

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 355**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2003 E 03813286 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 1572984**

54 Título: **Sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes para células madre embrionarias humanas**

30 Prioridad:

16.12.2002 US 433619 P

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION, LTD. (100.0%)
SENATE HOUSE, TECHNION CITY
HAIFA 32000, IL**

72 Inventor/es:

**AMIT, MICHAL y
ITSKOVITZ-ELDOR, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 571 355 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

Sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes para células madre embrionarias humanas

5 La presente invención se refiere a un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes de acuerdo con la reivindicación 1.

10 Las células madre embrionarias (CME), que son totipotentes, tienen el potencial de desarrollarse en cualquier tipo de célula y generar cualquier tipo de tejido, órgano o parte del cuerpo, incluyendo un organismo completo. Como tal, se espera que la capacidad de proporcionar a demanda CME humanas clonales normales y manipular su diferenciación, proporcione una poderosa herramienta que pueda impulsar avances radicales en los campos de la biomedicina, industrial y científico. Las posibles aplicaciones de las CME son de largo alcance e incluyen el descubrimiento de fármacos y ensayo con estos, la generación de células, tejidos y órganos para su uso en trasplante, la producción de biomoléculas, el ensayo de toxicidad y/o teratogenicidad de compuestos y facilitar el estudio de procesos evolutivos y otros procesos biológicos. Por ejemplo, enfermedades que actualmente se espera que puedan tratarse con trasplante terapéutico de CME o células procedentes de CME incluyen la enfermedad de Parkinson, infarto cardíaco, diabetes mellitus de aparición juvenil y leucemia (Gearhart J. Ciencia 1998, 282: 1061; Rossant y Nagy, Nature Biotech 1999, 17:2 3.).

20 Sin embargo, hay obstáculos significativos para el aprovechamiento práctico de las CME humanas.

Para mantener las CME humanas en un estado indiferenciado, los cultivos de CM deben complementarse con factores que mantengan la proliferación celular, inhiban la diferenciación de CM y conserven la pluripotencia.

25 Además, para terapias de remplazo celular y de regeneración tisular, las CME humanas deben cultivarse en un medio completo sin contaminantes de origen animal y en presencia de condiciones de cultivo bien definidas que permitan una reproducción completa de cultivos de CM.

30 Actualmente los métodos de cultivo de células ME practicados se basan principalmente en el uso de capas de células alimentadoras que segregan factores necesarios para la proliferación de células madre, aunque al mismo tiempo, inhiben su diferenciación. En el cultivo de células ME también se han usado sistemas sin células alimentadoras, utilizando dichos sistemas matrices complementados con suero, citocinas y factores de crecimiento como un sustituto de la capa de células alimentadoras.

35 *Cultivos basados en capas alimentadoras*

Capas alimentadoras de ratón - El método más habitual para el cultivo de células ME se basa en fibroblastos embrionarios de ratón (FER) como una capa de células nutritivas complementada con medio de cultivo tisular que contiene suero o factor inhibidor de leucemia (LIF, *Leukemia Inhibitor Factor*) que mantiene la proliferación y la pluripotencia de las células ME [Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282: 1145-7; Reubinoff BE, Pera MF, Fong C, Trounson A, Bongso A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat. Biotechnol. 18: 399-404]. Las células de FER proceden de embriones de ratón de 12-13 días en medio complementado con suero bovino fetal. En estas condiciones las células ME de ratón pueden mantenerse en cultivo como células madre pluripotentes, conservando sus características fenotípicas y funcionales. Sin embargo, a diferencia de las células ME de ratón, la presencia de LIF exógenamente añadido no impide la diferenciación de células ME humanas (Thomson *et al.*, 1998, Science 282: 1145-7; Reubinoff *et al.*, 2000, Nat. Biotechnol. 18: 399-404). Además el uso de células alimentadoras aumenta sustancialmente el coste de producción, y hace que la producción a mayor escala del cultivo de células ME humanas sea poco práctico. Adicionalmente, las células alimentadoras están metabólicamente inactivadas para impedir que crezcan más que las células madre, por tanto en cada división de cultivo de CME humanas es necesario tener células alimentadoras recientes. Hasta ahora, la separación de componentes de células alimentadoras de células embrionarias preparadas en cultivo a granel no puede conseguirse de manera eficaz, los cultivos de CME preparados con capas de células alimentadoras no son adecuados para terapia humana.

55 Las células ME también pueden cultivarse en fibroblastos embrionarios de ratón, FER, en condiciones asépticas usando sustitutivo del suero complementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) [Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev. Biol. 227: 271-8]. En estas condiciones la eficiencia de la clonación de las células ME es 4 veces mayor que con suero bovino fetal. Además, después de 6 meses de cultivo en sustitutivo del suero las células ME siguen conservando su pluripotencia, como se indica por su capacidad para formar teratomas que contienen las tres capas germinales embrionarias. Aunque este sistema utiliza unas condiciones de cultivo mejor definidas, la presencia de células de ratón en el cultivo expone al cultivo humano a patógenos lo que limita su uso en terapia basada en células.

Fibroblastos embrionarios humanos o células epiteliales adultas de trompas de Falopio como capas de células alimentadoras – Las células ME humanas pueden crecer y mantenerse usando fibroblastos embrionarios humanos o células epiteliales adultas de trompas de Falopio. Cuando crecen en estas células alimentadoras humanas, las células ME humanas exhiben cariotipos normales, presentan actividad fosfatasa alcalina, expresan Oct-4 y otros marcadores de superficie de células embrionarias, incluyendo SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y GCTM-2, forman teratomas *in vivo*, y conservan todas las características morfológicas clave [Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 20: 933-6]. Sin embargo, la desventaja principal del uso de fibroblastos embrionarios humanos o células epiteliales adultas de trompas de Falopio como células alimentadoras es que estas dos líneas celulares tienen una capacidad de pases limitada de solo 8 a 10 veces, por lo cual se limita la capacidad de un periodo de crecimiento de CME prolongado. Durante un periodo de cultivo prolongado, las células ME deben crecer en células alimentadoras humanas originadas de diversos sujetos lo que produce una variabilidad aumentada en las condiciones de cultivo.

Capas alimentadoras de prepucio – Las células ME humanas pueden cultivarse en capas alimentadoras de prepucio humano, como se desvela en la Patente de Estados Unidos 2004/00675580. Las capas de células alimentadoras procedentes de prepucio constan de un medio completo sin componentes de origen animal adecuado para el cultivo de células ME humanas. Además, desde su obtención, las células de prepucio pueden mantenerse en cultivo durante tanto tiempo como 42 pases, ofreciendo a las células ME un medio relativamente constante. En estas condiciones se descubrió que las células ME humanas no eran funcionalmente distintas de células que crecían con protocolos alternativos (por ejemplo, FER). Después de la diferenciación, las células ME expresaron genes asociados con las tres capas germinales embrionarias, *in vitro*, y formaron teratomas *in vivo*, constituidos por tejido originado de las tres capas germinales. Además, a diferencia de las células epiteliales humanas de trompas de Falopio o fibroblastos embrionarios humanos, las células ME humanas cultivadas en capas alimentadoras de prepucio se mantuvieron en cultivo en un estado pluripotente e indiferenciado durante al menos 87 pases. Sin embargo, aunque las células de prepucio pueden mantenerse en cultivo durante largos periodos (es decir, 42 pases), el sistema de cultivo en células de prepucio no está bien definido debido a diferencias entre lotes distintos. Además, los sistemas de cultivos basados en capas alimentadoras humanas todavía requeriría el crecimiento simultáneo de tanto capas alimentadoras como de células MEh. Por lo tanto, se han desarrollado sistemas de cultivo sin células alimentadoras.

Cultivos sin células alimentadoras

Las células madre pueden crecer en una superficie sólida tal como una matriz extracelular (por ejemplo, Matrigel^{RTM} o laminina) en presencia de un medio de cultivo. A diferencia de los cultivos basados en células alimentadoras que requieren el crecimiento simultáneo de células alimentadoras y de células madre y que pueden producir poblaciones celulares mixtas, las células madre que crecen en sistemas sin células alimentadoras se separan fácilmente de la superficie. El medio de cultivo utilizado para cultivar las células madre contiene factores que inhiben de un modo eficaz la diferenciación y promueven su crecimiento, tal como medio acondicionado con fibroblastos embrionarios de ratón y bFGF. Sin embargo, los sistemas de cultivo sin células alimentadoras usados normalmente utilizan una matriz basada en componentes de origen animal (por ejemplo, Matrigel^{RTM}) complementada con suero bovino o de ratón, o con medio acondicionado con fibroblastos embrionarios de ratón, FER [Xu C, *et al.* (2001). Feeder cells-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 19: 971-4] que presentan el riesgo de transferencia cruzada con patógenos animales con las células ME humanas, comprometiendo de este modo las aplicaciones clínicas futuras.

Como se desvela adicionalmente en la Patente de Estados Unidos 2004/00675580, las células madre pueden cultivarse en una superficie de matriz complementada con medio acondicionado procedente de prepucio. Sin embargo, aunque este medio presenta un sistema exento de componentes de origen animal, aún no está completamente definido en cuanto a la composición del cultivo.

Recientes intentos para cultivar células madre embrionarias humanas en una composición de cultivo más definida utilizaron superficies de Matrigel o de laminina y una mezcla de factores de crecimiento. Sin embargo, como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20030017589, en estas condiciones solo el 50-70 % de las células exhibió morfología celular indiferenciada. Además, las células madre exhibieron adicionalmente un tiempo de generación relativamente corto de 19 horas, lo que sugiere que las células madre se vuelven tumorigénicas (véase Amit *et al*, 2000, Dev. Biol. 227: 271-8).

El documento WO 0151616 proporciona un sistema mejorado para el cultivo de células madre pluripotentes (MPp) humanas en ausencia de células alimentadoras. El papel de las células alimentadoras puede sustituirse manteniendo el cultivo en una matriz extracelular, y cultivando las células en un medio acondicionado. Se proporcionan líneas celulares permanentes que pueden producir medio acondicionado a una escala comercial. También se han descubierto métodos para alterar genéticamente células MPp introduciendo las células con un vector viral o complejo de ADN/lípido. El sistema descrito en esta divulgación permite la proliferación a granel de células MPp para su uso en el estudio de la biología de la diferenciación de células MPp y la producción de productos importantes para su uso en terapia humana.

El documento WO03029443 se refiere al campo del cultivo de células madre, en particular el cultivo de células madre indiferenciadas y a métodos para la obtención y propagación de dichas células. Más particularmente, la invención se refiere a la obtención y propagación de células MEH indiferenciadas en capas alimentadoras humanas y/o en ausencia de una capa alimentadora. Las capas alimentadoras humanas pueden seleccionarse del grupo que incluye músculo fetal humano (MFH), piel fetal humana (PFH), fibroblastos humanos de trompas Falopio de adulto (FHTPA) y células de piel humana de adulto. Estas pueden cultivarse en presencia de un medio adecuado seleccionado del grupo que incluye medio de Células Madre Embrionarias (CME) Humanas, Knockout (KO), o Alimentador Humano (HF, *Human Feeder*) complementado con o sin suero humano.

5
10 XU C *ET AL*: "Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells". NATURE BIOTECHNOLOGY OCT 2001, vol. 19, no. 10, octubre 2001 (2001-10), páginas 971 - 974.

15 GOLDSBOROUGH *ET AL*: 'Serum-free culture of murine embryonic stem cells Focus' vol. 20, no. 1, 1998, páginas 9 - 12.

AMIT *ET AL*: 'Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells' BIOL. OF REPROD. vol. 70, 2004, páginas 837 - 845.

20 AMIT *ET AL*: 'Human feeder layers for human embryonic stem cells' BIOL. OF REPROD. vol. 68, 2003, páginas 2150 - 2156.

PEI *ET AL*: 'Serum-free culture of rhesus monkey embryonic stem cells' ARCH. ANDROL. vol. 49, 2003, páginas 331-342.

25 MURDOCH *ET AL*: 'Human embryonic-derived hematopoietic repopulating cells require distinct factors to sustain in vivo repopulating function' EXP. HEMATOL. vol. 30, 2002, páginas 598 - 605.

AMIT *ET AL*: 'Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture' DEV. BIOL. vol. 227, 2000, páginas 271 - 278.

30 ROBERTSON D: "NIH sacrifices commercial rights in WiCell deal.", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 19, no. 11, noviembre 2001 (2001-11), página 1001.

35 ZHANG X *ET AL*: "Feeder layer- and serum-free culture of rhesus monkey embryonic stem cells", REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE, vol. 13, no. 3, 1 enero 2006 (2006-01-01), páginas 412-420.

Hay por tanto una necesidad muy reconocida de, y sería muy ventajoso tener, un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes, capaz de mantener las células ME humanas en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado desprovisto de las limitaciones anteriores.

40 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes que comprende una matriz y un medio de cultivo tisular que comprende sustitutivo del suero, TGFβ1 y bFGF, pudiendo el sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes mantener células madre embrionarias humanas, cultivadas en su interior, en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado.

Preferentemente, dicha matriz es fibronectina de origen humano.

50 Preferentemente dicha fibronectina de origen humano se selecciona del grupo que consiste en fibronectina de plasma humano, fibronectina de plasma humano recombinante, fibronectina celular humana, fibronectina celular humana recombinante y fibronectina sintética.

Preferentemente dicho sustitutivo del suero se proporciona a una concentración de al menos 10 %.

55 Preferentemente dicho sustitutivo del suero se proporciona a una concentración de 15 %.

Preferentemente dicho TGFβ1 se proporciona a una concentración de al menos 0,06 ng/ml.

60 Preferentemente dicho TLFβ1 se proporciona a una concentración de 0,12 ng/ml.

Preferentemente dicho bFGF se proporciona a una concentración de al menos 2 ng/ml.

Preferentemente dicho bFGF se proporciona a una concentración de 4 ng/ml.

65 Preferentemente dicho medio de cultivo comprende adicionalmente LIF.

Preferentemente dicho LIF se proporciona a una concentración de al menos 500 u/ml.

