utilizar con varios fines comerciales, de investigación y desarrollo importantes.

Las células se pueden utilizar para preparar una colección de ADNc relativamente libre de contaminación en forma de ADNc expresado preferentemente en células de otros linajes. Por ejemplo, las células progenitoras mesenquimatosas u osteoblastos se recogen por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min y a continuación se prepara el ARN a partir del sedimento mediante técnicas estándar (Sambrook *et al.*, anteriormente). Después de transcribirlo de manera inversa en ADNc, se puede sustraer la preparación con ADNc de células pPS
20 indiferenciadas, otras células progenitoras, o células de la etapa final procedentes de osteoblastos o cualquier otra ruta de desarrollo.

Las células diferenciadas también se pueden utilizar para preparar anticuerpos que son específicos para marcadores de células mesenquimatosas, osteoblastos y precursores intermedios. Se pueden preparar anticuerpos policlonales
25 inyectando células de esta invención en una forma inmunogénica a un animal vertebrado. La producción de anticuerpos monoclonales se describe en referencias estándar tales como las patentes de los EE. UU. 4 491 632, 4 472 500 y 4 444 887 y *Methods in Enzymology* 73B:3 (1981). Las moléculas de anticuerpos específicos también se pueden producir poniendo en contacto una colección de células inmunocompetentes o partículas víricas con el antígeno diana y cultivando los clones seleccionados positivamente. Remítase a Marks *et al.*, *New Eng. J. Med.*
30 335:730, 1996 y McGuinness *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:1449, 1996. Una alternativa adicional es la reorganización de fragmentos de ADN aleatorios en las regiones codificantes de los anticuerpos, tal y como se describe en la solicitud de patente EP 1 094 108 A.

35 Seleccionando positivamente utilizando pPS y negativamente utilizando células que portan antígenos distribuidos más ampliamente (tal como células embrionarias diferenciadas) o células madre obtenidas a partir de adultos, se puede obtener la especificidad deseada. A su vez, los anticuerpos se pueden utilizar para identificar o rescatar células mesenquimatosas de un fenotipo deseado a partir de una población celular mixta, con fines tales como la co-
40 nunciación durante el inmunodiagnóstico utilizando muestras tisulares y aislar células precursoras a partir de osteoblastos totalmente diferenciados y células de otros linajes.

Las células también tienen interés para identificar patrones de expresión de transcritos y proteínas sintetizadas recientemente que son características de las células mesenquimatosas y podrán asistir para dirigir las rutas de
45 diferenciación o facilitar la interacción entre células. Se obtienen patrones de expresión de las células diferenciadas y se comparan con líneas celulares de control, tales como células pPS indiferenciadas, otros tipos de células precursoras dedicadas (tales como células pPS diferenciadas en otros linajes) o células totalmente diferenciadas.

Fritz *et al.*, *Science* 288:316, 2000; "Microarray Biochip Technology", L Shi, www.Gene-Chips.com, revisan de
50 manera general el uso de micromatrices para analizar la expresión génica. Se lleva a cabo un método ilustrativo utilizando un generador de matrices de Genetic Microsystems y un escáner GenePix™ de Axon. Las micromatrices se preparan primero amplificando fragmentos de ADNc que codifican secuencias marcadoras que se van a analizar y se colocan directamente en portaobjetos de vidrio. Para comparar preparaciones de ARNm procedente de dos células de interés, se convierte una preparación en ADNc marcado con Cy3 mientras que la otra se convierte en
55 ADNc marcado con Cy5. Las dos preparaciones de ADNc se hibridaron simultáneamente en el portaobjetos de la matriz y se lavaron a continuación para eliminar la unión no específica. A continuación se barrió el portaobjetos a longitudes de onda adecuadas para cada una de las marcas, se cuantificó la fluorescencia resultante y se formatearon los resultados para proporcionar una indicación de la abundancia relativa de ARNm para cada marcador de la micromatriz.

55 *Cribado farmacológico*

Las células mesenquimatosas y los osteoblastos se pueden utilizar para un cribado que seleccione factores (tales como disolventes, fármacos con bajo peso molecular, péptidos, oligonucleótidos) o condiciones ambientales (tales como manipulación o entorno de cultivo) que afecte a las características de tales células y sus diferentes progenies.

