

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 319**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2007 PCT/GB2007/003636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2008 WO08035110**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2007 E 07804383 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2066786**

54 Título: **Medio y método de cultivo de células madre**

30 Prioridad:

22.09.2006 JP 2006257780

27.04.2007 JP 2007118183

25.05.2007 GB 0710095

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

01.08.2018

73 Titular/es:

RIKEN (100.0%)

2-1 HIROSAWA

WAKOU-SHI, SAITAMA 351-0198, JP

72 Inventor/es:

SASAI, YOSHIKI y

WATANABE, KIICHI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 677 319 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

Medio y método de cultivo de células madre

La presente invención proporciona un método para cultivar células madre tales como células madre embrionarias (células ES), un medio para el cultivo de tales células madre, y usos de los mismos.

5 Las células ES proporcionan un fuerte candidato como fuente de células en trasplantes de células para enfermedades del sistema nervioso central, tales como la enfermedad de Parkinson y la diabetes. En el estudio de las células ES, en el momento actual se usan normalmente las células ES de ratón, pero a la vista de las aplicaciones clínicas es necesario llevar a cabo investigación y desarrollo sin usar células ES humanas. Sin embargo, las células ES humanas experimentan más fácilmente la muerte celular que las células ES de ratón en cultivo celular.

10 Por ejemplo, en el subcultivo de células ES humanas en cultivo de mantenimiento, los agregados celulares se suspenden una vez que se han separado de células alimentadoras o sustratos mediante tratamiento enzimático o desprendimiento mecánico, separados por pipeteo a pequeños agregados celulares, y luego se han sembrado en una nueva placa de cultivo. Sin embargo, las células ES humanas experimentan un desprendimiento y una disociación deficientes en comparación con las cepas celulares comunes y las células ES de ratón, y muchas de las células no sobreviven. Dado que las células ES humanas se dividen muy lentamente y se diferencian fácilmente, se requiere mucho tiempo y mucha mano de obra para cultivar células ES humanas manteniendo al mismo tiempo sus propiedades indiferenciadas, y se requiere una capacitación técnica para obtener resultados reproducibles. Además, un impedimento para la investigación y el desarrollo que usa células ES humanas es que la tasa de recolección disminuye debido a la muerte celular en el subcultivo. Además, aunque se desea clonar células ES humanas en procesos de ingeniería genética, cuando las células ES humanas se disocian homogéneamente en células únicas la muerte celular y el cese del crecimiento ocurren muy fácilmente y se cree que la eficacia de clonación en células ES humanas es del 1% o menos.

Además, para diferenciar las células ES humanas, se separan de las células alimentadoras, se disocian como pequeños agregados celulares o células individuales, luego se siembran en un sustrato o células alimentadoras específicas y se cultivan en un medio inductor de la diferenciación. Este proceso tiene una eficiencia muy baja. Además, en un método de cultivo embrioide, un método SFEB (cultivo flotante libre de suero de agregados similares a cuerpos embrioides) desarrollado por el presente inventor (documento WO2005/123902 y Watanabe et al., *Nature Neuroscience* 8, 288 - 296 (2005)), se requiere que las células se disocien en células individuales una vez que se forman agregados de células, pero cuando dicha metodología se aplica a las células madre humanas, muchas células mueren. Además, existe un problema en el caso de las células ES humanas que, incluso si no están completamente disociadas individualmente (en el caso del cultivo a partir de pequeños agregados celulares), es muy frecuente que las células mueran - Frisch et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 555 - 562 (2001)). De acuerdo con esto, se desea el desarrollo de una metodología mejorada para el cultivo de células ES humanas.

La quinasa en doble espiral Rho-asociada (ROCK: nº de registro Gen-Bank: NM_005406) es una de las principales moléculas efectoras de la Rho GTPasa y se sabe que controla fenómenos fisiológicos tales como la constricción vascular y la extensión del axón del nervio (Riento et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 446 - 456 (2003)). Se conocen varios compuestos como inhibidores de ROCK (por ejemplo, Ishizaki et al., *Mol. Pharmacol.*, 57, 976 - 983 (2000) y Narumiya et al., *Methods Enzymol.* 325, 273 - 284 (2000)).

Aunque hay varias publicaciones según las cuales la muerte celular es controlada por la inhibición de ROCK (Minambres et al., *J. Cell Sci.* 119, 271 - 282 (2006) y Kobayashi et al., *J. Neurosci.* 24, 3480 - 3488 (2004)), también hay informes de que la inhibición de ROCK acelera la apoptosis (Rattan et al., *J. Neurosci Res.* 83, 243 - 255 (2006) y Svoboda et al., *Dev Dyn.* 229, 579 - 590 (2004)) y el papel de Rho/ROCK en el control de la apoptosis aún no ha sido establecido (Riento et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 446 - 456 (2003)).

Se conoce por Pacary E. et al., *J. Cell Science* 119, nº 13, julio 2006 pp 2667 - 2678 que el CoCl_2 induce la diferenciación de células madre mesenquimales en las neuronas y que la inhibición de ROCK potencia este efecto. Sin embargo, no hay ninguna publicación con respecto al cultivo de células madre tales como células ES en un medio que contiene un inhibidor de ROCK.

Fukushima et al., *Hepatology*, vol. 38, página 562, 2003, publica que el hidroxifasudil, un inhibidor de ROCK, suprime el crecimiento celular y la producción de colágeno en células hepáticas de rata. Laplante et al., *Journal of Neurobiology*, vol. 60, no. 3, 289 - 307, 2004 publica que RhoA/ROCK y Cdc42 regulan el contacto de célula con célula y el nivel de proteína N-cadherina durante la neurodeterminación de células madre embrionarias P19.

El documento WO2006/053014 A2 describe un método para prevenir o retrasar la apoptosis de una célula suministrando a la célula un agente que inhibe selectivamente ROCK1 y que comprende un ácido nucleico, un polipéptido, un péptido o una mezcla de los mismos. Se propone en particular el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante la administración de tal agente.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva metodología y un nuevo medio eficaz para el cultivo de células madre tales como las células ES.

Los presentes inventores han estudiado ampliamente el tema y como resultado han encontrado que la tasa de supervivencia, la potencia de proliferación y/o la eficacia de diferenciación de una célula madre tal como una célula madre pluripotente, especialmente una célula ES, se puede mejorar cultivando la célula madre en un medio de cultivo que contiene un inhibidor de ROCK.

5 Por tanto, la presente invención proporciona:

[1] Un método de cultivo de células madre pluripotentes humanas, que comprende tratar las células madre con un inhibidor de ROCK (Rho-quinasa).

[2] El método del epígrafe [1] mencionado anteriormente, en el que las células madre están disociadas.

10 [3] El método del epígrafe [2] mencionado anteriormente, en el que las células madre son células únicas o células madre agregadas (es decir, células que han formado un racimo de células).

[4] El método de cualquiera de los epígrafes [1] - [3] anteriormente mencionados, en el que las células madre se cultivan en cultivo adherente o en cultivo en suspensión.

15 [5] Un método para producir una célula diferenciada a partir de una célula madre que tiene una tasa de supervivencia y/o una potencia de proliferación mejorada, o una célula madre que tiene una eficacia de diferenciación mejorada, comprendiendo dicho método cultivar una célula madre pluripotente humana en presencia de un inhibidor de ROCK.