Preferentemente dicho LIF se proporciona a una concentración de 1.000 u/ml.

5 Preferentemente dicho TGFβ1 se proporciona a una concentración de 0,06 a 0,24 ng/ml

Preferentemente dicho bFGF se proporciona a una concentración de 2-8 ng/ml.

10 Preferentemente dicho TLFβ1 se proporciona a una concentración de 0,06-0,24 ng/ml y dicho bFGF se proporciona a una concentración de 2-8 ng/ml

Preferentemente dicho sistema de cultivo tiene la capacidad de mantener dichas células madre embrionarias humanas cultivadas en su interior en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 38 pases.

15 Preferentemente dicho sistema de cultivo tiene la capacidad de mantener dichas células madre embrionarias humanas cultivadas en su interior en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 5 pases.

20 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, se controlará la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

25 Breve descripción de las figuras

En el presente documento la invención se describe solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, cabe destacar que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y solo con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan con objeto de proporcionar lo que se piensa que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la presente invención. En este sentido, no se hacen intentos de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo necesario para un entendimiento fundamental de la presente invención, la descripción tomada con los dibujos ponen de manifiesto a los expertos en la técnica cómo pueden materializarse en la práctica las diferentes formas de la invención.

35 En los dibujos: dibujos de referencia:

40 Las FIGS. 1a-d son micrografías que ilustran el crecimiento de colonias de células ME y de células ME sencillas en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema sin células alimentadoras. Se muestran imágenes de campo claro de las diversas líneas de células ME que crecen en fibronectina en presencia de sustitutivo del suero y diversas combinaciones de factores de crecimiento.

Figura 1a - crecimiento de la línea I-6 de células ME en presencia de TLFβ1, LIF y bFGF (TLF) durante 31 pases (el tamaño de la barra representa 100 μM);

45 Figura 1b - crecimiento de la línea I-3 de células ME en TLF durante 21 pases (el tamaño de barra representa 50 μM);

Figura 1c - crecimiento de la línea I-6 de células ME en TLF durante 31 pases (el tamaño de barra representa 50 μM);

50 Figura 1d - crecimiento de la línea de células ME I-3 en TGFβ1 y bFGF (TF) durante 20 pases (el tamaño de la barra representa 38 μm). Obsérvense los espacios entre las células (Figuras 1a-c) y la alta proporción del núcleo con respecto al citoplasma típica de células ME humanas (Figura 1d).

Las FIGS. 1e-h son micrografías inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de marcadores de superficie típicos de células indiferenciadas en las líneas I-3 y I-6 de células ME humanas que crecen en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema sin células alimentadoras. Se muestran imágenes fluorescentes de células ME humanas (línea I-3) que crecen en presencia de TF durante 17 pases y marcadas con anticuerpos anti-SSEA4 (Figura 1e, el tamaño de la barra representa 50 μM), células ME línea I-3 que crecen en presencia de TLF durante 38 pases y marcadas con anticuerpos anti-SSEA4 (Figura 1f, el tamaño de la barra representa 6 μM), células ME línea I-6 que crecen en presencia de TLF durante 30 pases y marcadas con anticuerpos anti-TRA-60 (Figura 1g, el tamaño de la barra representa 6 μM), células ME línea I-3 que crecen en presencia de TF durante 21 pases y marcadas con anticuerpos anti-TRA-81 (Figura 1h, el tamaño de la barra representa 6 μM). Se capturaron imágenes fluorescentes usando un microscopio fluorescente invertido (Figura 1e) o un microscopio confocal (Figuras 1f-h).

65 Las FIGS. 2a-c ilustran la diferenciación *in vitro* de células MEh que crecen en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema sin células alimentadoras. Se muestran secciones histológicas de cuerpos embrionarios CE procedentes de células que crecen en el sistema de cultivo sin células alimentadoras. Figura 2a – un CE simple de 24 horas de vida procedente de la línea celular I-3 después de crecer durante 28 pases en TF

(el tamaño de barra representa 100 μ M); Figura 2b - un CE de 14 días de vida procedente de la línea celular I-3 que crece durante 28 pases en TF (el tamaño de la barra representa 50 μ M); Figura 2c, un CE de 14 días de vida procedente de la línea celular I-3 que crece durante 30 pases en TLF (el tamaño de la barra representa 25 μ M).

Obsérvese el epitelio protector externo (Figura 2b, flecha) del CE y la estructura de tipo bola que consta de endotelio columnar rodeado de tejido mesenquimático (Figura 2c).

Las FIGURAS 2d-f ilustran la expresión de marcadores representativos de mesodermo y ectodermo en células procedentes de CE de 14 días de vida formados a partir de células ME que crecen en diversos medios en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema sin células alimentadoras de la presente invención. Las células de CE procedentes de diversas líneas de células ME se tiñeron con inmunotinción fluorescente con diversas sondas de anticuerpo. Figura 2d - la línea celular I-6 creció en TLF durante 22 pases y se tiñó con inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra tubulina específica de neuronas (el tamaño de la barra representa 6 μ m). Figura 2e - la línea celular I-3 creció en TLF durante 30 pases y se tiñó con inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra la actina de músculo liso (el tamaño de la barra representa 6 μ m). Figura 2f - la línea celular I-3 creció en TF durante 28 pases y se tiñó con inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra CD-31 (el tamaño de la barra representa 6 μ m).

La FIG. 3 ilustra la determinación con RT-PCR de la fase de diferenciación de las células ME, líneas I-3 o I-6, que crecieron en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema sin células alimentadoras y de los cuerpos embrionarios (CE) procedentes de las mismas. La reacción RT-PCR se realizó en muestras de ARN extraídas de células ME I-3, I-6 o de CE procedentes de las mismas. Carril 1 - células ME I-3 que crecen en TF durante 19 pases; carril 2 - células ME I-3 que crecen en TLF durante 20 pases; carril 3 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TLF durante 23 pases; carril 4 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TF durante 28 pases; carril 5 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TLF durante 30 pases; carril 6 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TLF durante 29 pases; carril 7 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-6 que crecen en TLF durante 22 pases. La especificidad de la reacción se verificó en ausencia de ARN (Figura 3, carril 8). Obsérvese que las muestras de cuerpos embrionarios, CE, de los carriles 3-6 procedían de cuatro lotes diferentes de células ME línea I-3.

Las FIGURAS 4a-c ilustran secciones histológicas de teratomas procedentes de las líneas I-3 y I-6 de células ME que crecen durante 26 y 19 pases, respectivamente, en TLF en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema sin células alimentadoras. Las secciones de teratoma incluyen nervios mielinizados (Figura 4a), detalles de cartílago hialino (Figura 4b) y epitelio secretor rico en células calciformes (Figura 4c). El tamaño de las barras representa 25 μ M.

Las FIGS. 5a-c son micrografías morfológicas que ilustran colonias de células ME que crecen en una matriz de fibronectina de origen humano en un sistema sin células alimentadoras. Se muestran imágenes de campo claro de la línea I-3 de células ME que crece en fibronectina celular humana durante 22 pases en presencia de sustitutivo del suero y de la combinación de factores de crecimiento TF.

Las FIGS. 5d-f son micrografías inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de marcadores de superficie típicos de células indiferenciadas en líneas de células ME humanas I-3 y H-9 que crecen en una matriz de fibronectina de origen humano en un sistema sin células alimentadoras. Se muestran imágenes fluorescentes de la línea I-3 humana de células ME cultivada en fibronectina celular humana en presencia de TF durante 16 pases y marcada con anticuerpos anti-TRA-1-60 (Figura 5d) o anti-TRA-1-81 (Figura 5e) y de la línea H-9 humana de células ME cultivada en fibronectina de plasma humano en presencia de TLF durante 10 pases y marcada con anti-SSEA4 (Figura 5f).

Las FIGS. 6a-c ilustran la diferenciación *in vitro* de células MEh que crecen en una matriz de fibronectina humana en condiciones sin células alimentadoras ni componentes exógenos. Se muestran imágenes de CE de 14 días de vida procedentes de células ME de la línea I-3 que crecen en diversas condiciones de cultivo. Figura 6a - matriz de fibronectina celular humana en presencia de los factores de crecimiento TLF durante 17 pases; Figura 6b - matriz de fibronectina celular humana en presencia de los factores de crecimiento TF durante 17 pases; Figura 6c - matriz de fibronectina de plasma humano en presencia de los factores de crecimiento TLF durante 16 pases.

La FIGURA 7 ilustra la determinación por RT-PCR de la fase de diferenciación de las células ME de la línea I-3 que crecen en una matriz de fibronectina de origen humano en un sistema sin células alimentadoras y de los cuerpos embrionarios (CE) procedentes de las mismas. La reacción RT-PCR se realizó en muestras de ARN extraído de células ME I-3 o de CE procedentes de las mismas. Carril 1 - células ME I-3 que crecen en TF durante 22 pases; carril 2 - células ME I-3 que crecen en TLF durante 18 pases; carril 3 - células ME I-3 que crecen en TLF durante 17 pases; carril 4 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TF durante 17 pases; carril 5 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TLF durante 17 pases; carril 6 - CE de 14 días de vida procedentes de células ME I-3 que crecen en TLF durante 16 pases; La especificidad de la reacción se verificó en ausencia de ARN (Figura 7, carril 7).

Las FIGS. 8a-c ilustran tasas de crecimiento de las líneas I-3 (Figura 8a), I-6 (Figura 8b) y H-9 (Figura 8c) de células MEh, en diversas condiciones de cultivo. Se muestran las tasas de crecimiento de las líneas I-3, I-6 y H-9 de células MEh cuando se cultivan en las matrices de fibronectina de origen bovino en presencia de TLF (Figuras 8a, b y c, respectivamente, curvas rosas) o de las combinaciones de factores de crecimiento TF (Figuras 8a, banda C, respectivamente, curvas negras), sobre la matriz de fibronectina de origen humano en presencia de la combinación de factores de crecimiento TF (Figuras 8a, b y c, respectivamente, curvas azul claro) o en las células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón, FER (Figuras 8a, b y c respectivamente, curvas azul oscuro).

La FIG. 8d es un gráfico de barras que ilustra la capacidad de diversas condiciones de cultivo para mantener el crecimiento de células MEh indiferenciadas. Se cultivaron células ME humanas en las siguientes condiciones de cultivo: fibroblastos embrionarios de ratón (FER), fibronectina de origen bovino en presencia de TGF β , LIF y bFGF (TLF BF), fibronectina de origen humano en presencia de TGF β , LIF y bFGF (TLF HF), fibronectina de origen bovino en presencia de TGF β y bFGF (TF BF), fibronectina de origen humano en presencia de TGF β y bFGF (TF HF), fibronectina de origen bovino en presencia de LIF y TGF β (LT), fibronectina de origen bovino en presencia de LIF y bFGF (LF), fibronectina de origen bovino en presencia solo de TGF β (T) y fibronectina de origen bovino en presencia solo de bFGF (F). Los porcentajes de células indiferenciadas se determinaron en incrementos de dos días.

Las FIGS. 9a-f ilustran células ME humanas y colonias de células ME humanas que crecen en sistemas sin células alimentadoras en diversas condiciones de cultivo. Se muestran imágenes de campo claro de las diversas líneas de células ME que crecen en sistemas sin células alimentadoras. Figura 9a - crecimiento de la línea celular I-6 EN matriz de prepucio en presencia de TLF durante 5 pases (el tamaño de la barra representa 75 μ M); Figura 9b - crecimiento de la línea celular I-3.2 en Matrigel^{RTM} durante 12 pases en presencia de medio acondicionado con FER (el tamaño de la barra representa 50 μ M); Figura 9c - crecimiento de la línea celular I-6 en matriz con FER en presencia de TLF durante varios pases (el tamaño de la barra representa 75 μ M); Figura 9d - crecimiento de la línea celular I-3 en fibronectina durante 21 pases en presencia de TF (el tamaño de la barra representa 50 μ M); Figura 9e - crecimiento de la línea celular I-6 en Matrigel^{RTM} durante 12 pases en presencia de TLF (el tamaño de la barra representa 75 μ M); Figura 9f - crecimiento de la línea celular I-3 en fibronectina en presencia de TF durante 20 pases (el tamaño de la barra representa 38 μ M).

Las FIGS. 10a-f ilustran secciones histológicas de teratomas en ratones SCID color beige procedentes de las líneas I-6 y I-3 de CM que crecen en fibronectina (Figuras 10a y b), en matriz con FER (Figuras 10c, e, y f) o en Matrigel^{RTM} (Figura 10d). Las secciones de teratoma, teñidas con hematoxilina y eosina, incluyen epitelio de tipo intestinal que incluye células calciformes (Figura 10a), tejido de cartílago maduro (Figuras 10b y c), miotubos embrionarios (Figura 10d), epitelio estratificado (Figura 10e) y nervios mielinizados (Figura 10f). El tamaño de las representa 40 μ M.

Descripción de las realizaciones preferidas

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no está limitada a su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los Ejemplos. La invención tiene otras realizaciones o puede llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras. También debe entenderse que la fraseología y terminología que se emplea en el presente documento es con fines descriptivos y no deben contemplarse como limitante.

Para conservar células ME humanas en un estado indiferenciado, los cultivos de CM deben proporcionar a las células condiciones que mantengan la proliferación celular, inhibir la diferenciación de las células ME y preservar la pluripotencia. Dichas condiciones de cultivo se consiguen generalmente utilizando capas de células alimentadoras que segregan factores necesarios para la proliferación de células madre, aunque al mismo tiempo, inhiben su diferenciación.

Para atravesar las limitaciones asociadas con el uso de una capa de células alimentadoras, tal como sistemas de cultivo indefinido y contaminación de las células alimentadoras, se han desarrollado sistemas de cultivo más definidos sin células alimentadoras. Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras emplean una matriz, a la que se adhieren las células ME, y un medio de cultivo, que proporciona a las células ME citocinas y factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular, aunque al mismo tiempo inhiben la diferenciación celular.