En algunas aplicaciones, las células pPS (diferenciadas o indiferenciadas) se utilizan en un cribado que seleccione factores que promuevan la maduración en precursores mesenquimatosos de una etapa más avanzada, o células totalmente diferenciadas, o para promover la proliferación y mantenimiento de tales células en un cultivo a largo plazo. Por ejemplo, los factores de maduración o los factores de crecimiento candidatos se prueban añadiéndolos a células en diferentes pocillos y a continuación se determina cualquier cambio fenotípico que se produzca, de acuerdo con el criterio deseable para un cultivo adicional y el uso de las células. En una ilustración, las células obtenidas a partir de pPS con un fenotipo mesenquimatoso temprano se utilizan para cribar los factores en función de su capacidad para dirigir la diferenciación hacia tipos celulares particulares tales como miocitos, cartilago o adipocitos.

Otras aplicaciones de cribado se refieren a la prueba de compuestos farmacéuticos en función de su efecto en el mantenimiento o reparación del tejido musculoesquelético. En una ilustración, las células derivadas de pPS con características de osteoblastos se utilizan para cribar factores en función de su capacidad para afectar al depósito de calcio. El cribado se podrá realizar debido a que el compuesto se diseña para que tenga un efecto farmacológico en las células o debido a que el compuesto diseñado para tener efectos en otro punto pueda tener efectos secundarios imprevistos en células de este tipo tisular. El cribado se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de las células precursoras o células completamente diferenciadas.

Se dirige al lector de manera general al manual estándar "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997 y la patente de los EE. UU. 5 030 015. La evaluación de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos conlleva generalmente combinar las células diferenciadas de esta invención con el compuesto candidato ya sea solo o combinado con otros fármacos. El investigador determina cualquier cambio en la morfología, fenotipo marcador o actividad funcional de las células que es atribuible al compuesto (comparado con las células no tratadas o las células tratadas con un compuesto inerte) y a continuación correlaciona el efecto del compuesto con el cambio observado.

La citotoxicidad se puede determinar en primer lugar mediante el efecto en la viabilidad, supervivencia, morfología celulares y la expresión de ciertos marcadores y receptores. Los efectos de un fármaco en el ADN cromosómico se pueden determinar midiendo la síntesis o reparación del ADN. La incorporación de [³H]-timidina o BrdU, especialmente en momentos no programados del ciclo celular, o por encima del nivel requerido para la replicación celular, es coherente con un efecto farmacológico. Los efectos no deseados también pueden incluir tasas inusuales de intercambio entre cromátidas hermanas, determinadas por frotis de la metafase. Se dirige al lector a A. Vickers (págs. 375-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997) para una descripción más detallada.

Se puede evaluar el efecto de la función celular utilizando cualquier ensayo estándar para observar el fenotipo o actividad de las células mesenquimatosas o células osteoblastoides, tales como la unión al receptor, depósito en la matriz o procesamiento del calcio - ya sea en un cultivo celular o en un modelo en animales apropiado.

Uso terapéutico

Para determinar la idoneidad de las composiciones celulares para la administración terapéutica, las células se pueden probar primero en un modelo en animales adecuado. En un nivel, se evalúan las células para determinar su capacidad de sobrevivir y mantener su fenotipo *in vivo*. Las composiciones celulares se administran a animales inmunodeficientes (tales como ratones atímicos o animales que se han convertido en inmunodeficientes por tratamiento químico o con irradiación). Se recolectan los tejidos tras un periodo de neocrecimiento y se evalúan para determinar si las células originadas a partir de células pPS están todavía presentes.

Esto se puede realizar administrando células que expresan una marca detectable (tal como la proteína fluorescente verde, o β -galactosidasa); que se han marcado previamente (por ejemplo, con BrdU o [³H]timidina) o mediante la detección posterior de un marcador celular constitutivo (por ejemplo, utilizando un anticuerpo específico para seres humanos). La presencia y fenotipo de las células administradas se puede evaluar mediante técnicas inmunohistoquímicas o ELISA utilizando un anticuerpo específico para seres humanos o mediante análisis por RT-PCR utilizando cebadores y condiciones de hibridación que hacen que la amplificación sea específica para los polinucleótidos humanos, de acuerdo con los datos secuenciales publicados.

