

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 059**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2010 E 14187130 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2821480**

54 Título: **Sustrato de cultivo para células madre pluripotentes humanas y uso del mismo**

30 Prioridad:

08.10.2009 JP 2009234583

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

21.11.2017

73 Titular/es:

**OSAKA UNIVERSITY (50.0%)
1-1, Yamadaoka Suita-shi
Osaka 565-0871, JP y
KYOTO UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SEKIGUCHI, KIYOTOSHI;
FUTAKI, SUGIKO;
TANIGUCHI, YUKIMASA;
HAYASHI, MARIA;
NAKATSUJI, NORIO;
MIYAZAKI, TAKAMICHI;
KAWASE, EIACHIRO y
SUEMORI, HIROFUMI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 643 059 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

Sustrato de cultivo para células madre pluripotentes humanas y uso del mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a un sustrato de cultivo para células madre pluripotentes humanas.

5 **Antecedentes de la técnica**

Las células madre pluripotentes humanas, tales como las células ES humanas y las células iPS humanas, han atraído la atención mundial por su aplicación potencial en medicina regenerativa. Para el cultivo y el mantenimiento de células madre pluripotentes humanas en un estado pluripotente, por lo general se emplea el co-cultivo con células alimentadoras tales como fibroblastos de ratón o humanos, pero el uso de células alimentadoras es una gran restricción a la aplicación clínica de células madre pluripotentes humanas. Con el fin de resolver este problema, se han probado diversas proteínas de adhesión en lugar de células alimentadoras para su uso como una matriz extracelular para las células ES humanas y se notificó que el Matrigel (nombre comercial), que se compone de componentes de la membrana basal extraídos y purificados de sarcoma EHS de ratón, conocido por producir componentes de la membrana basal en exceso, es muy eficaz en el mantenimiento de la pluripotencia. Sin embargo, puesto que el Matrigel es un producto derivado de ratón y una mezcla compleja de proteínas y polisacáridos xenógenos, no es adecuado para el cultivo de células madre pluripotentes humanas en medicina regenerativa.

Para la aplicación de las células madre pluripotentes humanas en medicina regenerativa, el cultivo celular debe realizarse en condiciones sin xenógenos, en las que el sistema de cultivo no contenga ningún componente xenógeno y en condiciones sin células alimentadoras, en las que no se utilizan células alimentadoras. Sobre la base de estos requisitos, se ha probado la vitronectina humana o la fibronectina humana para su uso como una matriz extracelular humana, pero en comparación con el Matrigel, ninguna de las dos es superior en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células ES humanas o en la eficiencia de unión de las mismas y son insatisfactorias en términos de calidad, disponibilidad de material de origen, seguridad, etc. Por tanto, en el desarrollo de matrices extracelulares adecuadas para el cultivo de mantenimiento de células madre pluripotentes humanas, hay mucho que mejorar, y se desea fuertemente el desarrollo de una nueva tecnología de cultivo de células madre pluripotentes humanas utilizando una matriz extracelular humana que tenga una composición química uniforme.

La laminina es una proteína de adhesión celular de gran importancia presente en la membrana basal. La laminina es una glicoproteína heterotrimérica grande que consiste en tres subunidades denominadas cadenas α , β y γ y tiene un peso molecular de 800.000 Da. Las tres subunidades se asocian entre sí a través de sus dominios de superenrollamiento en las regiones C-terminales y se ensamblan en un heterotrímero que se estabiliza mediante enlaces disulfuro dentro del mismo. Los presentes inventores examinaron el tipo de integrinas expresadas en las células ES humanas e informaron que la integrina $\alpha 6 \beta 1$ es un receptor de adhesión de gran importancia de células ES humanas y que las lamininas humanas recombinantes (en particular, la laminina 332, compuesta de cadenas $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\gamma 2$, y la laminina 511, compuesta de cadenas $\alpha 5$, $\beta 1$ y $\gamma 1$) son eficaces para el mantenimiento de la pluripotencia de las células ES humanas (véase la Literatura no de patente 1). Los presentes inventores también informaron que la laminina 511 tiene una afinidad muy alta por la integrina $\alpha 6 \beta 1$ y que el fragmento E8 de la laminina 511 tiene una actividad de unión a la integrina $\alpha 6 \beta 1$ equivalente a la de la laminina 511 de longitud completa (véase no la Literatura no de patente 2).

Sin embargo, puesto que la laminina se une a diversas moléculas de la superficie celular y moléculas de la matriz extracelular, deben ser superarse muchos problemas técnicos para la preparación de una laminina pura y homogénea sin impurezas. Además, puesto que cada una de las tres subunidades de la laminina tiene un peso molecular tan grande como de 200.000 a 400.000 Da, la molécula heterotrimérica ensamblada a partir de estas subunidades no es fácil de expresar como una proteína recombinante y su rendimiento es bajo.

[Lista de citas]

45 [Literatura no de patente]

Literatura no de patente 1:

Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, Kawase E, Sekiguchi K, Nakatsuji N, Suemori H.

50 *Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375:27-35, 2008.

Literatura no de patente 2:

Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K.

The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. J. Biol. Chem. 284:7820-7831, 2009.

Sumario de la invención**Problema técnico**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un sustrato de cultivo que permita el cultivo de mantenimiento de células madre pluripotentes humanas en un estado pluripotente en un ambiente de cultivo sin células alimentadoras.

5 Solución al problema

La presente invención incluye lo siguiente como solución a los problemas mencionados anteriormente.

(1) Un sustrato de cultivo para el cultivo de células madre pluripotentes humanas, estando el sustrato de cultivo recubierto con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ o fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$, en el que la concentración de recubrimiento de fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ o de fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ es de 0,5 a 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

(2) El sustrato de cultivo de acuerdo con el punto (1) anterior, en el que el sustrato de cultivo se selecciona entre el grupo que consiste en una cubeta de vidrio o de plástico, un matraz de vidrio o de plástico, una placa de múltiples pocillos de vidrio o de plástico, un portaobjetos de cultivo de vidrio o de plástico, un micro-soporte y una membrana polimérica.

(3) El sustrato de cultivo de acuerdo con los puntos (1) o (2) anteriores, en el que la célula madre pluripotente humana es una célula ES humana o una célula iPS humana.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sustrato de cultivo que permite el cultivo de mantenimiento de células madre pluripotentes humanas en un estado pluripotente en un ambiente de cultivo sin células alimentadoras. En el caso en el que se utilice adicionalmente un medio de cultivo sin xenógenos en la presente invención, las células madre pluripotentes humanas pueden cultivarse en condiciones sin xenógenos y sin células alimentadoras y de este modo pueden proporcionarse células madre pluripotentes humanas muy seguras. Adicionalmente, el sustrato de cultivo de la presente invención permite la expansión y la proliferación rápidas de las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales, la separación de clones derivados de células individuales y el mantenimiento del estado de células individuales. Además, el fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ y el fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ utilizados para recubrir el sustrato de cultivo pueden producirse como una proteína recombinante con un alto rendimiento y de este modo puede producirse un sustrato de cultivo recubierto con una proteína humana muy pura y homogénea con una de alta calidad y bajo coste.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados comparativos de diferentes matrices extracelulares en la eficiencia de unión, dependiente de la concentración de recubrimiento, de las células ES humanas.

La Fig. 2 muestra los resultados en la eficiencia de unión, dependiente de la densidad de siembra, de las células ES humanas disociadas en células individuales en el sustrato de cultivo recubierto con Matrigel o con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$.

La Fig. 3 muestra la morfología de las células ES humanas en el sustrato de cultivo recubierto con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$.

La Fig. 4 muestra la morfología de las células ES humanas en el sustrato de cultivo recubierto con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$.

La Fig. 5 muestra los resultados del análisis por citometría de flujo de los antígenos de superficie en las células ES humanas cultivadas en el sustrato de cultivo recubierto con Matrigel, con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ o con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$.

Descripción de las realizaciones

<Sustrato de cultivo para células madre pluripotentes humanas>

La presente invención proporciona un sustrato de cultivo para el cultivo de células madre pluripotentes humanas, estando el sustrato de cultivo recubierto con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ o fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ en el que la concentración de recubrimiento del fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ o fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ es de 0,5 a 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los ejemplos de las células madre pluripotentes incluyen las células ES (células madre embrionarias, del inglés *embryonic stem cells*), las células iPS (células madre pluripotentes inducidas, del inglés *induced pluripotent stem cells*), células mGS (células madre germinales multipotentes, del inglés *multipotent germ stem cells*) e hibridomas de células ES humanas y células somáticas.

El fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (denominado en lo sucesivo en el presente documento "laminina humana 511E8") significa un fragmento de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (denominada en lo sucesivo en el presente documento "laminina humana 511") correspondiente al fragmento E8 de laminina de ratón $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (denominado en lo sucesivo en el presente documento "laminina de ratón 111E8") y el fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (denominado en lo sucesivo en el presente documento "laminina humana 332E8") significa un fragmento de laminina

humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (denominada en lo sucesivo en el presente documento "laminina humana 332") correspondiente a la laminina de ratón 111E8.

Entre los fragmentos obtenidos por digestión con elastasa de la laminina de ratón $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (denominada en lo sucesivo en el presente documento "laminina de ratón 111"), el fragmento E8 de laminina se identificó como un fragmento que tiene la actividad de adhesión celular más fuerte (Edgar D., Timpl R., Thoenen H. *The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. EMBO J.*, 3:1463-1468, 1984; y Goodman SL., Deutzmann R., von der Mark K. *Two distinct cellbinding domains in laminin can independently promote nonneuronal cell adhesion and spreading. J. Cell Biol.*, 105:589-598, 1987). Por tanto, se presume que la digestión por elastasa de la laminina humana 511 y de la laminina humana 332 podría producir un fragmento correspondiente a la laminina de ratón 111E8, pero no ha habido ningún informe acerca del aislamiento o la identificación de un fragmento de este tipo hasta ahora. Por tanto, la laminina humana 511E8 y la laminina humana 332E8 utilizadas en la presente invención no tienen que ser un producto digerido por elastasa de la laminina humana 511 o la laminina humana 332 y pueden ser cualquier fragmento de laminina humana 511 o laminina humana 332, a condición de que el fragmento tenga una actividad de la adhesión celular, estructura y peso molecular equivalentes a los de la laminina de ratón 111E8.

