

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 586**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2005 PCT/US2005/031839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2006 WO06029198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2005 E 05806471 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1797172**

54 Título: **Cultivo de células madre embrionarias humanas**

30 Prioridad:

08.09.2004 US 608040 P
29.06.2005 US 695100 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 WALNUT STREET, P.O. BOX 7365
MADISON, WI 53707-7365, US

72 Inventor/es:

THOMSON, JAMES, A. y
LUDWIG, TENNEILLE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 586 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

Cultivo de células madre embrionarias humanas

Antecedentes de la invención

Las células madre se definen como células capaces de diferenciarse en otros muchos tipos de células diferenciadas. Las células madre embrionarias son células madre procedentes de embriones que son capaces de diferenciarse en la mayoría, si no todos, los tipos celulares diferenciados de un cuerpo adulto. Las células madre se describen como pluripotenciales, lo que hace referencia a su capacidad para diferenciarse en muchos tipos celulares. Un tipo de célula precursora pluripotencial de gran interés para la comunidad investigadora es la célula madre embrionaria humana, nombrada en este documento célula ES, que es una célula madre embrionaria derivada de una fuente embrionaria humana. Las células madre embrionarias humanas son de gran interés científico porque son capaces de proliferar indefinidamente en medios de cultivo y así son capaces, al menos en principio, de proporcionar células y tejidos que permiten reemplazar tejidos humanos que fallan o defectuosos. La existencia de células madre embrionarias humanas en cultivo ofrece un potencial de cantidades ilimitadas de células y tejidos humanos para emplear en una gran variedad de protocolos y programas de investigación de ayuda para la salud humana. Se prevé que en el futuro las células madre embrionarias humanas proliferarán y se orientarán a diferenciarse en linajes específicos de forma que se desarrollen células o tejidos diferenciados que puedan trasplantarse en cuerpos humanos con fines terapéuticos.

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

Varias formulaciones de medios permiten que las células ES humanas permanezcan indiferenciadas durante cierto tiempo, pero este estado falla a menudo en el automantenimiento. En particular, el solicitante ha definido el crecimiento de células ES humanas desde un estado de siembra inicial en un recipiente de cultivo hasta la confluencia en el mismo recipiente de cultivo como un "pase". El solicitante ha encontrado varias formulaciones de medios que permiten el cultivo de células ES humanas durante uno o dos pases sin una diferenciación estricta, pero posteriormente las células se diferencian rápidamente durante pases sucesivos. El solicitante entiende que para que un medio permita verdaderamente la proliferación indefinida de células ES humanas sin diferenciación, en ausencia de un medio condicionado o células alimentadoras de fibroblastos, debe demostrarse que el medio puede mantener el cultivo de células ES humanas en un estado sustancialmente uniforme e indiferenciado durante al menos cinco pases. También es importante que los cultivos permanezcan relativamente homogéneos e indiferenciados durante el periodo de cultivo y conserven todas las características significativas de las células ES humanas.

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

do de cultivos de células ES indiferenciadas.

El estado de diferenciación de un cultivo de células madre puede evaluarse a través de las características morfológicas. Las células madre indiferenciadas tienen una morfología característica, es decir, son células pequeñas y compactas con bordes celulares claramente definidos, una morfología que puede verse fácilmente mediante el examen de un cultivo de células madre con un microscopio. En cambio, las células que se han diferenciado aparecen más grandes y más difusas, con bordes poco definidos. Aunque algunas células diferenciadas pueden, y normalmente lo hacen, aparecer en el margen de las colonias de células indiferenciadas, el cultivo óptimo de células madre es aquel que prolifera en el recipiente de cultivo con solo un número mínimo de células que parezcan estar diferenciadas en la periferia del cultivo. Con experiencia se puede evaluar visualmente con gran exactitud el estado de diferenciación y la salud de los cultivos de células ES humanas.