La idoneidad también se puede determinar evaluando el grado de recuperación que se origina a partir del tratamiento con una población celular de células mesenquimatosas. Por ejemplo, la capacidad regenerativa del hueso y el cartilago se puede determinar utilizando un modelo de defecto en la bóveda craneal en ratas (patente de los EE. UU. 6 200 606). Existen modelos en animales establecidos para el tratamiento de los defectos mandibulares, hendiduras alveolares maxilares y de huecos de ostectomía en conejos, perros y monos (WO 99/39724). El depósito de hueso en los modelos de lesiones se puede monitorizar por análisis de rayos X y otras técnicas. El tejido óseo reconstruido se puede evaluar para determinar su función utilizando una prueba biomecánica estándar. Remítase a Minamide *et al.*, *Spine* 24:1863, 1999; Takahashi *et al.*, *J. Neurosurg.* 90 (4 supl.):224, 1999; Helm *et al.*, *J. Neurosurg.* 88:354, 1997.

Después de las pruebas adecuadas, se pueden utilizar las células diferenciadas para la reconstitución o regeneración tisular en un paciente humano u otro sujeto que necesite un tratamiento de este tipo. Se administran las células de manera que se permita que se injerten o migren al sitio tisular previsto y reconstituyan o regeneren el área funcionalmente deficiente. Las indicaciones médicas para un tratamiento de este tipo incluyen la regeneración de los defectos musculoesqueléticos, reparación de fracturas, rehabilitación de la médula espinal, instalación de prótesis y reparación de una lesión relacionada con la osteoporosis.

La administración de la composición dependerá del sitio musculoesquelético que se está reparando. Por ejemplo, la osteogénesis puede facilitarse de acuerdo con un procedimiento quirúrgico con un tejido remodelado o insertar una parte o un dispositivo protésico tal como un reemplazo de cadera. En otras circunstancias, no se requerirá cirugía invasiva y la composición se puede administrar por inyección o (para reparar la columna vertebral) utilizando un endoscopio que se pueda guiar.

Las células mesenquimatosas y los osteoblastos se pueden suministrar en forma de una composición farmacéutica, que comprenda un excipiente isotónico preparado en condiciones lo suficientemente estériles para la administración a seres humanos. Para consultar los principios generales de la formulación médica, se dirige al lector a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, de G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E.D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. La elección del excipiente celular y cualesquiera elementos que lo acompañan de la composición se adaptará según el dispositivo utilizado para la administración.

Si se desea, la preparación celular puede incluir adicionalmente, o se puede administrar conjuntamente con un factor bioactivo complementario tal como un glucocorticoide sintético como la dexametasona o proteína morfogénica ósea, tal como BMP-2 o BMP-4. Otros componentes que potencialmente lo pueden acompañar incluyen fuentes inorgánicas de calcio o fosfato adecuadas para ayudar a la regeneración ósea (WO 00/07639). Si se desea, la preparación celular se puede administrar en una matriz o material portador para proporcionar una mejor regeneración tisular. Por ejemplo, el material puede ser una cerámica granular o un biopolímero tal como gelatina, colágeno, osteonectina, fibrinógeno u osteocalcina. Las matrices porosas se pueden sintetizar de acuerdo con técnicas estándar (p. ej., Mikos *et al.*, *Biomaterials* 14:323, 1993; Mikos *et al.*, *Polymer* 35:1068, 1994; Cook *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 35:513, 1997).

La composición se podrá empaquetar opcionalmente en un envase adecuado con instrucciones escritas para un fin deseado, tal como la reconstitución de la función de las células mesenquimatosas para mejorar alguna anomalía musculoesquelética.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

Ejemplo de referencia 1: Propagación exenta de alimentadoras de células madre embrionarias

Las líneas establecidas de células madre embrionarias humanas (hES) indiferenciadas se mantuvieron en un entorno de cultivo esencialmente exento de células alimentadoras.