[6] Un método según cualquiera de los epígrafes [1] - [5] mencionados anteriormente, en donde el inhibidor de ROCK es Y-27632, Fasudil o H-1152.

[7] Un preparado de células que comprende una célula madre pluripotente humana y un inhibidor de ROCK.

20 [8] El preparado celular del epígrafe [7] antes mencionado, en el que la célula madre está disociada.

[9] Un preparado celular de acuerdo con cualquiera de los epígrafes [7] - [8] anteriormente mencionados, en el que el inhibidor de ROCK es Y027632, Fasudil o H-1152.

25 [10] Uso de un inhibidor de ROCK (i) para promover y/o mejorar la eficiencia de clonación o la eficiencia de pasajes en un cultivo de células madre pluripotentes, (ii) para promover y/o mejorar la formación de colonias en un cultivo de células madre pluripotentes humanas, y/o (iii) para promover y/o mejorar la supervivencia de las células madre pluripotentes humanas en un cultivo.

[11] Un uso de acuerdo con el epígrafe [10] mencionado anteriormente, en el que el inhibidor de ROCK es Y-27632, Fasudil o H-1152.

30 Las realizaciones de lo anterior incluyen así un método de cultivo de una célula madre pluripotente humana que comprende el mantenimiento de la célula madre en un medio de cultivo que comprende un inhibidor de ROCK, y un medio de cultivo de células madre pluripotentes humanas que comprende un inhibidor de ROCK.

35 En otros aspectos, la invención proporciona un método de cultivo de células madre pluripotentes humanas para promover la eficiencia de clonación o la eficiencia de los pasajes, que comprende cultivar las células madre en un medio de cultivo que comprende un inhibidor de ROCK; un método para promover la formación de colonias en un cultivo de células madre, que comprende cultivar células madre pluripotentes humanas en presencia de un inhibidor de ROCK; y un método para mejorar la eficacia de clonación o la eficacia de pasaje en un cultivo de células madre, que comprende cultivar células madre pluripotentes humanas en presencia de un inhibidor de ROCK.

40 En realizaciones preferidas de la invención, las células madre se cultivan en ausencia de células alimentadoras, extractos de células alimentadoras y/o suero. Las células madre se pueden cultivar en presencia de un inhibidor de ROCK antes de la subclonación o el pasaje, v. g. durante al menos una hora antes de subclonar o pasar. Alternativa o adicionalmente, las células madre se mantienen en presencia de un inhibidor de ROCK después de la subclonación o el pasaje. En realizaciones preferidas, las células madre se mantienen en presencia de un inhibidor de ROCK durante al menos aproximadamente 12 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 2, aproximadamente 4 o aproximadamente 6 días. En otras realizaciones, las células madre se mantienen en presencia de un inhibidor de ROCK durante al menos uno a cinco pasajes.

45 En algunas realizaciones de la invención, el inhibidor de ROCK se retira posteriormente del medio de cultivo, por ejemplo después de aproximadamente 12 horas o después de aproximadamente 2, aproximadamente 4 o aproximadamente 6 días. En otras realizaciones, el inhibidor de ROCK se retira después de al menos uno a cinco pasajes.

50 Otro aspecto de la invención proporciona un método para mejorar la supervivencia de células madre pluripotentes humanas en un cultivo, que comprende poner en contacto las células madre con un inhibidor de ROCK o exponer de otra forma las células madre al mismo. Los métodos de este aspecto de la invención son particularmente adecuados

5 para mejorar la supervivencia celular cuando el cultivo comprende células madre disociadas o agregados de células madre en suspensión. Tales métodos son especialmente útiles cuando el cultivo comprende células a baja densidad, que incluyen las densidades celulares ejemplares descritas aquí, o cuando el cultivo comprende células madre a densidad clonal. Preferiblemente, las células madre se mantienen en presencia de un inhibidor de ROCK durante al menos aproximadamente 12 horas, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 2, aproximadamente 4, o aproximadamente 6 días, o durante al menos uno a cinco pasajes. Opcionalmente, el inhibidor de ROCK se retira posteriormente del medio de cultivo, v. g. después de aproximadamente 12 horas, después de aproximadamente 2, aproximadamente 4, o aproximadamente 6 días, o después de al menos uno a cinco pasajes. Un método adicional de la invención es un método de transporte de células madre que comprende el transporte de las células madre en un medio que comprende un inhibidor de ROCK.

10 Se apreciará que los métodos de la invención se pueden llevar a cabo usando cualquier inhibidor de ROCK adecuado como se describe en el presente texto. Los inhibidores de ROCK preferidos son Y-27632, Fasudil y H-1152.

15 Los métodos se pueden usar ventajosamente en cualquier situación en la que las células madre pluripotentes humanas se aislen o se cultiven a bajas densidades. En el uso de la invención, las células madre se mantienen en un estado indiferenciado con muerte celular reducida. Por tanto, los métodos se pueden usar para mejorar la derivación de las células madre de los tejidos.

Los métodos también son útiles en el contexto de la modificación genética de células madre pluripotentes humanas, particularmente en el aislamiento de poblaciones clonales de células madre genéticamente modificadas. Una población transfectada de células ES humanas se puede obtener mediante un método, que comprende:

- 20 - transfectar células ES con una construcción que codifica un marcador seleccionable;
- cultivar en placa las células ES;
- cultivar las células ES en presencia de un inhibidor de ROCK; y
- seleccionar las células que expresan el marcador seleccionable.

25 El inhibidor de ROCK puede estar presente en el medio de cultivo antes y/o después de la aplicación de la selección para las células que expresan el marcador seleccionable. Se prefiere que el inhibidor de ROCK esté presente durante la selección, particularmente si el marcador seleccionable confiere resistencia a agentes de selección particulares presentes en el medio (por ejemplo, resistencia a antibióticos) para contrarrestar los efectos de las bajas densidades de células madre. Opcionalmente, el método incluye además la etapa de subclonar las células ES que expresan el marcador seleccionable en presencia de un inhibidor de ROCK, promoviendo así el crecimiento de células madre y/o la formación de colonias, y/o mejorando la supervivencia de las células madre.

30 Se puede usar un inhibidor de ROCK en la fabricación de un medio de cultivo para células madre pluripotentes humanas. El medio de cultivo puede ser cualquier medio descrito en el presente texto, o puede comprender una combinación o uno o más componentes de medios descritos en este documento. El medio puede formularse para que sea adecuado para el cultivo de cualquier tipo de célula madre descrito en la presente memoria, que incluye células madre humanas y de ratón, v. g. células ES.

35 También se describe un medio de cultivo de células que está libre de suero y extracto de suero y comprende: medio basal; un inhibidor de ROCK; y opcionalmente uno o más de insulina, factor de crecimiento de insulina y un transportador de hierro. Los medios basales adecuados y los transportadores de hierro (por ejemplo, transferrina) están fácilmente disponibles para un profesional experto, incluyendo los medios ejemplares y transportadores de hierro descritos en este documento.

40 Los aspectos de adición de la presente invención se refieren al uso de un inhibidor de ROCK para lograr los efectos sobre células madre pluripotentes humanas descritas en este documento. En particular, los aspectos de la invención proporcionan el uso de un inhibidor de ROCK para promover y/o mejorar la eficacia de la clonación o la eficacia de los pasajes en un cultivo de células madre; uso de un inhibidor de ROCK para promover y/o mejorar la formación de colonias en un cultivo de células madre; y el uso de un inhibidor de ROCK para promover y/o mejorar la supervivencia de las células madre en un cultivo.

