(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 674 239**

(51) Int. CI.:

C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2008 PCT/US2008/080516**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09052505**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2008 E 08840374 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2215214**

(54) Título: **Medios para células madre pluripotentes carentes de alimentadores que contienen suero humano**

(30) Prioridad:

19.10.2007 US 875057

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2018

(73) Titular/es:

VIACYTE, INC. (100.0%)
3550 General Atomics Court
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

ROBINS, ALLAN, J.;
SCHULZ, THOMAS, C. y
BRANDON, EUGENE, P.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Medios para células madre pluripotentes carentes de alimentadores que contienen suero humano

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones y a métodos para cultivar células madre pluripotentes humanas, que comprenden un medio de cultivo definido que contiene suero humano.

Antecedentes de la invención

Las células madre embrionarias (ES, del inglés *embryonic stem*) son un poderoso sistema modelo para la investigación de los mecanismos que subyacen a la biología y diferenciación de las células pluripotentes en el embrión temprano, así como para proporcionar oportunidades para la manipulación genética de mamíferos y las aplicaciones comerciales, médicas y agrícolas resultantes. Además, la proliferación y diferenciación apropiadas de células ES pueden usarse potencialmente para generar una fuente ilimitada de células adecuadas para el trasplante, para el tratamiento de enfermedades que son el resultado del daño o disfunción celular. Otras células pluripotentes y líneas celulares que incluyen células de tipo ectodermo primitivo temprano (EPL, del inglés *early primitive ectoderm-like*), como se describe en la solicitud de patente internacional WO 99/53021, MCI/epiblasto obtenido *in vivo* o *in vitro*, ectodermo primitivo obtenido *in vivo* o *in vitro*, células germinales primordiales (células GP), células de teratocarcinoma (células EC, del inglés *embryonal carcinoma cells*), y células pluripotentes obtenidas por desdiferenciación o por transferencia nuclear, compartirán algunas o todas estas propiedades y aplicaciones. La solicitud de patente internacional WO 97/32033 y la patente de Estados Unidos N.º 5.453.357, describen células pluripotentes que incluyen células de especies que no son de roedores. Se han descrito células ES humanas en la solicitud de patente internacional WO 00/27995 y en la patente de Estados Unidos N.º 6.200.806, y las células GP humanas se han descrito en la solicitud de patente internacional WO 98/43679.

Sin embargo, hasta la fecha, solo se han informado varios métodos subóptimos para aislar y cultivar células madre de primates. Por ejemplo, las células madre embrionarias murinas se mantienen en un estado indiferenciado usando cultivos carentes de alimentadores complementados con factor inhibidor de la leucemia (FIL). Por otro lado, las células madre embrionarias humanas se diferencian cuando las células se cultivan sin una capa de células alimentadoras o en medio condicionado procedente de una línea celular de alimentadora adecuada, incluso en presencia de FIL. Los sistemas que emplean células alimentadoras (o medios condicionados procedentes de cultivos de células alimentadoras) normalmente usan células de una especie distinta a la de las células madre cultivadas, por ejemplo, los fibroblastos embrionarios de ratón (FER) forman la capa alimentadora en el crecimiento indiferenciado de la mayoría de células madre embrionarias humanas notificadas. Además, los informes de sistemas carentes de alimentadores normalmente precisan el uso de medio condicionado procedente de cultivos de FER, lo que no remedia la necesidad de productos/agentes no xenogénicos. Incluso los sistemas que emplean células alimentadoras humanas tienen el inconveniente de exponer las células indiferenciadas a condiciones de cultivo no definidas y, por lo tanto, muchas condiciones de cultivo de células madre a menudo no son reproducibles.

De manera adicional, para la mayoría de las terapias celulares, el tratamiento precisa cantidades extremadamente grandes de células madre pluripotentes. Basándose en el número de células necesario para el trasplante de islotes utilizando el protocolo de Edmonton, la cantidad estimada de células diferenciadas necesarias está en el orden de 10^9 a 10^{10} células/paciente. Además, dependiendo de la célula diana diferenciada obtenida de hES (del inglés *human embrionary stem cells*, células madre embrionarias humanas), la cantidad de hESC indiferenciadas podría ser órdenes de magnitud mayor.

Existe una necesidad, por lo tanto, de identificar métodos y composiciones para el cultivo, estabilización y producción a gran escala de una población uniforme de células madre pluripotentes de primates para fines terapéuticos; en donde las composiciones de cultivo estén definidas y/o se produzcan con respecto a las BPF (buenas prácticas de fabricación) habituales.

A continuación la presente invención descrita en detalle proporciona métodos y composiciones para cultivar las hESC indiferenciadas usando agentes que no se hayan expuestos u obtenido de agentes no humanos, proporcionando así medios de cultivo más seguros.

Sumario de la invención

La invención proporciona composiciones y métodos para un medio definido que sustenta el cultivo a largo plazo de células madre indiferenciadas. El medio carece sustancialmente de alimentadores (es decir, no se precisan células alimentadoras o un medio condicionado de células alimentadoras) y carece sustancialmente de cualquier recubrimiento de matriz.

La invención se refiere a una composición y un método de cultivo de tejidos de células madre pluripotentes humanas esencialmente carentes de alimentadores.
Se proporciona una composición de cultivo de tejido de células madre pluripotentes humanas como se define en las reivindicaciones.
Se divulgan medios definidos útiles en el cultivo de células madre, incluyendo células madre pluripotentes indiferenciadas. En solución, los medios pueden ser sustancialmente isotónicos en comparación con las células madre que cultivadas. En un cultivo dado, el medio particular puede comprender un medio base y una cantidad de diversos factores necesarios para sustentar el crecimiento sustancialmente indiferenciado de células madre embrionarias. El medio base puede comprender sales, aminoácidos esenciales, una fuente de carbono que pueda ser metabolizada por células madre de primate y suero humano. Todos estos ingredientes pueden suministrarse en una cantidad que sustentará el crecimiento sustancialmente indiferenciado de células madre de primate.

La invención proporciona un método para cultivar células madre pluripotentes humanas obtenidas de células germinales primordiales, como se define en las reivindicaciones. Además, se divulga un método de cultivo de células madre pluripotentes humanas, obtenidas de células madre primordiales, en un medio definido que carece de alimentadores, mediante el cultivo de células madre pluripotentes humanas en un medio de cultivo que puede sustentar el crecimiento de células madre, careciendo sustancialmente el medio de cultivo de células alimentadoras y conteniendo adicionalmente de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 2 % de suero humano, llevándose a cabo la etapa de cultivo durante más de un mes, con las células madre embrionarias proliferando en cultivo, mientras se mantiene el potencial de las células madre para diferenciarse en derivados de tejido endodérmico, mesodérmico y ectodérmico, y mientras se mantiene el cariotipo de las células madre embrionarias.

Estas y otras realizaciones de la invención se describirán con más detalle en el presente documento.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de elementos, se puede incluir en cada aspecto de la invención. La presente invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención admite otras realizaciones y se puede realizar o llevar a la práctica de diversos modos.

La fraseología y terminología usadas en el presente documento son con fines de descripción y no deben considerarse como limitantes. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica", y variaciones de los mismos, pretenden incluir los artículos enumerado a continuación y equivalentes de los mismos, así como artículos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1E muestran imágenes de fotomicrografía de cultivos de células madre pluripotentes en un medio definido que contiene diversas concentraciones de suero humano en los pases 0 a 3 (p0 a p3) y los días 1 a 4 (d1-d4).

La Figura 2 es una fotomicrografía de un gel de agarosa que contiene resultados de RT-PCR usando los marcadores celulares OCT4, NANOG, REX1, SOX2, UTF1, CRIPTO, FOXD3, TERT, DPPA5 AFP, MSX1 y HAND1 de las hESC pluripotentes (calles 2-11, de izquierda a derecha) y de células obtenidas de hES diferenciadas (calles 12-14).

La Figura 3 es un gráfico que describe la expresión relativa normalizada de SOX17, HNF1B y HNF4A en las hESC pluripotentes (pase 67; calle 1, izquierda), cultivos de endodermo definitivo del d3 (calles 2, 4 y 5) y cultivos de endodermo del intestino anterior del d5 (calles 3 y 6).

Descripción detallada de la invención

El uso de suero humano como matriz para el crecimiento de células madre embrionarias humanas (las hESC) en condiciones que carecen de alimentadores está descrito en Stojkovic *et al.* (Stem Cells Express (2005) Stem Cells 23:895-902, publicado originalmente en internet el 11 de mayo de 2005). El método implica recubrir las placas con suero humano (Sh) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la eliminación del exceso de suero y el secado de las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. El suero humano se obtuvo de sangre coagulada masculina, se analizó y resultó negativo para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, para anti virus de la hepatitis C y anti VIH/VIH-2 mediante pruebas aprobadas por la FDA. La resiembra de hESC en placas también debe usar placas prerrecubiertas de suero. En algunas realizaciones, el suero humano se usó junto con medio condicionado con hESC-dF. El medio condicionado se obtuvo de cultivos de células de tipo fibroblasto, que se obtuvieron de hESC diferenciadas de forma espontánea, como se describe en Stojkovic *et al*.

La presente invención, descrita con mayor detalle a continuación, proporciona composiciones y métodos para el cultivo, mantenimiento y cultivo de una célula madre pluripotente de primate uniforme e indiferenciada y, en particular, hESC obtenidas de células madre primordiales, en un medio definido y en ausencia de una matriz, capa

alimentadora o del recubrimiento de placas.

Definiciones

A menos que se indique otra cosa, los términos usados en el presente documento deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por parte de los expertos en la materia pertinente. Además de las definiciones de términos proporcionadas a continuación, también pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Rieger *et al.*, 1991 Glossary of genetics: classical and molecular, 5ª Ed., Berlín: Springer-Verlag; y en Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1998), o cualquier diccionario alojado en internet. Debe entenderse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, "un", "una" o "uno" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en que se utilice. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que se puede utilizar al menos una célula.

Como se usa en el presente documento, la expresión "poner en contacto" (es decir, poner en contacto una célula, por ejemplo, una célula diferenciable, con un compuesto) pretende incluir la incubación del compuesto y la célula juntos *in vitro* (por ejemplo, añadir el compuesto a células en cultivo). Se entiende que las células que se ponen en contacto con el medio definido pueden tratarse adicionalmente con un entorno de diferenciación celular para estabilizar las células o para diferenciar las células.