Las matrices normalmente utilizadas incluyen la preparación de una membrana basal extraída de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (por ejemplo, Matrigel^{RTM}), o de fibronectina/laminina de origen bovino. Dichas matrices se complementan normalmente con un medio acondicionado con fibroblastos embrionarios de ratón (FER) o con un medio sintético complementado con suero bovino y factores de crecimiento.

Intentos anteriores para cultivar células ME humanas usando sistemas de cultivo sin células alimentadoras emplearon matrices de Matrigel^{RTM} o de laminina complementadas con medio de cultivo reciente y una mezcla de factores de crecimiento (Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20030017589). Sin embargo, estas matrices sin células alimentadoras procedían de tejidos de origen animal y por lo tanto podían exponer a las células ME humanas a patógenos animales. Además, estos experimentos utilizaron una combinación de seis factores de crecimiento diferentes a concentraciones extremadamente altas que podían dañar de manera irreversible a las células cultivadas. De hecho, como se demuestra en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20030017589, el tiempo de generación de las células ME fue de aproximadamente 19 horas, lo que sugiere un fenotipo tumorigénico.

Además, en estas condiciones, únicamente el 50-70 % de las células mostraron una morfología celular indiferenciada después de 14 pases en sistemas de cultivo sin células alimentadoras.

Aunque dichas condiciones de cultivo podrían ser idóneas para propósitos de investigación, las células ME humanas han de cultivarse en condiciones de cultivo bien definidas que estén esencialmente exentas de componentes de origen animal cuando se utilizan para terapia de reemplazo celular o regeneración de tejidos en seres humanos.

Aunque limitando a la práctica la presente invención, los autores de la misma han contemplado condiciones de cultivo sin células alimentadoras que carecen de xenocontaminantes y que incluso pueden de mantener células madre humanas en cultivo durante al menos 38 pases. Como se ilustra más adelante en la sección de ejemplos, las líneas de células madre cultivadas en dichas condiciones mantienen todas las características de las células ME, incluyendo la pluripotencia, la inmortalidad, la capacidad de proliferación indiferenciada y el cariotipo normal. Por tanto, el sistema de cultivo sin células alimentadoras de la presente invención, proporciona, por primera vez, un medio de cultivo completo sin componentes de origen animal, que puede mantener células ME humanas durante al menos 38 pases en un estado proliferativo preservando al mismo tiempo la pluripotencia de las células ME. Además, más del 85 % de las células ME cultivadas en dichas condiciones mostraron una morfología celular indiferenciada con un tiempo de generación de 30-35 horas.

Como se usa en el presente documento, la frase "línea de células madre" se refiere a células con capacidad de diferenciarse en otros tipos de células que tienen una función particular, especializada (es decir, células "completamente diferenciadas") o células con capacidad de mantenerse en un estado indiferenciado, en lo sucesivo en el presente documento "células madre pluripotentes".

El cultivo se efectúa sembrando en placas las células madre en una matriz a una densidad celular que promueva la supervivencia y proliferación celular pero limite la diferenciación. Típicamente, se usa una densidad de siembra en placa de entre aproximadamente 15.000 células/cm² y aproximadamente 200.000 células/cm².

Se apreciará que, aunque normalmente se siembran suspensiones unicelulares de células madre, también pueden utilizarse grupos pequeños. Para esta finalidad, la digestión enzimática utilizada para la alteración del grupo (véase más adelante el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos) finaliza antes de que las células madre comiencen a dispersarse por completo y las células se trituran con una pipeta de tal manera que se forman agregados (es decir, 10-200 células). Sin embargo, se toman medidas para evitar el uso de grupos grandes que ocasionen diferenciación celular.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, las células madre pueden cultivarse preferentemente en un sistema de cultivo sin células alimentadoras que incluye una matriz en lugar de una capa celular alimentadora. Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a cualquier matriz que pueda sustituir la función de adhesión celular de las células alimentadoras. Dicha matriz contiene típicamente componentes extracelulares a los que pueden unirse las células madre y por tanto esta proporciona un sustrato de cultivo adecuado.

Particularmente adecuados para su uso con la presente invención son los componentes de la matriz extracelular procedentes de la membrana basal o los componentes de la matriz extracelular que forman parte de acoplamientos entre receptor-ligando de moléculas de adhesión. La matriz Matrigel® es un ejemplo de una matriz disponible en el comercio (Becton Dickinson, USA) que es adecuada para su uso con la presente invención. Matrigel® es una preparación soluble de células tumorales de Engelbreth-Holm-Swarm que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida; Matrigel® está también disponible como una preparación reducida de factores de crecimiento. Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes que son adecuadas para su uso con la presente invención incluyen laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y similares, en solitario o en diversas combinaciones. Las matrices preferidas de la presente invención son matrices procedentes de fibronectina.

En casos en los que se deseen condiciones de cultivo completo sin componentes de origen animal, la matriz procede preferentemente de una fuente humana o se sintetiza usando técnicas recombinantes. Dichas matrices incluyen, por ejemplo, fibronectina de origen humano, fibronectina recombinante, laminina de origen humano, matriz de fibroblastos de prepucio o una matriz de fibronectina sintética. La fibronectina de origen humano puede ser fibronectina de plasma humano o fibronectina de células humanas, pudiendo obtenerse ambas en Sigma, St. Louis, MO, USA. La laminina de origen humano y la matriz de fibroblastos de prepucio pueden obtenerse en Sigma, St. Louis, MO, USA. Una matriz de fibronectina sintética puede obtenerse en Sigma, St. Louis, MO, USA.

La síntesis recombinante de proteínas de matriz puede efectuarse utilizando vectores de expresión. Los segmentos de polinucleótidos que codifican las proteínas de matriz (por ejemplo, fibronectina de plasma humano) pueden ligarse en un sistema de vector de expresión disponible en el comercio adecuado para la transformación de células de mamífero tales como células HeLa y para dirigir la expresión de esta enzima dentro de las células transformadas. Se apreciará que dichos sistemas de vector disponibles en el comercio pueden modificarse fácilmente mediante técnicas recombinantes habitualmente utilizadas para sustituir, duplicar o realizar mutaciones existentes en secuencias promotoras o potenciadoras y/o introducir cualquier secuencia de polinucleótidos adicional, tal como, por ejemplo, secuencias que codifican marcadores de selección adicionales o secuencias que codifican polipéptidos indicadores, etc.

Los vectores de expresión de mamífero adecuados incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3 0.1, que están disponibles en Invitrogen, pCI que

está disponible en Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Stratagene, pTRES que está disponible en Clontech y sus derivados.

5 El medio de cultivo incluye citocinas y factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular [por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor inhibidor de la leucemia (LIF)], y factores tales como factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1) que inhibe la diferenciación de células madre.

10 Dicho medio de cultivo puede ser un medio de cultivo tisular sintético tal como Ko-DMEM (Gibco-Invitrogen Corporation products, Grand Island, NY, USA) complementado con suero, sustitutivo del suero y/o factores de crecimiento.

15 El suero puede ser de cualquier fuente, incluyendo suero bovino fetal, suero de cabra o suero humano. Preferentemente se utiliza suero humano o sustitutivo del suero™ (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY USA) para proporcionar a las células ME humanas un medio sin componentes de origen animal.

20 El sustitutivo del suero™ incluye albúmina o sustitutos de albúmina, aminoácidos, vitaminas, transferrinas o sustitutos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno y oligoelementos (Publicación de Patente Internacional n.º WO 98/30679 de Price, P.J. *et al*). Para proporcionar condiciones de cultivo sin componentes de origen animal, la albúmina o sustitutos de albúmina proceden preferentemente de una fuente humana y/o son proteínas recombinantes.

25 El medio de cultivo, el suero y el sustitutivo del suero pueden obtenerse en cualquier proveedor comercial de productos de cultivo tisular, como ejemplos se incluyen Gibco-Invitrogen Corporation (Grand Island, NY USA), Sigma (St. Louis MO, USA) y la ATCC (Manassas, VA USA).

30 El suero o sustitutivo del suero se proporcionan a un intervalo de concentración del 1 % al 40 %, más preferentemente del 5 % al 35 %, lo más preferentemente del 10 % al 30 %.

De acuerdo con realizaciones actualmente preferidas, el sustitutivo del suero se proporciona a una concentración del 15 % (véanse los Ejemplos 1 y 4 de la sección de Ejemplos).

35 Los factores de crecimiento de la presente invención pueden utilizarse en cualquier combinación y pueden proporcionarse a las células madre a cualquier concentración adecuada para la proliferación de células ME, aunque al mismo tiempo inhiben la diferenciación de las células ME.

40 Los factores de crecimiento adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, factor de crecimiento transformante β_1 (TLF β_1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor inhibidor de leucemia (LIF) recombinante humano, factor neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina M humana recombinante, interleucina 6 (IL-6) ligando Flt-3, factor de células madre (SCF) y similares. Dichos factores de crecimiento pueden obtenerse en cualquiera de los proveedores de reactivos de cultivo tisular tales como Gibco Invitrogen Corporation Products, USA, R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA and Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA.

45 Como se observa en el Ejemplo 1 y en la sección de Ejemplos más adelante, cuando se cultivan células ME en fibronectina de origen bovino en presencia de medio de cultivo complementado con sustitutivo del suero al 20 %, la combinación de ambos factores de crecimiento TGF β_1 y bFGF (TF) y la combinación de factores de crecimiento TGF β_1 , LIF y bFGF (TLF) puede mantener células ME humanas durante al menos 53 y 56 pases, respectivamente.

50 Los factores de crecimiento utilizados para complementar las células ME cuando se cultivan en un sistema sin células alimentadoras incluyen TGF β_1 , bFGF y/o LIF.

55 En sistemas de cultivo sin células alimentadoras, el TGF β_1 se proporciona a un intervalo de concentración de 0,06-0,24 ng/ml, más preferentemente de 0,10-0,20 ng/ml, lo más preferentemente de 0,12 ng/ml, LIF se proporciona a un intervalo de concentración de 500-2000 u/ml, más preferentemente de 750-1500 u/ml, lo más preferentemente de 1000 u/ml, y bFGF se proporciona a un intervalo de concentración de 2-8 ng/ml, más preferentemente a 3-6 ng/ml, lo más preferentemente de 4 ng/ml. Aunque menos preferido, el cultivo de células MEh puede efectuarse de manera alternativa usando un medio acondicionado en lugar de suero o medio complementado con sustitutivo del suero. El medio acondicionado es el medio de crecimiento de un cultivo celular monocapa (es decir, células alimentadoras) presente después de un determinado período de cultivo. El medio acondicionado incluye factores de crecimiento y citocinas segregados por las células en el cultivo monocapa. El medio acondicionado puede recogerse de diversas células que forman monocapas en cultivo. Los ejemplos incluyen medio acondicionado con FER, medio acondicionado con células de prepucio, medio acondicionado con fibroblastos embrionarios humanos, medio acondicionado con células epiteliales humanas de trompas de Falopio y similar.

65 Particularmente el medio acondicionado adecuado es aquel medio que procede de células humanas, tal como medio acondicionado de células de prepucio que se produce cultivando células de prepucio humano en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para producir el medio acondicionado.

5 Dicho medio de cultivo puede ser cualquier medio adecuado para el cultivo de células alimentadoras. El medio de cultivo puede complementarse con factores nutricionales, tales como aminoácidos, (por ejemplo, L-glutamina), antioxidantes (por ejemplo, beta-mercaptoetanol) y factores de crecimiento, que benefician el crecimiento de células madre en un estado indiferenciado. El suero y los sustitutivos del suero se añaden a intervalos de concentración eficaces como se describe en cualquier parte (Patente de Estados Unidos 2004/00675580).

10 Las células alimentadoras se cultivan en el medio de cultivo durante un tiempo suficiente para permitir la acumulación de factores adecuados segregados para dar soporte a la proliferación de células madre en un estado indiferenciado. Típicamente el medio se acondiciona cultivando durante 4-24 horas a 37 °C. Sin embargo, el periodo de cultivo puede graduarse evaluando el efecto del medio acondicionado sobre el crecimiento y la diferenciación de las células madre.

15 La selección de los aparatos de cultivo para acondicionar el medio se basa en la escala y en la finalidad del medio acondicionado. La producción a gran escala implica preferentemente el uso de dispositivos adecuados para ese fin. En Furey (2000) Genetic Eng. News 20: 10 se revisan sistemas de cultivo celular continuos.

20 Después de la acumulación en el medio de factores adecuados, el medio de cultivo (es decir, medio acondicionado) se separa de las células alimentadoras y se recoge. Se apreciará que las células alimentadoras pueden usarse varias veces para acondicionar otros lotes de medio durante periodos de cultivo adicionales, siempre que las células conserven su capacidad para acondicionar el medio.

25 Preferentemente, antes de su uso, el medio acondicionado se esteriliza (por ejemplo, por filtración, usando un filtro de 20 µM). El medio acondicionado de la presente invención puede aplicarse directamente a las células madre o extraerse para concentrar el factor eficaz tal como por filtración salina. Para su uso futuro, el medio acondicionado se conserva preferentemente congelado a -80 °C.

30 Las células madre se cultivan en condiciones de cultivo sin células alimentadoras para establecer una línea de células madre embrionarias humanas.

35 Como se describe en los Ejemplos 1 y 4 de la sección de Ejemplos, más adelante, las células madre indiferenciadas son de distinta morfología, lo que hace que un experto en la técnica las distinga claramente de células diferenciadas de origen embrionario o adulto. Típicamente, las células madre indiferenciadas tienen proporciones nucleares/citoplasmáticas altas, nucleolos prominentes y formación de colonias compactas con uniones celulares poco discernibles. Más adelante en el presente documento se describen otras características de las células madre indiferenciadas.

40 Cuando se cultivan, el crecimiento de las células madre se monitoriza para determinar su estado de diferenciación. Para determinar la diferenciación celular de las células cultivadas como se describe en el presente documento, pueden utilizarse diversas estrategias incluyendo, por ejemplo, la determinación morfológica.