45 Se apreciará que la discusión de las ventajas de los métodos de la invención proporcionados en la presente memoria se aplica igualmente al uso de inhibidores de ROCK según la invención y a medios y otras composiciones de acuerdo con la invención.

50 Los métodos de cultivo de la presente invención pueden mejorar la tasa de supervivencia, la potencia de proliferación o la eficacia de diferenciación de células madre pluripotentes humanas. En particular, el método de cultivo de la presente invención puede mostrar sus ventajas, por ejemplo, en cualquier método de cultivo que incluya la disociación de células madre, cultivos adherentes o en suspensión de las células madre disociadas, o similares. El método de cultivo de la presente invención tiene tales ventajas, por lo que puede usarse preferiblemente para el cultivo de paso de la célula madre, inducción de diferenciación de la célula madre (por ejemplo, células neurales o nerviosas),

purificación o clonación de la célula madre, modificación genética de la célula madre, etc.

La preparación de células, el agente de cultivo, la combinación (por ejemplo, composición y kit), medio libre de suero, sistema de cultivo y similares descritos en la presente memoria se pueden usar preferiblemente, por ejemplo, para el método de cultivo de la presente invención.

5 Las células madre pluripotentes humanas a tratar con un inhibidor de ROCK de acuerdo con la presente invención pueden ser células disociadas o células no disociadas. Las células disociadas se refieren a células tratadas para promover la disociación celular (por ejemplo, la disociación que se describe más adelante). Las células disociadas incluyen una sola célula y las células que han formado un pequeño racimo de células (agregado) de varias células (típicamente de aproximadamente 2 a 50, de 2 a 20 o de 2 a 10). Las células disociadas pueden ser células suspendidas (flotantes) o células adheridas. Por ejemplo, se ha sabido que las células ES, tales como las células ES humanas, son susceptibles a condiciones específicas tales como la disociación (y/o el cultivo en suspensión después de la disociación). Los métodos de la presente invención tienen un uso particular cuando la célula madre está sujeta a condiciones en las que se habría producido la muerte celular hasta ahora.

15 Para practicar la presente invención, los inhibidores de ROCK generalmente son adecuados sin limitación, siempre y cuando un inhibidor pueda inhibir la función de la Rho-quinasa (ROCK), y los inhibidores adecuados incluyen Y-27632 (por ejemplo, véanse Ishizaki et al., *Mol. Pharmacol.*, 57, 976 - 983 (2000); Narumiya y col., *Methods Enzymol.* 325, 273 - 284 (2000)), Fasudil (también denominado HA1077) (por ejemplo, véase Uenata et al., *Nature* 389: 990 - 994 (1997)), H-1152 (por ejemplo, véase Sasaki et al., *Pharmacol. Ther.* 93: 225 - 232 (2002)), Wf-536 (por ejemplo, véase Nakajima et al., *Cancer Chemother Pharmacol.* 52 (4): 319 - 324 (2003)), Y-30141 (descrito en la patente de EE. UU. 5478838) y sus derivados, y ácido nucleico antisentido para ROCK, ácido nucleico que induce la interferencia de ARN (por ejemplo, ARNsi), péptidos competitivos, péptidos antagonistas, anticuerpos inhibidores, fragmentos de anticuerpo-ScFV, variantes negativas dominantes y vectores de expresión de los mismos. Además, dado que otros compuestos moleculares bajos son conocidos como inhibidores de ROCK, tales compuestos o sus derivados también se pueden usar en la presente invención (por ejemplo, véanse las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 20050209261, 20050192304, 20040014755, 20040002508, 20040002507, 20030125344 y 20030087919, y Publicaciones de patente internacional Nos. 2003/062227, 2003/059913, 2003/062225, 2002/076976 y 2004/039796). En la presente invención, también se puede usar una combinación de uno o dos o más de los inhibidores de ROCK.

30 De acuerdo con la presente invención, la célula madre se puede tratar con el inhibidor de ROCK en un medio. De ese modo el medio usado en los métodos de la presente invención puede contener ya el inhibidor de ROCK o, alternativamente, los métodos de la presente invención pueden implicar una etapa de adición del inhibidor de ROCK al medio. La concentración del inhibidor de ROCK en el medio no está limitada particularmente en la medida en que pueden lograr los efectos deseados, tales como la tasa de supervivencia mejorada de las células madre. Por ejemplo, cuando se usa Y-27632 como inhibidor de ROCK, se puede usar preferiblemente a la concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1000 μM , más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 μM , aún más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 30 μM , y lo más preferiblemente alrededor de 2,0 a 20 mM. Cuando se usa Fasudil/HA1077 como inhibidor de ROCK, se puede usar a aproximadamente el doble de la concentración de Y-27632 antes mencionada. Cuando se usa H-1152 como inhibidor de ROCK, puede usarse aproximadamente a 1/50 de la concentración de Y-27632 antes mencionada.

40 El tiempo para tratar con el inhibidor de ROCK no está particularmente limitado siempre y cuando tenga una duración suficiente para que se puedan conseguir los efectos deseados, tales como la tasa de supervivencia mejorada de las células madre. Para una célula madre embrionaria humana (no de la invención), el tiempo para el tratamiento es preferiblemente de aproximadamente 30 minutos a varias horas (por ejemplo, aproximadamente una hora) antes de la disociación. Después de la disociación, la célula madre embrionaria humana puede tratarse con el inhibidor de ROCK durante, por ejemplo, aproximadamente 12 horas o más para lograr los efectos deseados.

45 La densidad de la célula o células madre a tratar con el inhibidor ROCK es particularmente no limitada por cuanto es una densidad a la que se pueden conseguir los efectos deseados, tales como la tasa de supervivencia mejorada de las células madre. Es preferiblemente de aproximadamente $1,0 \times 10^1$ a $1,0 \times 10^7$ células/ml, más preferiblemente de aproximadamente $1,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ células/ml, además preferiblemente de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^7$ células/ml, y lo más preferiblemente de aproximadamente $3,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^6$ células/ml.

50 Los métodos de la presente invención pueden implicar adicionalmente una etapa de disociación de células madre. La disociación de células madre se puede realizar usando cualquier procedimiento conocido. Estos procedimientos incluyen tratamientos con un agente quelante (como EDTA), una enzima (como la tripsina, la colagenasa) o similares, y operaciones tales como la disociación mecánica (como el pipeteo). La o las células madre pueden tratarse con el inhibidor de ROCK antes y/o después de la disociación. Por ejemplo, las células madre pueden tratarse solo después de la disociación. El tratamiento de las células madre con el inhibidor de ROCK puede ser como se describió anteriormente.

Las condiciones de cultivo de acuerdo con la presente invención se definirán apropiadamente dependiendo del medio y de las células madre utilizadas. La presente invención también proporciona un medio para ser usado en los métodos de la presente invención.