El procedimiento para la producción de laminina humana 511E8 o la laminina humana 332E8 no está particularmente limitado. La laminina humana 511E8 y la laminina humana 332E8 pueden producirse mediante, por ejemplo, la digestión de la laminina humana 511 o la laminina humana 332 de longitud completa con una proteasa, tal como la elastasa, seguida del aislamiento y la purificación del fragmento objetivo. Como alternativa, la laminina humana 511E8 y la laminina humana 332E8 pueden producirse como una proteína recombinante. Esta última es de preferencia en términos de cantidad de producción, uniformidad de la calidad, costes de producción, etc.

La laminina humana 511E8 recombinante y la laminina humana 332E8 recombinante pueden producirse mediante una técnica recombinante apropiada conocida. La laminina humana 511E8 recombinante puede producirse mediante, por ejemplo, la preparación de ADN que codifiquen las cadenas α , β y γ de la laminina humana 511E8, la inserción de los ADN en vectores de expresión separados, la cointroducción de los tres vectores de expresión resultantes en una célula hospedadora apropiada para su expresión y la purificación de la proteína trimérica objetivo mediante un procedimiento conocido. Los presentes inventores produjeron la laminina humana 511E8 recombinante de acuerdo con el procedimiento de Ido y col. (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki y Kiyotoshi Sekiguchi, "The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin γ chains in integrin binding by laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007) (véanse los Ejemplos), pero el procedimiento de producción de la laminina humana 511E8 recombinante de la presente invención no se limita al mismo. La laminina humana 332E8 recombinante puede producirse de forma similar (véanse los Ejemplos). Con respecto a las subunidades de la laminina humana 511, a saber, las cadenas $\alpha 5$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ y las subunidades de la laminina humana 332, a saber, las cadenas $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\gamma 2$, los datos acerca la secuencia de bases de un gen (ADNc) que codifica cada cadena y acerca de la secuencia de aminoácidos de cada cadena pueden obtenerse a partir de una base de datos conocida (GenBank etc.) mediante el uso de cada número de referencia mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1

Datos de secuencias de laminina humana (número de referencia)		
	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de bases
Cadena $\alpha 5$	NP 005551	NM 005560
Cadena $\beta 1$	NP 002282	NM 002291
Cadena $\gamma 1$	NP 002284	NM 002293
Cadena $\alpha 3$	NP 000218	NM 000227
Cadena $\beta 2$	NP 000219	NM 000228
Cadena $\gamma 2$	NP 005553	NM 005562

Mediante la dilución de la laminina humana 511E8 o la laminina humana 332E8 preparadas con un disolvente adecuado, tal como PBS, solución salina fisiológica y una solución salina fisiológica ajustada a un pH neutro con tris(hidroximetil)aminometano o ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina etanosulfónico, la adición de la solución diluida a un sustrato de cultivo adecuado y dejando el sustrato de cultivo en reposo a temperatura ambiente hasta aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 1 a 12 horas, la superficie del sustrato de cultivo puede recubrirse con laminina humana 511E8 o laminina humana 332E8. De esta manera, puede producirse el sustrato de cultivo de la presente invención. El sustrato de cultivo que se recubre no está limitado a condición de que pueda

utilizarse para el cultivo de células madre pluripotentes humanas y los ejemplos del mismo incluyen cubetas de vidrio o de plástico, matraces, placas de múltiples pocillos y portaobjetos de cultivo, micro-soportes y membranas poliméricas tales como una membrana de fluoruro de polivinilideno.

5 La concentración de recubrimiento de la laminina humana 511E8 o la laminina humana 332E8 es de 0,5 a 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y preferentemente de aproximadamente 1,5 a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Incluso a una concentración de recubrimiento tan baja, tanto la laminina humana 511E8 como la laminina humana 332E8 permiten la unión y la proliferación de un mayor número de células madre pluripotentes humanas en comparación con cualquiera de entre Matrigel, la laminina humana 511 y la laminina humana 332, utilizados convencionalmente.

10 El sustrato de cultivo de la presente invención está recubierto con una o ambas laminina humana 511E8 y laminina humana 332E8. El sustrato de cultivo puede recubrirse con, además de la laminina humana 511E8 y/o la laminina humana 332E8, otros componentes de origen humano. Los ejemplos de dichos otros componentes de origen humano incluyen componentes del suero, moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, factores inductores de la diferenciación y factores morfogénicos (morfógenos). El sustrato de cultivo también puede recubrirse con componentes no biológicos, tales como gel polimérico sintético (polímero sintético).

15 El sustrato de cultivo de la presente invención, que se recubre con laminina humana 511E8 o laminina humana 332E8, permite el cultivo de mantenimiento de las células madre pluripotentes humanas en un estado pluripotente en un ambiente de cultivo desprovisto de células alimentadoras (ambiente de cultivo sin células alimentadoras), que por lo general se utilizan para el cultivo de células madre. Para el mantenimiento del crecimiento clonal y del estado indiferenciado, las células madre pluripotentes por lo general se cultivan en un sistema de co-cultivo en el que las células madre pluripotentes se cultivan sobre células alimentadoras, tales como fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés *mouse embryonic fibroblasts*) cuya proliferación se ha detenido mediante radiación de rayos X o tratamiento con mitomicina-C. Un sistema de cultivo que no utiliza este tipo de células alimentadoras se denomina sistema de cultivo sin células alimentadoras.

20 Adicionalmente, mediante el uso de un medio de cultivo sin componentes xenógenos, las células madre pluripotentes humanas pueden cultivarse en condiciones de cultivo completamente desprovistas de componentes xenógenos (condiciones de cultivo sin xenógenos) y de este modo pueden proporcionarse células madre pluripotentes humanas muy seguras con un riesgo extremadamente bajo de desarrollar inmunogenia para los seres humanos.

25 Adicionalmente, el sustrato de cultivo de la presente invención permite el cultivo de células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales, lo que no había sido factible en sistemas de cultivo convencionales. Por tanto, las células madre pluripotentes humanas pueden expandirse y proliferar significativamente más rápido en comparación con los sistemas de cultivo convencionales. Adicionalmente, los clones de células madre pluripotentes humanas derivados de células individuales pueden separarse fácilmente y mantenerse en un estado de células individuales.

30 <Procedimiento de cultivo de células madre pluripotentes humanas>

35 En el presente documento se describe un procedimiento de cultivo de células madre pluripotentes humanas utilizando el sustrato de cultivo anteriormente mencionado de la presente invención. El procedimiento de cultivo de la presente divulgación se utiliza preferentemente en el caso del cultivo de células madre pluripotentes humanas en condiciones de cultivo sin células alimentadoras y en particular se utiliza preferentemente en el caso del cultivo de células madre pluripotentes humanas en condiciones de cultivo sin células alimentadoras y sin xenógenos.

40 El medio de cultivo utilizado en el procedimiento de cultivo de la presente divulgación no está particularmente limitado, pero es de preferencia un medio sintético y es de particular preferencia un medio sintético sin componentes xenógenos (medio sintético sin xenógenos). Los ejemplos del medio sintético que está o estará disponible en el mercado incluyen mTeSR1 (nombre comercial, StemCell Technologies), TeSR2 (nombre comercial, StemCell Technologies), StemPro hESC SFM (nombre comercial, Invitrogen) y hESF-GRO (nombre comercial, Cell Science & Technology Institute, Inc.). Entre estos, TeSR2 es un medio de cultivo sin componentes xenógenos. Además, pueden utilizarse preferentemente los medios de cultivo descritos en las siguientes Referencias (1) a (5).

- 45 (1) Liu, Y. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346:131-139, 2006.
 (2) Vallier, L. y col., *J. Cell Sci.* 118:4495-4509, 2005.
 50 (3) Li, Y. y col., *Biotechnol. Bioeng.*, 91:688-698, 2005.
 (4) Yao, S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:6907-6912, 2006.
 (5) Lu, J. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:5688-5693, 2006.

(1) Recogida de células ES humanas de sistema de co-cultivo con células alimentadoras

55 Se recogieron células ES humanas de un sistema de co-cultivo con células alimentadoras de acuerdo con el siguiente procedimiento 1 o 2.

Procedimiento 1:

5 A una cubeta de cultivo en la que se habían co-cultivado células ES humanas con células alimentadoras (por ejemplo, MEF) (del día 3 al día 5), se le añadió tripsina al 0,25 %/DMEM-F12 (por ejemplo, 1 ml/cubeta de 60 mm) y el tratamiento con tripsina se realizó a 37 °C durante 2 a 3 minutos. La cubeta de cultivo se lavó con DMEM-F12 y de esta manera se retiraron las células alimentadoras. Después, se añadió un medio de cultivo a la cubeta de cultivo y las células enteras en la cubeta de cultivo se desprendieron físicamente. La suspensión de células resultante se filtró a través de una criba de células BD Falcon 100- μ m (BD Falcon n.º 352460), la criba se lavó y de este modo solo se separaron y recogieron colonias de células ES humanas.