Los cultivos exentos de alimentadoras se mantuvieron utilizando medio acondicionado preparado utilizando fibroblastos embrionarios de ratón primarios aislados de acuerdo con procedimientos estándar (WO 01/51616). Se recolectaron los fibroblastos de matraces T150 lavando una vez con PBS exento de $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ e incubando en 1.5-2 mL de tripsina/EDTA (Gibco) durante ~5 min. Después de que los fibroblastos se separaran del matraz, se recogieron de nuevo en medio para mEF (DMEM + 10% FBS). Se irradiaron las células con 4000 rad, se contaron y sembraron con una densidad de ~55,000 células cm^{-2} en medio para mEF (525 000 células/pocillo de una placa de 6 pocillos).

Después de al menos 4 h, se intercambió el medio con medio para ES que contenía SR (80% de knockout DMEM (Gibco BRL, Rockville MD), 20% de suero de reemplazo knockout (Gibco), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), L-glutamina 1 mM (Gibco), β -mercaptoetanol 0.1 mM (Sigma, San Luis, MO), suplementado con 4 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF; Gibco). Se acondicionaron aproximadamente 0.3-0.4 mL de medio por cm^2 del área superficial de la placa. Antes de la adición a los cultivos de hES, se suplementó el medio acondicionado con 4 ng/mL de bFGF humano.

Las placas para cultivar las células hES se recubrieron con Matrigel® (Becton-Dickinson, Bedford MA) diluyendo la solución madre ~1:30 en KO DMEM frío, y se dispensaron 0.75-1.0 mL por 9.6 cm^2 de pocillo y se incubaron durante 4 h a temp. ambiente o durante toda la noche a 4 °C.

Se realizaron pases de los cultivos con hES mediante incubación en ~200 U/mL de colagenasa IV durante aproximadamente 5'-10 minutos a 37 °C. Se recolectaron las células retirando las colonias individuales con una Pipetman™ con un microscopio o raspando, seguido por una disociación suave en pequeñas agrupaciones en medio acondicionado y a continuación se sembraron en placas recubiertas con Matrigel®. Aproximadamente una semana después de la siembra los cultivos se volvieron confluentes y se pudo realizar un pase. Los cultivos que se mantuvieron en estas condiciones durante más de 180 días siguieron mostrando una morfología como la de las ES.

Se llevaron a cabo técnicas inmunocitoquímicas incubando los pocillos con muestra con un anticuerpo primario para SSEA-4 (1:20), Tra-1-60 (1:40) y Tra-1-81 (1:80), diluido en knockout DMEM a 37 °C durante 30 min. Se lavaron las células con knockout DMEM tibio y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 15 min y a continuación con PBS. Se incubaron las células con suero de cabra al 5% en PBS a temp. ambiente durante 30 min, seguido por un anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado con FITC (1: 125) (Sigma) durante 30 min. Se lavaron las células, se tiñeron con DAPI y se montaron.

Las células también se examinaron para determinar la expresión de la fosfatasa alcalina, un marcador para las células ES indiferenciadas. Esto se realizó cultivando las células en portaobjetos con cámaras, fijando con paraformaldehído al 4% durante 15 min y a continuación lavando con PBS. A continuación se incubaron las células con sustrato de fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 h. Se lavaron los portaobjetos durante 2-5 min en etanol al 100% antes del montaje.

La Figura 1 muestra la expresión de los marcadores en las células hES detectadas mediante histoquímica. Las colonias de hES también expresaron SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81 y fosfatasa alcalina, como se ve para las células con alimentadoras - pero no así las células diferenciadas entre las colonias.