Como se usa en el presente documento, el término "estabilizar", cuando se usa en referencia al estado de diferenciación de una célula o cultivo celular, indica que las células continuarán proliferando a lo largo de múltiples pases en cultivo, y preferentemente de manera indefinida en cultivo, en donde la mayoría, si no todas, las células en el cultivo tienen el mismo estado de diferenciación. Además, cuando las células estabilizadas se dividen, la división normalmente produce células del mismo tipo de célula o produce células del mismo estado de diferenciación. En general, una célula o población celular estabilizada no se diferencia o desdiferencia adicionalmente si las condiciones del cultivo celular no se modifican, y las células continúan pasándose y no se cultivan excesivamente. En una realización, la célula que está estabilizada tiene la capacidad de proliferar en el estado estable de forma indefinida, o durante al menos más de 2 pases. En una más realización específica, las células son estables durante más de 3 pases, 4 pases, 5 pases, 6 pases, 7 pases, 8 pases, 9 pases, más de 10 pases, más de 15 pases, más de 20 pases, más de 25 pases o más de 30 pases. En una realización, la célula es estable durante más de aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses u 11 meses de realizar pases de forma continua. En otra realización, la célula es estable durante más de aproximadamente 1 año de realizar pases de forma continua. En una realización, las células madre se mantienen en cultivo en un estado pluripotente por el pase de rutina en el medio definido, hasta que se desee que se diferencien. Como se usa en el presente documento, el término "proliferar" se refiere a un aumento del número de células en un cultivo celular.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "entorno de crecimiento" es un entorno en el que las células madre proliferarán *in vitro.* Las características del entorno incluyen el medio en el que se cultivan las células y una estructura de soporte (tal como un sustrato sobre una superficie sólida), si está presente.

Un medio "definido" se refiere a una formulación definida desde el punto de vista bioquímico, compuesta únicamente de los constituyentes definidos bioquímicamente. Un medio definido puede incluir únicamente constituyentes que tienen composiciones químicas conocidas. Un medio definido también puede incluir constituyentes que proceden de fuentes conocidas. Por ejemplo, un medio definido también puede incluir factores y otras composiciones secretadas a partir de tejidos o células conocidos; sin embargo, el medio definido no incluirá el medio condicionado procedente de un cultivo de tales células. Por lo tanto, un "medio definido" puede, si se indica, incluir compuestos particulares añadidos para formar el medio de cultivo.

Como se usa en el presente documento, el término "medio basal" se refiere a una solución de aminoácidos, vitaminas, sales y nutrientes, que es eficaz para sustentar el crecimiento de las células en cultivo, aunque normalmente estos compuestos no sustentarán el crecimiento celular a menos que se complemente con compuestos adicionales. Los nutrientes incluyen una fuente de carbono (por ejemplo, un azúcar como la glucosa) que las células pueden metabolizar, así como otros compuestos necesarios para la supervivencia de las células. Estos son compuestos que las propias células no pueden sintetizar, debido a la ausencia de uno o más de los genes que codifican la proteína (o proteínas) necesarias para sintetizar el compuesto (por ejemplo, aminoácidos esenciales) o, con respecto a compuestos que las células pueden sintetizar, debido a su particular estado de desarrollo, el gen (o genes) que codifica las proteínas biosintéticas necesarias no se está expresando con niveles suficientes. Se conocen en la técnica del cultivo de células de mamíferos varios medios básicos, tales como medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Knockout-DMEM (KO-DMEM) y DMEM/F12, aunque se puede emplear cualquier medio base que sustente el crecimiento de células madre embrionarias de primate en un estado sustancialmente indiferenciado. Un "medio basal" como se describe en el presente documento también se refiere al medio basal descrito en el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755, presentado el 13 de junio de 2007).

El medio basal puede contener o no "insulina exógena o sustitutos de insulina", que se refiere a la insulina o

sustitutos de insulina que no se añaden de forma intencionada a las composiciones o métodos de la presente invención. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la presente invención, los métodos y composiciones carecen de insulina o de sustitutos de insulina que se suministran de forma intencionada. Las composiciones y métodos pueden, sin embargo, no carecer necesariamente de insulina endógena. Como se usa en el presente documento, "insulina endógena" indica que las células cultivadas pueden estar produciendo insulina por sí mismas cuando se cultivan de acuerdo con los métodos de la presente invención. La insulina endógena también puede usarse para indicar impurezas residuales del cultivo celular primario o impurezas de los materiales de partida. En ejemplos específicos, las composiciones y métodos del presente documento contienen menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,1 µg/ml, o sustancialmente ninguna cantidad de insulina.

Siendo claros, el término "insulina" se refiere a la proteína, o variante o fragmento de la misma, que se une al receptor de insulina en concentraciones fisiológicas normales y puede inducir la señalización a través del receptor de insulina. El término "insulina" abarca una proteína que tiene la secuencia polipeptídica de la insulina humana nativa, o de otra insulina de mamífero, o de cualquiera de los homólogo o variantes de estas secuencias. De manera adicional, el término insulina abarca fragmentos polipeptídicos que tienen la capacidad de unirse al receptor de insulina para inducir la señalización a través del receptor de insulina. La expresión "sustituto de insulina" se refiere a cualquier compuesto que contiene zinc que pueda usarse en lugar de la insulina, para proporcionar resultados sustancialmente similares a los de la insulina. Los ejemplos de sustitutos de insulina incluyen, pero sin limitación, cloruro de zinc, nitrato de zinc, bromuro de zinc y sulfato de zinc.

También para ser claros, los factores de crecimiento insulínicos no son sustitutos de la insulina u homólogos de la insulina, como se contempla en la presente invención. Por consiguiente, en otra realización específica, las composiciones y métodos de la presente comprenden el uso de al menos un factor de crecimiento insulínico (IGF) o una variante o un fragmento funcional del mismo. En otra realización, las composiciones y métodos de la presente invención carecen de cualquier factor de crecimiento insulínico (los IGF) exógeno. En realizaciones específicas, las composiciones y métodos de la presente invención contienen menos de 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 ng/ml de IGF-1.

Los medios definidos y/o los medios basales pueden incluir "un aminoácido (o aminoácidos) no esencial", que se refiere a una especie de aminoácido que no necesita añadirse a un medio de cultivo para un dado tipo de célula, normalmente debido a que la célula sintetiza, o tiene la capacidad de sintetizar, la especie de aminoácido particular. Aunque difieren de una especie a otra, se sabe que los aminoácidos no esenciales incluyen L-alanina, L-asparragina, L-ácido aspártico, ácido L-glutámico, glicina, L-prolina y L-serina.

Los medios definidos y/o los medios basales también pueden incluir diversos factores de crecimiento, por lo tanto, la expresión "factor de crecimiento", que puede o no incluirse en los medios definidos descritos en el presente documento, se refiere a una sustancia que es eficaz para estimular el crecimiento del células madre y que, a menos que se añada al medio de cultivo como un complemento, no es, por lo demás, un componente del medio basal. Dicho de otra forma, un factor de crecimiento es una molécula que no es secretada por las células que se están cultivando (incluyendo cualquiera de las células alimentadoras, si están presentes) o, si es secretada por células en el medio de cultivo, no se secreta en una cantidad suficiente para lograr el resultado obtenido agregando de forma exógena el factor de crecimiento. Los factores de crecimiento incluyen, pero sin limitación, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico I (IGF-I), factor de crecimiento insulínico II (IGF-II), factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), activina A y proteínas morfogenéticas óseas (las BMP), citocinas, quimiocinas, morfógenos, anticuerpos neutralizantes, otras proteínas y otras moléculas que incluyen, pero sin limitación, heregulina, como se describe en el documento WO 2007/101130 (PCT/US07/062755). El medio de cultivo definido como se describe en el presente documento tampoco contiene sustancialmente insulina o carece de cantidades sustanciales de insulina.

Las condiciones de cultivo descritas en el presente documento son "isotónicas", término que se refiere a una solución que tiene esencialmente la misma tonicidad (es decir, una presión osmótica eficaz equivalente) que otra solución con la que se compara. En el contexto de un cultivo celular, un medio "isotónico" es uno en el que las células pueden cultivarse sin un flujo neto apreciable de agua a través de las membranas celulares.

Además, las condiciones de cultivo descritas en el presente documento son soluciones que tienen "baja presión osmótica", que se refiere a una solución que tiene una presión osmótica de menos de aproximadamente 300 miliosmoles por kilogramo ("mOsm/kg").

Aunque no se emplea en la presente invención un medio condicionado, como se usa en el presente documento, la expresión "medio condicionado" se refiere a un medio de cultivo que se complementa adicionalmente con factores solubles procedentes de células cultivadas en el medio. Las técnicas para aislar el medio condicionado de un cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Como se apreciará, preferentemente el medio condicionado carece esencialmente de células. En este contexto, "carece esencialmente de células" se refiere a un medio condicionado que contiene menos de aproximadamente el 10 %, preferentemente menos de aproximadamente el 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % y el 0,0001 % que el número de células por unidad de volumen, en comparación al cultivo del cual

que se separó. Sin embargo, se contempla que el experto en la materia pueda "eliminar sustancialmente" uno o más componentes detectables de un medio acondicionado. Por ejemplo, el experto en la materia puede eliminar una cantidad del componente (o componentes) conocido detectable del medio condicionado, lo que da como resultado un medio condicionado fraccionado, en comparación con un medio condicionado no fraccionado. El fraccionamiento de un medio condicionado se puede realizar mediante cualquier método (o combinación de métodos) adecuado para eliminar los componentes detectables, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, precipitación inmunitaria, dispositivos de exclusión por tamaño.

"Células madre embrionarias humanas" o "células hES" o "las hESC" o "células madre" o "células madre pluripotentes" son células obtenidas de un embrión humano, que no sea mediante la destrucción de un embrión humano. Estos términos y frases son equivalentes a la frase "célula diferenciable". Una "célula diferenciable" se usa para describir una célula o población de células que pueden diferenciarse en células al menos parcialmente maduras, por ejemplo, fusionarse con otras células, que pueden diferenciarse en células al menos parcialmente maduras. Como se usa en el presente documento, las "células parcialmente maduras" son células que presentan al menos una característica del fenotipo, tal como la morfología o la expresión proteínas, de una célula madura del mismo órgano o tejido.

Las células diferenciables, como se usa en el presente documento, pueden ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e incluso unipotentes, como se define con detalle a continuación. En determinadas realizaciones de la presente invención, las células diferenciables son células diferenciables pluripotentes. En realizaciones más específicas, las células diferenciables pluripotentes se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias, células de MCI/epiblasto, células de ectodermo primitivo, células germinales primordiales y células de teratocarcinoma. En una realización particular, las células diferenciables son células madre embrionarias de mamífero. En una más realización particular, las células diferenciables son células madre embrionarias humanas.

La descripción también contempla células diferenciables de cualquier fuente dentro de un animal, con la condición de que las células sean diferenciables como se define en el presente documento. Por ejemplo, las células diferenciables pueden recogerse de embriones o de cualquier capa germinal primordial de los mismos, de tejido placentario o coriónico, o de tejido más maduro, tal como células madre adultas incluyendo, pero sin limitación, tejido adiposo, médula ósea, tejido nervioso, tejido mamario, tejido hepático, páncreas, tejido epitelial, respiratorio, gonadal y muscular. En realizaciones específicas, las células diferenciables son células madre embrionarias. En otras realizaciones específicas, las célula diferenciables son células madre adultas. En aún otras realizaciones específicas, las células madre son células madre obtenidas de placenta o del corion.