Además, la suficiencia de un medio para soportar la derivación de nuevas líneas de células ES humanas es un criterio aún más estricto para la suficiencia de las condiciones de cultivo de la célula madre. Algunas condiciones de cultivo que dan soporte a la expansión y al crecimiento de líneas de células madre existentes, no han probado que sean suficientes para uso en la derivación de nuevas líneas de células ES humanas. Parece que la capacidad para dar soporte en la iniciación de nuevas líneas de células madre es una capacidad que no presentan todas las condiciones de cultivo de células madre. El documento WO 03/020920 describe un sistema de cultivo para una expansión rápida de las células madre embrionarias humanas. Amit et al. (Biology of Reproduction, 2004; 70: 837-845) describen el cultivo exento de capa alimentadora y suero, de células madre embrionarias humanas. El documento WO 2004/055155 describe métodos de preparación de células madre embrionarias humanas y de cultivos de células madre exentos de células alimentadoras y xenobióticos, empleando los mismos. Carpenter et al. (Developmental Dynamics, 2004; 229(2): 243-258) describen las propiedades de cuatro líneas de células madre embrionarias humanas mantenidas en un sistema de cultivo exento de células alimentadoras. Schmidt et al. (The International Journal of Developmental Biology, 2001; 45(2):421-429) describen que el litio influye en la diferenciación y en la expresión génica específica de tejido de células madre embrionarias de ratón (ES) *in vitro*. Aubert et al. (Nature Biotechnology, 2002; 20(12):1240-1245) describen que el escrutinio de genes funcionales en células madre embrionarias implica un antagonismo de Wnt en la diferenciación neural. Park et al. (Anatomical Science International, 2004; 79:337) describen que la activación de Wnt no estaba acompañada con un mantenimiento de la pluripotencia sino con una diferenciación de las células madre embrionarias humanas.

Breve compendio de la invención

La presente invención se resume como un medio de cultivo celular que comprende, en cantidades suficientes para mantener las células madre en un estado indiferenciado a través de múltiples pases del cultivo, albúmina, minerales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, lípidos, una transferrina o un sustituto de transferrina, insulina o un sustituto de insulina, y todos menos uno de los siguientes constituyentes: factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de 10 ng/ml a 1000 ng/ml, ácido gamma amino butírico, ácido pipécólico, TGFβ y una sal de litio, estando el medio exento de células alimentadoras y sin haber estado expuesto nunca a células alimentadoras. La sal de litio es preferentemente cloruro de litio.

También se describe en esta memoria un cultivo celular *in vitro* de células madre embrionarias humanas cultivadas en un medio de la invención.

El medio de la presente invención permite la creación de nuevas líneas de células madre embrionarias humanas que no han sido expuestas a productos animales, células alimentadoras o medio condicionado.

Es un objeto de la descripción definir las condiciones de cultivo a largo plazo para células madre embrionarias humanas que eviten el uso de células animales, ya sean células alimentadoras o para un medio condicionado en el que se cultivan las células madre.

Es otro objeto de la descripción definir las condiciones de cultivo para células madre embrionarias humanas que son como se han definido en la manera de lo posible, evitando al mismo tiempo la exposición a células animales o proteínas animales.

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

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La Fig. 1 es una ilustración gráfica de algunos de los datos de los ejemplos siguientes.

La Fig. 2 es una ilustración gráfica adicional de datos de los ejemplos siguientes.

Descripción detallada de la invención

Ahora se han identificado múltiples condiciones de cultivo y medios que permiten el cultivo indefinido y la proliferación de células madre embrionarias humanas en estado indiferenciado y también en ausencia completa tanto de

células alimentadoras como de medio condicionado. Las condiciones del cultivo y los medios descritos en esta memoria están totalmente exentos de productos animales y todas las proteínas son de origen humano. El desarrollo de estos medios y condiciones de cultivo hace posible la derivación y el mantenimiento de líneas de células ES humanas en condiciones definidas y controladas, sin una exposición directa o indirecta a células animales de cualquier tipo, y también posibilita la derivación de nuevas líneas de células ES humanas que no han estado nunca expuestas a células animales o a un medio en el que se hayan cultivado células animales. El medio está exento de productos animales o proteínas. Se ha demostrado que este medio permite la proliferación de células ES indiferenciadas a través de al menos veinticinco pases, lo que es una firme evidencia de que sustentará dichos cultivos indefinidamente. El medio preferido también ha demostrado ahora ser suficiente para permitir la derivación de nuevas líneas de células ES humanas, y estas nuevas líneas han pasado a través de más de diez pases en cultivo.