Se sometió a ensayo la expresión de los marcadores de células hES indiferenciadas mediante amplificación por PCR con transcriptasa inversa. Para la cuantificación relativa radioactiva de los productos génicos individuales, se emplearon los cebadores patrones internos alternados de 18S QuantumRNA™ (Ambion, Austin TX, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Resumiendo, se determinó el intervalo lineal de la amplificación de un par de cebadores particular, a continuación se amplificó conjuntamente con la mezcla apropiada de cebadores:competímeros de 18S alternados para generar productos de PCR con intervalos lineales coincidentes. Antes de la adición de AmpliTaq™ (Roche) a las reacciones de PCR, se preincubó la enzima con el anticuerpo TaqStart™ (ProMega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se analizaron las reacciones de PCR radioactivas con geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 5%, se secaron y se expusieron a pantallas de fosfoimagen (Molecular Dynamics) durante 1 h. Se realizó un barrido de las pantallas con un Storm 860 de Molecular Dynamics y se cuantificaron las intensidades de las bandas utilizando un software ImageQuant™. Los resultados se expresan como la relación de la radioactividad incorporada a la banda de hTERT o de Oct-4, normalizado respecto a la radioactividad incorporada a la banda 18s. Las secuencias de los cebadores utilizados en este experimento se pueden consultar en la publicación PCT WO 01/51616.

El factor de transcripción Oct-4 se expresa normalmente en las células hES indiferenciadas y tras la diferenciación disminuye. Las células mantenidas en Matrigel® en medio acondicionado durante 21 días expresaron hTERT y Oct-4. Se midió la actividad telomerasa mediante un ensayo TRAP (Kim *et al.*, *Science* 266:2011, 1997; Weinrich *et al.*, *Nature Genetics* 17:498, 1997). Las células mantenidas en un entorno de cultivo exento de alimentadoras mostró una actividad telomerasa positiva después de más 40 días en cultivo.

La pluripotencia de las células indiferenciadas cultivadas sin alimentadoras se determinó formando cuerpos embrioides en un cultivo en suspensión durante 4 días y a continuación se cultivó en placas recubiertas con poliornitina durante 7 días. Las técnicas inmunocitoquímicas mostraron patrones de tinción coherentes con células de los linajes de neuronas y cardiomiocitos y las células presentaron una tinción positiva para α -fetoproteína, un marcador del linaje endodérmico. Las células indiferenciadas también se probaron para determinar su capacidad para formar teratomas mediante inyección intramuscular en ratones SCID. Los tumores resultantes se extirparon tras 78-84 días. Los tipos celulares de todas las tres capas germinales se identificaron mediante análisis histológicos.

Ejemplo de referencia 2: Establecimiento de una línea celular diferenciada

Se produjeron cuerpos embrioides de la siguiente manera. Se recolectaron cultivos en monocapa confluentes de células hES mediante la incubación en 1 mg/mL de colagenasa durante 5-20 min y se rasparon las células de la placa. A continuación las células se disociaron en agrupaciones y se colocaron en placas de cultivo de células no adherentes (Costar) en medio compuesto por un 80% de KO ("knockout") DMEM (Gibco) y un 20% de FBS no inactivado térmicamente (Hyclone), suplementado con un 1% de aminoácidos no esenciales, glutamina 1 mM, β -mercaptoetanol 0.1 mM. Las células se sembraron con una relación 1:1 o 1:2 en 2 mL de medio por pocillo (placa de 6 pocillos). Los EB (cuerpos embrioides) se alimentaron cada dos días añadiendo 2 mL de medio por pocillo. Cuando el volumen de medio superó los 4 mL/pocillo, se recogieron los EB y se resuspendieron en medio fresco. Después de 4-8 días en suspensión, los EB se colocaron en placas en un sustrato.

Se estableció una línea celular diferenciada recolectando las células obtenidas a partir de cuerpos embrioides y se permitió que se diferenciaran adicionalmente. Se recolectaron las células incubando en 2 mg/mL de colagenasa de tipo II en PBS durante 30 min a 37 °C. Las células se disociaron, se centrifugaron, se resuspendieron en medio de diferenciación y se colocaron en una placa de 6 pocillos. Las células en proliferación se sometieron a un pase en medio para hEF (90% de DMEM, 10% de FBS inactivado térmicamente, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y L-glutamina 2 mM) y se alimentaron cada 2-3 días. Después de dos pases, la población celular pareció ser homogénea, con características morfológicas de fibroblastos. La línea celular se designó HEF1.