Las células diferenciables de la presente divulgación pueden obtenerse usando cualquier método conocido para los expertos en la materia. Por ejemplo, las células pluripotentes humanas pueden producirse usando métodos de desdiferenciación y transferencia nuclear. De manera adicional, la célula de MCI/epiblasto humana o la célula de ectodermo primitivo utilizada en la presente invención puede obtenerse *in vivo* o *in vitro*. Las células ectodérmicas primitivas se pueden generar en cultivo adherente o como agregados celulares en cultivo en suspensión, como se describe en el documento WO 99/53021. Además, las células pluripotentes humanas pueden pasarse usando cualquier método conocido para los expertos en la materia, incluyendo, métodos de realización manual de pases y métodos de realización de pases masiva, tales como realización enzimática o no enzimática de pases.

Como se usa en el presente documento, el término "diferenciar" se refiere a la producción de un tipo celular que está más diferenciado que el tipo celular del que se obtiene. Por lo tanto, el término abarca los tipos celulares que están parcial y definitivamente diferenciados.

En determinadas realizaciones de la presente invención, el término "enriquecido" se refiere a un cultivo celular que contiene al menos el 50 %, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% del linaje celular deseado.

Como se usa en el presente documento, la expresión cultivo celular "sustancialmente indiferenciado" se refiere a una población de células madre que contiene al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 60 %, 70 % o el 80 %, o incluso más preferentemente, al menos aproximadamente el 90 %, de células madre indiferenciadas. La clasificación de células activadas por fluorescencia usando anticuerpos marcados o genes/proteínas indicadoras (por ejemplo, proteína verde fluorescente potenciada [EGFP]), para uno o más marcadores indicativos de un estado indiferenciado deseado, puede usarse para determinar cuántas células de una dada población de células madre están indiferenciadas. Con el fin de hacer esta evaluación, pueden detectarse uno o más marcadores de superficie celular correlacionados con un estado indiferenciado (por ejemplo, SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81), así como el marcador de factor de transcripción típico de células madre pluripotentes, Oct-4. También se puede someter a ensayo la actividad de transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y de fosfatasa alcalina. En el contexto de las células madre de primate, la selección positiva y/o negativa se puede usar para detectar, por ejemplo, mediante inmunotinción o empleando un gen informador (por ejemplo, EGFP), la expresión (o la falta de la misma) de determinados marcadores (por ejemplo, Oct-4, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1, SSEA-3, nestina, telomerasa, Myc, p300 e histona Tip60 acetiltransferasas, y actividad de fosfatasa alcalina) o la presencia de determinadas modificaciones postraduccionales (por ejemplo, histonas acetiladas), lo que facilita de este modo la evaluación del estado de autorrenovación o de diferenciación de las células. Además, las células indiferenciadas

descritas en el presente documento tienen una morfología típica de células madre, que está bien descrita en la técnica.

"Pluripotente" se refiere a células que tienen la capacidad de diferenciarse en uno de una pluralidad de tipos celulares distintos, aunque no necesariamente en todos los tipos celulares. Una clase ilustrativa de células pluripotentes son las células madre embrionarias, que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular del cuerpo humano. Por lo tanto, se reconocerá que, aunque las células pluripotentes se pueden diferenciar en células multipotentes y otros tipos celulares más diferenciados, el proceso de diferenciación inversa (es decir, la desdiferenciación) es probablemente más complicado y precisa la "reprogramación" de la célula para ser volverse más primitiva, lo que significa que, después de la reprogramación, tiene la capacidad de diferenciarse en más o distintos tipos celulares de lo que era posible antes de la reprogramación. Las células pluripotentes no incluyen las hESC obtenidas a través de la destrucción de un embrión humano.

"Totipotente" se refiere a células que tiene la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular, incluyendo células pluripotentes, multipotentes y completamente diferenciadas (es decir, células que ya no son capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares), tales como, pero sin limitación, células madre embrionarias, célula madre neurales, células madre de médula ósea, células madre hematopoyéticas, cardiomiocitos, neuronas, astrocitos, miocitos y células del tejido conectivo.

Como se usa en el presente documento, las "células multipotentes" incluyen células, y su progenie, que pueden diferenciarse en, o dar lugar a, células multipotentes, oligopotentes y progenitoras unipotentes, y/o uno o más tipos de células maduras o parcialmente maduras, excepto que los tipos de células maduras o parcialmente maduras obtenidas de células multipotentes se limiten a células de un tejido, órgano o sistema de órganos particular. Por ejemplo, una célula hematopoyética progenitora multipotente y/o su progenie poseen la capacidad de diferenciarse en o dar lugar a uno o más tipos de células oligopotentes, tales como células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides, y también de dar lugar a otros componentes celulares maduros encontrados normalmente en la sangre. Las "células oligopotentes" incluyen células y su progenie cuya capacidad para diferenciarse en células maduras o parcialmente maduras está más restringida que en las células multipotentes. Las células oligopotentes pueden, sin embargo, poseer aún la capacidad de diferenciarse en células oligopotentes y unipotentes, y/o uno o más tipos celulares más maduros o parcialmente maduros de un dado tejido, órgano o sistema de órganos particular. Un ejemplo de una célula oligopotente es una célula mieloide progenitora, que en última instancia puede dar lugar a eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos maduros o parcialmente maduros. Las "células unipotentes" incluyen células y su progenie que poseen la capacidad de diferenciarse o de dar lugar a otras células unipotentes y/o un tipo celular maduro o parcialmente maduro.

Además, una célula madre "normal" se refiere a una célula madre (o su progenie) que no presenta un fenotipo anómalo o tiene un genotipo anómalo, y por lo tanto puede dar lugar a la variedad completa de células que se pueden obtener de dicha célula madre. En el contexto de una célula madre totipotencial, por ejemplo, la célula podría dar lugar a, por ejemplo, un animal completo y normal que es saludable. Por el contrario, una célula madre "anómala" se refiere a una célula madre que no es normal, debido a, por ejemplo, o una o más mutaciones o modificaciones genéticas o patógenos. Por lo tanto, las células madre anómalas difieren de las células madre normales.

De nuevo, aunque la presente invención no emplea un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o matriz, por ejemplo, una "matriz extracelular", una "matriz extracelular" o "matriz", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más sustancias que proporcionan sustancialmente las mismas condiciones para sustentar el crecimiento celular que proporciona una matriz extracelular sintetizada por células alimentadoras. La matriz puede proporcionarse en un sustrato (por ejemplo, fibronectina, colágeno, MATRIGEL™ y similares).

Como se usa en el presente documento, la expresión "células alimentadoras" o "capas de células alimentadoras" son células que crecen *in vitro* y se cocultivan con una célula diana, por ejemplo, se cocultivan con células madre. Como se usa en el presente documento, la expresión "carece esencialmente de una célula alimentadora" o "carece de alimentador", y equivalentes de la misma, se refiere a condiciones de cultivo de tejidos que no contienen células alimentadoras añadidas de forma intencionada. Además, un cultivo celular está "carece esencialmente de alimentadores" cuando no contiene medio condicionado añadido de forma exógena tomado de un cultivo de células alimentadoras ni células alimentadoras añadidas de forma exógena al cultivo, donde "células alimentadoras no añadidas de forma exógena" significa que las células para desarrollar una capa de células alimentadoras no se ha introducido deliberadamente por esa razón. Obviamente, si las células a cultivar se obtienen de un cultivo de siembra que contenía células alimentadoras, el coaislamiento incidental y la posterior introducción en otro cultivo de una pequeña proporción de esas células alimentadoras junto con las células deseadas no deben considerarse como una introducción intencionada de células alimentadoras. En dicho caso, el cultivo contiene un número mínimo de células alimentadoras. Por "mínimo", se entiende el número de células alimentadoras que se transfiere a las condiciones de cultivo presentes a partir de las condiciones de cultivo previas, en las que las células diferenciables pueden haberse cultivado en células alimentadoras. De forma similar, no se considerará que las células alimentadoras o las células de tipo alimentadoras que se desarrollan a partir de las células madre sembradas en el cultivo se hayan introducido de forma intencionada en el cultivo.

La presente invención contiene un medio definido que contiene además diversas cantidades de suero humano, por ejemplo, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10%, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5%, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 3%, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 2% y de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 1%. Sin embargo, los cultivos de células madre de medios definidos típicos usan la expresión "carente esencialmente de suero", que se refiere al suero añadido de forma exógena. El suero añadido en tales medios está normalmente en cantidades mayores que las descritas en el presente documento. Obviamente, si las células que se están cultivando producen algunos o todos los componentes del suero, o si las células a cultivar se obtienen de un cultivo de siembra cultivado en un medio que contenía suero, el coaislamiento incidental y la posterior introducción en otro cultivo de una pequeña cantidad de suero (por ejemplo, menos de aproximadamente el 1 %), no deben considerarse una introducción intencionada de suero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dispositivo de exclusión por tamaño" se refiere a dispositivos de filtración que tiene la capacidad de separar materiales en función de su tamaño. Una clase ilustrativa, no limitante, de tales dispositivos es la clase de tipo filtración, en donde los componentes de la muestra se separan en función del peso molecular, a través de una matriz que permite que las moléculas pequeñas pasen más rápidamente que las moléculas más grandes. Normalmente, los dispositivos de tipo filtración se caracterizan por un límite de peso molecular que representa un límite superior del peso molecular de las moléculas que pueden atravesar la matriz. Normalmente, una solución de muestra o mezcla de reacción se fuerza a través de la matriz de separación por peso molecular aplicando una fuerza centrífuga (por centrifugación) o presión positiva (por ejemplo, aplicación de presión gaseosa o aplicación de un pistón sobre la solución o mezcla de reacción). En algunas realizaciones, la matriz de proporciona como una membrana. Normalmente, tales dispositivos tienen un material de filtro integrado entre una cámara superior y una inferior. Ejemplos de tales dispositivos de exclusión por tamaño, disponibles en el mercado, son los Microcon 300, 100, 50, 30, 3 y Centricon 3K, 30K, 50K, 100K y 300K (todos de Millipore), y Nanosep disponible con los límites 10 K, 30K, 100 K y 300 k (todos de Pall Corp.). Las unidades Microcon y las Centricon son los mismos dispositivos, pero difieren en el volumen de solución que se puede usar. También está disponible una placa de 96 pocillos, para procesar muchas muestras de forma simultánea. El uso de tal placa de pocillos para múltiples muestras hace que el proceso de purificación sea menos laborioso. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el "dispositivo de exclusión por tamaño" comprende una barrera porosa que discrimina por tamaño, que permite que moléculas más pequeñas (por ejemplo, más pequeñas que un límite de peso molecular predeterminado, como se ejemplifica anteriormente) pasen, mientras se retienen moléculas más grandes (que tienen pesos moleculares más grandes que el límite). Por ejemplo, tal dispositivo puede ser un dispositivo de ultrafiltración, que comprende una membrana porosa, tal como un dispositivo de filtración Microcon o Centricon, del tipo que se acaba de describir. El límite de peso molecular del dispositivo de exclusión por tamaño se selecciona para retener los componentes deseados y permitir el paso de especies no deseadas. Por lo tanto, tales realizaciones funcionan reteniendo moléculas más grandes que pueden quedar atrapadas de forma transitoria en los poros de las partículas, mientras que las moléculas más pequeñas pasan con grueso del eluyente, de forma que las moléculas más pequeñas eluyen primero. En algunas realizaciones, el dispositivo de exclusión por tamaño tiene un límite de 300 K, o un límite de 100 K, o un límite de 30 K. Se apreciará que, sin embargo, que se puede emplear en los presentes métodos un dispositivo de exclusión por tamaño que tenga cualquier límite adecuado.