45 Las condiciones de cultivo proporcionan a las células madre un medio completo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes, que puede mantener a las células madre en un estado proliferativo, incluso en un estado indefinidamente indiferenciado. Por tanto, las condiciones de cultivo incluyen una matriz de origen humano (o recombinante) y un medio de cultivo complementado con los factores de crecimiento TGFβ₁, LIF y bFGF.

50 Como se muestra en los Ejemplos 4 y 5 de la sección de Ejemplos a continuación, los autores de la presente invención han ilustrado que las células ME pueden cultivarse en matrices de fibronectina de origen humano, complementarse con suero humano o sustitutivo del suero, proporcionando de este modo cultivos de células madre pluripotentes que están desprovistos de patógenos animales o de cualquier otro contaminante. En estas condiciones la línea de células ME se mantiene en un estado proliferativo e indiferenciado durante al menos 38 pases.

55 Durante la etapa de cultivo también se monitoriza el estado de diferenciación de las células madre. La diferenciación celular puede determinarse examinando marcadores específicos de células o de tejidos, que se sabe que son indicativos de diferenciación. Por ejemplo, las células ME de primates pueden expresar el antígeno embrionario específico de fase (SSEA), el antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81.

60 Como se muestra en los Ejemplos 2 y 4 de la sección de Ejemplos más adelante, las células ME crecen en cultivos sin células alimentadoras complementados con medio de cultivo sin xenocontaminantes y factores de crecimiento seleccionados que expresan los marcadores de superficie celular SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 típicos de células indiferenciadas.

65 Los marcadores específicos de tejidos/células pueden detectarse usando técnicas inmunológicas muy conocidas en la materia [Thomson JA *et al.*, (1998). Science 282: 1145-7]. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo para marcadores unidos a membrana, inmunohistoquímica para marcadores extracelulares e intracelulares e inmunoensayo enzimático, para marcadores moleculares secretados.

La determinación de la diferenciación de células ME también puede efectuarse midiendo la actividad fosfatasa alcalina. Las células ME humanas indiferenciadas tienen actividad fosfatasa alcalina que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4 % y revelando con el kit de sustrato Vector Red de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA).

Como se ha mencionado anteriormente, la línea de células madre mantiene pluripotencia durante al menos 38 pases. Dicha pluripotencia puede monitorizarse *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrionarios (CE) así como mediante la formación *in vivo* de teratomas.

Los cuerpos embrionarios se forman después de la retirada de las células ME de las capas alimentadoras o de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras. La retirada de las células ME puede efectuarse usando tratamiento con colagenasa de tipo IV durante un tiempo limitado. Después de la disociación de la superficie de cultivo, las células se transfieren a placas de cultivo tisular que contienen un medio de cultivo complementado con suero y aminoácidos. Como se muestra en los Ejemplos 3 y 5 de la sección de Ejemplos más adelante, después de 14 días en un cultivo en suspensión, las células ME se diferencian en CE que contienen mesodermo, ectodermo y endodermo embrionario, demostrando claramente que la línea de células ME conserva pluripotencia en las condiciones de cultivo sin células alimentadoras.

El nivel de diferenciación de las células CE puede monitorizarse siguiendo la pérdida de expresión de Oct-4, y el aumento del nivel de expresión de otros marcadores tales como α -fetoproteína, NF-68 kDa, α -actina cardiaca y albúmina. Los métodos útiles para monitorizar el nivel de expresión de genes específicos son muy conocidos en la técnica e incluyen RT-PCR, hibridación *in situ* de ARN, análisis de transferencia Western e inmunohistoquímica.

La capacidad pluripotente de la línea de células ME también puede confirmarse inyectando células en ratones SCID [Evans MJ y Kaufman M (1983). Pluripotential cells grown directly from normal mouse embryos. *Cancer Surv.* 2: 185-208], que después de la inyección forman teratomas. Los teratomas se fijan usando paraformaldehído al 4 % y las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) se examinan desde un punto de vista histológico.

Como se muestra en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos más adelante, las células ME cultivadas en sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina complementados con las combinaciones de factores de crecimiento seleccionadas (es decir, las combinaciones de TF y de TLF) forman teratomas funcionales, demostrando la capacidad pluripotente de las células ME para diferenciarse *in vivo*.

Además de monitorizar un estado de diferenciación, frecuentemente las células madre también se monitorizan con respecto a su cariotipo, para verificar euploidia citológica, en la que todos los cromosomas están presentes y no se alteran de manera detectable durante el cultivo. Las células madre cultivadas pueden cariotiparse usando una tinción Giemsa convencional y compararse con cariotipos publicados de la especie correspondiente.

Las células madre cultivadas conservan un cariotipo normal después de 30 y 32 pases en matriz de fibronectina cuando se complementan con la combinación TF o TLF de factores de crecimiento, respectivamente (véase el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos).

Dado que la línea de células ME carece de xenocontaminantes y de células alimentadoras, esta puede usarse para terapia y regeneración tisular basada en células humanas.

Ejemplos de referencia

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos de referencia que, junto con las anteriores descripciones, ilustran la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura que se utiliza en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación, incluyen técnicas moleculares bioquímicas microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías se exponen en las patentes de Estados Unidos n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 and 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por

ejemplon Patentes de Estados Unidos n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); "Terato-carcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach" Robertson EJ, ed. (1987) Oxford: IRL Press; "Manipulating the Mouse Embryo" Nagy A *et al.*, (2003) Cold Spring Harbor Lab Press, Tercera Edición; Thomson, J. A., Marshall, V.S. (1998) Primate embryonic stem cells. Current Topics in Developmental Biology 38, 133-165; Marshall, V. S., Waknitz, M. A., Thomson, J. A. (2001) Isolation and maintenance of primate embryonic stem cells. Methods in Molecular Biology 158, 11-18. A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se piensa que los procedimientos del presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan por comodidad para el lector.

Ejemplo de referencia 1

Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras, complementados con medio sin xenoccontaminantes, son adecuados para el crecimiento de líneas de células ME

Células ME humanas se transfirieron a sistemas de cultivo basados en fibronectina en presencia de sustitutivo del suero y factores de crecimiento seleccionados para proporcionar un entorno bien definido, sin células alimentadoras, para cultivos de células ME.

Materiales y métodos experimentales

Cultivos de células ME - Células ME humanas de las líneas I-6, I-3 [Amit, M. y Itskovitz-Eldor, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J Anat. 200, 225-232 (2002)] y H-9 [Thomson, J. A., *et al.*, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-7 (1998)] se cultivaron con fibroblastos embrionarios de ratón (FER) durante 46, 39 y 25 pases, respectivamente, en un medio de cultivo que consistía en Ko-DMEM al 85 %, complementado con sustitutivo del suero (SS) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % y bFGF 4 ng/ml (todos ellos productos de Corporación Gibco Invitrogen, USA). Después, las células ME se transfirieron a placas cubiertas con fibronectina de origen bovino (50 μ g/10 cm², Biological Industries, Bet Haemek, Israel) en presencia de SS al 20 %, medio de cultivo al 80 % y una de las siguientes combinaciones de factores de crecimiento: "T" - TLF β_1 0,12 ng/ml (R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA); "TF" - TGF β_1 0,12 ng/ml con bFGF 4 ng/ml (Gibco Invitrogen Products Corporation, USA); "LF" - factor inhibidor de leucemia 1.000 U/ml (LIF, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) con bFGF 4 ng/ml; o "TLF" - TLF β_1 0,12 ng/ml, LIF 1000 u/ml y bFGF 4 ng/ml. Las células adherentes se dividieron cada cuatro a seis días usando colagenasa de tipo IV 1 mg/ml (Productos de Corporation Gibco Invitrogen, USA) durante 30 min y se sembraron en matraces que contenían medio reciente. De acuerdo con el protocolo de congelación, las células se congelaron en nitrógeno líquido usando una solución refrigerante que consistía en DMSO al 10 % (Sigma, St Louis, MO, USA), suero humano al 10 % (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) o SS al 15 % y Ko-DMEM al 80 % (Productos de Corporación Gibco Invitrogen, USA).

Evaluación morfológica - Con un microscopio invertido se examinaron células ME (células vivas) usando contraste de fase (Olympus, IX70, Japón).

Resultados experimentales

Capacidad de proliferación de las células MEh en sistemas de cultivo sin células alimentadoras - Células ME de las I-3, I-6 y H-9 se transfirieron a placas cubiertas con fibronectina, en presencia de sustitutivo del suero complementado con factores de crecimiento seleccionados, como se ha detallado anteriormente en la sección de Métodos del presente documento. Cuando el medio de cultivo se complementó solo con bFGF o con LIF y bFGF (LF) la proliferación de las células continuó durante varios pases y después cambiaron a diferenciación. Además, cuando el medio de cultivo de las células ME se complementó solo con TGF β , las células ME permanecieron en el estadio indiferenciado durante más de 10 pases aunque proliferaron mal y se desvanecieron lentamente hasta el pase 15. Por otro lado, cuando el medio de cultivo de las células ME se complementó con TLF β_1 y bFGF (TF) o con TGF β_1 , LIF y bFGF (TLF) las células continuaron proliferando y mantuvieron las características normales de las células MEh de manera similar a las células MEh que crecían en FER. Sin embargo, a pesar de que las células crecieron con la combinación TF se dividieron en una sola placa durante cada pase, las células que crecieron con la combinación TLF se dividieron en 2-3 placas, de manera similar a las células ME que crecían en FER, demostrando un alto índice de proliferación en presencia de la combinación TLF. Por tanto, el sistema de cultivo sin células alimentadoras complementado con la combinación de factores de crecimiento TLF pudo dar soporte al crecimiento normal de las células MEh, con un tiempo de generación de al menos 25 horas, similar al del crecimiento de células ME en FER.

5 *Características morfológicas de colonias y células ME en sistemas de cultivo sin células alimentadoras* - Las características morfológicas del crecimiento de colonias ME sobre el sistema de cultivo sin células alimentadoras eran indiferenciables a las de las colonias ME que crecían en FER, incluso después de más de 56 pases (más de 224 días) cuando se complementaba con la combinación TLF y de 53 pases (más de 212 días) cuando se complementaba con la combinación TF de factores de crecimiento (no mostrado). Además, el día cuatro desde su pase sobre el sistema sin células alimentadoras con fibronectina, los cultivos de células MEh consistían en 85-90 % de células indiferenciadas con un tiempo de generación de 30-35 horas, lo que está en consonancia con el tiempo de generación de células MEh que crecían en FER.

10 Cuando se observaron con mayor aumento, las células MEh que crecían en el sistema de cultivo sin células alimentadoras eran pequeñas y redondas con una relación alta entre el núcleo con respecto al citoplasma, con una presencia notable de uno a tres nucléolos y una separación típica entre las células (Figuras 1a-d).

15 *Las células ME que crecen en un sistema de cultivo sin células alimentadoras tienen un índice de supervivencia similar al de las células ME que crecen en FER* - Para la conservación de CM, CM que crecieron en el sistema de cultivo sin células alimentadoras se congelaron en presencia de SS al 15 % y DMSO al 10 %. Cuando las células ME congeladas se descongelaron posteriormente y volvieron a sembrarse en placas, mostraron un índice de supervivencia similar al de las células ME que crecían en FER.

20 Por tanto, estos resultados demuestran que las combinaciones de factores de crecimiento TF y TLF son adecuadas para los cultivos de células MEh, siendo la combinación TF inferior a la combinación TLF debido a una baja capacidad de proliferación. Además, las células ME que crecieron en el sistema de cultivo sin células alimentadoras exhibieron características morfológicas y un índice de supervivencia similar al de las células ME que crecían en FER.

25 *Ejemplo de referencia 2*

Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras complementados con medio sin xenoccontaminantes dan soporte al crecimiento de células ME fenotípicamente consistentes

30 Las características fenotípicas de células MEh que crecen en sistemas de cultivo sin células alimentadoras complementados con medio sin xenoccontaminantes se evaluó usando marcadores de superficie celular típicos de células indiferenciadas.

35 *Materiales y Métodos experimentales*

40 *Análisis de cariotipo* - Se bloquearon las metafases de células ME usando colcemid (KaryoMax colcemid solution, Invitrogen, Grand island, NY, USA) y se efectuó la lisis de membranas nucleares en una solución hipotónica de acuerdo con protocolos convencionales (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN). El bandeo cromosómico G se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Giemsa, Merck). Se analizaron cariotipos de al menos 20 células por muestra y se describieron de acuerdo con el ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). *Inmunohistoquímica* - Las células se fijaron durante 20 min en paraformaldehído al 4 %, se bloquearon durante 15 min en suero normal de cabra al 2 % en PBS (Biological Industries, Bet Haemek, Israel) y se incubaron durante una noche a 4 °C con diluciones 1:50 de anticuerpos contra SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-60, TRA-81 (Hybridoma bank, Iowa, USA) humanos de ratón, proporcionados por el Profesor P Andrews de la Universidad de Sheffield, Inglaterra. Después, las células se lavaron en PBS y se incubaron adicionalmente con diluciones 1:100 de anticuerpos de burro contra IgG de ratón conjugados con el fluorocromo Cys3 (Chemicon International, Temecula CA, USA). Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia invertido (Carl Zeiss, Alemania) o con un microscopio confocal (Bio-Rad laboratories, Hertfordshire, Inglaterra).