Procedimiento 2:

10 A una cubeta de cultivo en la que se habían co-cultivado células ES humanas con células alimentadoras (por ejemplo, MEF) (del día 3 al día 5), se le añadieron una solución de desprendimiento de células ES humanas (por ejemplo, Solución de Disociación para Células ES de Primate (RCHETP002 fabricada por ReprCELL Inc.), Dispasa 1 mg/ml/DMEM-F12, colagenasa IV 10 mg/ml/DMEM-F12, etc.) (por ejemplo, 1 ml/cubeta de 60 mm) y el tratamiento de desprendimiento se realizó a 37 °C durante 5 minutos. Como resultado, las células ES humanas y los MEF se desprendieron de la cubeta de cultivo. Después, las células desprendidas se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml. A este tubo, se le añadieron aproximadamente 10 ml de un medio de cultivo, las células se suspendieron, el tubo se dejó en reposo durante 5 minutos para permitir que solo precipitaran las colonias y después se retiró el sobrenadante. Mediante la repetición de este procedimiento dos veces o más, solo se recogieron las colonias de células ES humanas.

20 (2) Transferencia de células ES humanas al sustrato de cultivo de la presente invención

Las colonias de células ES humanas recogidas se disociaron en células individuales. El procedimiento para la disociación de las colonias en células individuales no está particularmente limitado y, por ejemplo, las colonias pueden disociarse mediante el lavado abundante con un medio de cultivo varias veces utilizando un Pipetman P-1000 o similar. Las células disociadas en células individuales se resuspendieron en un medio de cultivo adecuado (por ejemplo, TeSR2 etc.) y se sembraron en un sustrato de cultivo de la presente invención (por ejemplo, una cubeta de cultivo recubierta con laminina humana 511E8 (1,5 μ g/cm²)). El cultivo se realizó en una condición de concentración de CO₂ adecuada para el medio de cultivo utilizado y el medio de cultivo se cambió a diario.

(3) Cultivo por pase

30 El pase se realizó en el momento en el que se hicieron visibles la falta de espacio para una expansión adicional o células muertas en las colonias. En el procedimiento de cultivo de la presente divulgación, el pase puede realizarse mediante la siembra de células ES humanas mantenidas como colonias de tamaño moderado, como en los procedimientos convencionales. Como alternativa, el pase puede realizarse mediante la siembra de células ES humanas disociadas en células individuales. En este caso, el estado "disociado en células individuales" no solo significa un estado en el que todas las células en una suspensión de células están presentes como una sola célula, sino que incluye un estado en el que algunas células en una suspensión de células están presentes como una sola célula y otras células están presentes en la misma en una forma agregada de aproximadamente varias a poco más de diez células.

En el caso de células disociadas en células individuales:

40 A un sustrato de cultivo de la presente invención (por ejemplo, una cubeta de cultivo recubierta con laminina humana 511E8 (1,5 μ g/cm²)) en el que se habían cultivado células ES humanas, se le añadió TrypLE Select (nombre comercial, Invitrogen n.º 12563011) (por ejemplo, se añadió 1 ml/cubeta de 60 mm) y las células ES humanas se trataron con el mismo a 37 °C durante 5 minutos. Las colonias de células ES humanas se disociaron en células individuales mediante, por ejemplo, el lavado abundante con un medio de cultivo varias veces utilizando un Pipetman P-1000 o similar. Después de la adición de un medio de cultivo, las células ES humanas se suspendieron y después se recogieron en un tubo de centrifuga. Después de que una etapa de centrifugación (200xg, 3 minutos) y una etapa posterior de lavado con un medio de cultivo se repitieran dos veces, las células ES humanas se volvieron a suspender en un medio de cultivo recién preparado y se sembraron en un estado de células individuales a una densidad celular de, por ejemplo, aproximadamente 40.000 células/cm² en un sustrato de cultivo de la presente invención (por ejemplo, una cubeta de cultivo recubierta con laminina humana 511E8 (1,5 μ g/cm²)). El cultivo se realizó en una condición de concentración de CO₂ adecuada para el medio de cultivo utilizado y el medio de cultivo se cambió a diario.

En el caso de células no disociadas en células individuales:

55 En este caso, se utilizaron enzimas, tales como colagenasa IV, Dispasa y Accutasa, para el desprendimiento de células. A un sustrato de cultivo de la presente invención en el que se habían cultivado células ES humanas, se le añadieron colagenasa 10 mg/ml/DMEM-F12, Dispasa 2 mg/ml/DMEM-F12 o Accutasa (Millipore n.º SCR005) (por ejemplo, 1 ml/cubeta de 60 mm) y las células ES humanas se tratan con la misma a 37 °C durante 5 minutos. Después de la retirada de la solución de enzima, se añadió un medio de cultivo y las colonias de células ES humanas se dividieron en colonias de menor tamaño compuestas por aproximadamente 50 a 100 células

mediante, por ejemplo, el lavado abundante con un medio de cultivo varias veces utilizando un Pipetman P-1000 o similar. La suspensión de células se recogió en un tubo de centrifuga. Después de que una etapa de centrifugación (200xg, 3 minutos) y una posterior etapa de lavado con un medio de cultivo se repitieran dos veces, las células ES humanas se volvieron a suspender en un medio de cultivo recién preparado y se sembraron en una dilución con factor de dilución de 2 a 4 en un sustrato de cultivo de la presente invención (por ejemplo, una cubeta de cultivo recubierta con laminina humana 511E8 (1,5 µg/cm²)). El cultivo se realizó en una condición de concentración de CO₂ adecuada para el medio de cultivo utilizado y el medio de cultivo se cambió a diario.

<Procedimiento para la expansión rápida de las células madre pluripotentes humanas>

En el presente documento se describe un procedimiento para la expansión rápida de células madre pluripotentes humanas. El procedimiento de expansión rápida de la presente divulgación comprende las etapas de: disociar las células madre pluripotentes humanas en células individuales y cultivar las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales utilizando el sustrato de cultivo anteriormente mencionado de la presente invención, cultivándose las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales a una densidad celular de aproximadamente 2×10^4 a 20×10^4 células/cm². La densidad de siembra es más preferentemente de aproximadamente 3×10^4 a 10×10^4 células/cm² y más preferentemente de aproximadamente 4×10^4 a 5×10^4 células/cm². A una densidad de siembra de este tipo, la eficiencia de unión de las células ES humanas disociadas en células individuales en los sistemas de cultivo convencionales es inferior al 10 %, pero el procedimiento de expansión rápida de la presente divulgación puede conseguir una eficiencia de unión significativamente mayor y permite la proliferación vigorosa posterior, permitiendo de este modo que las células madre pluripotentes humanas proliferen a una velocidad notablemente más alta que la de los procedimientos convencionales.

En la etapa de disociación de células madre pluripotentes humanas en células individuales, como en la anteriormente mencionada "En el caso de células disociadas en células individuales", las colonias de células madre pluripotentes humanas se desprendieron y recogieron de una cubeta de cultivo y estas colonias se disociaron en células individuales mediante, por ejemplo, el lavado abundante con un medio de cultivo varias veces utilizando un Pipetman P-1000 o similar. Después, el número de células se contó mediante un procedimiento de recuento de células conocido y la concentración de células de la suspensión de células se ajustó adecuadamente para proporcionar la densidad de siembra anteriormente mencionada. La etapa de cultivo puede realizarse de acuerdo con la descripción del procedimiento de cultivo anterior de la presente divulgación.

<Procedimiento de separación de clones de células madre pluripotentes humanas derivados de células individuales>

En el presente documento se describe un procedimiento de separación de clones derivados de células individuales de células madre pluripotentes humanas. El procedimiento de separación de la presente divulgación comprende las etapas de: disociar las células madre pluripotentes humanas en células individuales y cultivar las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales utilizando el sustrato de cultivo anteriormente mencionado de la presente invención y el procedimiento se caracteriza por la formación de colonias derivadas de células individuales. De acuerdo con el procedimiento de separación de la presente divulgación, a diferencia de los sistemas de cultivo convencionales, los clones de células madre pluripotentes humanas derivados de células individuales pueden formarse y separarse fácilmente y de este modo pueden obtenerse células madre pluripotentes humanas homogéneas fácilmente.

Para la formación de colonias derivadas de células individuales y la separación de clones derivados de células individuales, puede utilizarse cualquier procedimiento sin ninguna limitación particular y, por ejemplo, puede utilizarse preferentemente una dilución limitante conocida etc. Dependiendo del procedimiento utilizado, se seleccionan apropiadamente la densidad celular y el sustrato de cultivo de la presente invención que se utilizan y, en las condiciones seleccionadas, se siembran y se cultivan las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales. La etapa de cultivo puede realizarse de acuerdo con la descripción del procedimiento de cultivo anterior de la presente divulgación.

<Procedimiento de cultivo de células individuales de células madre pluripotentes humanas>

En el presente documento se describe un procedimiento de cultivo de células individuales de células madre pluripotentes humanas. El procedimiento de cultivo de células individuales de la presente divulgación comprende las etapas de: disociar las células madre pluripotentes humanas en células individuales y cultivar las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales utilizando el sustrato de cultivo anteriormente mencionado de la presente invención y el procedimiento se caracteriza por el mantenimiento de las células madre pluripotentes humanas en un estado de células individuales sin proliferación. En general, en la colonia formada por células madre pluripotentes humanas, las células en el borde de la colonia pueden ser diferentes en la condición de la célula de aquellas dentro de la colonia, pero de acuerdo con el procedimiento de cultivo de células individuales de la presente divulgación, las células madre pluripotentes humanas no forman colonias y de este modo pueden obtenerse en una condición uniforme y puede esperarse una potenciación en la eficiencia de la inducción de la diferenciación.

Para el mantenimiento de las células madre pluripotentes humanas en un estado de células individuales sin proliferación, es de preferencia que las células madre pluripotentes humanas disociadas en células individuales se siembren a una densidad celular apropiada seleccionada dependiendo del sustrato de cultivo de la presente invención que se utilice, y después se utilicen para otras aplicaciones antes de que las células proliferen. Además, es posible que se utilice, por ejemplo, un medio de cultivo con menos o sin factor de crecimiento para el mantenimiento prolongado de las células en un estado de células individuales.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se ilustrará en detalle mediante Ejemplos, pero no se limita a los mismos.