Se transdujo una subpoblación para expresar la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT). Esto se logró infectando con un constructo retroviral pBABE *puro* hTERT, que contenía la secuencia codificante de hTERT controlada por MoLV LTR y el gen de resistencia a la puromicina controlado por el promotor temprano SV40. Se reemplazó el medio de crecimiento con una mezcla que contenía 5 mL de patrón retroviral (1×10^6 pfu/mL) y 4 $\mu\text{g/mL}$ de polybrene y se incubó a 37 °C. Después de 8 h, se añadieron 5 mL adicionales de la mezcla retrovirus/polybrene y las células se incubaron a 37 °C. Al día siguiente, la mezcla retrovirus/polybrene se retiró y se reemplazó con medio de crecimiento fresco. Al día siguiente se reemplazó el medio con medio de crecimiento suplementado con 0.5 microgramos/mL de puromicina. Se dividieron las células una vez a la semana con una relación de 1:4 durante 8 semanas en medio que contenía puromicina y se probaron para determinar su actividad telomerasa.

La Figura 2 (Cuadro A) muestra la morfología de la línea celular telomerizada HEF1. El cuadro B (debajo) muestra la actividad telomerasa, según se ha medido con el ensayo TRAP. Las células transducidas con el casete de expresión de hTERT mostraron una actividad telomerasa positiva 20 o 65 días después de la transducción. La línea celular sin transducir, o las células transducidas con el vector de control no mostraron actividad telomerasa. Tanto las células HEF1 transducidas con hTERT como las células transducidas con el vector de control, duplicaron su cantidad aproximadamente una vez cada 2 días, hasta el día 38, cuando las células de control cesaron de dividirse. Las células transfectadas con hTERT continuaron proliferando más allá de los 60 días (30 duplicaciones) con una velocidad de crecimiento constante.

El medio de crecimiento de las células ES se acondicionó como en el Ejemplo 8, utilizando células HEF1 irradiadas con 6000 rad, y se sembraron con una densidad de ~ 4.1 a 5.5×10^4 células cm^{-2} . Se probó el medio para determinar su capacidad de favorecer el crecimiento de la línea celular hES H9 cultivada en un sustrato Matrigel®. Las células hES se mantuvieron utilizando el medio acondicionado para HEF1 durante más de 4 pases, mostraron morfología de células ES indiferenciadas y mantuvieron la expresión de hTERT y Oct-4.

Ejemplo de referencia 3: Diferenciación adicional en células similares a osteoblastos

Las células ES humanas (línea celular H1, pase 30) se mantuvieron en condiciones exentas de alimentadoras, como se ha descrito anteriormente. Para su uso en este experimento, las células hES se sembraron con una densidad de $\sim 1 \times 10^5$ cm^{-2} en Matrigel® en medio acondicionado para mEF. Las células HEF1 telomerizadas se colocaron en placas con una densidad de 3.1×10^3 cm^{-2} en DMEM con un 10% de FBS, un 1% de aminoácidos no esenciales y L-glutamina 2 mM. Las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) normales se obtuvieron de BioWhittaker Inc., MD (una filial de Cambrex Co.). Se mantuvieron en medio de crecimiento para MSC (BioWhittaker Part n.º PT-3001) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La línea celular de fibroblastos BJ5ta (Bodnar *et al.*, *Science* 279:349, 1998) se mantuvo en un medio estándar constituido por un 10% de FBS en 1:3 M199/DMEM.

Dos días después del último pase, cada medio de cultivo se reemplazó por medio de inducción de osteoblastos (OIM) para inducir la diferenciación. La base del OIM fue el medio de crecimiento para MSC (ClonTech n.º de cat. PT-3238) (patente de los EE. UU. 5 486 359) suplementado con dexametasona 0.1 μM , ácido 2-fosfato ascórbico 5 μM , β -glicerofosfato 10 mM y 100 ng/mL de BMP-4. Las células se alimentaron con OIM fresco cada 2-3 días.

Después de 11 días en OIM, todas las células mostraron cambios en la morfología celular. Las células HEF1, hMSC y células BJ cambiaron de una forma en husillo a una forma cuboidal y algunas células se volvieron planas. Las células hES mostraron una morfología heterogénea que parecía ser una población diferenciada mixta.

Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 min, se lavaron con PBS y se analizaron para determinar los marcadores de osteoblastos. Se detectó la fosfatasa alcalina (AP) con sustrato Vector (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). La expresión de AP estuvo claramente ubicada en agrupaciones de células, células H1 diferenciadas así como también células HEF1, BJ y hMSC.