En el pasado, a veces ha existido la práctica de referirse al uso de un medio condicionado como la creación de condiciones de cultivo "exentas de alimentación". Esta expresión es una denominación incorrecta, ya que todavía se requieren células alimentadoras de algún tipo para condicionar el "medio condicionado". En esta memoria se describen condiciones de cultivo que permiten el cultivo "independiente de un alimentador" de células ES humanas. Por "independiente de un alimentador" se entiende que no se necesitan células alimentadoras de ningún tipo, humanas o animales, en ninguna parte del proceso y no son necesarias ni para el cultivo ni para condicionar el medio. Las condiciones independientes del alimentador no requieren células alimentadoras en absoluto para ningún propósito.

Un medio definido y humanizado para el cultivo y la proliferación de células ES humanas normalmente incluye sales, vitaminas, una fuente de energía tal como glucosa, minerales y aminoácidos. Para complementar el medio y proporcionar unas condiciones que permitan el crecimiento celular, inicialmente los medios de cultivo de células madre incluían suero procedente de una fuente u otra. También se ha informado previamente de que la adición de un factor de crecimiento de fibroblastos además de un aditivo de sustitución del suero, permitirá el cultivo de células ES humanas sin suero. El sustituto del suero puede ser un producto comercial disponible, vendido para ese propósito o puede ser una mezcla formulada de proteína, tal como albúmina sérica, vitaminas, minerales, una transferrina o un sustituto de transferrina, e insulina o un sustituto de la insulina. Este componente sustitutivo del suero puede complementarse también con selenio y con una mezcla de lípidos. En la presente invención se prefiere que, para cultivar células ES humanas, se utilice una mezcla de aditivo sustituto de suero definido, en lugar de un suero procedente de cualquier fuente, con el fin de evitar los aspectos de variación en los componentes del suero y utilizar medios tan definidos como sea posible. Otros factores de crecimiento que se ha encontrado que son ventajosos para añadir al medio de cultivo son GABA, ácido pipécólico, cloruro de litio y factor de crecimiento transformante beta (TGF β), aunque el TGF β puede no ser necesario con niveles crecientes de FGF añadidos al medio.

Para evitar la necesidad de una capa alimentadora de fibroblastos, que anteriormente se consideraba necesaria para mantener las células ES humanas en un estado indiferenciado, en esta memoria se describe que la combinación del uso de mayores concentraciones de FGF (10 a 1000 ng/ml) junto con el uso de ácido gamma amino butírico (GABA), ácido pipécólico, cloruro de litio y TGF β , permitirá que un medio sustente el crecimiento de células madre indiferenciadas. Se ha encontrado que la combinación de estos aditivos es suficiente para mantener indefinidamente el cultivo de células ES humanas en un estado indiferenciado, sin exposición ya sea a células alimentadoras o a medios condicionados. Se ha demostrado que estos aditivos son suficientes. No obstante, no todos ellos pueden ser necesarios en todas las formulaciones de medios. Mediante una eliminación selectiva de estos aditivos, se puede determinar empíricamente si uno o más de ellos no son necesarios para conseguir este resultado para un medio dado. No obstante, queda claro que la combinación es suficiente para permitir una variedad de medios que sustenten el cultivo a largo plazo y la proliferación de células ES humanas indiferenciadas sin células alimentadoras o medio condicionado.

Estos constituyentes están sujetos a alguna variación. Por ejemplo, el LiCl se utiliza en el medio, ya que estimula la vía wnt. Las wnts por sí mismas u otros estimuladores de esta vía como la activina, podrían ser sustituidas como equivalentes de LiCl, aunque LiCl es probablemente el agente más económico para este propósito. De forma similar, se cree que el GABA interacciona con el receptor de GABA, y las publicaciones científicas incluyen la identificación de varias moléculas que son agonistas de ese mismo receptor y podrían sustituir a GABA en el medio como un equivalente. También se cree que PA también interacciona con el receptor de GABA. Aunque tanto PA como GABA resultaron ser útiles en el medio en las concentraciones usadas en esta memoria, también se prevé que uno u otro de estos constituyentes podría incrementarse dramáticamente en concentración para obviar la necesidad del otro.