<Materiales para los experimentos>

(1) Matrices extracelulares

Se utilizaron laminina humana 511E8 recombinante (denominada en lo sucesivo en el presente documento "rhLM511E8"), laminina humana 332E8 recombinante (denominada en lo sucesivo en el presente documento "rhLM332E8"), laminina humana 511 recombinante (denominada en lo sucesivo en el presente documento "rhLM511"), laminina humana 332 recombinante (denominada en lo sucesivo en el presente documento "rhLM332"), laminina humana 111 recombinante (denominada en lo sucesivo en el presente documento "rhLM111"), Matrigel (BD Bioscience n.º 354230), fibronectina humana (purificada utilizando una columna de afinidad de gelatina de acuerdo con el procedimiento de Sekiguchi y col. (Sekiguchi K. y Hakomori S.: *Domain structure of human plasma fibronectin. Differences and similarities between human and hamster fibronectins. The Journal of Biological Chemistry*, 258, 3967-3973, 2003)) y vitronectina (purificada utilizando una la columna de afinidad de heparina de acuerdo con el procedimiento de Yatohgo y col. (Yatohgo T., Izumi, M., Kashiwagi, H. y Hayashi, M. *Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. Cell Structure and Function*, 13, 281-292, 1988)).

(2) Células utilizadas para los experimentos

Como célula ES humana, se utilizaron cepas establecidas en el Instituto para las Ciencias Médicas Aplicadas (Institute for Frontier Medical Sciences) de la Universidad de Kioto (KhES-1 [ejemplo de referencia], KhES-2 [ejemplo de referencia], KhES-3 [ejemplo de referencia]) y cepas adquiridas del Banco Nacional de Células Madre (National Stem Cell Bank) (H1 [ejemplo de referencia], H9 [ejemplo de referencia]). Como célula iPS humana, se utilizaron cepas adquiridas del Banco Nacional de Células Madre (National Stem Cell Bank) (nombre del clon: iPS(IMR90)-1-DL-1, iPS(IMR90)-4-MCB-1, iPS(prepuccio)-1-DL-1).

El cultivo de mantenimiento de estas células se realizó de acuerdo con los procedimientos de cultivo respectivos que recomiendan las organizaciones. Por ejemplo, las células ES humanas H9 (ejemplo de referencia) se mantuvieron mediante co-cultivo con células alimentadoras de ratón de acuerdo con un procedimiento recomendado por Banco Nacional de Células Madre (National Stem Cell Bank). Después de que se añadiera tripsina al 0,25 %/DMEM-F12 a la cubeta de co-cultivo y se retiraran las células alimentadoras de ratón, la suspensión de células se filtró a través de una criba de células BD Falcon 100-µm (BD Falcon n.º 352460), la criba se lavó y de este modo se separaron colonias de células ES humanas H9 (ejemplo de referencia). Las colonias de la criba se recogieron en un medio de cultivo de células ES humanas y se dividieron en colonias más pequeñas mediante el uso de un Pipetman P-1000. Después, las colonias más pequeñas se volvieron a suspender en mTeSR1 (StemCell Technologies) y se sembraron en un sustrato de cultivo recubierto con Matrigel. El número de pases de las células recién sembradas se designó como P1. El cultivo de expansión se realizó en una atmósfera de CO₂ al 5 %/aire al 95 % y continuó hasta el día 4. Durante el cultivo de expansión, el medio se reemplazó a diario con la comprobación de la contaminación con células alimentadoras de ratón. Se utilizaron en los experimentos células que se confirmó que no estaban contaminadas con células alimentadoras de ratón. El cultivo de mantenimiento y el cultivo de expansión de los otros tipos celulares se realizaron de manera similar y después estas células se utilizaron en experimentos. En los siguientes ejemplos, solo se muestran los resultados de células ES humanas H9 [ejemplo de referencia], pero se obtuvieron resultados similares con respecto a los otros tipos celulares.

(3) Procedimiento de preparación de rhLM511E8

Se preparó rhLM511E8 de la siguiente manera de acuerdo con el procedimiento de Ido y col. (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki y Kiyotoshi Sekiguchi, "The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin γ chains in integrin binding by laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007).

En primer lugar, mediante PCR utilizando un plásmido de clonación pBluescript KS(+) (Stratagene) como molde, se prepararon tres tipos de pBluescript KS(+) que contenían un ADN que codificaba un marcador 6xHis (HHHHHH), un ADN que codificaba un marcador HA (hemaglutinina) (YPYDVPDYA) o un ADN que codificaba un marcador FLAG (DYKDDDDK) insertado en el extremo 5' del sitio EcoRV en el sitio de multiclonación. Los pares de cebadores utilizados para la PCR fueron los siguientes.

(i) Cebadores para la inserción del marcador 6xHis

5'-ATGATGATGAAGCTTATCGATACCGT-3' (directo, SEQ ID NO: 1)

5'-CATCATCATGATATCGAATTCTGCA-3' (inverso, SEQ ID NO: 2)

(ii) Cebadores para la inserción del marcador HA

5'-ATCATATGGATAAAGCTTATCGATACCGT-3' (directo, SEQ ID NO: 3)

5'-GTGCCAGATTATGCAGATATCGAATTCT-3' (inverso, SEQ ID NO: 4)

(iii) Cebadores para la inserción del marcador FLAG

5'-ATCCTTGTAATCAAGCTTATCGATACCGT-3' (directo, SEQ ID NO: 5)

5'-GTGCCAGATTATGCAGATATCGAATTCT-3' (inverso, SEQ ID NO: 4)

10 A continuación, mediante PCR utilizando plásmidos que contenían las secuencias de bases de longitud completa de las cadenas $\alpha 5$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ (Ito y col., *J. Biol. Chem.*, 279, 10946-10954, 2004) como plantillas, se amplificaron las regiones correspondientes a $\alpha 5$ (Ala²⁵³⁴-Ala³³²⁷), $\beta 1$ (Leu¹⁵⁶¹-Leu¹⁷⁸⁶) y $\gamma 1$ (Asn¹³⁶²-Pro¹⁶⁰⁸), respectivamente. Los cebadores utilizados para la PCR fueron los siguientes.

(iv) Cebadores para la amplificación del fragmento E8 de la cadena $\alpha 5$

5'-GCTGCCGAGGATGCTGCTGGCCAGG-3' (directo, SEQ ID NO: 6)

5'-CTAGGCAGGATGCCGGGCGGGCTGA-3' (inverso, SEQ ID NO: 7)

(v) Cebadores para la amplificación del fragmento E8 de la cadena $\beta 1$

5'-CTTCAGCATAGTGCTGCTGACATTG-3' (directo, SEQ ID NO: 8)

5'-TTACAAGCATGTGCTATACACAGCAAC-3' (inverso, SEQ ID NO: 9)

20 (vi) Cebadores para la amplificación del fragmento E8 de la cadena $\gamma 1$

5'-AATGACATTCTCAACAACCTGAAAG-3' (directo, SEQ ID NO: 10)

5'-CTAGGGCTTTTCAATGGACGGGGTG-3' (inverso, SEQ ID NO: 11)

25 Los ADNc amplificados se insertaron por separado en el sitio EcoRV en el sitio de multiclonación de los pBluescript KS(+) preparados anteriormente que contenían una secuencia de marcador. Después, la región que contenía el ADNc amplificado y la secuencia que codificaba el marcador 5'-terminal se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII y se insertó en el sitio de restricción correspondiente de pSecTag2B, un vector de expresión diseñado para células de mamíferos (Invitrogen). De esta manera, se prepararon vectores de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\alpha 5$ humana (que contenía el marcador 6xHis en la región N-terminal), el fragmento E8 de la cadena $\beta 1$ humana (que contenía el marcador HA en la región N-terminal) y el fragmento E8 de la cadena $\gamma 1$ humana (que contenía el marcador FLAG en la región N-terminal).

30 Para la expresión de rhLM511E8, los tres vectores de expresión se introdujeron en células 293F derivadas de riñón embrionario humano (adquirido de Invitrogen). Se co-transfectaron 180 μ g cada uno de estos vectores de expresión en 300 ml de células 293F ($1,0 \times 10^6$ células/ml) mediante el uso de un reactivo de transfección 293fectin (nombre comercial, Invitrogen) y Opti-MEM (nombre comercial, Invitrogen) y las células se cultivaron durante 72 horas. Después de esto, se recogió el medio de cultivo. El medio de cultivo recogido se centrifugó a $1.000 \times g$ durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se centrifugó adicionalmente a $15.000 \times g$ durante 30 minutos para retirar la materia insoluble y las células restantes. Al sobrenadante resultante, se le añadieron 5 ml de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) y se dejó que la proteína objetivo se uniera a la misma mediante incubación durante la noche. La agarosa Ni-NTA se recogió y se lavó sucesivamente con TBS(-) (solución salina tris-tamponada sin Ca o Mg) e imidazol 10 mM/TBS(-) y las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 200 mM/TBS(-). La rhLM511E8 eluida de este modo se confirmó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con plata. A la fracción que contenía rhLM511E8, se le añadieron 2 ml Gel de afinidad ANTI-FLAG M2 (Sigma) y la mezcla se hizo girar a 4 °C durante la noche. El gel de afinidad se transfirió a una columna Econo, que después se lavó con PMSF 1 mM que contenía TBS(-). Después, la elución se realizó con péptido FLAG 100 μ g/ml que contenía TBS(-) (Sigma). Después de que las fracciones eluidas se sometieran a la tinción con plata, las fracciones que contenían rhLM511E8 se combinaron y se dializaron frente a TBS(-).

(4) Procedimiento de preparación de rhLM332E8

(4-1) Preparación del vector de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\alpha 3$ de laminina humana

50 En primer lugar, mediante PCR utilizando un plásmido de clonación pBluescript KS(+) (Stratagene) como molde, se preparó un pBluescript KS(+) que contenía la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción AscI (GGCGCGCC) y un ADN que codificaba un marcador 6xHis (HHHHHH) insertado en el extremo 5' del sitio EcoRV en el sitio de multiclonación. El par de cebadores utilizado para la PCR era el siguiente.