50 *Resultados experimentales*

55 Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina complementados con medio de cultivo sin xenoccontaminantes proporcionan a las células ME un cariotipo congruente como en otros protocolos basados en células alimentadoras. El análisis del cariotipo se realizó en células MEh después de cultivo continuo en sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina complementados con medio de cultivo sin xenoccontaminantes. El análisis del cariotipo se realizó en nueve cultivos distintos, que representaban las dos condiciones de medio, TF y TLF y con las tres líneas de células MEh (I-3, I-6 y H-9) a diferentes fases de 6 a 32 pases en el sistema de cultivo sin células alimentadoras. Este análisis reveló cariotipos normales en 136 células de 140 células examinadas en el pase 30 cuando se cultivaron en el medio TF y en el pase 32 cuando se cultivaron en el medio TLF. En cuatro células del mismo grupo, se encontró un cariotipo anómalo de 47, XXX. Estas cuatro células, cultivadas durante casi un año, fueron al pase 71 post-derivación de los cuales 20 pases fueron en el sistema de cultivo sin células alimentadoras complementado con TLF. Como se ha indicado anteriormente [Amit, M. *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227: 271-8 (2000)], puede producirse inestabilidad cromosómica en células ME cuando se cultivan durante ocho meses en FER. En su conjunto estos resultados sugieren que los sistemas de cultivo sin células alimentadoras dan soporte a un cariotipo normal y estable de células MEh.

Las células ME humanas cultivadas en sistemas de cultivo sin células alimentadoras complementados con medio sin xenocontaminantes expresan marcadores de superficie embrionarios - Para caracterizar adicionalmente la capacidad de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina para mantener el crecimiento normal de células ME humanas, se realizó IHC en células ME humanas con anticuerpos marcadores de superficie embrionarios incluyendo TRA-1-60, SSEA4, TRA-1-81, SSEA3 y SSEA1. Después de 17 y 38 pases en cultivo complementado con los factores de crecimiento TF y TLF, respectivamente, las células ME humanas de las líneas I-3, I-6 demostraron niveles altos de expresión del antígeno embrionario específico de fase 4 (SSEA4), del antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81 (Figuras 1e-h). Estos marcadores son características típicas de células ME indiferenciadas [Thomson JA, *et al.* (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7; Thomson JA, *et al.* (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55: 254-9; Thomson JA, *et al.* (1995). Aislamiento de la línea de células madre embrionaria de primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7844-8]. Cabe destacar que, el antígeno embrionario específico de fase 3 (SSEA3) solo se expresó de manera moderada, mientras que la expresión del antígeno embrionario específico de fase 1 (SSEA1), un marcador exclusivo de células ME de ratón, no se detectó (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran que los sistemas de cultivo sin células alimentadoras complementados con los factores de crecimiento TF o TLF pueden mantener células ME humanas en un estado indiferenciado incluso después de períodos de cultivo prolongados.

Ejemplo de referencia 3

Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras complementados con medio sin xenocontaminantes da soporte al crecimiento de células ME funcionales

Células ME humanas que crecían en los sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina complementados con sustitutivo del suero y factores de crecimiento libres de xenocontaminantes, se ensayaron con respecto a su capacidad para formar cuerpos embrionarios *in vitro* y teratomas *in vivo*.

Material y métodos experimentales

Formación de cuerpos embrionarios (CE) de células ME humanas - Células ME humanas que crecían en los sistemas de cultivo sin células alimentadoras se retiraron de la placa de cultivo de 6 pocillos (40-60 cm²) con colagenasa de tipo IV (1 mg/ml) y se disociaron adicionalmente en pequeños grupos usando puntas de pipeta Gilson de 1.000 µl. Después de esto, las células disociadas se cultivaron en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Alemania) en un medio que consistía en Ko-DMEM al 80 %, complementado con suero bovino fetal al 20 % definido (FBS, Hyclone, Utah, USA), L-glutamina 1 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM y reserva de aminoácidos no esenciales al 1 %. A menos que se indique de otra manera todo se adquirió en Gibco Invitrogen corporation, USA. Después de 14 días en suspensión se examinó la formación de CE.

Formación de teratomas - Células ME se extrajeron de 6 pocillos confluentes en una placa de seis pocillos (60 cm²) y se inyectaron en el músculo de la pata trasera de 4 ratones beige SCID macho de 4 semanas de vida (Harlan, Jerusalem Israel). Los teratomas resultantes se fijaron en formaldehído y se examinaron desde un punto de vista histológico, al menos 12 semanas después de la inyección.

PCR acoplada a transcriptasa inversa (RT) - Se aisló ARN total de células ME humanas indiferenciadas que crecían en los sistemas de cultivo sin células alimentadoras durante 17-25 pases o de CE de 14 días creados a partir de células ME que crecían en condiciones sin células alimentadoras, usando el kit Tri-Reagent (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó en un molde de ARN total de 1 µg usando MMLV RT-RNasa H-minus (Promega Corp., Madison, WI, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores y las condiciones de reacción de la PCR se describen más adelante en la Tabla 1 en el presente documento. Todas las reacciones PCR incluyeron una desnaturalización de cadena inicial durante 5 minutos a 94 °C. Los productos de la PCR se fraccionaron por tamaño usando electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Tabla 1: cebadores y condiciones de la PCR

Producto génico (Número de Registro)	SEQ ID NO.	Cebadores directo (D) e inverso (I) (5'173)	Condiciones de Reacción	Tamaño (pb)
Oct-4 (581255)	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2	D: GAGAACAATGAGAACCTTCAGGA I: TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	30 ciclos, hibridación a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	219

Producto génico (Número de Registro)	SEQ ID NO.	Cebadores directo (D) e inverso (I) (5'173)	Condiciones de Reacción	Tamaño (pb)
Albúmina (AF542069)	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4	D: GCTTGAATGTGCTGATGACAGGG I: AAGGCAAGTCAGCAGCCATCTCAT	35 ciclos, hibridación a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	302
α-fetoproteína (BC027881)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6	D: GCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAA I: TCCCCTGAAGAAAATTGGTTAAAAT	30 ciclos, hibridación a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	216
NF-68KD (AY156690)	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8	D: GAGTGAATGGCAGGATACCTA I: TTTCTCTCTCTTCTTACCTTC	30 ciclos, hibridación a 60 °C en MgCl ₂ 2 mM	473
α-actina cardiaca (NM_005159)	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10	D: GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC I: AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA	35 ciclos, hibridación a 65 °C en MgCl ₂ 2 mM	486
Receptor de LIF (NM_002310)	SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 12	D: CAAAAGAGTGTCTGTGAG I: CCATGTATTTACATTGGC	35 ciclos, hibridación a 61 °C en 1,5 mM MgCl ₂	459
β- Actina (NM_001101)	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14	D: ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG I: CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	35 ciclos, hibridación a 62 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	838

Resultados experimentales

- 5 Las células ME se diferencian espontáneamente en tipos de células de la capa germinal embrionaria *in vitro*, después de su retirada de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras - Para verificar que las células ME humanas cultivadas en sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina eran funcionalmente, así como fenotípicamente, congruentes con las células ME humanas procedentes de protocolos basados en células alimentadoras, las células ME se retiraron de los cultivos sin células alimentadoras después de 22 a 30 pases en TLF y de 28 pases en TF y crecieron en suspensión. Como resultado, las células MEh formaron cuerpos embrionarios (CE) similares a los creados por células ME que crecían en FER (Figuras 2a-c). La funcionalidad de los
- 10 CE aislados se ensayó adicionalmente mediante IHC usando diversos marcadores de células embrionarias. Como se muestra adicionalmente en las Figuras 2d-f, los CE expresaron tubulina específica neutra, que es de origen ectodérmico, actina de músculo liso y el marcador CD-31 de origen mesodérmico.
- 15 Adicionalmente se verificó la expresión génica congruente con las células ME dentro de los CE usando RT-PCR. Dentro de los CE las células madre se diferenciaron en células representativas de las tres capas germinales embrionarias, es decir mesodermo, endodermo y ectodermo. Como se muestra en la Figura 3, aunque las células indiferenciadas que crecían en sistemas de cultivo sin células alimentadoras complementados con TLF o TF expresaban altos niveles de Oct-4 (Figura 3), un marcador de células madre embrionarias pluripotentes y células
- 20 germinales [Pesce M, y Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development (2001). *Stem Cells* 19: 271-8] células recogidas de CE de 14 días expresaron genes, que se asociaron con diferenciación celular incluyendo neurofilamento (NF-68 kD) que está relacionado con ectodermo embrionario, α-actina cardiaca que está asociada con mesodermo embrionario y α-fetoproteína y albúmina ambas de las cuales son indicadores de endodermo embrionario. La expresión disminuida de Oct 4 en muestras de CE era congruente con informes previos
- 25 de expresión disminuida de Oct 4 después de diferenciación de células totipotentes en líneas somáticas [Thomson JA, *et al.* (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7, Reubinoff BE, *et al.* (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404]. Como se ha indicado anteriormente en cualquier parte [Schuldiner M. *et al.* Effect of eight-growth factors on the differentiation of cells derived from human ES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11307-12 (2000); Amit, M. *et al.*, Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 68: 2150-2156 (2003); Kehat, I. *Et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108: 407-14 (2001)] los cultivos de células ME podrían tener algún grado de diferenciación de fondo. De
- 30

hecho, algunos de los genes específicos de células, como albúmina y α -actina cardiaca, también se expresaron en las células ME indiferenciadas (Figuras 3).

Por tanto, estos resultados demuestran que las células ME humanas que crecen en cultivos sin células alimentadoras pueden crear CE funcionales con células que se diferencian en las diversas estirpes somáticas.

5 *Las células ME humanas cultivadas en cultivos de células sin células alimentadoras se diferencian en capas germinales embrionarias in vivo* - Para confirmar adicionalmente la capacidad de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras para dar soporte a la diferenciación de células ME humanas en capas germinales embrionarias, se analizó la formación *in vivo* de teratomas en células ME. Después de inyectar a ratones beige SCID células I-3 y I-6
10 cultivadas en TLF durante 26 y 19 pases, respectivamente, estas pudieron formar teratomas. Cada teratoma contenía tejidos representativos de las tres capas germinales embrionarias, incluyendo nervios mielinizados de origen ectodérmico (Figura 4a), detalles de cartílago hialino que es de origen mesodérmico (Figura 4b) y epitelio secretor rico en células caliciformes que está relacionado con un endodermo (Figura 4c).

15 En conclusión, las células ME humanas que crecían en los sistemas de cultivo sin células alimentadoras no eran funcionalmente distintas de las células que crecían en cultivos basados en células alimentadoras. Después de la diferenciación, las células ME expresaban genes asociados con las tres capas germinales embrionarias, *in vitro*, y también formaban teratomas *in vivo*, que contenían tejido originado de las tres capas germinales. A diferencia de
20 otros protocolos sin células alimentadoras, los sistemas de cultivo contenidos en un medio de cultivo bien definido, sin xenocontaminantes, son adecuados para propagar células ME humanas.

Ejemplo de referencia 4

25 *Los sistemas de cultivo completos sin células alimentadoras ni xenocontaminantes son adecuados para el crecimiento fenotípicamente congruente de células humanas*

Dado que para cualquier uso clínico futuro de células ME humanas, es crucial un entorno sin componentes de origen animal, se desarrolló un sistema de cultivo completo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes usando fibronectina de origen humano como una matriz para el cultivo de células MEh y medio complementado sin
30 xenocontaminantes y factores de crecimiento.

Resultados experimentales

35 *Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes dan soporte al crecimiento de células ME humanas* - Para crear un entorno bien definido, completo, sin componentes de origen animal para cultivos de células MEh, se usó fibronectina de origen humano como sistema de cultivo sin células alimentadoras. El medio de cultivo incluyó sustitutivo del suero (15 %) complementado con las combinaciones T, LF, TF y TLF de factores de crecimiento, como se describe anteriormente en la sección Materiales y Métodos experimentales en el Ejemplo 1 en el presente documento. Se descubrió que tanto la fibronectina plasmática humana (fibronectina de plasma humano, Sigma, St. Louis, MO, USA) como la fibronectina celular (fibronectina de células de fibroblasto de prepucio humano, Sigma, St. Louis, MO, USA) daban soporte al crecimiento indiferenciado de células MEh durante al menos 38 pases (aproximadamente 110 duplicaciones) en presencia de las dos combinaciones de factores de crecimiento TF y TLF. Además, el día cuatro desde el pase en el sistema sin células alimentadoras con fibronectina, los cultivos de células MEh consistían en 85-90 % de células indiferenciadas con un tiempo de generación de 30-35 horas, que es congruente con el tiempo de generación de células MEh que crecían en FER, demostrando la capacidad de estos sistemas de cultivo sin xenocontaminantes para propagar el crecimiento normal de células MEh.

50 Estos resultados demuestran la capacidad de la fibronectina de origen humano complementada con un sistema de cultivo sin xenocontaminantes para dar soporte al crecimiento de cultivos prolongados de células ME humanas proliferativas e indiferenciadas.

55 *Las células ME humanas que crecen en sistemas de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes son fenotípicamente indiferenciables de las células ME que crecen en sistemas de cultivo sin células alimentadoras con fibronectina de origen bovino* - Las células que crecían durante 22 pases en sistemas de cultivo con fibronectina celular humana complementado con sustitutivo del suero y los factores de crecimiento TF conservaron una morfología celular indiferenciada. Las células ME eran pequeñas y redondas, con una relación grande del núcleo con respecto al citoplasma, con una notable presencia de uno a tres nucleolos y separación típica entre las células (Figuras 5a-c).

60 Adicionalmente, se descubrió que las células ME humanas que crecían en un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes, tenían un cariotipo normal después de 32 pases (no mostrado).

65 Además, como se reveló adicionalmente mediante IHC, las células ME humanas cultivadas durante 16 pases en un sistema completo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes expresaron todos los marcadores de superficie embrionarios característicos incluyendo Try-1-60, SSEA4, TRA-1- 81 (Figuras 5D-F).

Por tanto, estos resultados demuestran la capacidad de los sistemas completos, sin células alimentadoras, ni xenoccontaminantes para dar soporte a células ME humanas de fenotipo congruente, manteniendo cultivos altamente proliferativos con cariotipo normal y estable y expresando todos los marcadores de superficie embrionarios típicos.

- 5 Estos resultados sugieren por lo tanto el uso de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras ni xenoccontaminantes para la obtención y cultivo de células ME humanas.