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

También es útil incluir en las condiciones de cultivo de células ES humanas una matriz biológica en el recipiente del cultivo. Un material de este tipo que se ha utilizado previamente es MatrigelTM, que es una membrana basal artificial procedente de células de ratón, que se suministra como un producto comercial exento de células de ratón. Sin embargo, el uso de Matrigel introduce en el cultivo un material que está mal definido y que incluye material de origen murino. En esta memoria también se describe cómo crear una matriz biológica de proteínas humanas que sustituye completamente a Matrigel. Esta matriz está compuesta por cuatro proteínas humanas: colágeno aislado a partir de

placenta humana, fibronectina aislada a partir de plasma humano, vitronectina aislada a partir de plasma humano y laminina aislada a partir de placenta humana. La combinación de estas cuatro proteínas es suficiente, pero el uso de las cuatro puede no ser necesario para impulsar el crecimiento y el cultivo de células ES humanas. El uso de una matriz de este tipo sin una entre vitronectina, fibronectina o laminina, pero incluyendo las otras tres proteínas, favorece el cultivo de células ES, con cierta pérdida de pureza en el estado de diferenciación del cultivo de células ES. El método de preparación de la matriz para el crecimiento de células ES se describe en los ejemplos siguientes.

Llegando a los aditivos del medio indicados anteriormente, se siguió la prueba metódica de más de 80 factores de crecimiento individuales. Mientras que algunos de los aditivos parecían, al menos en algunos pases, impulsar el crecimiento de células ES humanas en cultivo, muchos fracasaron en pases posteriores para mantener las células ES en un estado indiferenciado. Hemos sido capaces de identificar combinaciones de estos otros factores que dieron los resultados de los aditivos de medios descritos en los ejemplos a continuación.

La observación de que los cultivos de células madre embrionarias (ES) humanas se habían mantenido previamente en un estado indiferenciado, solo cuando se cultivaban en presencia de células alimentadoras de fibroblastos, o en un medio condicionado, ha llevado a la especulación de que los fibroblastos liberan en el medio un factor que actúa para inhibir la diferenciación de las células ES. Los datos presentados a continuación demuestran que este no es el caso. Sin embargo, independientemente del efecto que está mediado por las células alimentadoras de fibroblastos en el medio, ahora está claro que los medios descritos a continuación sustituirán ese efecto. El medio descrito a continuación está definido, no contiene células animales y permite un cultivo a largo plazo de células ES humanas indiferenciadas. Se presenta un ejemplo de un medio en el que las proteínas en el medio son todas humanas, para tener un medio "humanizado" y una matriz para impedir cualquier objeción relativa a productos subcelulares de origen animal.

También se describe a continuación la derivación de nuevas líneas de células madre embrionarias humanas utilizando este medio. Estas líneas de células ES humanas, por lo tanto, nunca han estado expuestas a células alimentadoras, a medio condicionado, a productos animales o a proteínas animales. Se ha informado previamente de que las líneas de ES humanas anteriores presentan una forma de ácido siálico (Neu5Gc) que no se encuentra de forma natural en las células humanas, ya sea en cultivo o en el cuerpo. Puesto que las líneas de ES humanas anteriores adquirieron el Neu5Gc a partir de condiciones de cultivo que incluían componentes murinos, las nuevas líneas de células ES humanas descritas en esta memoria estarán y están completamente exentas de Neu5Gc.

Ejemplos de referencia

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

Aunque un medio con todos los constituyentes anteriores es suficiente y se prefiere, no todos los componentes son necesarios para el cultivo exitoso de células ES humanas. Dependiendo de la cantidad de células diferenciadas que se esté dispuesto a tolerar, algunos de los componentes del medio se pueden omitir en un medio, particularmente si el medio se usa solo para unos pocos pases. Para investigar qué constituyentes podrían omitirse, se cultivaron células ES humanas sobre variantes del medio anterior, omitiendo diferentes componentes. Se extendieron en placas doscientas mil células y se cultivaron durante 7 días sobre los medios experimentales, dos pocillos por tratamiento. Las células se sometieron a ensayo después para estudiar la expresión del factor de transcripción Oct4, un marcador reconocido de células indiferenciadas. Los datos de ese experimento se presentan como un gráfico en la Fig. 1, en donde los números de células que expresan Oct4 en cada medio experimental se presentan como una fracción de las mismas desde el medio preferido TeSR1. Téngase en cuenta que el TGFβ parece ser el componente menos necesario, al menos en presencia de altos niveles de FGF para un cultivo a corto plazo. Obsérvese también que otros constituyentes omitidos dan lugar a porcentajes incrementados de células indiferenciadas, pero las diferencias son cuantitativas y el medio funciona sin esos componentes, al menos hasta cierto punto, para pases celulares limitados.