(vii) Cebadores para la inserción del marcador 6xHis

5'-ATGATGATGGGCGCGCCAAGCTTATCGATACCGT-3' (directo, SEQ ID NO: 12)

55 5'-CATCATCATGATATCGAATTCTGCA-3' (inverso, SEQ ID NO: 13)

A continuación, mediante PCR utilizando un plásmido que contenía la secuencia de ADNc de la cadena $\alpha 3$ de laminina humana (que carecía de los dominios globulares de laminina 4^o y 5^o) (Ito y col., *J. Biol. Chem.*, 282, 11144-11154, 2007) como molde, se amplificó la región correspondiente a $\alpha 3$ (Ala⁵⁷⁹-Ala¹³⁶⁴). Los cebadores utilizados para

la PCR fueron los siguientes. El cebador inverso contenía la secuencia de reconocimiento de XbaI (TCTAGA) en la región 5'-terminal.

(viii) Cebadores para la amplificación del fragmento E8 de la cadena $\alpha 3$
 5'-GCGGCCGAGGACGCAGCCAACAGG-3' (directo, SEQ ID NO: 14)
 5'-GGTCTAGACTAAGCATCTTGCCACACC-3' (inverso, SEQ ID NO: 15)

El ADNc amplificado se insertó en el sitio EcoRV-XbaI en el sitio de multiclonación del pBluescript KS(+) preparado anteriormente que contenía la secuencia de reconocimiento de AclI y la secuencia que codificaba el marcador 6xHis. Después, el ADNc que contenía la secuencia que codificaba el fragmento E8 de la cadena $\alpha 3$ y la secuencia que codificaba el marcador 6xHis 5'-terminal se digirió con las enzimas de restricción AclI y NotI y se insertó en el sitio de restricción correspondiente de pSecTag2A, un vector de expresión diseñado para células de mamífero (Invitrogen). De esta manera, se preparó un vector de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\alpha 3$ humana (que contenía el marcador 6xHis en la región N-terminal).

(4-2) Preparación del vector de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\beta 3$ de laminina humana

Para la preparación de un fragmento de ADNc que codificaba un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón, un marcador HA y fragmento E8 de la cadena $\beta 3$, en este orden desde el extremo 5', se obtuvieron por separado un fragmento de ADNc que codificaba un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón y un marcador HA y un fragmento de ADNc que codificaba E8 de la cadena $\beta 3$ y estos dos fragmentos se ligaron y se amplificaron mediante PCR de extensión.

En primer lugar, mediante PCR utilizando un vector de expresión de E8 de cadena $\beta 1$ de laminina humana (Ido y col., *J. Biol. Chem.*, 282, 11144-11154, 2007) como molde, se amplificó la región correspondiente a un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón y un marcador HA. Los cebadores utilizados para la PCR fueron los siguientes. El cebador inverso contenía una secuencia utilizada para la PCR de extensión en la región 5'-terminal.

(ix) Cebadores para la amplificación de la secuencia del péptido señal y la secuencia del marcador HA
 5'-TGGGCGTGGATAGCGGTTTG-3' (directo, SEQ ID NO: 16)
 5'-TCTGGGACAGATCTGCATAATCTGGCAC-3' (inverso, SEQ ID NO: 17)

A continuación, mediante PCR utilizando un plásmido que contenía la secuencia de ADNc de la cadena $\beta 3$ de laminina humana (Ido y col., *J. Biol. Chem.*, 282, 11144-11154, 2007) como molde, se amplificó la región correspondiente a $\beta 3$ (Leu⁹⁴⁹-Lys¹¹⁷²). Los cebadores utilizados para la PCR fueron los siguientes. El cebador directo contenía una secuencia utilizada para la PCR de extensión en la región 5' terminal y el cebador inverso contenía la secuencia de reconocimiento de EcoRI (GAATTC) en la región 5'-terminal.

(x) Cebadores para la amplificación del fragmento E8 de la cadena $\beta 3$
 5'-AGATTATGCAGATCTGTCCCAGACCAAG-3' (directo, SEQ ID NO: 18)
 5'-GCGAATTCTCACTTGCAGGTGGCATA-3' (inverso, SEQ ID NO: 19)

Las dos clases de fragmentos de ADNc resultantes se ligaron y se amplificaron mediante PCR de extensión utilizando los cebadores que se describen a continuación, para proporcionar un fragmento de ADNc que codificaba un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón, un marcador HA y E8 de la cadena $\beta 3$. Después, el ADNc amplificado se digirió con las enzimas de restricción NheI y EcoRI y se insertó en el sitio de restricción correspondiente de pSecTag2B, un vector de expresión diseñado para células de mamíferos (Invitrogen). De esta manera, se preparó un vector de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\beta 3$ humana (que contenía el marcador HA en la región N-terminal). La secuencia de reconocimiento NheI (GCTAGC) estaba situada en el extremo 5' inmediato del codón de iniciación.

(xi) Cebadores para la amplificación de péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón, marcador HA y E8 de la cadena $\beta 3$
 5'-TGGGCGTGGATAGCGGTTTG-3' (directo, SEQ ID NO: 16)
 5'-GCGAATTCTCACTTGCAGGTGGCATA-3' (inverso, SEQ ID NO: 19)

(4-3) Preparación del vector de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\gamma 2$ de laminina humana

Para la preparación de un fragmento de ADNc que codificaba un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón, un marcador FLAG y fragmento E8 de la cadena $\gamma 2$, en este orden desde el extremo 5', se obtuvieron por separado un fragmento de ADNc que codificaba un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón y un marcador FLAG y un fragmento de ADNc que codificaba E8 de la cadena $\gamma 2$ y estos dos fragmentos se ligaron y se amplificaron mediante PCR de extensión.

En primer lugar, mediante PCR utilizando un vector de expresión de E8 de cadena $\gamma 1$ de laminina humana (Ido y col., *J. Biol. Chem.*, 282, 11144-11154, 2007) como molde, se amplificó la región correspondiente a un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón y un marcador FLAG. Los cebadores utilizados para la PCR fueron los siguientes. El cebador inverso contenía una secuencia utilizada para la PCR de extensión en la región 5'-terminal.

(xii) Cebadores para la amplificación de la secuencia del péptido señal y la secuencia del marcador FLAG
 5'-TGGGCGTGGATAGCGGTTTG-3' (directo, SEQ ID NO: 16)
 5'-GGATGCTCTCATCCTTATCATCATCC-3' (inverso, SEQ ID NO: 20)

5 A continuación, mediante PCR utilizando un plásmido que contenía la secuencia de ADNc de la cadena $\gamma 2$ de laminina humana (Ito y col., *J. Biol. Chem.*, 282, 11144-11154, 2007) como molde, se amplificó la región correspondiente a $\gamma 2$ (Glu⁹⁴⁹-Gln¹¹⁷²). Los cebadores utilizados para la PCR fueron los siguientes. El cebador directo contenía una secuencia utilizada para la PCR de extensión en la región 5' terminal y el cebador inverso contenía la secuencia de reconocimiento de EcoRI (GAATTC) en la región 5'-terminal.

10 (xiii) Cebadores para la amplificación del fragmento E8 de la cadena $\gamma 2$
 5'-GATGATGATAAGGATGAGAGCATCCTTAAAAAC-3' (directo, SEQ ID NO: 21)
 5'-GCGAATTCTCACTGTTGCTCAAGAGCCTG-3' (inverso, SEQ ID NO: 22)

15 Las dos clases de fragmentos de ADNc resultantes se ligaron y se amplificaron mediante PCR de extensión utilizando los cebadores que se describen a continuación, para proporcionar fragmento de ADNc que codificaba un péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón, un marcador FLAG y E8 de la cadena $\gamma 2$. Después, el ADNc amplificado se digirió con enzimas de restricción NheI y EcoRI y se insertó en el sitio de restricción correspondiente de pSecTag2B, un vector de expresión diseñado para células de mamíferos (Invitrogen). De esta manera, se preparó un vector de expresión para el fragmento E8 de la cadena $\gamma 2$ humana (que contenía el marcador FLAG en la región N-terminal).

20 (xiv) Cebadores para la amplificación de péptido señal V-J2-C de la cadena κ de Ig de ratón, marcador FLAG y E8 de la cadena $\gamma 2$
 5'-TGGGCGTGGATAGCGGTTTG-3' (directo, SEQ ID NO: 16)
 5'-GCGAATTCTCACTGTTGCTCAAGAGCCTG-3' (inverso, SEQ ID NO: 22)

(4-4) Expresión y purificación de rhLM332E8

25 Para la expresión de rhLM332E8, los tres vectores de expresión se introdujeron en células 293F derivadas de riñón embrionario humano (Invitrogen). Se co-transfectaron 70 μ g cada uno de estos vectores de expresión en 300 ml de células 293F (1,0 \times 10⁶ células/ml) mediante el uso de un reactivo de transfección 293fectin (nombre comercial, Invitrogen) y Opti-MEM (nombre comercial, Invitrogen) y las células se cultivaron durante 72 horas. Después de esto, se recogió el medio de cultivo. El medio de cultivo recogido se centrifugó a 1.000 \times g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se centrifugó adicionalmente a 15.000 \times g durante 30 minutos para retirar la materia
 30 insoluble y las células restantes. Al sobrenadante resultante se le añadió imidazol de modo que la concentración final fuera 10 mM y la mezcla se agitó bien. A esto, se le añadieron 40 ml de agarosa Ni-NTA al 50 % (v/v) (QIAGEN) y se dejó que la proteína objetivo se uniera a la misma en un procedimiento discontinuo a 4 °C durante la noche. La agarosa Ni-NTA se recogió y se lavó con TBS(-) y se realizó una elución con imidazol 200 mM/TBS(-). La fracción que contenía rhLM332E8 se identificó basándose en la absorbancia a 280 nm. A la fracción eluida objetivo,
 35 se le añadieron 2 ml de Gel de afinidad ANTI-FLAG M2 (Sigma) y se dejó que la proteína objetivo se uniera al mismo en un procedimiento discontinuo a 4 °C durante la noche. El gel de afinidad se transfirió a una columna Econo (fabricada por Bio-Rad Laboratories, Inc.), que después se lavó con TBS(-). Después, se realizó una elución con péptido FLAG 100 μ g/ml que contenía TBS(-) (Sigma). Después de que las fracciones eluidas se sometieran a la tinción con plata, la fracción que contenía rhLM332E8 se dializó (corte de 20 kDa) frente a TBS(-).