Ejemplo de referencia 5

- 10 *Las células humanas que crecen en un sistema de cultivo completo, sin células alimentadoras, ni xenoccontaminantes son funcionalmente indiferenciables de las células que crecen en otros sistemas de cultivo*

Se ensayó la capacidad de las células ME humanas que crecían en sistemas de cultivo sin células alimentadoras basados en fibronectina humana complementados con sustitutivo del suero y factores de crecimiento sin xenoccontaminantes, para formar cuerpos embrionarios *in vitro*.

15 *Las células ME se diferencian espontáneamente en tipos de células de la capa germinal embrionaria in vitro, después de su retirada de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras* - Para verificar que las células ME humanas cultivadas en un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenoccontaminantes, eran funcionalmente, así como fenotípicamente congruentes con las células ME humanas procedentes de protocolos basados en células alimentadoras, las células ME se retiraron de los cultivos sin células alimentadoras después de 17 y 19 pases en matrices de fibronectina celular humana, y de plasma humano, respectivamente. Como resultado, las células MEh formaron CE similares a los creados por células ME que crecían en FER (Figura 6a-c).

20 La expresión génica congruente con ME en los CE se verificó adicionalmente usando RT-PCR. Dentro de los CE, las células madre se diferenciaron en células representativas de las tres capas germinales embrionarias, es decir, mesodermo, endodermo y ectodermo. Como se muestra en la Figura 7, aunque las células indiferenciadas crecieron en sistemas de cultivo sin células alimentadoras ni xenoccontaminantes complementados con TLF o TF expresaron altos niveles expresados de Oct 04 y receptor de LIF (Figura 7), las células recogidas de CE de 14 días de vida expresaron genes, que estaban asociados con diferenciación celular, incluyendo neurofilamento (NF-68 kD) que está relacionado con ectodermo embrionario, α -actina cardiaca que está asociada con mesodermo embrionario y α -fetoproteína y albúmina ambas de ellas indicadores de endodermo embrionario. Por tanto, estos resultados demuestran que las células ME humanas que crecen en cultivos completos sin células alimentadoras ni xenoccontaminantes pueden crear CE funcionales con células que se diferencian en las diversas estirpes somáticas.

35 *Ejemplo de referencia 6*

Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras dan soporte a tasas de crecimiento normales y a altos porcentajes de células madre embrionarias humanas indiferenciadas

40 Para caracterizar adicionalmente la capacidad de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras para propagar células madre embrionarias humanas, se determinó la tasa de crecimiento y la fracción de células madre indiferenciadas en células MEh en diversas condiciones de cultivo.

45 *Los sistemas de cultivo sin células alimentadoras mantienen tasas de crecimiento normales y altos porcentajes de células ME humanas indiferenciadas en sistemas de cultivo basados en células alimentadoras* - Para determinar la capacidad de los sistemas de cultivo sin células alimentadoras para dar soporte al crecimiento de células MEh, se determinó la tasa de crecimiento y la fracción de células madre indiferenciadas en los sistemas de cultivo sin células alimentadoras. Como se muestra en las Figuras 8a-c, cuando las células MEh se cultivan en una matriz de fibronectina de origen bovino en presencia de la combinación TLF de factores de crecimiento, las tasas de crecimiento de las líneas I-3 (Figura 8A, curva rosa), I-6 (Figura 8b, curva rosa) y H-9 (Figura 8c, curva rosa) de células MEh eran similares a las de las células MEh cultivadas en FER. Además, cuando las células MEh se cultivaban en una matriz de fibronectina de origen humano en presencia solo de la combinación TF de factores de crecimiento, las tasas de crecimiento de la línea I-3 (Figura 8a, curva azul claro), I-6 (Figura 8b, curva azul claro) y H-9 (Figura 8c, curva azul claro) de células MEh eran similares a las de las células MEh cultivadas en FER. Por otro lado, cuando estas células se cultivaban en matriz de fibronectina de origen bovino en presencia de la combinación TF de factores de crecimiento, las tasas de crecimiento de la línea I-3 (Figura 8a, curva negra), I-6 (Figura 8b, curva negra) y H-9 (Figura 8c, curva negra) de células MEh eran inferiores en comparación con las de las líneas de células MEh cultivadas en FER. Por tanto, la matriz de fibronectina de origen bovino complementada con la combinación TF de factores de crecimiento y la matriz de fibronectina de origen humano complementada sólo con la combinación TF de factores de crecimiento da soporte a una tasa de crecimiento alta y normal de células MEh similar a la conseguida en FER.

60 *Las células ME humanas cultivadas en sistemas de cultivo sin células alimentadoras mantienen altos porcentajes de células indiferenciadas* - Para caracterizar adicionalmente la capacidad de los sistemas sin células alimentadoras para propagar líneas de células MEh indiferenciadas, se determinaron las fracciones de células indiferenciadas

después de 4, 6 y 10 días de cultivo. Como se observa en la figura 8d, cuando se cultivaron células MEh en matrices de fibronectina de origen humano o bovino en presencia de las combinaciones TF o TLF de factores de crecimiento, un alto porcentaje de las células (85-90 %) permaneció indiferenciado incluso después de seis días en cultivo. Por otro lado, cuando las células MEh se cultivaron en matriz de fibronectina de origen bovino en presencia de las combinaciones LT, LF, T o F de factores de crecimiento, el porcentaje de células indiferenciadas fue de 77-85 % después de 4 días en cultivo y descendió a 60-75 % después de 6 días en cultivo. Por tanto, estos resultados demuestran que los sistemas de cultivo sin células alimentadoras que utilizan matrices de fibronectina y las combinaciones TF o TLF de factores de crecimiento, pueden mantener una alta fracción de células indiferenciadas similar a la obtenida con MEF.

Ejemplo de referencia 7

Las combinaciones TLF y TF de factores de crecimiento son adecuadas para mantener células ME en otros sistemas de cultivo sin células alimentadoras

Para confirmar adicionalmente la capacidad de las combinaciones TLF y TF de factores de crecimiento para complementar otros sistemas sin células alimentadoras, se han usado matrices adicionales.

Resultados experimentales

Células ME humanas originalmente cultivadas en FER se transfirieron a los siguientes sistemas de cultivo sin células alimentadoras: Matrigel^{RTM}, matrices de FER de fabricación propia y matrices de fibroblastos de prepucio de fabricación propia, todas complementadas con sustitutivo del suero y con combinaciones seleccionadas de factores de crecimiento. Usando las combinaciones TLF o TF de factores de crecimiento, las células MEh crecieron satisfactoriamente en Matrigel^{RTM}, en matrices de FER y en matrices de fibroblastos de prepucio (Figuras 9a-f). Cuando se utilizaron cualquiera de las matrices de Matrigel^{RTM} o FER, las células sobrepasaron 30 pases en el estadio indiferenciado (más de 120 días), crearon CE y formaron teratomas (Figuras 10c-f). Sin embargo, estas matrices no están exentas de componentes de origen animal ni están bien definidas, quedando la fibronectina como la opción favorable.

Cuando las células ME crecieron en matriz de fibroblastos de prepucio complementada con SS y las combinaciones TF y TLF de fabricación propia, las células sobrepasaron 5 pases en el estado indiferenciado (más de 20 días), conservando las características morfológicas típicas de las células ME (Figura 9a). Aunque esta matriz representa un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni componentes de origen animal, la matriz de fibroblastos de prepucio no es un sistema bien definido en comparación con la matriz de fibronectina.

Por tanto, estos resultados demuestran que el medio de cultivo bien definido sin xenocontaminantes que consiste en sustitutivo del suero y de las combinaciones TLF o TF de factores de crecimiento, es adecuado para mantener y propagar células MEh en una variedad de sistemas de cultivo sin células alimentadoras.

Se apreciará que determinadas características de la invención, que se describen por claridad en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención que por brevedad se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amit, Michal
Itskovitz-Eldor, Joseph

<120> MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMPRIONARIAS HUMANAS SIN CÉLULAS ALIMENTADORAS NI XECONTAMINANTES Y CULTIVOS DE CELULAS MADRE PREPARADOS USANDO DICHOS MÉTODOS

<130> 25365

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 571 355 T3

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1
gagaacaatg agaacctca gga 23

5

<210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 2
ttctggcgcc ggttacagaa cca 23

15

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 3
tgcttgaatg tgctgatgac aggg 24

25

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 4
aaggcaagtc agcagccatc tcat 24

35

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 5
gctggattgt ctgcaggatg gggaa 25

45

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 6
tcccctgaag aaaattggtt aaaat 25

55

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>

65

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400>7
 5 gagtgaaatg gcacgatacc ta 22

<210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 8
 15 ttctctctcc ttctcacct tc 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 9
 25 ggagtatgg tgggtatgg tc 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 10
 35 agtggtgaca aaggagtagc ca 22

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 11
 45 caaaagagtg tctgtgag 18

<210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 12
 60 ccatgtattt acattggc 18

<210> 13
 <211> 32
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 571 355 T3

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 13
atctggcacc acaccttcta caatgagctg cg 32

5

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

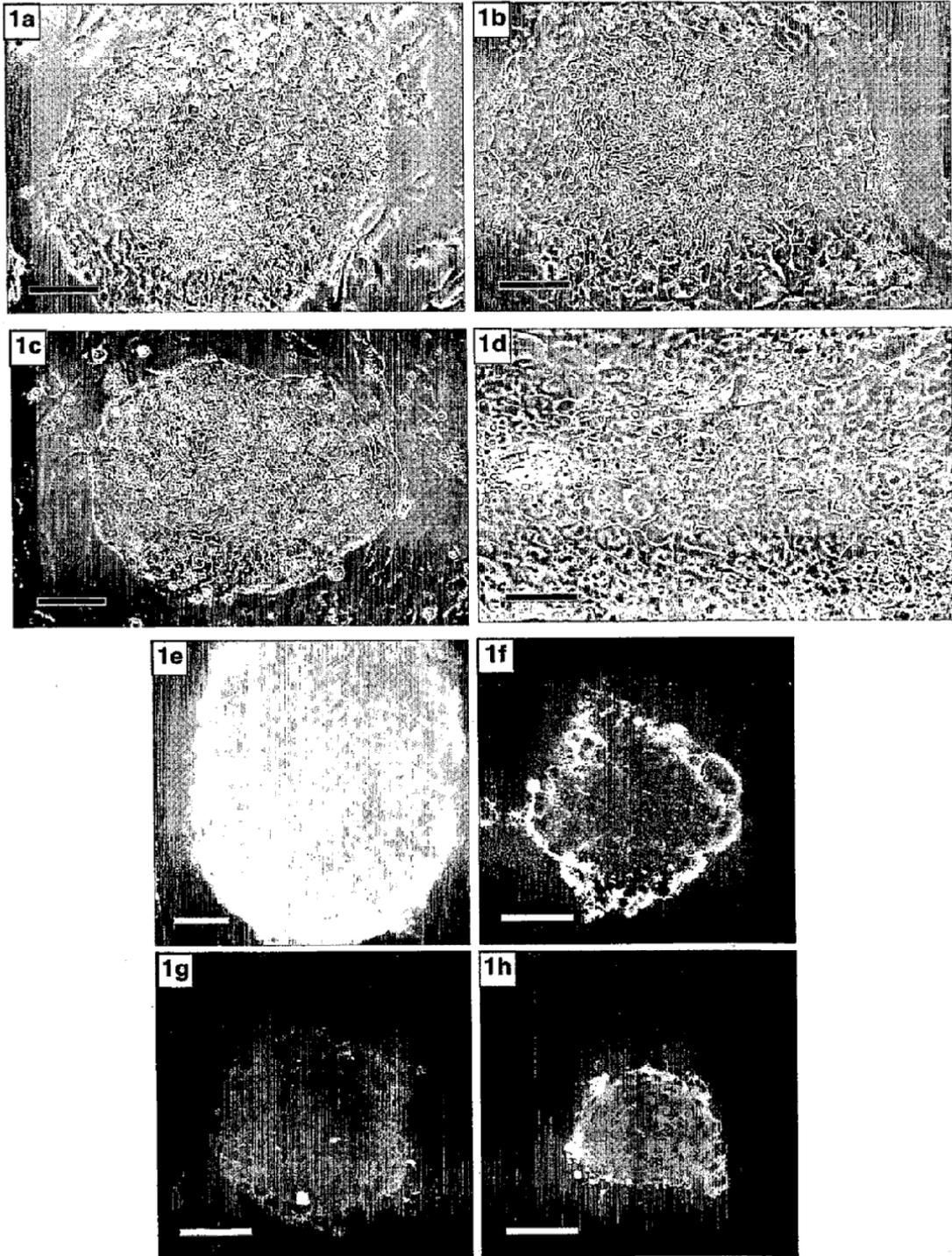
<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 14
cgtcactctc ctgcttgctg atccacatct gc 32