El medio también se ha utilizado para cultivar células ES humanas utilizando un nuevo material de matriz de origen humano. La nueva matriz se compone de las siguientes cuatro proteínas:

1. Colágeno (aislado a partir de placenta humana) a una concentración final de 10 µg/100 µl/cm².
2. Fibronectina (aislada a partir de plasma humano) a una concentración final de 5 µg/100 µl/cm².
3. Vitronectina (aislada a partir de plasma humano) a una concentración final de 0,2 µg/100 µl/cm².
4. Laminina (aislada a partir de placenta humana) a una concentración final de 5 µg/100 µl/cm².

Para ensamblar esta matriz, el colágeno se desnatura con GuHCl 6 M (guanidina HCl), se filtra a través de un filtro de 0,45 micrómetros y se congela en partes alícuotas. Después de descongelar, el colágeno desnaturado se

diluyó en un PBS exento de Ca y Mg para alcanzar la concentración final apropiada y se extendió en placas. Las placas recubiertas se incubaron a temperatura ambiente durante no menos de 1 hora, antes de que los componentes adicionales de la matriz se extendieran en placas. Después de esta incubación inicial, componentes adicionales de la matriz (Fibronectina, Vitronectina y Laminina) se diluyeron en un PBS exento de Ca y Mg para alcanzar la

5 concentración final apropiada y se extendieron en placas. Las placas recubiertas se incubaron a temperatura ambiente durante no menos de 1 hora antes de extender en placas las células ES humanas.

Usando el nuevo material de la matriz, células ES humanas de líneas que existían previamente se han cultivado durante un mínimo de 10 pases, a la vez que permanecían indiferenciadas y proliferaban.

10 Para someter a ensayo la estricta necesidad de los componentes de la matriz humanizada, se formularon variaciones de la matriz, omitiendo uno o varios componentes. Los datos de ese experimento se presentan en la Fig. 2. Las letras iniciales para cada condición experimental representan las proteínas en la matriz (C-colágeno, F-fibronectina, V-vitronectina y L-laminina). Obsérvese que las membranas CFV, CVL y CFL funcionan bien y mantienen las células ES en un estado indiferenciado, pero simplemente no son tan propicias para el crecimiento de cultivos celulares como la condición de la matriz CVFL.

15 Este medio también ha demostrado ser capaz de impulsar el inicio de nuevas líneas de células madre embrionarias humanas. El proceso de derivación para nuevas líneas puede ser una prueba difícil para las formulaciones de un medio, pero el uso del medio definido permite crear nuevas líneas de células madre embrionarias humanas que no han estado expuestas a proteínas o a matrices animales y nunca han estado expuestas a células alimentadoras o a un medio en el que se habían cultivado células alimentadoras. Se cree que esto es un logro novedoso.

20 Este trabajo se llevó a cabo solo después de obtener la aprobación de la junta de revisión institucional y el consentimiento informado de los donantes. Se donaron embriones humanos congelados que fueron creados para protocolos humanos de fertilización *in vitro*, pero que excedieron las necesidades clínicas. Los embriones se descongelaron y se cultivaron hasta la etapa de blastocisto, utilizando un sistema de cultivo de embriones secuencial, comercialmente disponible (serie Vitrolife-GIII). Después de la eliminación de la zona pelúcida, la masa celular interna (ICM) de los blastocistos humanos se aisló mediante inmunocirugía (Solter y Knowles, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:5099-5102) o como soportes completos cultivados (Evans y Kaufman, 1981, Nature, 292:154-156) y se extendieron en placas de cultivo de 4 pocillos sobre el medio TeSR1 definido, con la matriz humanizada definida como se ha descrito anteriormente (CVFL). Después de 48 horas iniciales de cultivo, el medio de cultivo TeSR1 se reemplazó

25 diariamente. Después de 14 a 21 días, se aislaron mecánicamente grupos de células y se volvieron a sembrar en placas con CVFL de nuevo aporte. El aislamiento mecánico continuó durante los 2 a 3 pases siguientes, después de lo cual se realizaron pases en las colonias utilizando la enzima dispasa. Se confirmó que las nuevas colonias eran nuevas líneas de células madre embrionarias humanas.