Las proteínas matriciales producidas por los osteoblastos, colágeno-1 y osteocalcina se detectaron mediante inmunotinción. Se permeabilizaron los cultivos mediante tratamiento con EtOH al 100% durante 2 min. Después de los lavados en PBS, se incubaron los cultivos con un 5% de suero de cabra normal en PBS durante 2 h y a continuación con anticuerpo de conejo primario contra el colágeno-1 (1:10, Monosan n.º de cat. P5041) u osteocalcina (1:50, Biomedical Technologies Inc. n.º de cat. 13T593). La tinción se reveló con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de conejo producido en cabra marcado con FITC (1:100, Southern Biotechnology Associates inc. n.º de cat. 4050-02).

La Figura 3 muestra los resultados. Los cuadros A y B muestran los resultados inmunocitoquímicos de los marcadores osteocalcina y colágeno-1. El cuadro C muestra la tinción de la actividad fosfatasa alcalina. Estos rasgos son característicos de las células del linaje de osteoblastos.

Estos datos son coherentes con la hipótesis de que tanto las células hES como las células HEF1 tienen la capacidad de generar osteoblastos cuando se someten a un protocolo de diferenciación apropiado *in vitro*.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo para obtener osteoprogenitores y/u osteoblastos a partir de células madre embrionarias humanas (hES) o su progenie, que comprende BMP4, dexametasona y ácido ascórbico o uno de sus análogos.
2. El medio de cultivo de la reivindicación 1, que comprende además beta-glicerofosfato.
- 5 3. Un entorno de crecimiento que comprende un medio de cultivo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y una estructura de soporte.