- 5 El medio de acuerdo con la presente invención se puede preparar usando un medio que se emplea para cultivar células animales como su medio basal. Como medio basal, puede ser utilizado cualquiera de los medios BME, BGJb, CMRL 1066, Glasgow MEM, MEM Zinc Option mejorado, IMDM, Medio 199, Eagle MEM, α MEM, DMEM, Ham, RPMI 1640 y Fischer, así como cualquier combinación de los mismos, pero el medio no está particularmente limitado a él en la medida en que puede usarse para cultivar células animales.
- 10 El medio de acuerdo con la presente invención puede ser un medio que contiene o que no contiene suero. El medio libre de suero se refiere a medios sin suero no procesado o no purificado y, en consecuencia, puede incluir medios con componentes hemoderivados purificados o componentes derivados de tejido animal (tales como factores de crecimiento). Desde el punto de vista de la prevención de la contaminación con componentes heterogéneos derivados de animales, el suero puede derivarse del mismo animal que el de las células madre.
- 15 El medio de acuerdo con la presente invención puede contener o no contener ninguna alternativa al suero. Las alternativas al suero pueden incluir materiales que contienen apropiadamente albúmina (tal como albúmina rica en lípidos, sustitutos de albúmina como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteínas), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, elementos traza, 2-mercaptoetanol, 3'-tioglicerol, o equivalentes de los mismos. Las alternativas al suero se pueden preparar por el método descrito en la Publicación Internacional N° 98/30679, por ejemplo. Alternativamente, se puede usar cualquier material disponible comercialmente para mayor comodidad. Los materiales comercialmente disponibles incluyen knockout Serum Replacement (KSR), lípido químicamente definido concentrado (Gibco) y Glutamax (Gibco).
- 20 El medio de la presente invención también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), vitaminas, factores de crecimiento, citoquinas, sustancias antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes de tamponamiento y sales inorgánicas. La concentración de 2-mercaptoetanol puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mM, y preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 0,5 mM, pero la concentración no se limita de un modo particular a ellas, siempre y cuando sea apropiada para cultivar las células madre.
- 25 Un recipiente de cultivo utilizado para cultivar las células madre puede incluir, pero sin limitarse a ellos: matraz, matraz para cultivo de tejidos, plato, placa de Petri, plato para cultivo de tejidos, plato múltiple, microplaca, placa de micropocillos, multiplaca, placa multipocillos, micro slide, portaobjetos de cámara, *schale*, tubo, bandeja, bolsa de cultivo, y frasco rotatorio, siempre y cuando sea capaz de cultivar las células madre en ellos.
- 30 El recipiente de cultivo puede ser adhesivo o no adhesivo celular, y puede seleccionarse según el propósito. El recipiente de cultivo adhesivo celular se puede recubrir con cualquiera de los sustratos para la adhesión celular, tal como la matriz extracelular (ECM) para mejorar la adhesividad de la superficie del recipiente a las células. El sustrato para la adhesión celular puede ser cualquier material destinado a unir células madre o células alimentadoras (si se usan). El sustrato para la adhesión celular incluye colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, laminina y fibronectina y mezclas de los mismos, por ejemplo Matrigel, y preparados de membranas celulares lisadas (Klimanskaya I et al. 35 2005. Lancet 365: p 1636 - 1641).
- Pueden definirse apropiadamente otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de aproximadamente 30 a 40°C y preferiblemente aproximadamente 37°C, pero no se limita a ellas de un modo particular. La concentración de CO₂ puede ser de aproximadamente 1 a 10% y preferiblemente de aproximadamente 2 a 5%. La tensión de oxígeno puede ser del 1 al 10%.
- 40 Los métodos de la presente invención se pueden usar para el cultivo de adhesión de células madre, por ejemplo. En este caso, las células se pueden cultivar en presencia de células alimentadoras. En el caso en el que se usan las células alimentadoras en los métodos de la presente invención, se pueden usar como células alimentadoras células estromales tales como fibroblastos fetales (por ejemplo, véanse Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981); Evans et al., Nature, 292, 154 (1981); Jainchill et al., J. Virol., 4, 549 (1969); Nakano et al., Science, 272, 722 (1996); Kodama et al., J. Cell. Physiol., 112, 89 (1982); y las publicaciones internacionales Nos. 01/088100 y 2005/080554).
- 45 Los métodos de la presente invención también se pueden usar para un cultivo en suspensión de células madre, incluyendo el cultivo en suspensión en portadores (Fernandes AM) et al. J. Biotechnology 2007) o encapsulación en gel/biopolímero (Patente de los Estados Unidos 20070116680). La expresión "cultivo en suspensión de células madre" significa que las células madre se cultivan bajo condiciones no adherentes con respecto al recipiente de cultivo o células alimentadoras (si se usan) en un medio. El cultivo en suspensión de células madre incluye un cultivo de disociación de células madre y un cultivo en suspensión de agregados de células madre. La expresión "cultivo de disociación de células madre" significa que se cultivan células madre suspendidas, y el cultivo de disociación de células madre incluye las de las células madre individuales o las de pequeños agregados de células compuestos por una pluralidad de células madre (por ejemplo, de 2 a 20 células). Cuando se continúa el cultivo de disociación mencionado anteriormente, las células disociadas cultivadas forman un agregado de células madre más grande, y después de eso puede realizarse un cultivo de suspensión de agregados. El cultivo de suspensión de agregados incluye un método de cultivo embrioide (véase Keller et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7, 862 - 869 (1995)), y un método SFEB (Watanabe et
- 50
- 55

al., Nature Neuroscience 8, 288 - 296 (2005); publicación internacional nº 2005/123902). Los métodos de la presente invención pueden mejorar significativamente la tasa de supervivencia y/o la eficacia de diferenciación de células madre en un cultivo en suspensión.

5 Los métodos de la presente invención se pueden usar como métodos de subcultivo de células madre. Por tanto, los métodos de la presente invención pueden implicar una etapa de recolección/cultivo en placa de células madre. De acuerdo con los métodos de la presente invención, se puede conseguir una tasa de supervivencia más alta y una potencia de proliferación mejorada.

10 En consecuencia, los métodos de la presente invención permiten que las células individuales (o una pequeña agregación de células) se disocien unas de otras en cultivo de manera eficiente; además, los métodos de la invención pueden promover la eficacia del descubrimiento de fármacos y ensayos de seguridad (por ejemplo, cribado de alto rendimiento) usando células madre. Además, los métodos de la presente invención proporcionan un fácil cribado/subclonación de células madre modificadas genéticamente (células recombinadas y/o recombinadas homológicamente) y un cribado más seguro y más homogéneo de una línea de células madre para aplicaciones médicas. Los métodos de la presente invención también tienen ventajas por cuanto dan como resultado que las células madre retengan propiedades indiferenciadas de células madre sin afectar su potencia de diferenciación.