40 (5) Procedimientos de preparación de lamininas humanas recombinantes (rhLM511, rhLM332, rhLM111)

Se preparó rhLM511 de acuerdo con el procedimiento de Ido y col. (Hiroyuki Ido, Kenji Harada, Sugiko Futaki, Yoshitaka Hayashi, Ryoko Nishiuchi, Yuko Natsuka, Shaoliang Li, Yoshinao Wada, Ariana C. Combs, James M. Ervasti y Kiyotoshi Sekiguchi, "*Molecular dissection of the α -dystroglycan- and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10*" *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 10946-10954, 2004).

45 Se preparó rhLM332 de acuerdo con el procedimiento de Ido y col. (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki y Kiyotoshi Sekiguchi, "*The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin γ chains in integrin binding by laminins*" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007).

50 Se preparó rhLM111 de acuerdo con el procedimiento de Ido y col. (Hiroyuki Ido, Kenji Harada, Yoshiki Yagi y Kiyotoshi Sekiguchi, "*Probing the integrin-binding site within the globular domain of laminin-511 with the function-blocking monoclonal antibody 4C7*" *Matrix Biology*, 25, 112-117, 2006) y el procedimiento de Taniguchi y col. (Yukimasa Taniguchi, Hiroyuki Ido, Noriko Sanzen, Maria Hayashi, Ryoko Sato-Nishiuchi, Sugiko Futaki y Kiyotoshi Sekiguchi, "*The Cterminal region of laminin β chains modulates the integrin binding affinities of laminins*" *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 7820-7831, 2009).

55

<Ejemplo 1: Comparación de diferentes matrices extracelulares basándose en la eficiencia de unión, dependiente de la concentración de recubrimiento, de las células ES humanas>

Se diluyeron por separado rhLM511E8, rhLM332E8, rhLM511, rhLM332, rhLM111, Matrigel, fibronectina y vitronectina con PBS de Dulbecco (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. n.º 045-29795) o DMEM-F12 (Sigma n.º D6241) y después se añadieron a placas de microtitulación de 96 pocillos separadas (BD Bioscience n.º 351172) a concentraciones finales que variaban de 0 a 25 µg/cm². Las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas y de este modo se recubrieron con las matrices extracelulares anteriores.

Las células ES humanas cultivadas con mTeSR1 (P1) se trataron con TrypLE Select (Invitrogen n.º 12563011) a 37 °C durante 3 minutos y de esta manera se disociaron en células individuales. Después de que se contase el número de células, las células se sembraron a una densidad celular de 5×10^4 células/pocillo en las placas. A las 6 horas después de la siembra, los sobrenadantes se retiraron, los pocillos se lavaron una vez con DMEM-F12 y las células se fijaron con formol al 10 % tamponado neutro durante 10 minutos. El formol tamponado neutro se reemplazó por etanol al 100 % y, 5 minutos más tarde, las células se tiñeron con una solución de cristal violeta al 4 %/metanol al 100 % durante 5 minutos. Las placas se sumergieron en una gran cantidad de agua destilada para la retirada del exceso de solución de tinción y después se secaron al aire. Las células se lisaron con SDS al 1 % y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con un lector multiplaca.

Los resultados se muestran en la Fig. 1. Como se desprende de la Fig. 1, el número de células ES humanas unidas a las placas recubiertas con rhLM511E8 o rhLM332E8 fue significativamente mayor incluso a bajas concentraciones de recubrimiento. El número de células ES humanas unidas a las placas recubiertas con rhLM511E8 era mayor en cada concentración de recubrimiento que el número de células ES humanas unidas a las placas recubiertas con Matrigel, que habían sido considerado el más efectivo para la unión de las células ES humanas entre las proteínas de matriz extracelular conocidas. Sobre las placas recubiertas con rhLM511E8 o rhLM332E8, se unió un mayor número de células ES humanas incluso a una concentración de recubrimiento inferior a la de la correspondiente laminina de longitud completa (rhLM511 y rhLM332). Estos resultados demuestran que las concentraciones de recubrimiento óptimas de rhLM511E8 y rhLM332E8 son aproximadamente de 1,0 a 20 µg/cm².

<Ejemplo 2: Efectos de la densidad de siembra sobre la eficiencia de unión de células ES humanas disociadas en células individuales en sustrato de cultivo recubierto con rhLM511E8>

En el pase de células ES humanas, puesto que la disociación de las células en células individuales con tripsina/EDTA etc. provoca una notable disminución de la viabilidad, las células por lo general se someten a pases en forma de colonia. En este ejemplo, la eficiencia de unión de células ES humanas disociadas en células individuales en un sustrato de cultivo recubierto con rhLM511E8 se comparó con la de células ES humanas disociadas en células individuales en un sustrato de cultivo recubierto con Matrigel.

Se diluyó rhLM511E8 con PBS de Dulbecco de forma que la concentración final fuera de 1,5 µg/cm². Se diluyó Matrigel con DMEM-F12 de forma que la concentración final fuera de 25 µg/cm². Las dos soluciones diluidas se añadieron a placas de múltiples pocillos de 48 pocillos separadas (BD Bioscience n.º 351178) y las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas y de este modo se recubrieron con rhLM511E8 o Matrigel.

Las células ES humanas cultivadas con mTeSR1 (P1) se trataron con TrypLE Select a 37 °C durante 3 minutos y de esta manera se disociaron en células individuales. Las células se sembraron a densidades celulares que variaban de 1×10^3 a 5×10^5 células/cm² en pocillos por triplicado de la placa de pocillos múltiples de 48 pocillos recubierta con rhLM511E8 o Matrigel. A las 6 horas después de la siembra, los sobrenadantes se retiraron, los pocillos se lavaron con PBS y las células se desprendieron con tripsina al 0,25 %/EDTA. Se contó el número de células y se determinó la relación entre el número de células unidas con respecto al de las células sembradas en cada densidad celular.

Los resultados se muestran en la Fig. 2. Como se desprende de la Fig. 2, la eficiencia de unión de las células ES humanas disociadas en células individuales sembradas en la placa recubierta con Matrigel fue extremadamente baja como de costumbre, mientras que la eficiencia de unión así como la viabilidad de las células ES humanas disociadas en células individuales sembradas en la placa recubierta con rhLM511E8 eran tan altas como aproximadamente el 50 % a una densidad de siembra de 5×10^4 células/cm². Estos resultados demuestran que la densidad de siembra apropiada en un sustrato de cultivo recubierto con rhLM511E8 es de aproximadamente 5×10^4 a 10×10^4 células/cm².

<Ejemplo 3: Observación morfológica y análisis de antígenos de superficie de células ES humanas en sustrato de cultivo recubierto con rhLM511E8 o rhLM332E8>

Se diluyeron por separado rhLM511E8 y rhLM332E8 con PBS de Dulbecco de forma que la concentración final fuera de 1,5 µg/cm². Se diluyó Matrigel con DMEM-F12 de forma que la concentración final fuera de 25 µg/cm². Las tres soluciones diluidas se añadieron a Cubetas de Cultivo Celular Easy-Grip de 35-mm (BD Falcon n.º 353001) separadas y las cubetas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas y de este modo se recubrieron con rhLM511E8, rhLM332E8 o Matrigel.

Las células ES humanas cultivadas con mTeSR1 (P1) se trataron con TrypLE Select a 37 °C durante 3 minutos y de esta manera se disociaron en células individuales. Las células se sembraron a una densidad celular de 5×10^4 células/cm² en las Cubetas de Cultivo Celular Easy-Grip de 35-mm recubiertas con rhLM511E8, rhLM332E8 o Matrigel. Después de la siembra, las células se registraron fotográficamente a diario.

5 Para el análisis de antígenos de superficie, a los 5 días después de la siembra, las células se disociaron en células individuales mediante un tratamiento de 3 minutos con TrypLE Select y se lavaron con Solución de Trabajo (BSA al 0,1 %/PBS). Se añadió anticuerpo anti-SSEA-1, anticuerpo anti-SSEA-4, anticuerpo anti-Tra-1-60, anticuerpo anti-Tra-1-81, anticuerpo anti-Tra-2-54 (todos los anteriores, Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa) o anticuerpo anti-GCTM-2 (Invitrogen) como anticuerpo primario y las células se tiñeron con el mismo a 4 °C durante 30 minutos. Después, las células se lavaron con Solución de Trabajo. A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo secundario (Beckman Coulter n.º 731735) a 4 °C durante 30 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con Solución de Trabajo y la intensidad de fluorescencia se midió con BD FACS Calibur HG.

15 Los resultados de la observación morfológica de las células ES humanas cultivadas en la cubeta recubierta con rhLM332E8 se muestran en la Fig. 3. Los resultados de la observación morfológica de las células ES humanas cultivadas en la cubeta recubierta con rhLM511E8 se muestran en la Fig. 4. Como se desprende de las Figuras 3 y 4, en la cubeta recubierta con rhLM332E8 o rhLM511E8, las células ES humanas disociadas en células individuales se unieron individualmente o como una colonia vuelta a formar con las células adyacentes (véanse las secciones superiores del Día 1 de las Figuras 3 y 4) y después proliferaron vigorosamente (véanse las secciones inferiores del Día 3 de las Figuras 3 y 4). Estos resultados demuestran que un sustrato de cultivo recubierto con rhLM332E8 o rhLM511E8 permite el cultivo por pase de células individuales de las células ES humanas, anteriormente inviable.