Figura 1

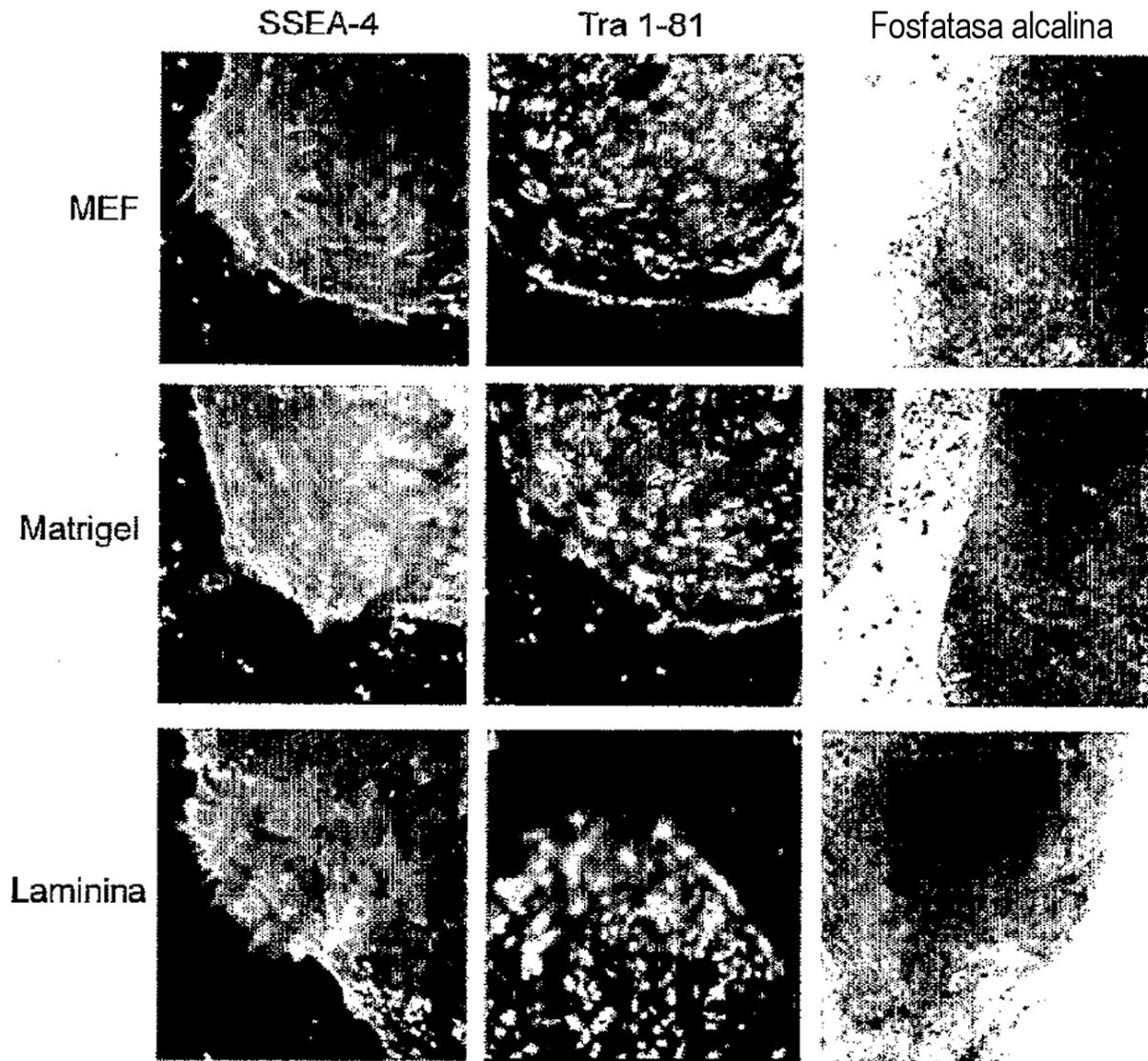
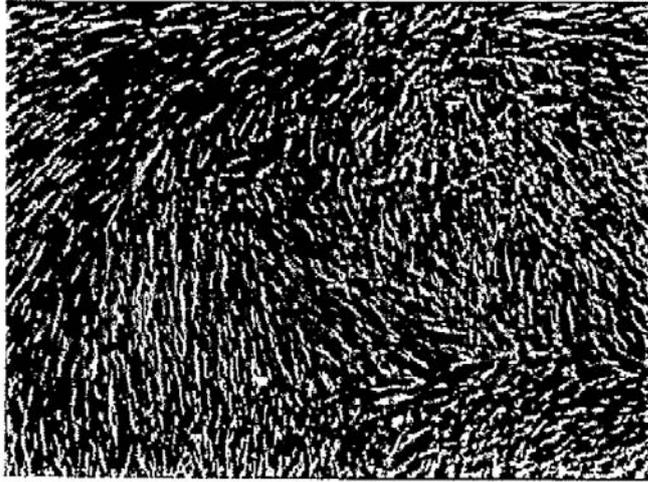


Figura 2

A



B

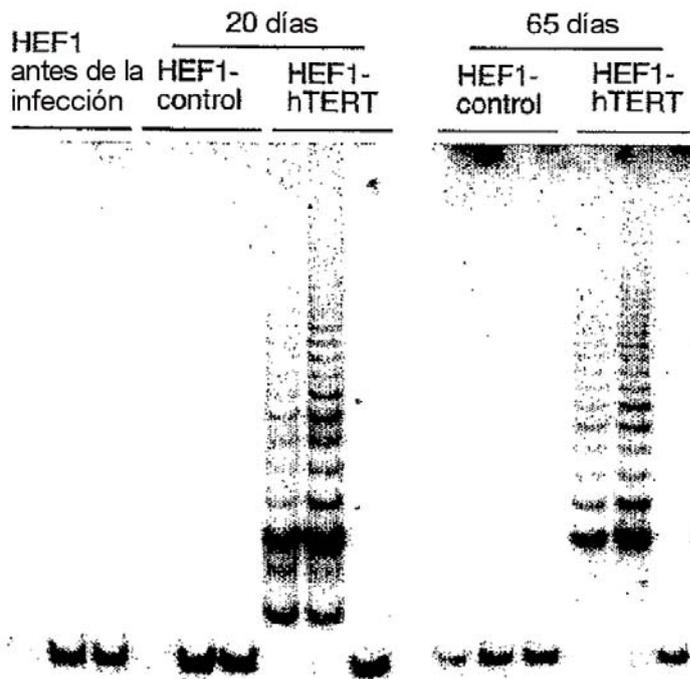


Figura 3