15 Los métodos de la presente invención se pueden usar mientras se induce la diferenciación de las células madre. Por tanto, los métodos de la presente invención pueden implicar una etapa de inducción de diferenciación de las células madre. Se puede emplear cualquier método conocido para inducir la diferenciación de células madre. Los ejemplos de las células que han de producirse a través de la diferenciación de células madre incluyen células endodérmicas (células positivas a marcadores Sox17 o AFP, etc.), células mesodérmicas (células positivas a marcadores Brachyury, Flk1, Mox, etc.) y células ectodérmicas. Los ejemplos de células ectodérmicas incluyen células neurales (NCAM, TuJ1, tirosina hidroxilasa (TH), serotonina, nestina, MAP2, MAP2ab, NeuN, GABA, glutamato, ChAT o células positivas al marcador Sox1, etc.), células epidérmicas (células positivas al marcador de citoqueratina, etc.), células sensoriales (células positivas para el marcador RPE o rodopsina, etc.), células pigmentarias (células positivas para el marcador TRP-1, etc.) y células mesenquimatosas derivadas de la cresta neural (células positivas para el marcador SMA, etc.). El método SFEB (véase Nature Neuroscience 8, 288 - 296, 2005; publicación internacional N° 2005/123902) puede usarse para inducir preferiblemente células del sistema nervioso, tales como células neurales (por ejemplo, células neurales cerebrales) y sus precursores, a partir de las células ES. En este caso, se pueden usar los factores de la forma siguiente; inhibidores nodales (Lefty-A, Lefty-B, Lefty-1, Lefty-2, receptores nodales solubles, anticuerpos nodales, inhibidores del receptor nodal, etc.); inhibidores Wnt (Dkk1, proteínas Cerberus, inhibidores del receptor Wnt, receptores Wnt solubles, anticuerpos Wnt, inhibidores de caseína quinasa, proteínas Wnt negativas dominantes, etc.); e inhibidores de BMP (anticuerpos anti-BMP, receptores BMP solubles, inhibidores del receptor de BMP, etc.). De acuerdo con los métodos de la presente invención, las células madre se pueden diferenciar eficientemente en células específicas. Los métodos de la presente invención tienen otras ventajas porque se pueden usar preferiblemente en otros métodos (por ejemplo, un método SDIA, un método AMED, un método que usa células PA6), que permiten que las células madre se diferencien en células neurales (células neurales del prosencéfalo o cerebro anterior y/o células dorsales cerebrales (región cortical) y células ventrales cerebrales (región ganglionar basal).

20 La presente invención proporciona un preparado celular obtenido por los métodos de la presente invención y/o los tratamientos de disociación mencionados anteriormente. El preparado celular de la presente invención incluye una célula madre pluripotente humana y un inhibidor de ROCK. Un preparado celular de la presente invención puede ser un preparado que comprende células disociadas tales como agregados pequeños de células compuestos por una pluralidad de células individuales. Tal preparado celular puede mejorar la tasa de supervivencia o la eficacia de diferenciación de las células madre, preferiblemente células madre neurales humanas. El preparado celular de la presente invención, por ejemplo, puede usarse para el almacenamiento (por ejemplo, crioconservación) y/o el transporte de células madre o el subcultivo de células madre. Cuando el preparado celular se usa para la crioconservación de células madre, el preparado celular de la presente invención puede incluir adicionalmente el suero descrito anteriormente o un sustituto del mismo, o un disolvente orgánico (por ejemplo, DMSO). En este caso, la concentración de suero o de su sustituto puede ser, pero no está limitada a ella, aproximadamente 1 - 50% (v/v), preferiblemente aproximadamente 5 - 20% (v/v). La concentración de disolvente orgánico puede ser, pero sin limitarse a ella, aproximadamente 0 - 50% (v/v), preferiblemente aproximadamente 5 - 20% (v/v). Las composiciones de estas realizaciones de la invención pueden incluir suero o pueden estar exentas de suero y por separado pueden incluir células alimentadoras.

25 Un agente de cultivo de células madre comprende un inhibidor de ROCK. En general, el agente de cultivo será un medio de cultivo para células madre. El agente de cultivo puede usarse preferiblemente en los métodos de cultivo de la presente invención.

Puede usarse, por ejemplo, una combinación que comprende un inhibidor de ROCK y otros componentes para cultivar células madre (por ejemplo, cultivo de pasaje, cultivo de inducción de la diferenciación).

30 Por ejemplo, la combinación puede ser una composición. La composición puede proporcionarse en forma de una mezcla de un inhibidor de ROCK y otros componentes. Los otros componentes que pueden incluirse en la composición incluyen, por ejemplo: agentes de ajuste de la diferenciación de células madre tales como inhibidores de diferenciación

de las células madre (por ejemplo, suero, FGF, LIF, BMP, Wnt, una matriz extracelular, TGF- β , una célula alimentadora), e inductores de diferenciación de células madre (por ejemplo, un inhibidor de BMP, un inhibidor de Wnt, un inhibidor nodal, ácido retinoico, suero, una matriz extracelular, las células alimentadoras tales como células mesenquimales); así como el aditivo de cultivo (por ejemplo, KSR, 2-mercaptoetanol, aminoácidos, ácidos grasos y los otros factores descritos anteriormente).

La combinación puede ser también un kit. Un kit puede comprender un inhibidor de ROCK y otros componentes por separado (es decir, de una manera no mixta). Por ejemplo, el kit se puede proporcionar en forma de cada componente que se empaqueta individualmente en un envase. Los otros componentes que pueden estar contenidos en el kit incluyen, por ejemplo: los otros componentes mencionados anteriormente, que se pueden incluir en la composición; un material para la identificación o medida (detección o cuantificación) de las células madre o células diferenciadas (por ejemplo, un anticuerpo contra el marcador celular); un medio de cultivo celular; un recipiente para cultivo que se trata con una matriz extracelular; un plásmido para recombinación genética y un agente selectivo de la misma.

Un sistema de cultivo contiene células madre y un inhibidor de ROCK en un medio. El sistema de cultivo puede contener células madre en el medio de la presente invención. El sistema de cultivo puede contener además factores de cultivo de células en un medio, distintos de los componentes descritos en detalle con relación a los métodos de la presente invención, tales como una célula alimentadora, matriz soporte de células, o un inhibidor de ROCK.

A continuación se proporcionan ejemplos detallados. Los ejemplos se ilustran mediante los siguientes dibujos:

Figura 1 - El inhibidor de ROCK Y-27632 aumenta notablemente la eficacia de clonación de células hES (KhES-1) sin afectar a su pluripotencia. (a - c) Cultivo de baja densidad de células hES disociadas en ausencia (a) y presencia (b) de Y-27632 10 μ M en MEF durante siete días. Casi todas las colonias fueron positivas para ALP. Barras, 500 μ m. (c) Relaciones de colonias ALP+ con el número de células hES sembradas inicialmente (**, P < 0,01 frente a control, n = 3). (d - f) Inmunotinción de colonias de células hES tratadas con Y-27632, con anticuerpos anti-E-cadherina (d), -Oct3/4 (e) y -SSEA-4 (f). Los paneles inferiores son tinciones DAPI nucleares. Barras, 100 μ m. El tratamiento con Y-27632 no produjo cambio drástico en la formación de haces de actina de células hES (no mostrado). (g) Análisis por RT-PCR de los marcadores mesodérmicos tempranos Brachyury y Meox1 en la diferenciación de células hES. RT(-), G3PDH PCR sin transcripción inversa. (h) Análisis de RT-PCR del marcador endodérmico temprano Sox17 en células ES diferenciadoras. (i - k) Inmunotinción para los marcadores mesodérmicos y endodérmicos en diferenciación de células hES en una placa de 8 pocillos recubierta con colágeno I y IV. (i) Expresión del marcador mesodérmico de Brachyury (rojo) en varias células diferenciadoras. Se usó DAPI para tinción nuclear (azul; c). Barra, 10 μ m. (j) Inmunotinción de actina de músculo liso (SMA; rojo) en células derivadas de células hES (tratadas con Y-27632) cultivadas en células OP9 durante 12 días. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra, 5 μ m. (k) Inmunotinción de Hnf3 β y E-cadherina en una lámina epitelial derivada de células hES en el día 6. Barra, 5 μ m. (l - n) Formación de teratoma (100%, n = 20) a partir de células hES mantenidas a baja densidad en presencia de Y-27632 (30 pasajes). Barras, 1 cm. Las células se inyectaron bilateralmente en los testículos de ratón SCID (l). Después de 9 semanas, los teratomas contenían una mezcla de tejidos bien diferenciados que incluían cartílagos macroscópicos (flechas blancas; m, n) y epitelio pigmentario (flecha negra; n).