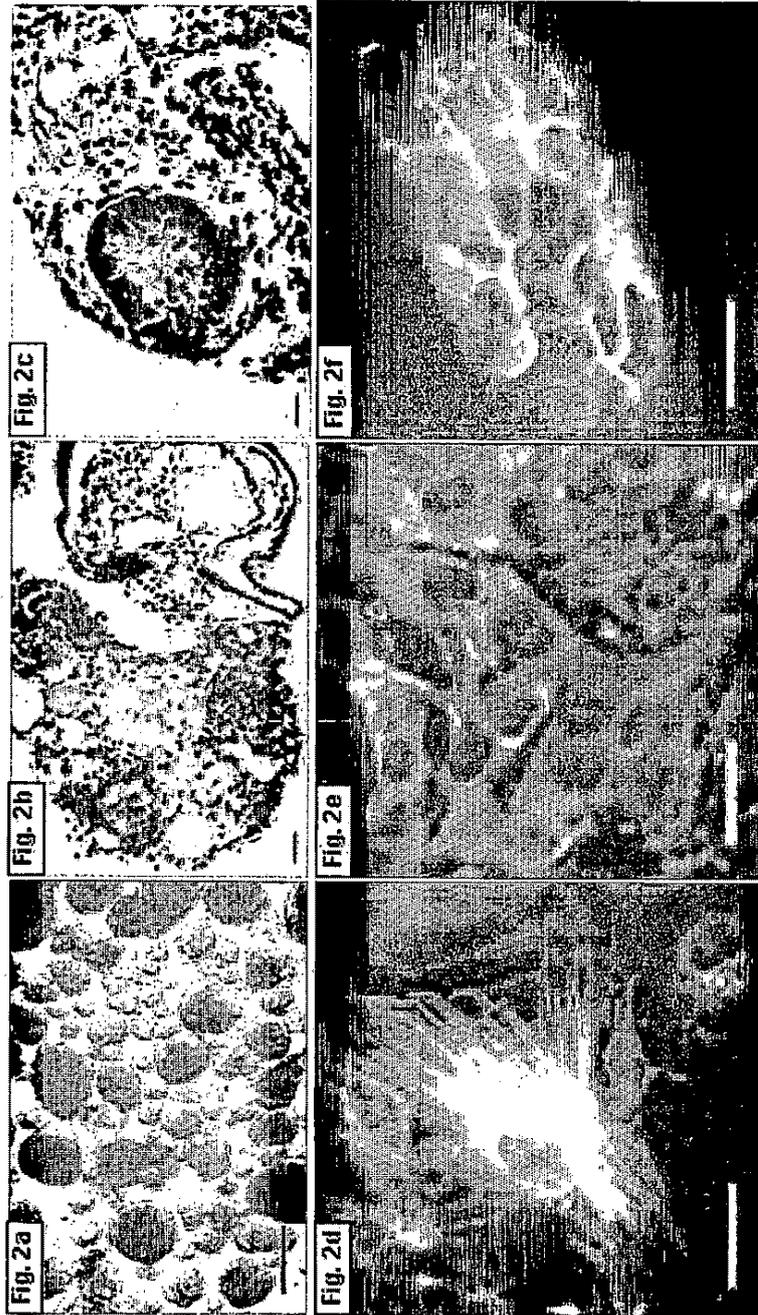
15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes que comprende una matriz y un medio de cultivo tisular que comprende sustitutivo del suero, TGFβ₁ y bFGF, pudiendo mantener el sistema de cultivo sin células alimentadoras ni xenocontaminantes, células madre embrionarias humanas cultivadas en su interior, en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado.
2. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz es fibronectina de origen humano.
- 10 3. El sistema de cultivo de la reivindicación 2, en el que dicha fibronectina de origen humano se selecciona del grupo que consiste en fibronectina de plasma humano, fibronectina de plasma humano recombinante, fibronectina celular humana, fibronectina celular humana recombinante y fibronectina sintética.
- 15 4. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho sustitutivo del suero se proporciona a una concentración de al menos 10 %.
5. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho sustitutivo del suero se proporciona a una concentración de 15 %.
- 20 6. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho TGFβ₁ se proporciona a una concentración de al menos 0,06 ng/ml.
7. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho TGFβ₁ se proporciona a una concentración de 0,12 ng/ml.
- 25 8. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho bFGF se proporciona a una concentración de al menos 2 ng/ml.
9. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho bFGF se proporciona a una concentración de 4 ng/ml.
- 30 10. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo comprende adicionalmente LIF.
11. El sistema de cultivo de la reivindicación 10, en el que dicho LIF se proporciona a una concentración de al menos 500 u/ml.
- 35 12. El sistema de cultivo de la reivindicación 10, en el que dicho LIF se proporciona a una concentración de 1.000 U/ml.
13. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho TGFβ₁ se proporciona a una concentración de 0,06-0,24 ng/ml
- 40 14. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho bFGF se proporciona a una concentración de 2-8 ng/ml.
- 45 15. El sistema de cultivo de la reivindicación 1, en el que dicho TGFβ₁ se proporciona a una concentración de 0,06-0,24 ng/ml y dicho bFGF se proporciona a una concentración de 2-8 ng/ml.
- 50 16. El sistema de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho sistema de cultivo puede mantener dichas células madre embrionarias humanas cultivadas en su interior, en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 38 pases.
- 55 17. El sistema de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho sistema de cultivo puede mantener dichas células madre embrionarias humanas cultivadas en su interior, en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 5 pases.



Figs. 1a-h



Figs. 2a-f

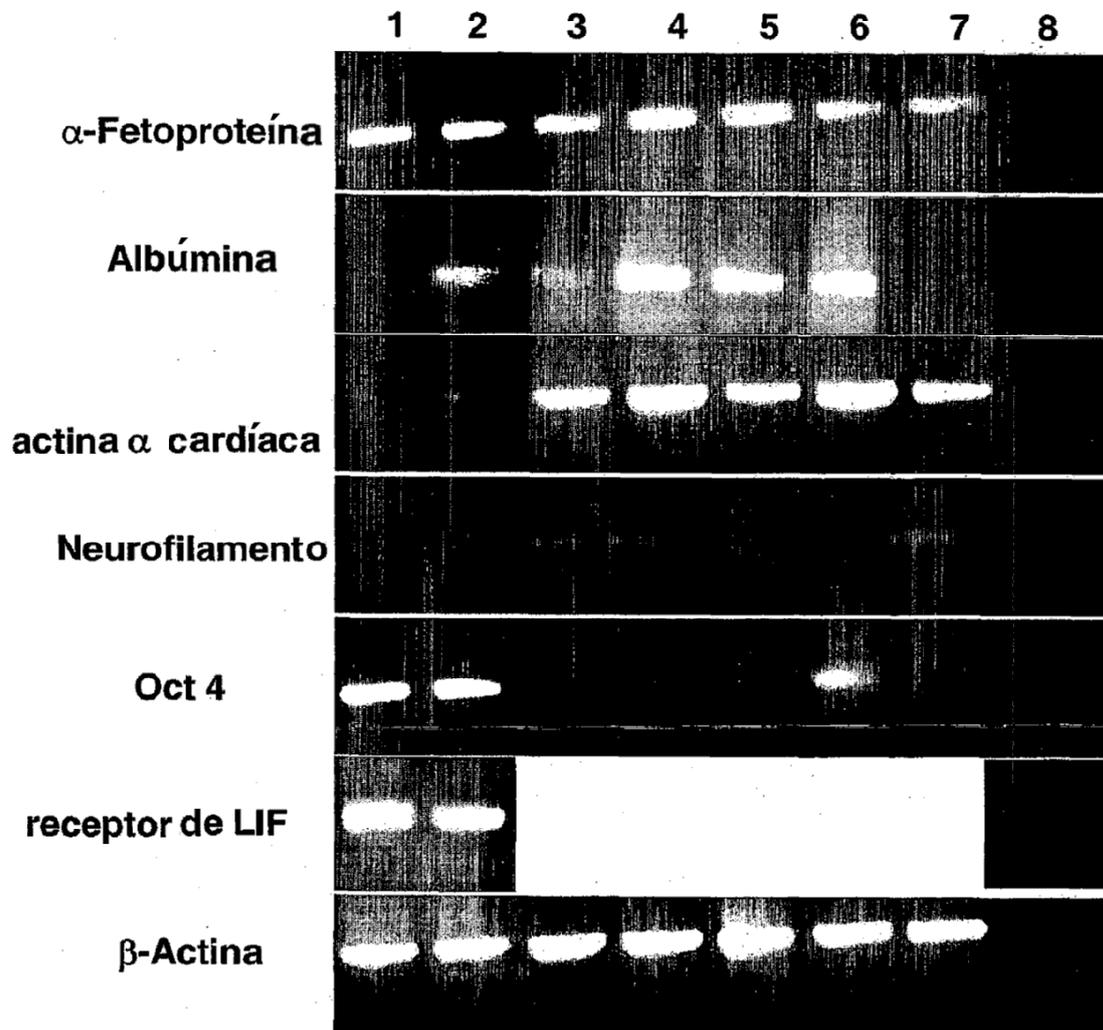
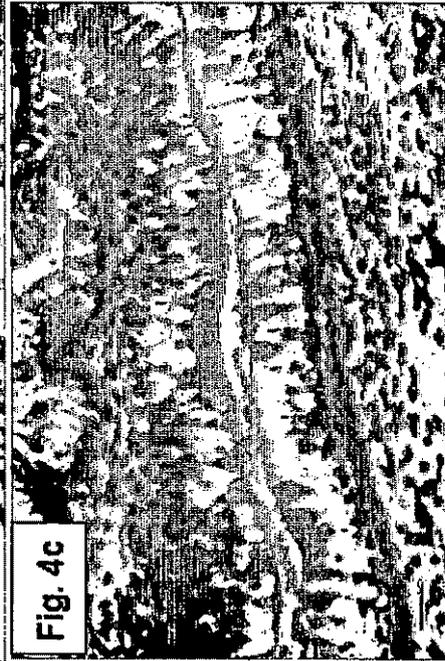
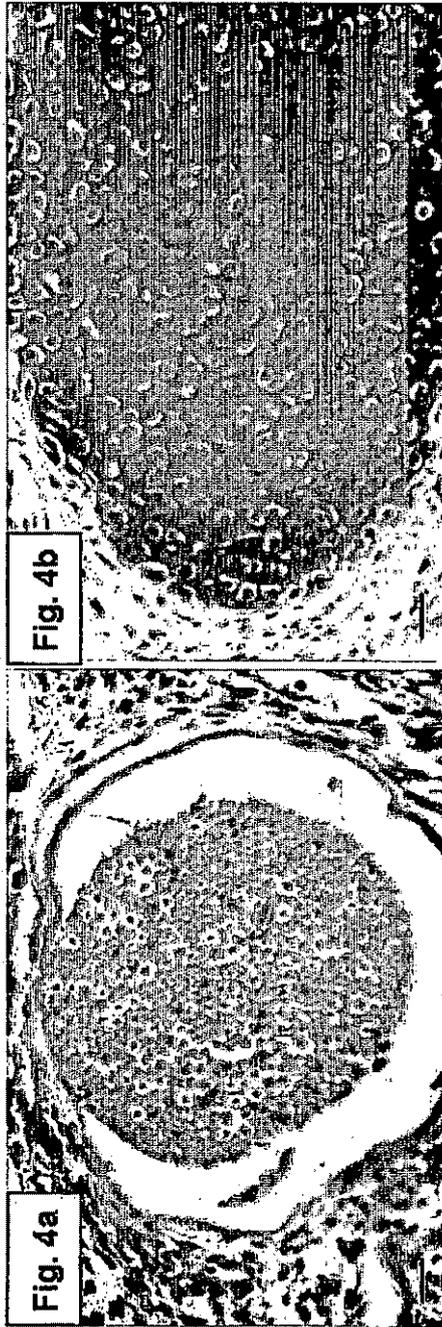
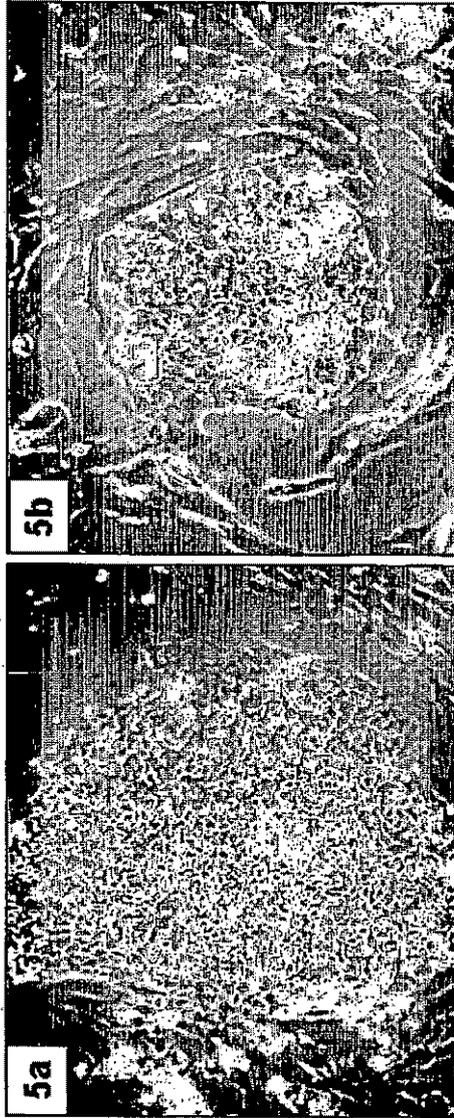