30

Utilizando el medio TeSR1 sobre los cuatro componentes de la matriz humana, identificados anteriormente, se derivaron dos nuevas líneas de células ES humanas a partir de 5 blastocistos cultivados. En el momento de escribir este

35 documento, ambas líneas de células ES humanas han estado continuamente en cultivo durante 6 meses a través de pases sucesivos. Las líneas son estables y morfológicamente similares a las anteriores líneas de células madre. Análisis con FACS y RT-PCR, y transferencia Western, demostraron que estas células expresan una serie de marcadores característicos de las células ES humanas. Los cuerpos embrionarios obtenidos a partir de estas líneas celulares expresaban marcadores de las tres capas germinales, y ambas líneas celulares formaban teratomas cuando se inyectaban en ratones SCID-beige. Después de 4 meses en cultivo, una línea celular era XXY (síndrome de Klinefelter) y la otra era cariotípicamente normal. El síndrome de Klinefelter es una de las anomalías cromosómicas humanas más comunes, lo que sugiere que esta anomalía puede haber estado presente en el propio embrión, en lugar de un artefacto introducido por el proceso de iniciar el cultivo de las células madre.

40

TABLA 1 Formulación completa del medio TeSR1

SALES INORGÁNICAS	mM	AMINOÁCIDOS	mM
Cloruro cálcico (Anhidro)	0, 8232	L-Alanina	0,1392
HEPES	11,76	Clorhidrato de L-Arginina	0,5488
Cloruro magnésico (Anhidro)	0,2352	L-Asparagina-H ₂ O	0,1392
Sulfato magnésico (MgSO ₄)	0,319088	Ácido L-aspartico	0,1392
Cloruro potásico (KCl)	3,26144	L-Cisteína-HCl-H ₂ O	0,0784
Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	11,2112	L-Cistina 2HCl	0,0784
Cloruro sódico (NaCl)	94,55824	Ácido L-glutámico	0,1392
Fosfato sódico, dibásico (Anhidro)	0,392	L-Glutamina	2,96
Fosfato sódico, monobásico (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	0,355152	Glicina	0,296
MINERALES TRAZA		L-Histidina-HCl-H ₂ O	0,1176
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	0,00009408	L-Isoleucina	0,326144
Sulfato férrico (FeSO ₄ -7H ₂ O)	0,001176	L-Leucina	0,353584
Sulfato de cobre (CuSO ₄ -5H ₂ O)	4,0768E-06	Clorhidrato de L-Lisina	0,391216
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	0,001176	L-Metionina	0,090944
Metavanadato sódico NH ₄ VO ₃	0,000056	L-Fenilalanina	0,16856
Sulfato de manganeso Mn SO ₄ H ₂ O	1,00592E-05	L-Prolina	0,2176
Molibdato amónico	1,00404E-05	L-Serina	0,296
NiSO ₄ 6H ₂ O	4,94861E-06	L-Treonina	0,352016
Metasilicato sódico Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	0,004926108	L-Triptófano	0,0346528
SnCl ₂	5,32544E-06	L- Tirosina 2Na 2H ₂ O	0,167776
CdCl ₂	6,21931E-05	L-Valina	0,354368
CrCl ₃	9,41176E-06	VITAMINAS	
AgNO ₃	5,00293E-06	Ácido ascórbico	0,375
AlCl ₃ 6H ₂ O	2,4855E-05	Biotina	1,12112E-05
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	4,99217E-05	Cloruro de colina	0,0502544
CoCl ₂ 6H ₂ O	5,0021E-05	Pantotenato D-calcio	0,0036064
GeO ₂	2,5337E-05	Ácido fólico	0,004704
KBr	5,04202E-06	i-Inositol	0,05488
KI	5,12048E-06	Niacinamida	0,012936
NaF	0,000500119	Clorhidrato de piridoxina	0,0076048
RbCl	5,00414E-05	Riboflavina	0,0004704
ZrOCl ₂ 8H ₂ O	9,03834E-05	Clorhidrato de tiamina	0,02460217
FACTORES DE CRECIMIENTO		Vitamina B12	0,000392
GABA	0,979	SUSTRATOS ENERGÉTICOS	
Ácido pipecólico	0,000984	D-Glucosa	13,72784
bFGF	5,80E-06	Piruvato sódico	0,392
LiCl	0,979	PROTEÍNAS	
TGF beta 1	2,35E-08	Insulina humana	0,0034438
LÍPIDOS		Holotransferrina humana	0,14
Ácido linoléico	0,0070976	Albúmina sérica humana	199,7
Ácido lipoico	0,00039984	OTROS COMPONENTES	
Ácido araquidónico	0,001312	Glutación (reducido)	0,00592996
Colesterol	0,0113798	Hipoxantina Na	0,01176
Acetato de DL-alfa tocoferol	0,02962	Rojo Fenol	0,0159936
Ácido linolénico	0,007184	Putrescina-2HCl	0,000394352
Ácido mirístico	0,008758	Timidina	0,001176
Ácido oleico	0,00708	2-mercaptoetanol	0,1
Ácido palmitoleico	0,007862	Selenio	0,000177304
Ácido esteárico	0,00703	Pluronic F-68	0,238
		Tween 80	0,3358