Figura 2 - Y-27632 potencia directamente la eficacia de clonación de las células hES (KhES-1). (a, b) Cultivo libre de células alimentadoras, de células hES en placas recubiertas de matrigel en medio acondicionado MEF. Barras, 500 μ m. La formación de colonias de células hES disociadas se vio claramente mejorada por Y-27632 (b; recuadro, una vista con muchos aumentos de una colonia típica, barra, 100 μ m) mientras que pocas colonias se formaron en su ausencia (a; < 0,2% y $10,2 \pm 1,2\%$ sin y con Y-27632, respectivamente, P < 0,001, n = 3). (c, d) Cultivo de una célula individual hES en MEF en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en presencia de Y-27632 10 μ M durante siete días. (c) Porcentajes de la presencia de una colonia ALP+ (d) en cada pocillo (**, P < 0,01 frente a control, n = 3 estudios). Control, células no tratadas. Barra, 100 μ m. (e, f) Formación de colonias resistentes a la higromicina a partir de células hES tratadas con Y-27632 en cultivo de disociación de baja densidad en MEF 12 días después de la transfección. Barras, 100 μ m. (e) Vista de contraste de fase. (f) Expresión de Venus-GFP. (g) Curva de crecimiento de células hES cultivadas en MEF con diferentes cursos de tiempo de tratamiento con Y-27632. Grupo 1 (azul), tratamiento con Y-27632 solamente durante las primeras 12 horas (con pretratamiento de una hora); Grupo 2 (rojo), tratamiento continuo con Y-27632 durante todo el período de cultivo; No Y-27632, ningún tratamiento en absoluto con Y-27632 (púrpura). Para cada condición, se sembraron en placas 5×10^4 células disociadas/pocillo (placa de 6 pocillos) en MEF. **, P < 0,01, Grupo 2 frente a Grupo 1 (n = 3 estudios). (h) Porcentajes de células Ki67+ (mitóticas) en células hES Nanog+ en los grupos 1 (azul) y 2 (rojo) en los días 3 y 5. (i - n) Análisis de citometría de flujo de las poblaciones específicas de la fase del ciclo celular. (i, j, l, m) Patrones de citometría de flujo. Eje X, contenido de ADN mostrado por unión de 7-AAD; Eje Y, captación de BrdU después de una exposición de una hora. (k, n) Porcentajes relativos de poblaciones específicas de fase entre las células hES en los Grupos 1 (azul) y 2 (rojo). (i - k) día 3. (l - n) día 5. *, P < 0,05; **, P < 0,01, Grupo 2 frente a Grupo 1 (n = 3 estudios). El grado de aumento en el crecimiento celular no es muy grande y no puede explicar el fuerte aumento de la eficiencia de clonación (1% frente a 27%).

Figura 3 - El inhibidor de ROCK previene la apoptosis y promueve la supervivencia de células hES disociadas (KhES-1) en cultivo en suspensión. (a - c) ensayo TUNEL. Las células hES disociadas se cultivaron en suspensión durante dos días en ausencia (a) o en presencia (b) de Y-27632 10 μ M. Las células TUNEL+ fueron analizadas por FACS. (c) Efectos de Y-27632, inhibidor de caspasa I (Z-VAD-fmk) y un cóctel de neurotrofina (BDNF+ NT-3 y -4) en porcentajes

de células apoptóticas (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$, entre cada par, $n = 3$ estudios). (d - f) Efectos de soporte de Y-27432 sobre la supervivencia/crecimiento de células hES en cultivo en suspensión. (d) Número de células dos, cuatro y seis días después de cultivar 2×10^5 células hES disociadas en placas de 35 mm ($n = 3$). El día 6, se observó la formación eficaz de agregados celulares con las células ES tratadas con Y-27632 (f), pero no con las células control (e). Barras, 300 μm . (g) Análisis a lo largo del tiempo de la expresión de Pax6 (verde), Oct3/4 (rojo) y E-cadherina (azul) en células hES cultivadas en SFEB-h. (h) Esquema del protocolo de cultivo. (i) Inmunotinción de células neurales derivadas de células hES inducidas en cultivo de SFEB-h. Bf1 (rojo), TuJ1 (verde), DAPI (azul). Barra, 50 μm . Se ha de observar que algunas células Bf1 + fueron positivas para el marcador neuronal TuJ1. (j - n) Análisis de inmunotinción de células neurales inducidas por SFEB-h. Barras, 25 μm . (j) Porcentajes de células telencefálicas Bf1+ que fueron positivas para Pax6 y Nkx2.1 (**, $P < 0,01$ frente a control, $n = 3$). Inmunoquímica de células neurales inducidas por SFEB-h cultivadas sin (k, l) o con (m, n) Shh (30 nM). Bf1 (verde; k - n), Pax6 (rojo; k, m) y Nkx2.1 (rojo; l, n).

Figura 4 - Análisis de células hES cultivadas en presencia de Y-27632 a baja densidad. (a - c) Inmunotinción de E-cadherina (a), Oct3/4 (b) y SSEA-4 (c) en células hES tratadas con Y-27632 (KhES-1) después de pases extendidos (30 veces) a baja densidad con tratamiento de Y-27632. Los paneles inferiores muestran tinción DAPI (azul). (d - g) Análisis histológico (tinción con hematoxilina-eosina, sección de parafina 5 μM) de tejidos de teratoma formados después de inyección subcapsular de células hES (KhES-1) después de pases extendidos con Y-27632 en testículos de ratón SCID. (d) Cartílago, (e) neuroepitelio, (f) epitelio pigmentado y (g) mucosa tipo intestinal con epitelio columnar. (h, i) Después de los pases extendidos que implican cultivo de baja densidad con el tratamiento Y-27632, la formación eficaz de colonias de células hES disociadas ($32,5 \pm 1,7\%$; KhES-1) se mantuvo dependiente de Y-27632 (i) y se observaron pocas colonias sin ella (h). (j) Relación dosis-respuesta de dos inhibidores de ROCK selectivos (Y-27632, Fasudil; la eficacia de clonación fue de $1,3 \pm 0,8\%$ y $25,1 \pm 1,6\%$ sin y con Fasudil 10 μM ; $P < 0,001$, $n = 3$) y dos inhibidores de quinasa no relacionados (cAMP-Rp, LY294002) en la formación de colonias (KhES-1). Eje Y, relaciones de actividad de promoción de la formación de colonias con Y-27632 10 μM . (k) Mejora de la formación de colonias mediante Y-27632 a diferentes densidades de placa de células hES. ***, $P < 0,001$ frente a control (sin tratamiento), $n = 5$. (l) Análisis de bandas G (a niveles de 300-500 bandas) de células hES (KhES-3) que muestra un cariotipo normal (100%, $n = 5$) después de pases de mantenimiento extendidos con tratamiento de Y-27632 durante tres meses.