Los métodos descritos en el presente documento comprenden sembrar las células en placas en un cultivo adherente. Como se usa en el presente documento, las expresiones "sembrado en placas" y "sembrar en placas" se refieren a cualquier procedimiento que permita cultivar una célula en un cultivo adherente. Como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo adherente" se refiere a un sistema de cultivo celular mediante el cual las células se cultivan sobre una superficie sólida, que a su vez puede estar recubierta con un sustrato insoluble que a su vez puede estar recubierto con otra capa superficial de un sustrato, como los enumerados a continuación, o cualquier otro material químico o biológico que permita a las células proliferar o estabilizarse en cultivo. Las células pueden o no adherirse firmemente a la superficie sólida o al sustrato. El sustrato para el cultivo adherente puede comprender uno cualquiera o una combinación de MATRIGEL™ poliornitina, laminina, polilisina, colágeno purificado, gelatina, fibronectina, tenascina, vitronectina, entactina, proteoglucanos heparina sulfato, ácido poliglicólico (PGA), poli ácido láctico (PLA) y poli (ácido láctico-glicólico) (PLGA). Además, el sustrato para el cultivo adherente puede comprender la matriz depositada por una capa alimentadora, o depositada por la célula humana pluripotente o cultivo celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "componente de unión soluble" o "agente de unión soluble" o equivalentes de las mismas, se refiere a un componente soluble, por ejemplo, un polipéptido, contenido en suero humano que actúa estimulando la unión de células madre pluripotentes a un sustrato, por ejemplo, estimulando que las células madre pluripotentes se unan al recipiente de cultivo de tejidos plástico. El componente de unión soluble es de al menos de 100 k Da, al menos de 150 kDa, al menos de 200 kDa, al menos de 250 kDa o al menos de 300 kDa o más, y permanece en suspensión o es un soluto en solución. Es decir, tal componente de unión soluble no se proporciona para el recubrimiento del recipiente de cultivo de tejidos y, por lo tanto, no forma la base de un recubrimiento de matriz como se entiende normalmente en los cultivos de células madre de primate.

Como se usa en el presente documento, la expresión, "recipiente de cultivo de tejidos" o "plástico de cultivo de

tejidos", o equivalentes de los mismos, se refieren a todos y cada uno de los recipientes, conocido ahora o descubierto más tarde, comúnmente utilizado para cultivar y crecer células madre. Por ejemplo, algunos recipientes de cultivo de tejidos tienen una base con una pared inferior y una pluralidad de paredes laterales que se extienden hacia arriba desde dicha pared inferior, una cubierta que se extiende a través de dichas paredes laterales y opuesta a la pared inferior. Como alternativa, la cubierta puede estar compuesta de al menos una abertura y un tabique que se extiende a través de dicha abertura para permitir el acceso a partes interiores de dicho recipiente mediante otro dispositivo. Aun así, muchos recipientes de cultivo de tejidos tienen generalmente forma prismática (por ejemplo, biorreactores), con una pluralidad de paredes laterales verticales que se extienden entre las paredes superior e inferior opuestas. Las paredes laterales generalmente están construidas de forma que la longitud y el ancho del recipiente exceden la altura. Como resultado, la pared inferior del recipiente define un área bastante grande con respecto al volumen del recipiente. Normalmente, se forma un cuello tubular en una de las paredes laterales del recipiente para proporcionar acceso al interior. La superficie exterior del cuello puede conformarse de un conjunto de rosca para recibir una tapa. Por lo tanto, un experto en la materia reconocerá que la presente invención y el uso de medios que contienen Sh para estimular la unión celular a la base, parte inferior o paredes laterales de un recipiente de cultivo de tejidos o similar a de cultivo de tejidos, abarca muchos y potencialmente todos los recipientes de cultivo de tejidos, independientemente de la forma, tamaño y volumen.

La presente invención también puede entenderse más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferentes de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento. Sin embargo, antes de divulgar y describir las presentes composiciones y procedimientos, se comprende que la presente invención no se limita a los ácidos nucleicos específicos, polipéptidos específicos, tipos celulares específicos, células hospedadoras específicas, condiciones específicas o métodos específicos, etc., y por lo tanto pueden, obviamente, variar, y las numerosas modificaciones y variaciones en los mismos serán evidentes para los expertos en la materia.

Cultivo definido para el cultivo, proliferación y mantenimiento de células madre pluripotentes

La presente invención describe el uso de métodos y composiciones para un medio definido, que se describió en primer lugar en el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755), presentado el 13 de junio de 2007).

Al guiar la tecnología de hESC hacia la clínica, una cuestión clave a abordar es la falta de uniformación en el cultivo y el mantenimiento de las hESC. En ausencia de capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón (FER), muchos investigadores se basan en el "condicionamiento", en el que el medio se expone en primer lugar a los FER para adquirir factores solubles que sustenten la propagación de las hESC indiferenciadas en el cultivo. Ha sido difícil discernir cómo el condicionamiento con FER permite a las hESC mantener un estado indiferenciado. Otras características comunes de las condiciones de cultivo de hESC desarrolladas de forma más reciente incluyen la presencia de FGF2, la ausencia de suero y la presencia de un sustituto del suero, tal como KnockOut Serum Replacer (KSR-Invitrogen, formulación patentada) o Xeno-Free KnockOut Serum Replacer (XFKSR-Invitrogen, formulación patentada). Otros factores sugeridos como desempeñando un papel en el sustento del mantenimiento de las hESC incluyen al TGFβ1, la activina A (ActA), el PDGF y la esfingosina-1-fosfato, BIO, un inhibidor de GSK3β de molécula pequeña, y las neurotrofinas. Se han descrito varios sistemas de medios definidos para las hESC, y están basados en FGF2 en combinación con nodal, TGFβ1, GABA, ácido pipecólico, más cloruro de litio, Wnt3a más April/BAFF, o los complementos N2/B27. Aunque estos estudios se han centrado en la identificación de los factores de crecimiento y las condiciones que sustentan la proliferación de las hESC indiferenciadas, poco se sabe sobre los receptores de superficie celular que se activan cuando las hESC se exponen a condiciones favorables para la autorrenovación.

Los métodos y composiciones de un medio definido que sustenta la autorrenovación de hESC se describen en el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755). Un beneficio de usar medios definidos es que los ingredientes que comprenden los medios son conocidos y tienen cantidades conocidas. Por el contrario, un medio no definido tiene algunos ingredientes complejos, que consiste en una mezcla de gran cantidad de especies químicas en proporciones desconocidas. Las razones para utilizar medios químicamente definidos también son prácticas, debido a que tales medios son reproducibles en distintos momentos y en distintos laboratorios. Los medios definidos se pueden variar de forma controlada y carecen de actividades biológicas desconocidas, tal como enzimas y, como alternativa, factores de crecimiento, los cuales pueden afectar las respuestas que se estudian.

Las composiciones y métodos de la presente invención son útiles para el cultivo de células, en particular, de células diferenciables. Se entiende que en distintos puntos durante el cultivo de células diferenciables, se pueden añadir diversos componentes al cultivo celular, de forma que el medio pueda contener componentes distintos de los descritos en el presente documento.

Las composiciones y métodos comprenden una solución nutritiva basal salina. Como se usa en el presente documento, y como se describe en el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755), una solución nutritiva basal salina se refiere a una mezcla de sales que proporcionan agua y cantidad de determinados iones inorgánicos a las células, esenciales para el metabolismo celular normal, mantiene el equilibrio osmótico intra- y extracelular, proporciona un hidrato de carbono como fuente de energía y proporciona un sistema de tamponador para mantener el medio dentro del intervalo de pH fisiológico. Los ejemplos de soluciones nutritivas basales salinas incluyen, pero

sin limitación, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio Esencial mínimo (MEM), medio basal Eagle (BME), RPM1 1640, Hams F-10, de Ham F-12, medio esencial mínimo β (βMEM), Medio mínimo esencial de Glasgow (G-MEM) y medio de Dulbecco modificado de Iscove, y mezclas de los mismos. En una realización particular, la solución nutritiva basal salina es una mezcla de aproximadamente 50:50 de DMEM y F12 de Ham.

En una realización, las composiciones y métodos de la presente invención proporcionan un factor o agente de unión soluble, tales componentes de unión solubles están contenidos en el suero humano, que en el intervalo de concentración apropiado facilita la unión de células hESC a plástico de tipo para cultivo tisular. Dicha unión celular permite que las células se unan y formen una monocapa, pero en ausencia de una capa alimentadora o de un recubrimiento de sustrato, por ejemplo, un recubrimiento de matriz, MATRIGEL™ y similares. Preferentemente, el suero humano se utiliza para proporcionar un entorno carente de animales. El suero humano se puede obtener de cualquier proveedor comercial de productos para el cultivo de tejidos, los ejemplos incluyen Gibco-Invitrogen Corporation (Grand Island, N.Y. EE. UU.), Sigma (St. Louis Mo., EE. UU.) y la ATCC (Manassas, Va. EE. UU.). El suero utilizado en la presente invención se proporciona en un intervalo de concentraciones de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 20 %, más preferentemente de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 3 %, más preferentemente de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 2%, más preferentemente de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1,5 % y más preferentemente de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1 %.

En otro aspecto de la invención, el suero humano se fracciona usando dispositivos microfluídicos de exclusión por tamaño. Están disponibles en el mercado diversos dispositivos microfluídicos para filtración. Los dispositivos pueden utilizarse, por ejemplo, para filtración en gel, filtración de exclusión por tamaño, filtración por intercambio iónico o combinaciones de estas técnicas de filtración. Por ejemplo, los materiales de filtración se pueden cargar y/o incluir en los dispositivos, y pueden incluir pequeñas perlas de materiales de filtración. Se pueden usar materiales de exclusión por tamaño que pueden retener moléculas más pequeñas de una muestra acuosa mientras permiten que las moléculas más grandes de la muestra pasen a través o alrededor. Por ejemplo, se pueden usar materiales de P-10BIO-GEL de Bio-Rad y están compuestos de partículas de acrilamida que tienen un diámetro promedio de tamaño de partícula de 45-100 µm. Las muestras se pueden manipular a través de dispositivos microfluídicos, mediante diferenciales de presión de gravedad o fuerza centrípeta, por ejemplo. Los filtrados resultantes que eluyen de los dispositivos se pueden analizar, utilizar o posteriormente pasar por el dispositivo a una fase posterior de procesamiento. En un aspecto de la invención, el dispositivo de exclusión por tamaño tiene columnas de centrifugación con un límite de 300 KDa, o un límite de 100 KDa, o un límite de 30 KDa, por ejemplo, columnas de centrifugación Microcon.