20 Los resultados del análisis por citometría de flujo de antígenos de superficie de las células ES humanas se muestran en la Fig. 5. En la Fig. 5, los resultados de las células cultivadas en la cubeta recubierta con Matrigel se muestran en la columna de la izquierda, los resultados de las células cultivadas en la cubeta recubierta con rhLM332E8 se muestran en la columna central y los resultados de las células cultivadas en la cubeta recubierta con rhLM511E8 se muestran en la columna de la derecha. Como se desprende de la Fig. 5, los resultados del análisis por citometría de flujo de antígenos de superficie no mostraron ninguna diferencia entre las células cultivadas en los tres tipos de cubetas: las células de cualquiera de estas cubetas fueron altamente positivas para los marcadores de indiferenciación (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, Tra-2-54, GCTM2), pero negativas para un marcador de diferenciación (SSEA-1). Estos resultados demuestran que un sustrato de cultivo recubierto con rhLM332E8 o rhLM511E8 puede mantener el estado indiferenciado de las células ES humanas en un nivel equivalente al de los procedimientos convencionales utilizando Matrigel.

25 La presente invención no se limita a las realizaciones y ejemplos mencionados anteriormente y pueden hacerse diversas modificaciones dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Otras realizaciones que puedan obtenerse mediante la combinación adecuada de medios técnicos desvelados en diferentes realizaciones de la presente invención también se incluyen en el ámbito técnico de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Osaka University
Kyoto University

<120> Sustrato de cultivo para célula madre pluripotente humana y utilización del mismo

40 <130> 011F3566

<150> JP 2009-234583
<151> 2009-10-08

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 1
atgatgatga agcttatcga taccgt 26

<210> 2
<211> 26

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador	
5	<400> 2 catcatcatg atatcgaatt cctgca	26
	<210> 3	
	<211> 29	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador	
	<400> 3 atcatatgga taaagcttat cgataccgt	29
15	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia de cebador	
	<400> 4 gtgccagatt atgcagatat cgaattcct	29
	<210> 5	
25	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador	
30	<400> 5 atcctgtgaa tcaagcttat cgataccgt	29
	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia de cebador	
	<400> 6 gctgccgagg atgctgctgg ccagg	25
	<210> 7	
40	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador	
45	<400> 7 ctaggcagga tgccgggctg gctga	25
	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Secuencia de cebador

 <400> 8
 cttcagcata gtgctgctga cattg 25
 5 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 10 <400> 9
 ttacaagcat gtgctataca cagcaac 27

 <210> 10
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 20 <400> 10
 aatgacattc tcaacaacct gaaag 25

 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia de cebador

 <400> 11
 ctagggcttt tcaatggacg gggtg 25
 30 <210> 12
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 35 <400> 12
 atgatgatgg gcgcgccaag cttatcgata ccgt 34

 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador

 <400> 13
 catcatcatg atatcgaatt cctgc 25
 45 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Secuencia de cebador

	<400> 14 gcggccgagg acgcagccaa cagg	24
5	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de cebador	
10	<400> 15 ggtctagact aagcatcttg ccacacc	27
	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia de cebador	
	<400> 16 tggcgtgga tagcggttg	20
20	<210> 17 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de cebador	
25	<400> 17 tctgggacag atctgcataa tctggcac	28
	<210> 18 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia de cebador	
	<400> 18 agattatgca gatctgtccc agaccaag	28
35	<210> 19 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de cebador	
40	<400> 19 gcgaattctc actgcaggt ggcata	26
	<210> 20 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de cebador	
50	<400> 20 ggatgctctc atccttatca tcatcatcc	29

ES 2 643 059 T3

<210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 21
gatgatgata aggatgagag catcctaaa aac 33