Figura 5 - Diferenciación neural de células hES (KhES-1) en cultivo en suspensión que implica disociación/reagregación en presencia de Y-27632. (a) Efectos de inhibidores de Nodal (5 $\mu\text{g/ml}$ Lefty, carril 2), Wnt (500 ng/ml Dkk1, carril 3) y BMP (1,5 $\mu\text{g/ml}$ BMPR1A-Fc, carril 4) sobre diferenciación de células hES en progenitores neurales Pax6+. Carril 5, combinación de los tres factores (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ frente a control; $n = 3$ estudios). (b, c) Inmunotinción de agregados SFEB de células hES (día 24) cultivadas con Y-27632 (días 0 - 6) y los tres inhibidores (días 0 - 24; SFEB-h). (b) Pax6 (verde) y E-cadherina (rojo). (c) Nestina (verde) y Oct3/4 (rojo).

Ejemplos.

Ejemplo de referencia 1: Mejora en la eficacia de clonación de células madre embrionarias humanas por el inhibidor de ROCK Y-27632.

(Método)

Las células madre embrionarias humanas utilizadas para los experimentos descritos en el presente texto fueron células madre embrionarias (KhES-1, KhES-2 y KhES-3) de blastocistos humanos establecidos en el laboratorio de Norio Nakatsuji, en el Institute for Frontier Medical Sciences, Universidad de Kyoto, que se distribuyeron y utilizaron (principalmente KhES-1) siguiendo las directrices de células madre embrionarias humanas del gobierno japonés. De acuerdo con el método del laboratorio Nakatsuji (Suemori et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 345, 926 - 32 (2006)), se cultivaron células madre embrionarias humanas indiferenciadas en un disco de cultivo de plástico con fibroblastos embrionarios de ratón (inactivados con mitomicina, MEF) sembradas como una capa de células alimentadoras. Más específicamente, se usó el medio de cultivo que contiene KSR (Invitrogen/Gibco-BRL) en la concentración final de 20%, 1 X NEAA (aminoácidos no esenciales, Invitrogen/Gibco BRL), ácido L-glutámico 2 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM en D-MEM F12 (Sigma D6421), y el cultivo se realizó a 37 °C, 5% de CO₂. El pasaje se realizó cada tres o cuatro días, y las células madre embrionarias se separaron de la capa alimentadora usando el líquido de disociación (que contiene 0,25% de tripsina, 1 mg/ml de solución de colagenasa IV, CaCl₂ 1 mM en una solución salina tamponada con fosfato; todo ello de Invitrogen/Gibco-BRL), seguido de disociación en racimos pequeños de células (de aproximadamente 50 - 100 células) pipeteando, y luego se sembró en la capa alimentadora que se había formado a partir de MEF de siembra el día anterior.

El efecto inhibitorio de la muerte celular y la influencia sobre la eficacia de clonación, del inhibidor de ROCK, para el cultivo de células madre embrionarias humanas después de la disociación a células individuales, se examinaron de la manera siguiente. Las células madre embrionarias humanas cultivadas anteriormente se desprendieron de la capa de alimentación como racimos pequeños de células, y después se adhirieron células alimentadoras contaminantes al fondo de una placa de cultivo adhesiva celular (recubierta con gelatina al 0,1%) para su eliminación, mediante incubación en el cultivo de mantenimiento medio a 37 °C durante una hora, en donde los racimos de células madre embrionarias no se adhieren fuertemente a la placa mientras que las células alimentadoras contaminantes se adhieren fuertemente. Los racimos de células madre embrionarias se disociaron a células individuales por digestión con tripsina (0,25% tripsina - EDTA, a 37 °C durante 5 minutos), y se sembraron en una capa alimentadora MEF en placas de

cultivo de 96 pocillos a baja densidad (500 células/0,32 cm² en 0,15 ml de medio). El número de colonias formadas se contó seis días después del cultivo en el medio de cultivo de mantenimiento. Se añadió el inhibidor de ROCK Y-27632 a la concentración de 10 µM una hora antes de separar las células de la capa alimentadora, y se añadió la misma cantidad al cultivo en la misma cantidad después de la separación.

- 5 También, para evaluar si la promoción de clonación sería causada por el factor autocrino de la célula madre embrionaria humana, se realizó un experimento similar en placas de cultivo de 96 pocillos a densidad clonal (una célula por pocillo) de células madre embrionarias humanas, y se determinó la eficacia de la clonación.

(Resultado)

- 10 Después de seis días de cultivo, las eficiencias de clonación (relaciones del número de colonias formadas con el número inicial de células madre embrionarias humanas sembradas) fueron 1% y 27% sin y con el inhibidor de ROCK, respectivamente. Las células en colonias formadas por el tratamiento con el inhibidor de ROCK expresaron fosfatasa alcalina y Oct3/4, que son marcadores de células madre embrionarias no diferenciadas. El efecto superior del inhibidor de ROCK para la eficiencia de la clonación fue confirmado no solo en KhES-1 sino también en KhES-2 y KhES-3 como células madre embrionarias humanas.

- 15 También, usando placas de 96 pocillos a densidad clonal (una célula por pocillo) de células madre embrionarias humanas, las eficiencias de clonación fueron inferiores al 1% y al 25% sin y con el inhibidor ROCK, respectivamente. Por lo tanto, se consideró que el efecto superior del inhibidor de ROCK para la eficacia de la clonación no se debía a un factor autocrino de células madre embrionarias humanas.

- 20 En consecuencia, se encontró que el inhibidor de ROCK Y-27632 mejoró significativamente la tasa de supervivencia de las células madre embrionarias humanas.

Referencia.

Ejemplo 2: Activación de Rho en células madre embrionarias humanas disociadas.

(Método)

- 25 El cultivo de mantenimiento de células embrionarias humanas se realizó por pasajes de racimos pequeños de células como se describe en el Ejemplo 1.

- 30 Como se describe en el Ejemplo 1, las células madre embrionarias humanas se disociaron a células individuales mediante digestión con tripsina, se suspendieron en el medio de cultivo para cultivo de mantenimiento, y se incubaron a 37 °C. Las células se recogieron por centrifugación después de 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, y 120 minutos de la incubación, y posteriormente se trataron con el kit de activación de GTPasa pequeño (Cytoskeleton Company, Denver, CO) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se analizaron por el método Pull down". La activación de Rho se juzgó sobre la base de aumentos en la relación de Rho activado (Rho asociado a GTP) a Rho total por transferencia Western. Se preparó una muestra de células a partir de una placa de cultivo de 10 cm (aproximadamente 1 x 10⁶ células) como un lote.

(Resultado)

- 35 Se observó una notable activación de Rho 15 - 30 minutos después de la disociación/incubación de células madre embrionarias humanas.

La activación de Rho disminuyó lentamente a lo largo de 30 minutos.

Por consiguiente, los resultados indican que el efecto superior de Y-27632 en las células madre embrionarias humanas fue debido a la inhibición de la activación de Rho, que fue causada por la acción de inhibición de ROCK de Y-27632.

- 40 Referencia

Ejemplo 3: La eficiencia de formación de colonias de células madre embrionarias humanas en el cultivo de mantenimiento por diferentes inhibidores de quinasa.