De acuerdo con otros aspectos de la invención, el material de ajuste del filtro puede "ajustarse a presión" en la cámara respectiva, colocarse en la cámara respectiva o posicionarse de otra manera en la cámara respectiva.

En otro aspecto de la invención, el material de filtración en gel puede disponerse en un canal del dispositivo microfluídico. El material de filtración en gel se puede cargar en el dispositivo pipeteando en una abertura de entrada del dispositivo y/o introduciendo el material en el dispositivo mediante el uso de fuerza de vacío, por ejemplo, aplicado a una abertura de salida del dispositivo. Un canal del dispositivo se puede llenar con un material de filtración en gel cargando a presión el material de filtración en gel a través de una abertura de entrada del dispositivo, para dosificar el material de filtración en gel en un canal o cámara del dispositivo. Una vez que el canal se llena con material de filtración de gel hidratado, el dispositivo se puede centrifugar para eliminar el agua del material de filtración en gel y para "compactar" el material de filtración en gel, formando una columna de purificación. Este procedimiento puede usarse para preparar el dispositivo para la filtración de la muestra y se puede usar para eliminar el agua o el exceso de agua innecesarios o en exceso del material de filtración en gel.

Por lo tanto, se apreciará que los dispositivos de exclusión por tamaño microfluídicos, en general, que tengan cualquier material y/o agente de filtración adecuado y que tengan cualquier límite de peso molecular adecuado, se pueden emplear en los presentes métodos; y las composiciones y métodos descritos en el presente documento no están limitados a los dispositivos descritos.

Las composiciones y los métodos de la invención también pueden incluir al menos un activador de un receptor de FGF, incluyendo cualquiera de los polipéptidos FGF, fragmentos funcionales de los mismos o variantes de los mismos. Las composiciones y métodos de la invención pueden incluir seroalbúmina (SA), por ejemplo, SA bovina (BSA) o SA humana (HSA), al menos un sustrato insoluble. Por ejemplo, las células diferenciables se pueden colocar en una superficie de cultivo celular que comprende tales compuestos como, pero sin limitación, poliestireno y polipropileno.

La presente invención se distingue de otras condiciones de cultivo definidas en que las composiciones y métodos comprenden células madre pluripotentes proliferativas, carentes sustancialmente de células o capas alimentadoras, o "sin alimentadores", o un medio condicionado producido recogiendo el medio de un cultivo de células alimentadoras. Además, las composiciones y métodos de la presente invención no precisan que las células madre pluripotentes proliferen y crezcan en ningún sustrato, incluyendo cualquier sustrato recubierto con componentes de matriz extracelular (es decir, colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y similares,

solos o en diversas combinaciones), o MATRIGEL™. La concentración de suero humano proporcionada en el presente documento es suficiente para estimular la unión celular y estimular el crecimiento y la proliferación de células madre pluripotentes indiferenciadas.

En una realización, las células diferenciables se ponen en contacto con al menos una de las composiciones de la invención, en ausencia de una capa de células alimentadoras, de forma que las células se mantienen en un estado indiferenciado durante al menos uno (1) a doce (12) meses, o más. La pluripotencia se puede determinar a través de la caracterización de las células con respecto a marcadores de superficie, marcadores transcripcionales, el cariotipo y la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales. Estas características son bien conocidas para los expertos en la materia.

Se contempla que las células diferenciables puedan pasarse utilizando métodos de disociación enzimáticos, no enzimáticos o manuales, antes y/o después del contacto con el medio definido de la invención. Los ejemplos no limitantes de los métodos de disociación enzimáticos incluyen el uso de proteasas, tales como tripsina, colagenasa, dispasa y ACCUTASE™. En una realización, para pasar las células en contacto se utiliza ACCUTASE ™. Cuando se usan métodos enzimáticos de realización de pases, el cultivo resultante puede comprender una mezcla de singletes, dobletes, tripletes y grupos de células que varían en tamaño, dependiendo de la enzima utilizada. Un ejemplo no limitante de un método de disociación no enzimático es un tampón de dispersión celular. Las técnicas manuales de realización de pases se han descrito en la técnica, tal como en Schulz *et al.*, 2004 Stem Cells, 22(7):1218-38. La elección del método de realización de pases está afectada por otras condiciones de cultivo, incluyendo, pero sin limitación, los alimentadores y/o matrices extracelulares; aunque ninguno de los dos se prevén en la presente invención.

La solución de disgregación utilizada en los métodos de la presente invención puede ser cualquier solución de disgregación que tenga la capacidad de separar o disgregar las células en células individuales, sin provocar una toxicidad extensa para las células. Los ejemplos de soluciones de disgregación incluyen, pero sin limitación, tripsina, ACCUTASE™, tripsina/EDTA al 0,25 %, TrypLE o VERSENE™ (EDTA) y tripsina. Los métodos de la presente invención no necesitan dar como resultado que cada célula de la capa confluente se disgregue en células individuales, siempre que al menos unas pocas células individuales estén disgregadas y puedan volver a cultivarse.

Las composiciones y métodos de la invención pueden contener prácticamente cualquier combinación de los componentes establecidos anteriormente o descritos en otra parte del presente documento, por ejemplo, véase el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755). Como reconocería un experto en la materia, los componentes de las composiciones y métodos de la invención variarán de acuerdo con el diseño del protocolo. Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere al cultivo de células diferenciables en placas de 96 pocillos y/o placas de 384 pocillos, o en recipientes más grandes que incluyen biorreactores, fábricas de células u otros dispositivos especializados automatizados o que cumplan con las BPF disponibles o ideados por un experto en la materia. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención no se limitan a dimensiones específicas de la cámara de cultivo.

Los métodos de cultivo de la invención comprenden el cultivo de células madre en un entorno de crecimiento que carece esencialmente de alimentadores y que comprende un medio de cultivo definido isotónico de acuerdo con la invención y en ausencia de una matriz. Dichos medios de cultivo isotónicos definidos contienen los componentes esenciales que se precisan para mantener a las células madre (por ejemplo, células madre pluripotentes) en un estado sustancialmente indiferenciado (o sus equivalentes funcionales). Las células pueden cultivarse en tal entorno, en cualquier recipiente de cultivo adecuado, en condiciones que permitan mantener un estado indiferenciado.

Utilizando tales métodos, pueden aislarse de los cultivos celulares resultantes poblaciones de células madre, incluyendo, por ejemplo, células madre embrionarias humanas, lo que representa, de este modo, otro aspecto de la invención. Dichas poblaciones pueden aislarse mediante cualquier técnica adecuada. Dichas técnicas incluyen cromatografía de afinidad, selección y clasificación de células asistida por fluorescencia. Dichas técnicas emplean cada una uno o más reactivos de separación (por ejemplo, pero sin restricción, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, genes/proteínas indicadoras, etc.) que son específicos para un marcador basado en células indicativo de un estado indiferenciado. En el contexto de las células madre embrionarias humanas sustancialmente indiferenciadas, tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero sin restricción, el factor transcripcional Oct4 y loa marcadores de superficie celular SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Otros marcadores incluyen a la telomesara, Myc, p300 e histona Tip60 acetiltransferasas, histonas acetiladas y fosfatasa alcalina, y la morfología típica de las células madre.

Método de identificación de factores/agentes que tengan la capacidad de estimular el crecimiento y/o diferenciación de células madre pluripotentes

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de uso de células madre para identificar factores que estimulan la diferenciación de las células o, como alternativa, el mantenimiento y la estabilización continuados de las células en un estado sustancialmente indiferenciado. Brevemente, en el contexto de diferenciación o mantenimiento de un estado sustancialmente indiferenciado, tales métodos implican, por ejemplo, exponer un compuesto de prueba

a células madre embrionarias sustancialmente indiferenciadas que se están cultivando en un medio de cultivo definido isotónico de la invención. Después de la exposición al compuesto de prueba, las células se evalúan para determinar si se han mantenido mejor en un estado sustancialmente indiferenciado o se han inducido a diferenciar. Si las células se han mantenido mejor en un estado sustancialmente indiferenciado, el compuesto de prueba se puede identificar como uno que estimula un estado indiferenciado o de autorrenovación de células madre pluripotentes. Si las células se han inducido a diferenciarse, el compuesto de prueba se puede identificar como uno que estimula la diferenciación de células madre pluripotentes sustancialmente indiferenciadas. Las células en diferenciación se pueden seguir para determinar su destino de desarrollo, en otras palabras, para determinar en qué linaje celular se convierten como resultado de la diferenciación. En el contexto de la desdiferenciación, las células de un estado más diferenciado se exponen a uno o más compuestos y después se evalúan para determinar si la exposición dio como resultado células de un tipo más primitivo (por ejemplo, una célula madre pluripotente) que las expuestas de forma inicial al compuesto de prueba. Si es así, El compuesto que produce el efecto se identifica como uno que estimula la desdiferenciación o reprogramación de células. Preferentemente, estos y otros métodos de exploración de acuerdo con la invención se llevan a cabo de una manera de alto rendimiento, de forma que pueden explorarse de forma simultánea numerosos compuestos.

Los tipos celulares que se diferencian a partir de las células diferenciables tienen varios usos en diversos campos de investigación y desarrollo incluyendo, pero sin limitación, el descubrimiento de fármacos, el desarrollo y análisis de fármacos, la toxicología, la producción de células con fines terapéuticos, así como investigación científica básica. Estos tipos celulares expresan moléculas que son de interés en una amplia diversidad de campos de investigación. Estas incluyen las moléculas conocidas como necesarias para el funcionamiento de los diversos tipos celulares, tal como se describe en los textos de referencia habituales. Estas moléculas incluyen, pero sin limitación, citocinas, factores de crecimiento, receptores de citocinas, la matriz extracelular, factores de transcripción, polipéptidos secretados y otras moléculas, y receptores de factores de crecimiento.

Debe entenderse que uno de los beneficios proporcionados por el cultivo de células madre mediante métodos descritos en la presente invención es la reducción y evitación de la contaminación de las células madre por patógenos o antígenos extraños a las células madre. Este tipo de contaminación puede producirse cuando se usan células alimentadoras de una especie distinta o de un individuo distinto y no relacionado de la misma especie. Los métodos de la invención están destinados a evitar tanto como sea los posibles análisis adicionales de las líneas de células madre (incluyendo el análisis del contenido de patógenos). En algunas realizaciones, se prevé que las células madre humanas y/o su progenie diferenciada se pueden trasplantar a un individuo genéticamente relacionado sin un análisis previo de parte o todo el contenido de patógenos.

Las líneas celulares pueden analizarse antes o después de la crioconservación en cuanto a su genotipo y haplotipo de histocompatibilidad, según fuese apropiado. El análisis de genotipo se refiere a la determinación del genotipo de las líneas de células madre en uno o más niveles de resolución. No es necesario determinar el genotipo de la línea celular con una resolución de un solo nucleótido. Más bien, el genotipado solo debe llevarse a cabo a un nivel de resolución que permita a un experto en la materia determinar la similitud entre la línea de células madre y cualquier receptor previsto de la misma. El genotipado se puede llevar a cabo de varias maneras, que incluyen pero sin limitación, el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), polimorfismos de un solo nucleótido (los SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) y similares.