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular que comprende, en cantidades suficientes para mantener las células madre en un estado indiferenciado a través de múltiples pases del cultivo, albúmina, minerales, vitaminas, aminoácidos, glucosa, lípidos, una transferrina o un sustituto de transferrina, insulina o un sustituto de insulina y todos menos uno de los siguientes constituyentes: factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de 10 ng/ml a 1000 ng/ml, ácido gamma amino butírico, ácido pipecólico, TGFβ y una sal de litio, estando el medio exento de células alimentadoras y sin haber estado expuesto nunca a células alimentadoras.
2. El medio según la reivindicación 1, en el que la sal de litio es cloruro de litio.
3. El medio según la reivindicación 1 o 2, que comprende el factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de 10 ng/ml a 1000 ng/ml, ácido gamma amino butírico, ácido pipecólico y una sal de litio.
4. El medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio incluye el factor de crecimiento de fibroblastos en una concentración de 40 ng/ml a 100 ng/ml.

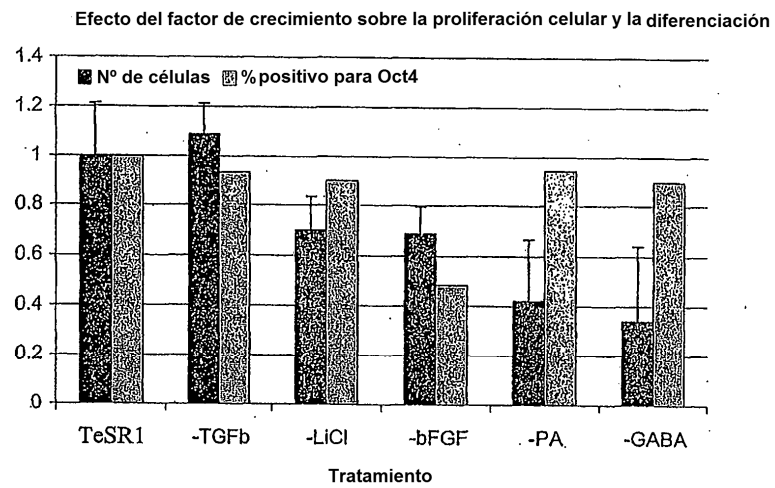


FIG 1

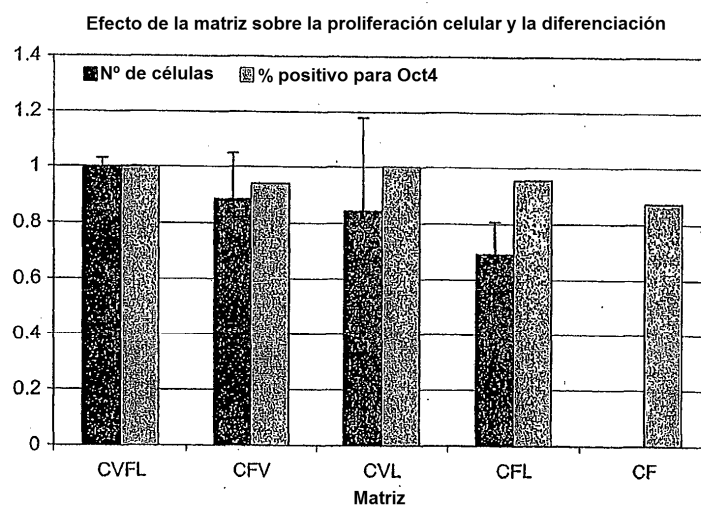


FIG 2