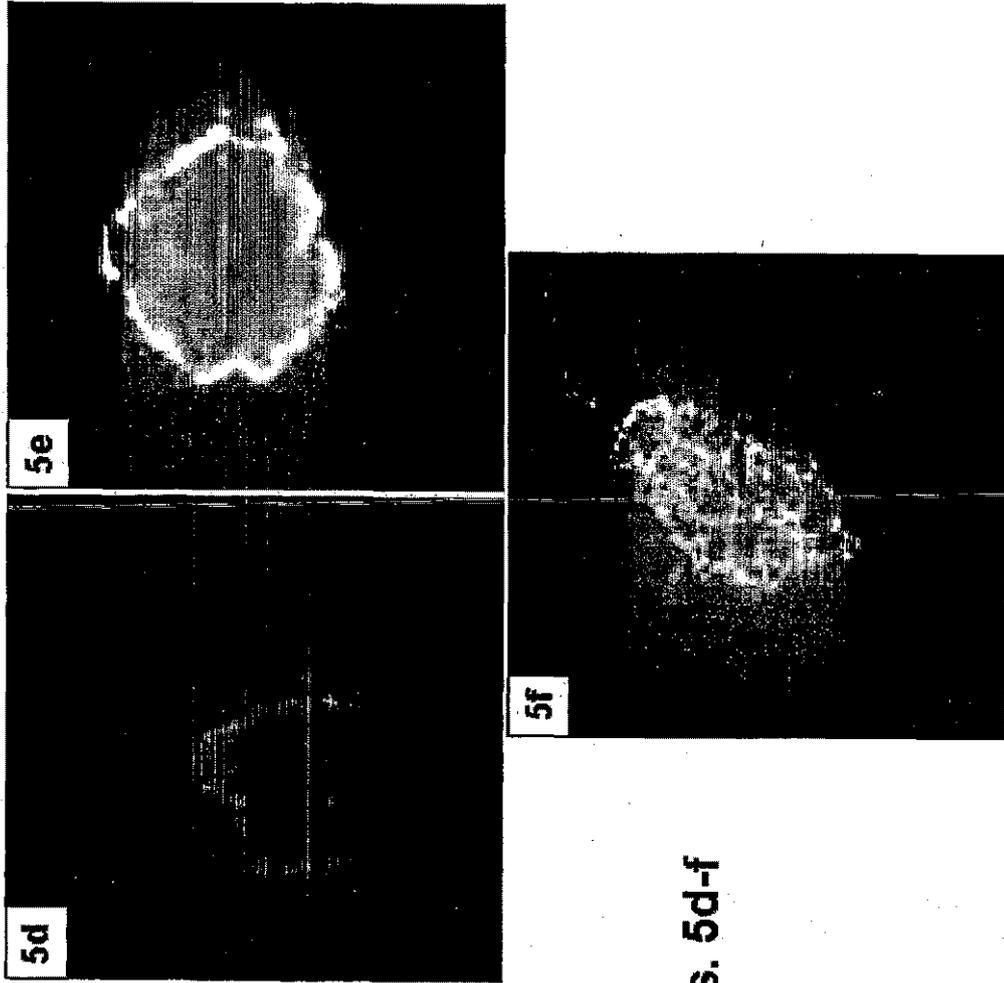
Fig. 3



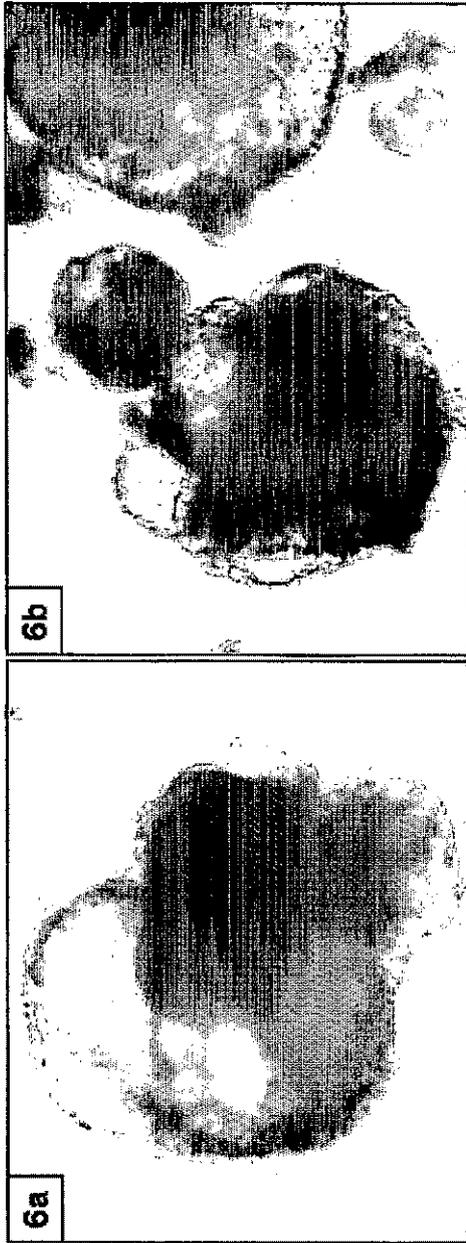
Figs. 4a-c



Figs. 5a-c



Figs. 5d-f



Figs. 6a-c

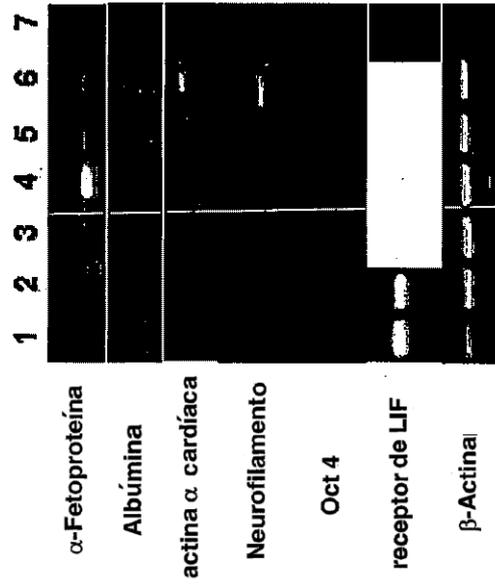


Figura 7

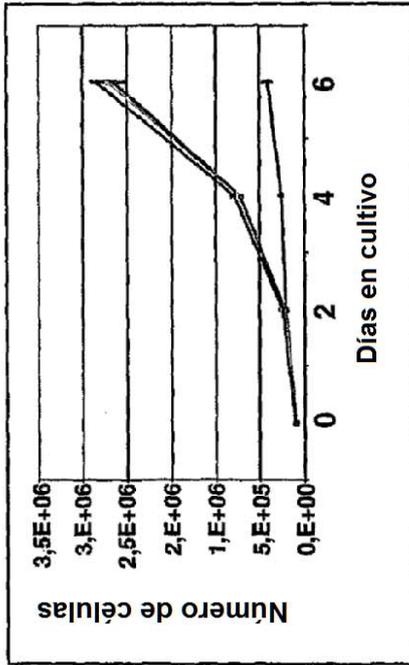
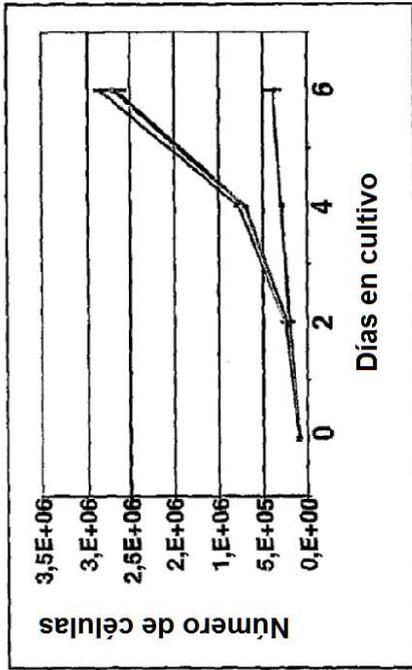


Fig. 8a

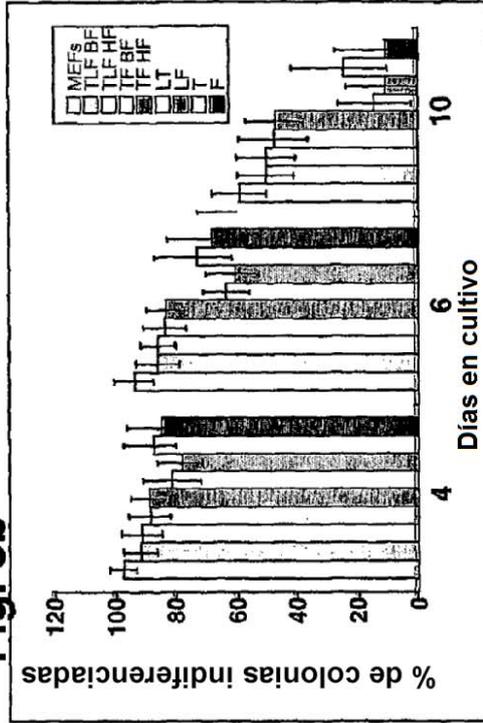


Fig. 8c

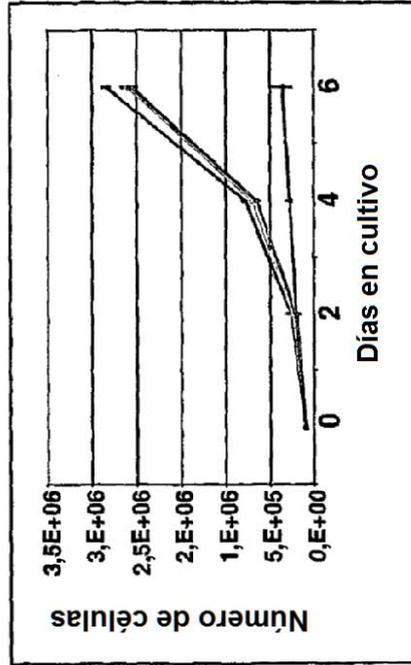
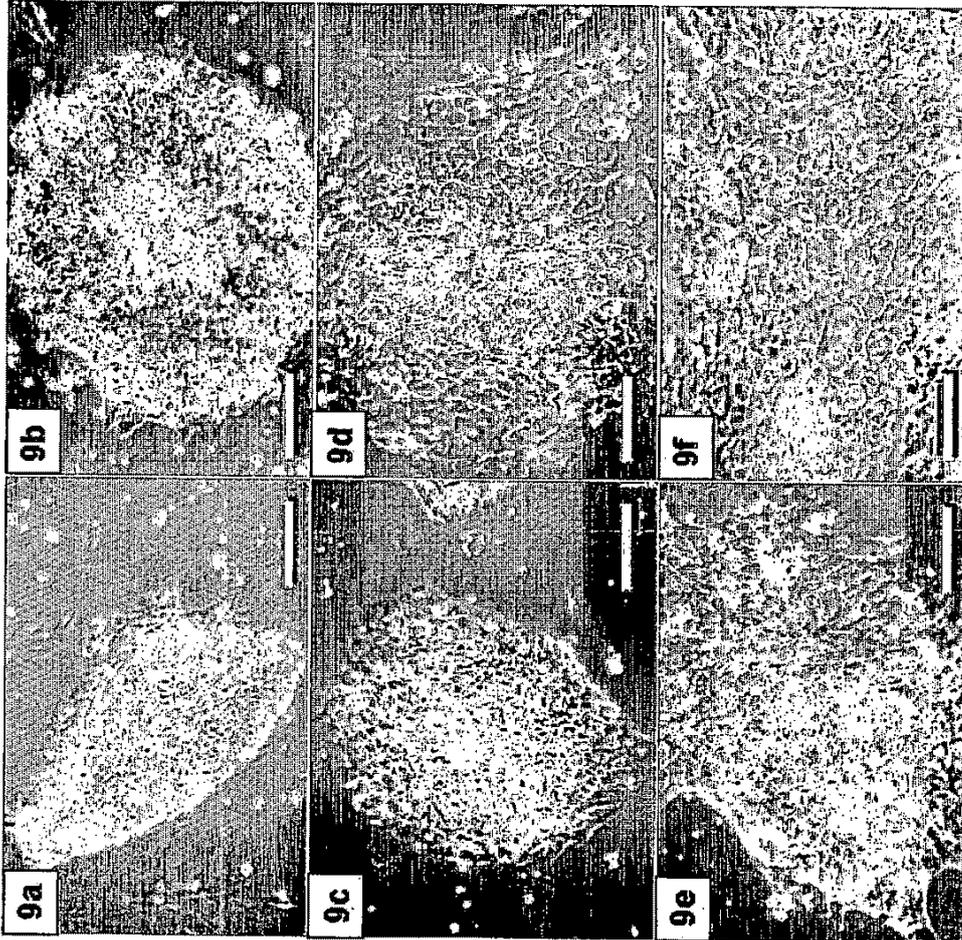
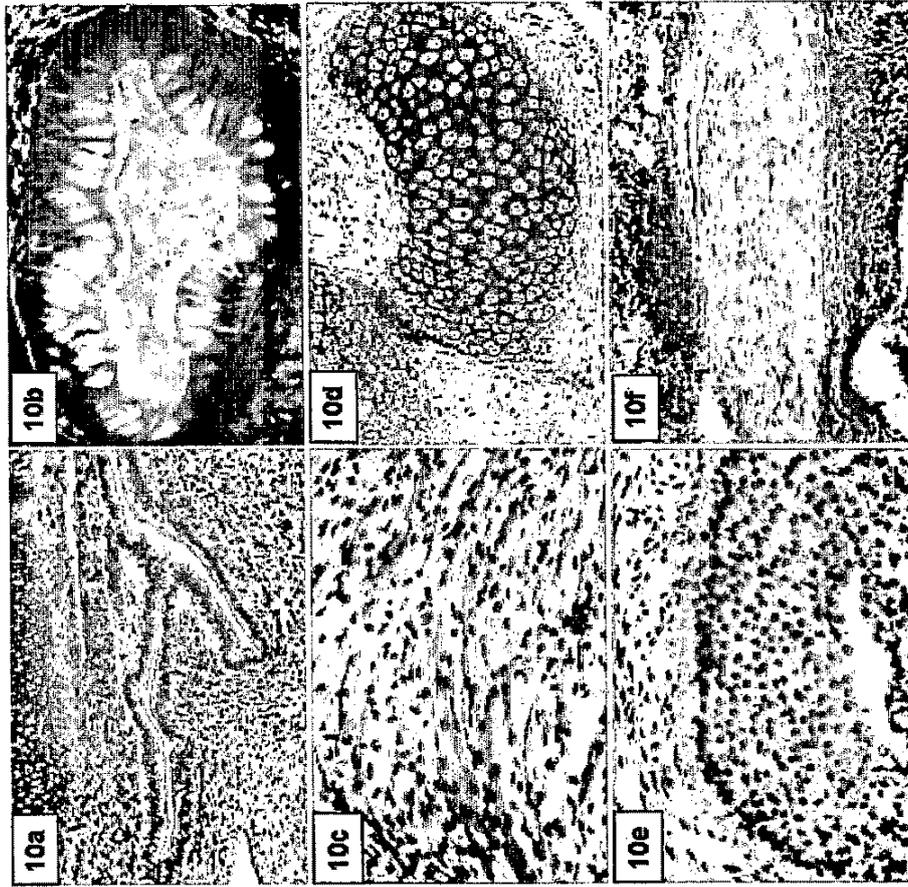


Fig. 8d



Figs. 9a-f



Figs. 10a-f