Las líneas celulares y/o su progenie también pueden analizarse en cuanto a su haplotipo de histocompatibilidad; o para determinar si son células madre "normales" o "anómalas". Un haplotipo de histocompatibilidad es un conjunto de alelos en los locus de los genes de histocompatibilidad que el sistema inmunitario usa para distinguir entre tejidos y/o células propios y no propios (es decir, extraños). En los seres humanos, el locus principal de histocompatibilidad (MHC) consta de cuatro locus en el brazo corto del cromosoma 6. Los seres humanos también tienen un conjunto de locus de histocompatibilidad menores. Como ejemplo, el tipado del antígeno principal de histocompatibilidad humano (HLA) se realiza comúnmente para diversos trasplantes, tales como los trasplantes de células hematopoyéticas. Los antígenos de histocompatibilidad principal y menor están presentes en las superficies celulares y son reconocidos por el sistema inmunitario como un indicador del origen de la célula o tejido. Las células o los tejidos que se ven como extraños generalmente serán rechazados por el receptor a través de una respuesta inmunitaria de rechazo. Sin embargo, en ocasiones es posible superar algunas diferencias en la histocompatibilidad, en particular las de los locus de histocompatibilidad menores, utilizando, por ejemplo, fármacos inmunosupresores, tales como, pero sin limitación, ciclosporina A, FK506, rapamicina, ciclofosfamida (CY), procarbazina (PCB) y globulina antitimocito (ATG). De manera adicional, determinados tejidos son menos susceptibles a las diferencias en, por ejemplo, los locus del HLA en humanos. Estos tejidos incluyen, pero sin limitación, hígado, riñón y el sistema nervioso central. Recientemente se ha informado que las células madre embrionarias poseen propiedades inmunitarias privilegiadas (Li *et al.*, Stem Cells 2004 33:448-456).

Kits

La presente divulgación también se refiere a kits, en donde el kit comprende una solución nutritiva basal salina y al menos un compuesto que tiene la capacidad de estimular la actividad de tirosina quinasa dirigida por ErbB2. Los kits

pueden comprender al menos un ligando de ErbB3, como se describe en el presente documento. Los kits pueden comprender más de un ligando de ErbB3. Los kits pueden comprender al menos un TGF-β o un miembro de la familia TGF-β, o una variante o fragmento funcional del mismo como se describe en este documento. Los kits pueden comprender más de un TGF-β o de un miembro de la familia TGF-β, o una variante o fragmento funcional de los mismos. Los kits pueden comprender al menos un factor de crecimiento de fibroblastos o una variante o fragmento funcional del mismo. Los kits pueden comprender más de un factor de crecimiento de fibroblastos o una variante o fragmento funcional de los mismos. Los kits pueden comprender al menos uno de FGF-7, FGF-10, FGF-22 o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Los kits pueden comprender seroalbúmina. Los kits pueden comprender suero y/o al menos un sustrato insoluble, como se describe en el presente documento, y/o al menos una solución de desagregación.

Los kits pueden contener prácticamente cualquier combinación de los componentes establecidos anteriormente o descritos en otra parte del presente documento, lo que incluye, pero sin limitación, el medio de cultivo definido descrito que comprende suero humano o una fracción de alto peso molecular del mismo. Como reconocería un experto en la materia, los componentes suministrados variarán con el uso previsto para los kits. Por lo tanto, os kits pueden diseñarse para realizar diversas funciones establecidas en la presente solicitud y los componentes de tales kits variarán en consecuencia.

A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Las divulgaciones de todas estas publicaciones y las referencias citadas en esas publicaciones en su descripción más completa describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDIFERENCIADAS EN UN CULTIVO CARENTE DE ALIMENTADORES QUE CONTIENE PEQUEÑAS CANTIDADES DE SUERO HUMANO

Para dilucidar un medio y una condición de cultivo celular que sea compatible con las directrices normativas que se espera que rijan la seguridad y eficacia clínica, los solicitantes han proporcionado una estrategia de producción de hESC a mayor escala que facilita este requisito, como se describe con más detalle a continuación. El cultivo a largo plazo de hESC indiferenciadas en un medio carente de alimentadores, carente de medio condicionado y carente de matriz, es crucial para proporcionar un suministro ilimitado de células para terapias basadas en células, así como para dirigir la diferenciación de hESC específica de linajes.

Anteriormente, se determinaron las condiciones esenciales mínimas necesarias para sustentar el crecimiento a largo plazo de hESC indiferenciadas. Véase el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755). Se evaluó la fase de desarrollo de las células madre, en parte, a base del análisis morfológico, así como mediante la expresión de marcadores de superficie celular y análisis de la fosfatasa alcalina.

Con el fin de establecer un entorno de cultivo de crecimiento con componentes que provienen del mismo organismo, carente de alimentador, carente de medio condicionado y carente de matriz, se utilizó un sistema de cultivo que incorpora los medios definidos descritos en el presente documento y en el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755). Además, para mantener las condiciones de cultivo que carecen de productos animales no humanos, pero que facilitaban la unión celular o la fijación o adherencia al plástico y el crecimiento, se usó suero humano. Las líneas de hESC BG01, BG02 y BG03 registradas en NIH, así como CyT49, una línea de hESC aislada usando células alimentadoras humanas en condiciones de BPF (Novocell, San Diego, CA) se cultivaron en medios definidos que incluían aproximadamente del 0,5 a 2 % de suero humano (Sh) durante aproximadamente 12 a 24 horas, a 37 ºC. Como alternativa, las células hES se sembraron en placas de cultivo de tejidos en medio carente de suero y después se añadió Sh aproximadamente del 1 al 10 % de concentración final, a temperatura ambiente. Se pueden usar la mayoría de los lotes de suero humano disponibles en el mercado, por ejemplo, se empleó el suero humano ALBUMARC para determinados cultivos de hESC descritos en el presente documento. ALBUMARC es un nombre registrado para suero humano procedente de los American Red Cross Blood Services. Es destacable que las hESC indiferenciadas se cultivaron y mantuvieron en un recipiente de cultivo de tejidos no recubierto. La cantidad de Sh utilizada estimula la unión de las células al plástico de cultivo de tejidos de forma que no se precisa el recubrimiento del recipiente de cultivo de tejidos, por ejemplo, con MEC, fibronectina, colágeno y/o MATRIGEL™, y similares. También se pueden emplear concentraciones aumentadas de Sh, se ha utilizado, por ejemplo, hasta el 20 % de Sh para cultivar y mantener cultivos de hESC.

La eliminación del requisito de una matriz proporciona un cultivo y crecimiento más eficaces de las células. Los cultivos celulares se pasaron de forma rutinaria con ACCUTASE. Después de la siembra en la placa de cultivo de tejidos durante aproximadamente 12-24 horas, las hESC parecían morfológicamente normales. Además, los análisis del cariotipo de las hESC cultivadas en los medios definidos y Sh se realizaron usando técnicas convencionales de bandeo G.

Para determinar si el Sh era termosensible o termoinestable, y si afectaba el crecimiento de las hESC, el Sh se calentó en primer lugar a aproximadamente 50-60 ºC durante aproximadamente 20 - 60 minutos y después se añadió al medio definido a una concentración de aproximadamente el 0,5 al 2 %. En este medio, las hESC no proliferaron significativamente, y la mayoría murieron después de aproximadamente 1-3 días después de la siembra. Por lo tanto, un componente del Sh que estimula la unión celular es termosensible y, a aproximadamente 50-60 ºC, la actividad disminuyó significativamente y las hESC no sobrevivieron. Es probable que las hESC no sobrevivan debido a la termosensibilidad de uno o más factores de unión solubles del Sh, que pueden inactivarse por calor. La inactivación por calor de estos factores solubles de unión impide la unión de las células madre pluripotentes al plástico, unión que estimula el crecimiento y el mantenimiento de las hESC.

Para determinar adicionalmente el tamaño aproximado de estos factores de unión solubles, se postuló que eran responsables de potenciar el crecimiento y la proliferación de las hESC fracciones específicas del Sh. Para determinar cuáles fracciones, el Sh se fraccionó usando diversos dispositivos de exclusión por tamaño, por ejemplo, columnas de centrifugación de límite Microcon 300K, 100K y 30K. El uso de estas columnas de centrifugación con punto límite permite que las proteínas con determinado de peso molecular pasen y se recojan como eluyente o como fracción retenida. Las hESC se cultivaron a continuación en los medios definidos, que contenían una de las diversas fracciones retenidas sustancialmente como se describe anteriormente. Las fracciones retenidas de las columnas de centrifugación de límite 300 K y 100 K parecían contener factores y/o agentes de unión solubles particulares que estimulaban el crecimiento y la proliferación de las hESC indiferenciadas. El crecimiento y proliferación de las hESC indiferenciadas fue consistente con diversas fracciones retenidas de las columnas de centrifugación de límite 300 K y 100 K, y esto fue independiente de la fuente comercial del Sh (no tratado con calor). Por lo tanto, los factores de unión solubles capaces de quedar retenidos en la fracción retenida en las columnas de centrifugación de límite de 300 K a 100 K, fueron importantes y capaces de estimular el crecimiento y la proliferación.

Las Figuras 1A-E son imágenes de las hESC (células BG02) cultivadas en medios definidos (DC-HAIF) en recipientes de cultivo de tejidos no recubiertos con distintas cantidades de suero humano. La FIG. 1A es una imagen de las hESC después de 4 días de cultivo en DC-HAIF que contenía suero completo 1 %, en recipientes de cultivo de tejidos no recubiertos. Las células se incubaron con DC-HAIF más Sh al 1 % durante aproximadamente 24 horas y después el medio se reemplazó por DC-HAIF. La FIG.1B es una imagen de las hESC después de 1 día de cultivo en DC-HAIF que contenía Sh al 1 %, que se fraccionó parcialmente (se utilizó la fracción retenida) en una columna de centrifugación de límite 300 K. La FIG. 1C es una imagen de las hESC después de 4 días de cultivo en DC-HAIF que contenía Sh aproximadamente al 0,7%, que se fraccionó parcialmente (se utilizó la fracción retenida) en una columna de centrifugación de límite de 100 K. La FIG. 1D es una imagen de las hESC después de 1 pase y después de 3 días de cultivo en medio DC-HAIF que contenía Sh al 0,7 %, que se fraccionó parcialmente (fracción retenida) en una columna de centrifugación de límite 100 K. La FIG. 1E es una imagen de las hESC de una población pasada de forma seriada (2 pases) cultivada en medio DC-HAIF y Sh aproximadamente al 1 %, que se fraccionó parcialmente (fracción retenida) en una columna de centrifugación de límite 100 K.