10 <210> 22
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

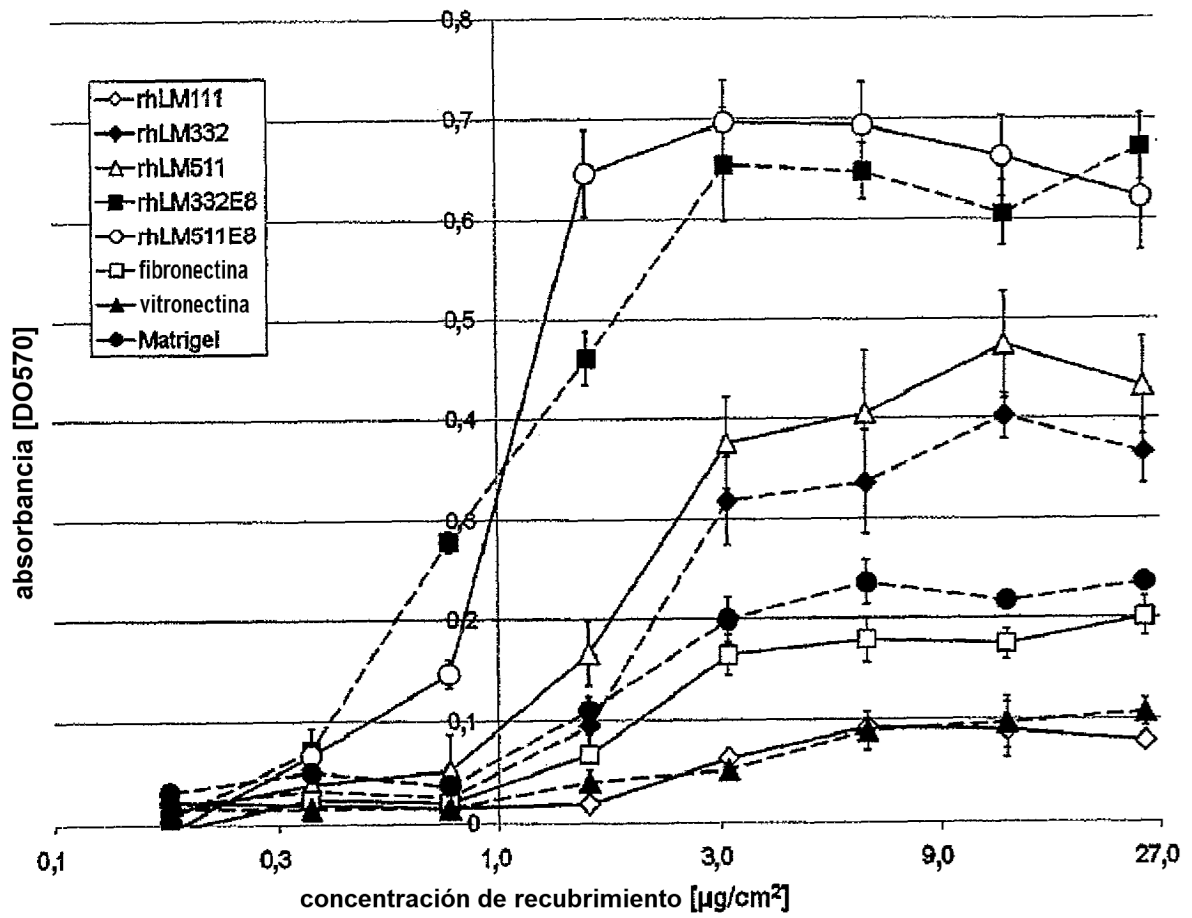
<220>
<223> Secuencia de cebador

15 <400> 22
gcgaattctc actgtgctc aagagcctg 29

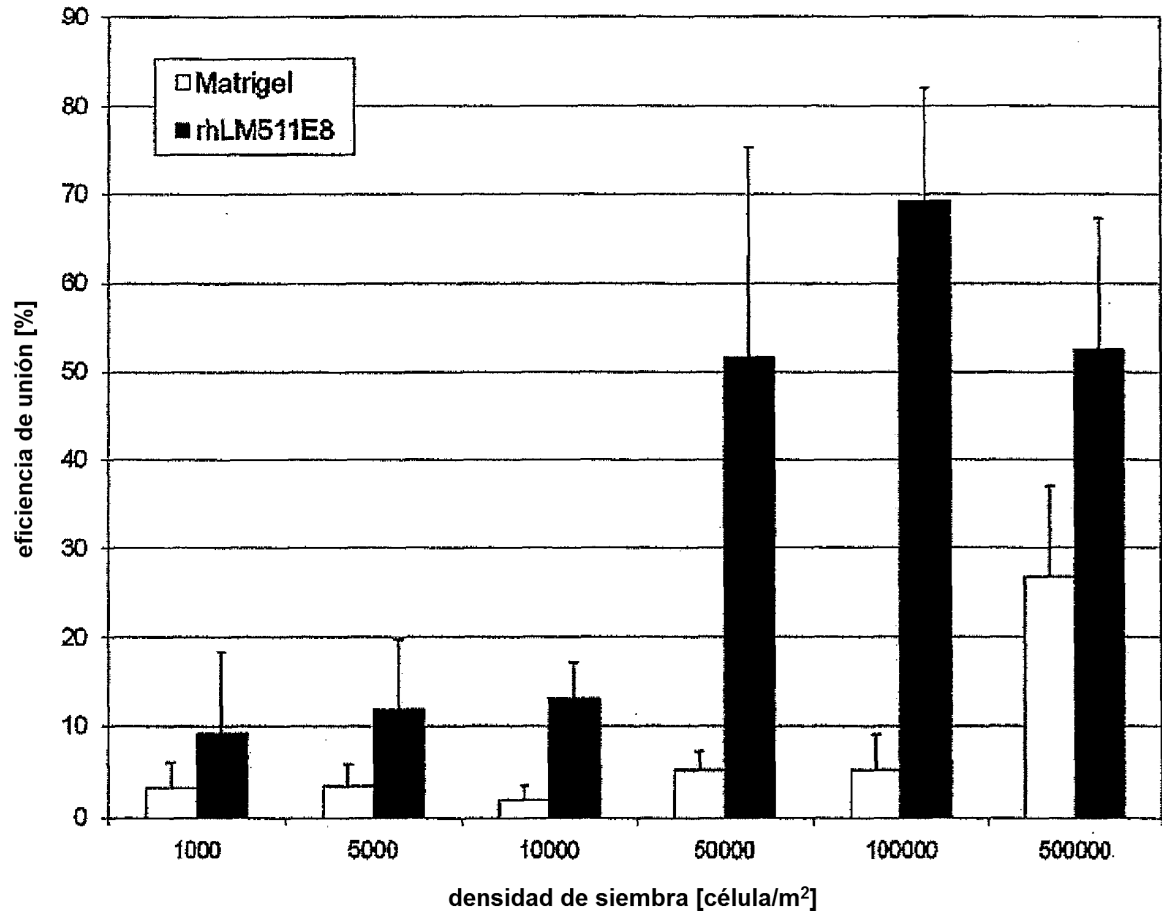
REIVINDICACIONES

1. Un sustrato de cultivo para el cultivo de células madre pluripotentes humanas, estando recubierto el sustrato de cultivo con fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ o fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$, en el que la concentración de recubrimiento de fragmento E8 de laminina humana $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ o fragmento E8 de laminina humana $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ es de 0,5 a 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
2. El sustrato de cultivo de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el sustrato de cultivo se selecciona entre el grupo que consiste en una cubeta de vidrio o de plástico, un matraz de vidrio o de plástico, una placa de múltiples pocillos de vidrio o de plástico, un portaobjetos de cultivo de vidrio o de plástico, un micro-soporte y una membrana polimérica.
3. El sustrato de cultivo de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, en el que la célula madre pluripotente humana es una célula ES humana o una célula iPS humana.

[Fig. 1]

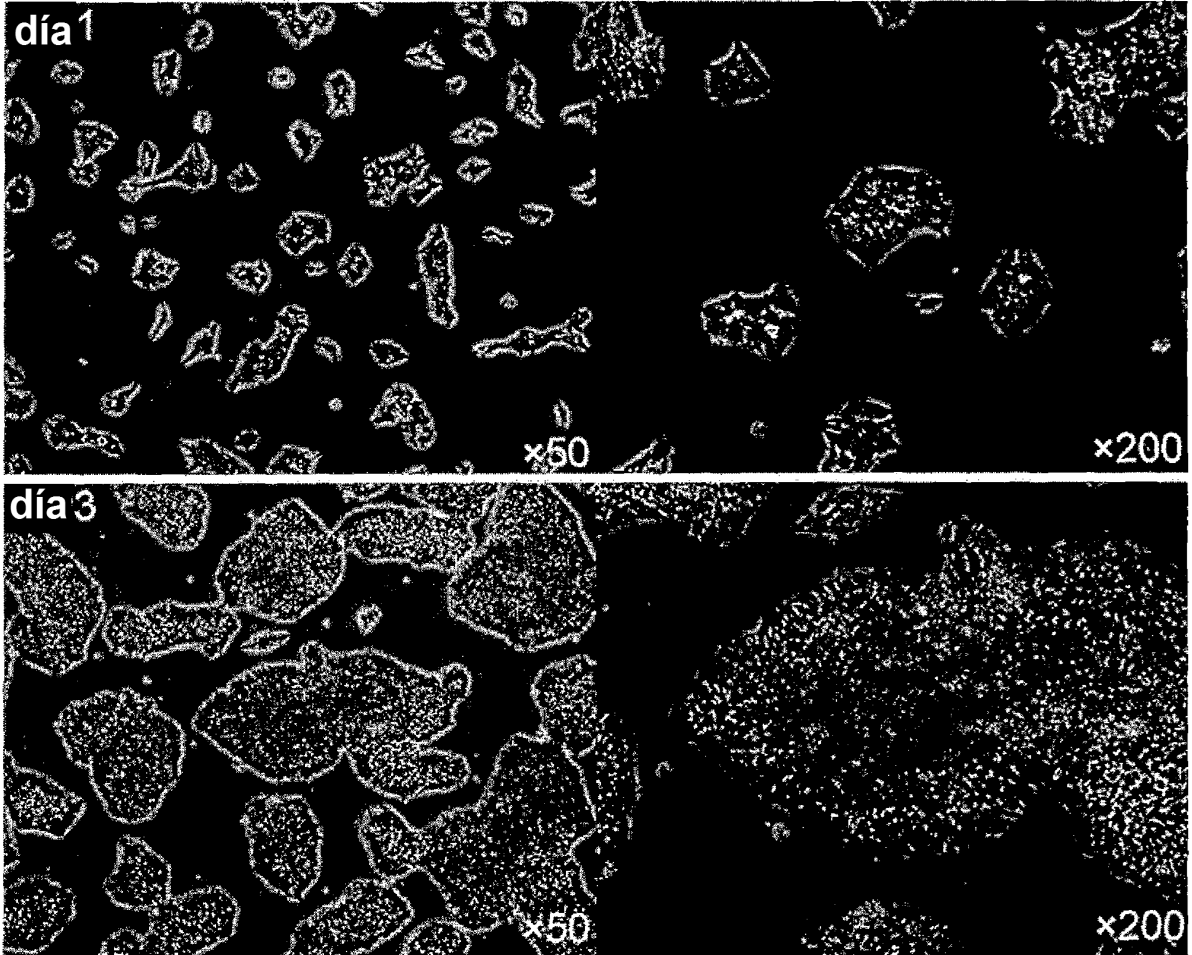


[Fig. 2]



[Fig. 3]

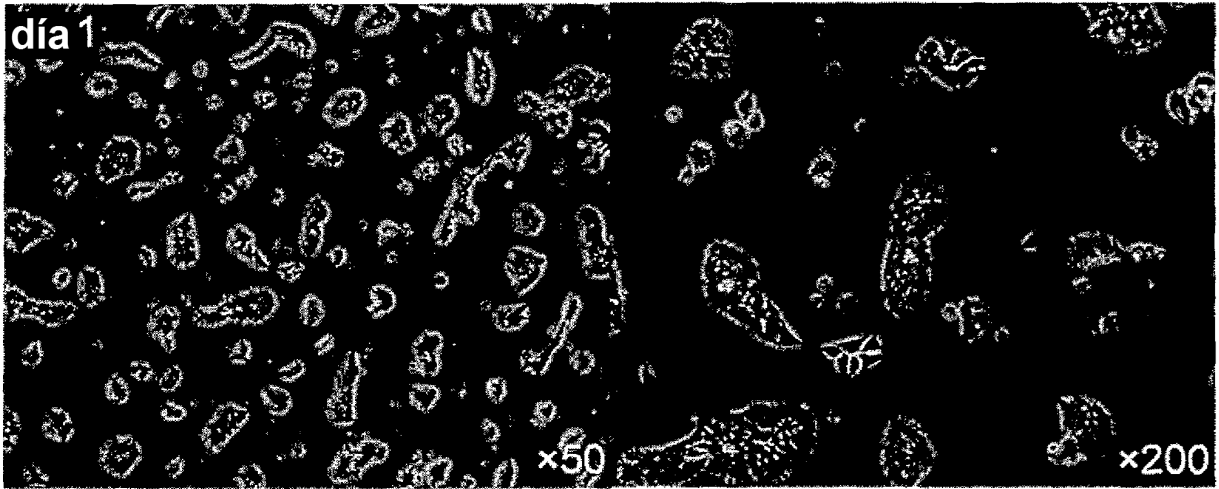
rhLM332E8



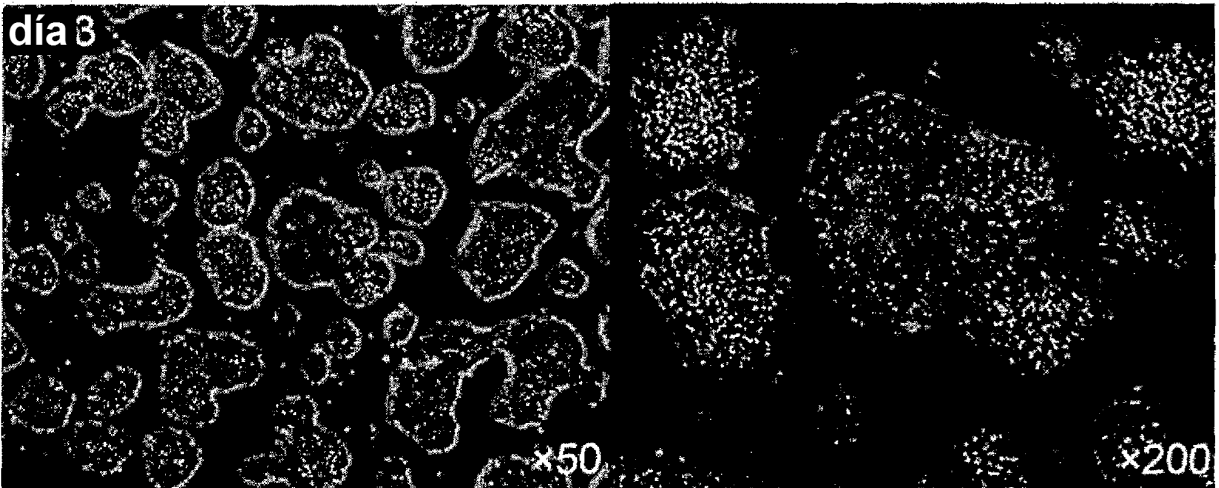
[Fig. 4]

rhLM511E8

día 1



día 3



[Fig. 5]