De manera adicional, para determinar si en estas condiciones de cultivo la morfología de célula madre estaba afectada tras la realización de pases en serie de las hESC, las hESC indiferenciadas se pasaron de forma seriada aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 veces y similar. Las hESC indiferenciadas separadas en células individuales también pueden crecer y proliferar sustancialmente como se describe. Con la ayuda de un microscopio, Todos los cultivos parecían morfológicamente normales. Por el contrario, cuando las hESC indiferenciadas se pasaron de forma seriada usando Sh completo, hubo algo de deterioro en la calidad morfológica de los cultivos de hESC en comparación con las hESC pasadas usando fracciones retenidas, como se describe anteriormente. Sin embargo, para restaurar la morfología celular de hESC típica, el Sh puede purificarse parcialmente filtrando aproximadamente el 20 % del Sh usando una columna de centrifugación de límite 100 K, después, la fracción de elución/retenida recogida se diluye de nuevo hasta volumen original. Por lo tanto, el fraccionamiento del Sh como se describe en el presente documento, evitó en gran medida el deterioro de la calidad morfológica de cultivos de hESC con realización de pases en serie. Esto también se observó con concentraciones de Sh entre aproximadamente el 0,5 y el 1,5 %.

Para demostrar la autorrenovación de las hESC indiferenciadas mantenidas en las condiciones de cultivo carentes de productos biológicos definidas anteriormente descritas, las hESC se trataron de forma enzimática, se disociaron en una suspensión de células individuales y después se cultivaron en las condiciones definidas sustancialmente como se describe anteriormente. Las colonias de hESC procedentes de células individuales indiferenciadas de tamaño maduro comenzaron a aparecer después de aproximadamente 4, 5, 6 y 7 días *in vitro.*

La eficacia de la siembra en placa fue comparable a la observada en las hESC cultivadas en DC-HAIF, como se describe en el documento WO 2007/101130 (PCT/US2007/062755) o cultivadas en medio DC-HAIF usando MATRIGEL™ como MEC. La eficacia de recubrimiento con MATRIGEL™ fue significativamente mayor que utilizando MEF-CM o alimentadores. Una explicación es que las células individuales disociadas se sembraron de manera eficaz en DC-HAIF que contenía Sh o medios para hESC definidos, en comparación con otros alimentadores y/o cultivos de tipo alimentador y de matriz.

Este ejemplo identifica los componentes esenciales mínimos necesarios para mantener células madre embrionarias,

en particular las hESC, en un estado saludable indiferenciado que tenga la capacidad tanto de una propagación prolongada como, después, de una diferenciación dirigida. Habiendo discernido estos requisitos moleculares, se hizo posible obtener condiciones que permitieran la sustitución de aditivos y sustratos biológicos mal caracterizados y no especificados (incluyendo los procedentes de animales) por constituyentes completamente definidos. Este sistema de cultivo definido tiene la ventaja de permitir que las hESC se expandan de forma eficaz y de forma estable después de la disociación mediada por enzimas. Por lo tanto, este estudio proporciona un enfoque viable para proporcionar un gran suministro de células sanas, bien caracterizadas y aceptables desde el punto de vista clínico, para terapias basadas en células. Además, habiendo establecido los componentes individuales necesarios para el crecimiento indiferenciado de hESC, ahora es posible evaluar de forma más precisa los efectos de otros factores de crecimiento y compuestos sobre el destino del desarrollo de las hESC. Como se apreciará, los medios definidos son cruciales para dirigir un número necesario de hESC pluripotentes de forma eficaz, uniforme, estable y reproducible hacia un linaje específico con fines terapéuticos. Además, los análisis por FISH de células BG02 mantenidas durante 10 pases en DC-HAIF con el 1% de fracción 100K de suero humano presentaron recuentos normales para el cromosoma 12 humano (Chrh 12; el 98 % dos copias, n=591) y Chrh 17 (el 98 % dos copias, n=578). Por lo tanto, la autorrenovación de las hESC pluripotentes en medios que contienen un pequeño porcentaje de suero humano no selecciona las aneuploidías normalmente observadas en las hESC.

Ejemplo 2

AUTORRENOVACIÓN A LARGO PLAZO DE LAS HESC UTILIZANDO LA FRACCIÓN DE 100 K DE SUERO HUMANO

Para ser útil, cualquier medio de cultivo hESC debe ser capaz de sustentar la autorrenovación a largo plazo o prolongada de las células, es decir, durante varios pasajes. Para demostrar que los medios DC-HAIF que contienen Sh descritos en el presente documento pueden sustentar la autorrenovación a largo plazo o prolongada de las hESC, las hESC se cultivaron en DC-HAIF con aproximadamente el 1 % de fracción retenida 100 k de suero humano. Para asegurarse de que las hESC mantuvieran su pluripotencia y no se diferenciaran de forma espontánea a distintos linajes celulares, se realizó un análisis por RT-PCR usando marcadores celulares para describir e identificar células madre pluripotentes y/o linajes diferenciados obtenidos de células madre bien conocidos en la técnica. La RT-PCR se realizó en cultivos de hESC después de 6 y 10 pases. En los cultivos de control, la RT-PCR se realizó después de 53 pases solo en medios definidos (FIG. 2). La Figura 2 muestra que los marcadores típicos de células madre pluripotentes se expresaron en los cultivos de 6 (panel central), 10 (panel de la parte inferior) y 53 (panel de la parte superior) pases, por ejemplo, expresión de OCT4, NANOG, REX1, SOX2, UTF1, CRIPTO, FOXD3, TERT y DPPA5. Por el contrario, los marcadores típicos de linajes diferenciados obtenidos de células madre, por ejemplo, α-fetoproteína (AFP), MSX1, HAND1, no se detectaron en estos cultivos. Por lo tanto, estos datos indican que las hESC cultivadas en medios DC-HAIF con suero humano estimulan la autorrenovación a largo plazo o prolongada de hESC pluripotentes y no la diferenciación espontánea en linajes celulares obtenidos de hES.

Ejemplo 3

LAS HESC MANTENIDAS EN UN MEDIO DEFINIDO QUE CONTIENE UNA FRACCIÓN 100K DE SUERO HUMANO PUEDEN DIFERENCIARSE A DISTINTOS LINAJES CELULARES

Para determinar si las hESC cultivadas como se describe en el presente documento también podrían diferenciarse a diversos linajes celulares procedentes de hES, se diferenciaron células BG02, usadas como línea celular de referencia, a células obtenidas de hES *in vitro* (FIG. 3). Las hESC se mantuvieron primero durante 3 divisiones, durante 5 a 7 días, en Sh al 0,7 % o al 1 % fraccionado usando una columna de centrifugación de límite 100 K. Las hESC se indujeron después a diferenciarse en los días 5 y 7, respectivamente, a endodermo definitivo, exponiendo los cultivos a RPMI que contenía BSA carente de ácidos grasos al 2 %, Wnt3a 25 ng/ml, Activina A 100 ng/ml y FGF2 8 ng/ml durante 24 horas, seguido de RPMI que contenía BSA al 2 %, Activina A 100 ng/ml y FGF2 8 ng/ml durante dos días más (d3 de diferenciación). Se realizó una diferenciación adicional de las células de endodermo definitivo a endodermo de intestino anterior, exponiendo las células a RPMI que contenía BSA al 2 %, FGF7 50 ng/ml y KAAD-ciclopamina 0,25 µM durante aproximadamente 2-3 días más (d6 de diferenciación). Los cultivos celulares se examinaron mediante PCRq como se describió anteriormente en D'Amour *et al.* 2005, Nat. Biotechnol. 23:1534-1541 y D'Amour *et al.*, 2006, Nat. Biotechnol. 24:1392-1401.

Las células obtenidas de hES (endodermo definitivo) se examinaron en el tercer día de diferenciación. La Figura 3 muestra gráficos que describen los niveles de expresión normalizados de diversos marcadores celulares en d3 (endodermo definitivo, ED) y d5 (endodermo de intestino anterior, IA). El panel de la parte superior de la FIG. 3 muestra que la expresión de SOX17 aumenta significativamente en d3 (endodermo definitivo); mientras que los niveles de expresión de HNF1B y HNF4A estaban regulados al alza en muestras en d5 (intestino anterior). Los niveles de expresión de SOX17, HNF1B y HNF4A en células de endodermo definitivo y de tipo intestino anterior obtenidas de hES concuerdan con los descritos en D'Amour *et al.* 2005 y 2006, citado anteriormente.

Estos datos demuestran que los cultivos carentes de alimentadores descritos, mantenidos usando fracciones retenidas de la fracción de 100 K de suero humano, pueden diferenciar de forma eficaz a diversos linajes celulares

obtenidos de hES, incluyendo endodermo definitivo y endodermo de intestino anterior.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de cultivo de tejidos de células madre pluripotentes humanas esencialmente carente de alimentadores, que comprende:

a) células madre pluripotentes humanas;
b) una superficie sólida que carece de una matriz; y
c) un medio de cultivo definido que puede sustentar el crecimiento de células madre y que está complementado con suero humano del 0,5 % al 40 % que estimula la unión de células madre pluripotentes a la superficie sólida, estimulando de este modo la proliferación de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas,

en donde la composición no contiene células alimentadoras añadidas de forma intencionada.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el suero humano que estimula la unión de células madre pluripotentes a la superficie sólida está en una concentración del 0,5 al 2 % del medio.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la superficie sólida es un recipiente de cultivo de tejidos.

4. Un método de cultivo de células madre pluripotentes humanas en un medio definido esencialmente carente de alimentadores, que comprende:
cultivar las células madre pluripotentes humanas en una superficie sólida que carece de una matriz en un medio de cultivo definido que pueda sustentar el crecimiento de células madre, careciendo el medio de cultivo de células alimentadoras añadidas de forma intencionada y en donde el medio está complementado con suero humano del 0,5 % al 40 % que estimula la unión de células madre pluripotentes a una superficie sólida, estimulando de este modo la proliferación de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el medio de cultivo comprende suero humano del 0,5 % al 2 % que estimula la unión de células madre pluripotentes a la superficie sólida.

6. Un método de la reivindicación 4, en donde el medio de cultivo comprende suero humano de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 2 % que estimula la unión de células madre pluripotentes a la superficie sólida, llevándose a cabo la etapa de cultivo durante más de un mes, con las células madre pluripotentes humanas que proliferan en cultivo, mientras se mantiene el potencial de las células madre para diferenciarse en derivados de tejidos endodérmico, mesodérmico y ectodérmico, y mientras se mantiene el cariotipo de las células madre.

FIG. 1

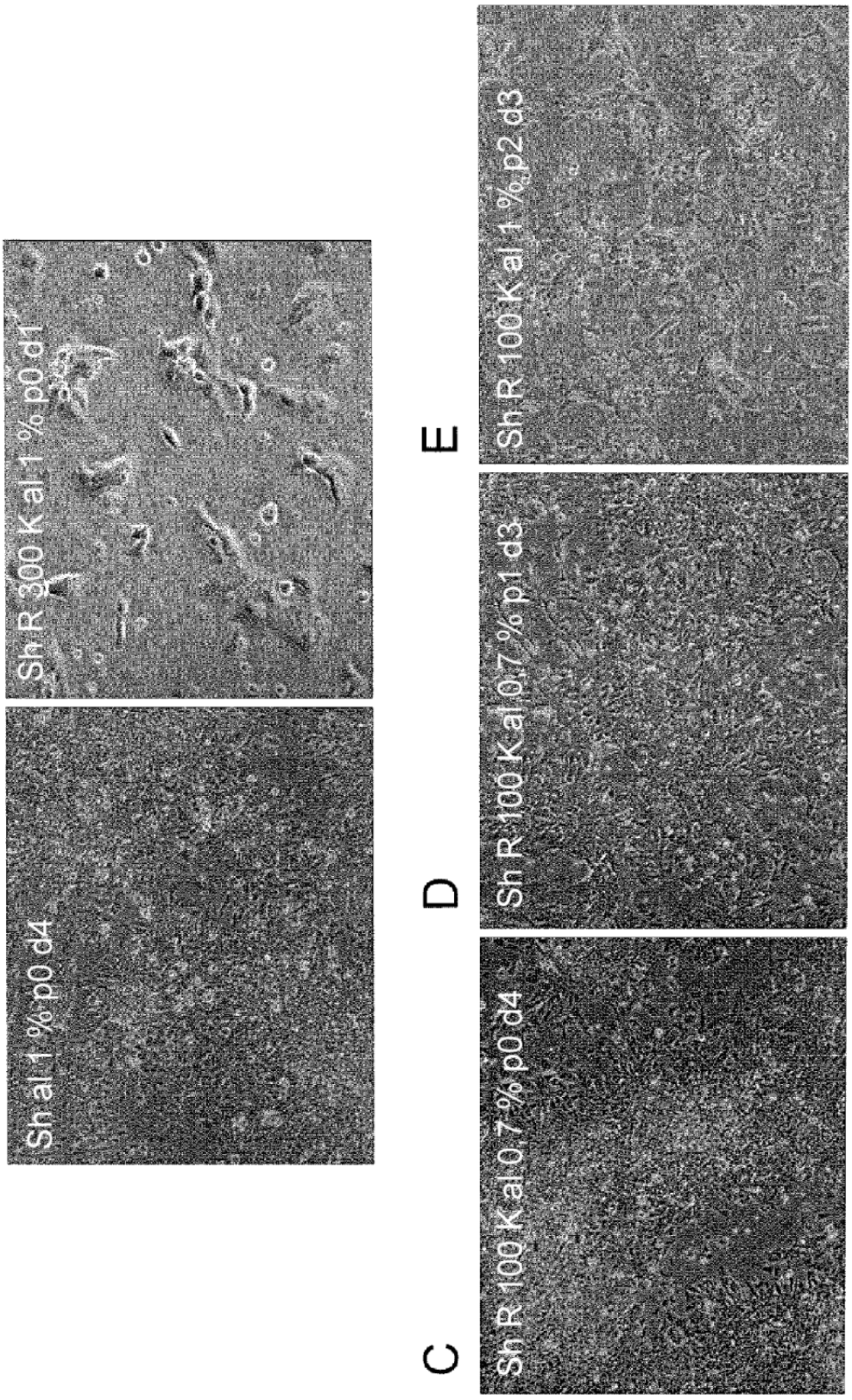

A
Sh al 1 % p0 d4
B
Sh R 300 Kal 1 % p0 d1
C
Sh R 100 Kal 0,7 % p0 d4
D
Sh R 100 Kal 0,7 % p1 d3
E
Sh R 100 Kal 1 % p2 d3

FIG. 2

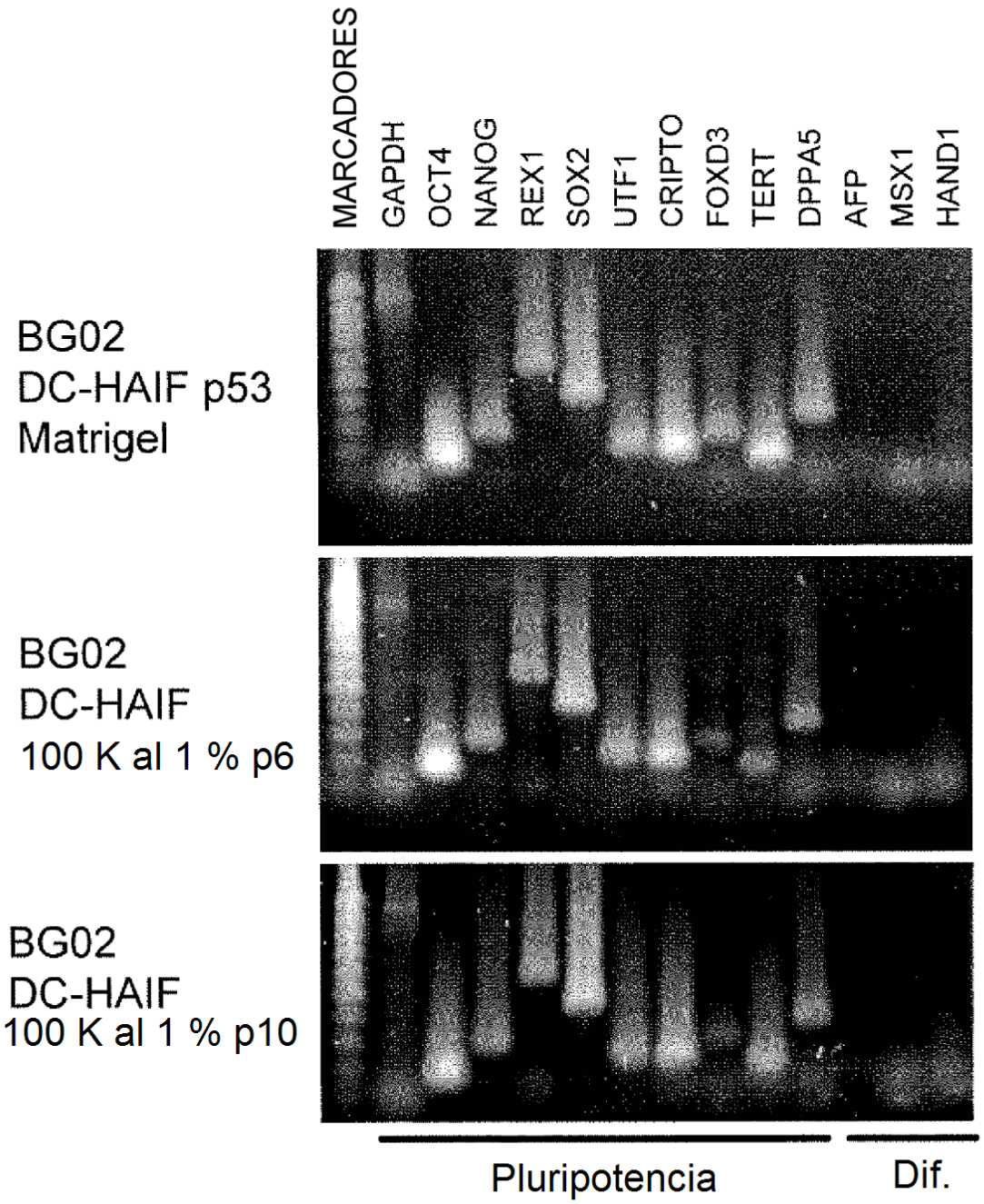
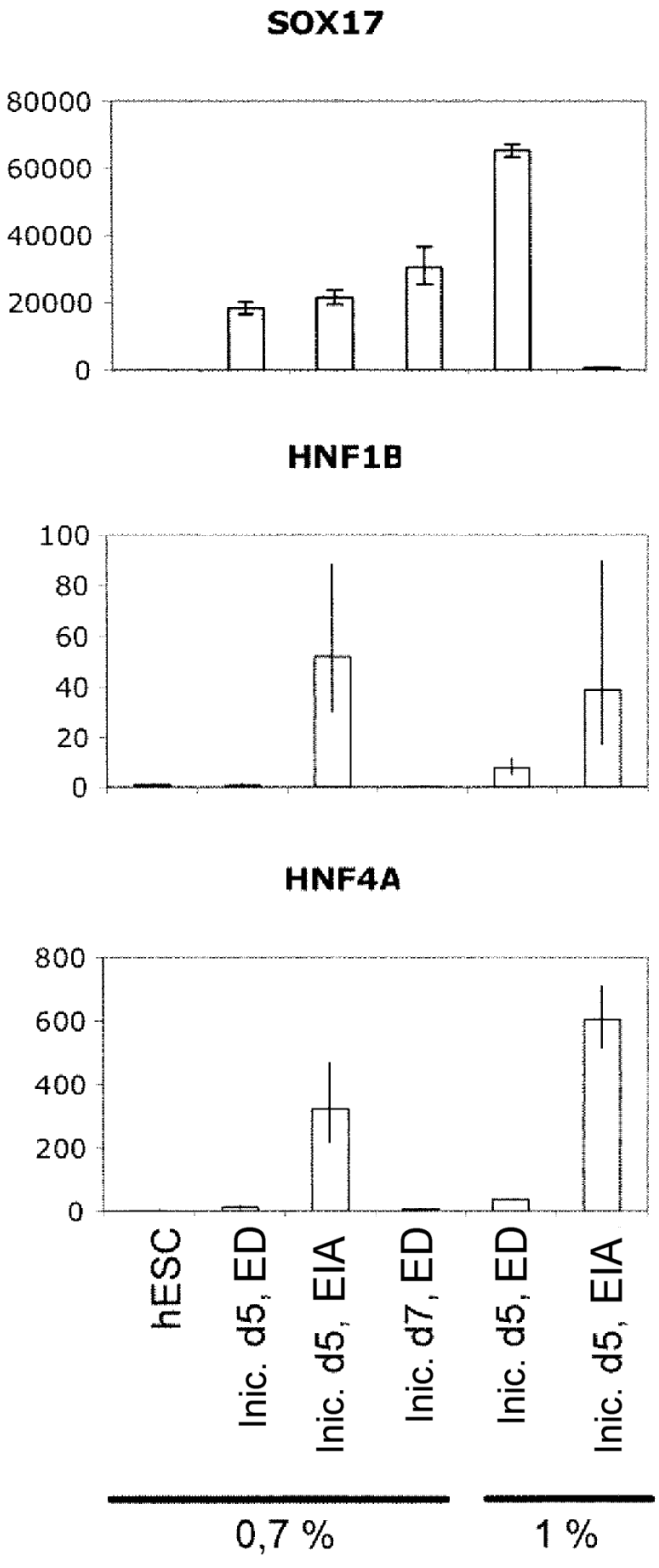

MARCADORES
GAPDH
OCT4
NANOG
REX1
SOX2
UTF1
CRIPTO
FOXD3
TERT
DPPA5
AFP
MSX1
HAND1
BG02
DC-HAIF p53
Matrigel
BG02
DC-HAIF
100 K al 1 % p6
BG02
DC-HAIF
100 K al 1 % p10
Pluripotencia
Dif.

FIG. 3


SOX17
80000
60000
40000
20000
0
HNF1B
100
80
60
40
20
0
HNF4A
800
600
400
200
0
hESC
Inic. d5, ED
Inic. d5, EIA
Inic. d7, ED
Inic. d5, ED
Inic. d5, EIA
0,7 %
1 %