(Método)

- 45 Los efectos de otros inhibidores de ROCK sobre la eficacia de clonación de células madre embrionarias humanas en cultivo de mantenimiento se evaluó usando métodos como se describen en el ejemplo 1. Se usaron los inhibidores de ROCK, Fasudil/HA1077 (10 µM) y H-1152 (200 nM). También se usaron inhibidores para otras quinastas como referencia. Los inhibidores para otras quinastas utilizados fueron: cAMP-Rp (1 - 100 µM) y KT5720 (5 - 500 nM), que son inhibidores de la proteína quinasa A; bisindolilmaleimida (0,01 - 5 µM) y estaurosporina (1 - 50 nM), que son inhibidores de la proteína quinasa C; PD98059 (0,5 - 50 µM), que es un inhibidor de MAPK; LY294002 (1 - 50 µM), que es un inhibidor de PI3K; y ML-7 (0,3 - 30 µM), que es un inhibidor de MLCK.
- 50

(Resultado)

En los casos de inhibidores de ROCK (Fasudil/HA1077 y H-1152), se observaron eficiencias de clonación significativamente mejoradas en comparación con la ausencia de los inhibidores, si bien en los casos de inhibidores para otras quininas no se observó mejora.

- 5 Por consiguiente, se encontró que el inhibidor de ROCK podría mejorar específicamente la tasa de supervivencia de células madre embrionarias humanas.

Referencia

Ejemplo 4: Supresión de la apoptosis por el inhibidor de ROCK en cultivo en suspensión de células ES humanas disociadas/reagregadas.

10 (Método)

Las células ES humanas sometidas a cultivo de mantenimiento se desprendieron como pequeños racimos de las células alimentadoras (agregados) de la misma manera que en el Ejemplo 1 y, después de la eliminación de las células alimentadoras residuales, se disociaron en células individuales por digestión con tripsina. Después de la centrifugación, se disociaron 2×10^5 células en medio de cultivo libre de suero para la inducción posterior a la diferenciación (Watanabe et al., Nature Neuroscience 8, 288 - 296, 2005; suplementado con G-MEM, KSR y 2-mercaptoetanol, se añadió KSR a una concentración del 20%). Las células ES humanas disociadas individualmente ($1,0 \times 10^5$ células/ml) se cultivaron en suspensión en una placa de cultivo de 35 mm no adhesiva celular para formar agregados, y se cultivaron en el mismo medio de cultivo durante 2 - 6 días (método SFEB; véase la referencia anterior de Watanabe et al.). Después de un cultivo de 2 días, el porcentaje de células apoptóticas se midió mediante el método TUNEL (MEBSTAIN Apoptosis kit Direct, MBL). El tratamiento con el inhibidor de ROCK, Y-27632, se inició 1 hora antes de la separación de células de la misma manera que en el Ejemplo 1, y el inhibidor se añadió al medio de cultivo de mantenimiento también después de la disociación. Como comparación, se usaron inhibidores de caspasa (ZVAD; $10 \mu\text{M}$) y BDNF/NT-3/NT-4 (mezcla de 50 ng/ml cada uno), cuyo efecto supresor de la apoptosis ha sido publicado, para llevar a cabo el experimento. Además, se contó en cada caso el número de células supervivientes el día 6.

25 (Resultado)

En el control no suplementado, después de un cultivo de 2 días, se observó apoptosis en el 80% de las células mediante el método TUNEL. En células tratadas con inhibidor de ROCK, solo el 9% de las células eran TUNEL-positivas. Por otra parte, la suplementación del inhibidor de caspasa (ZVAD; $10 \mu\text{M}$) y BDNF/NT-3/NT-4 (50 ng/ml cada uno) dio como resultado 72% y 69% de células positivas para TUNEL, respectivamente. Estos resultados indican una intensa actividad supresora de la muerte celular del inhibidor de ROCK. En consecuencia, en cuanto al número de células supervivientes en el día 6, el 8% sobrevivió en el grupo no suplementado al comienzo del cultivo de disociación, mientras que el 70% sobrevivió en el grupo tratado con el inhibidor de ROCK; sobrevivieron más células. Las células supervivientes, tratadas con inhibidor de caspasa o bien con BDNF/NT-3/NT-4, justificaron menos del 10% de las células cultivadas en placa. Como se describió anteriormente, se demostró que el inhibidor de ROCK mejoró notablemente la tasa de supervivencia de las células ES humanas.

Referencia

Ejemplo 5: Inducción de la diferenciación en células precursoras neuronales y células precursoras cerebrales mediante el método SFEB usando células ES humanas disociadas individualmente.

(Método)

40 Las células ES humanas sometidas a cultivo de mantenimiento se separaron de las células alimentadoras como racimos pequeños de células de la misma manera que en el Ejemplo 4 y, después de la eliminación de las células alimentadoras residuales, se disociaron en células individuales mediante digestión con tripsina. Después de la centrifugación, las células se disociaron en medio de cultivo para la inducción de la diferenciación a 2×10^5 células/mL, y se cultivaron en suspensión usando una placa de cultivo no adherente de células para realizar un cultivo libre de suero (método SFEB) de agregados suspendidos. Además, el inhibidor nodal LeftyA (1 mg/ml, R & D), el inhibidor Wnt Dkk1 (500 ng/ml, R & D) y el inhibidor BMP BMPR1A-Fc (1,5 $\mu\text{g/ml}$, R & D) se añadieron durante los primeros 10 días después del inicio del cultivo para la inducción de la diferenciación. Después de un cultivo en suspensión libre de suero durante 16 - 35 días, los agregados celulares se fijaron y se sometieron a inmunotinción por el método del anticuerpo de fluorescencia. El tratamiento con el inhibidor de ROCK, Y-27632, se inició 1 hora antes de la separación celular de la misma manera que en el Ejemplo 1, y el inhibidor se añadió al medio de cultivo de mantenimiento durante los primeros seis días también después de la disociación.

Para la diferenciación en células precursoras cerebrales, en el día 25 del cultivo SFEB se transfirieron agregados de células flotantes a un portaobjetos de cultivo revestido con poli-D-lisina/laminina/fibronectina, y se cultivaron en un estado de adhesión durante 10 días más. En el cultivo de adhesión, se usó medio neurobasal como medio de cultivo, suplementado con B27 (libre de vitamina A) y L-glutamina 2 mM (ambos suministrados por Gibco-BRL).

(Resultado)

- El día 20 después del inicio del cultivo de diferenciación, en casi todos los agregados celulares tratados con el inhibidor de ROCK se expresaron células positivas para los marcadores celulares precursores neuronales, nestina y Pax6. El día 24 del cultivo de diferenciación, el número de estas células positivas aumentó, y aproximadamente el 80% de las células se convirtieron en células positivas para Pax6. Por otro lado, el marcador de células ES en estado no diferenciado, las células positivas para Oct3/4 justificaron menos del 10%. En el día 35 del cultivo de diferenciación, había muchos marcadores precursores cerebrales, células Bf1 positivas en aproximadamente el 60% de agregados celulares. Esto indica que las células ES humanas generan tejidos nerviosos cerebrales. Sin tratamiento inhibitor de ROCK, hubo pocas células supervivientes en el día 7 de cultivo de diferenciación.
- 5
- 10 En células no tratadas con el inhibidor de ROCK, pocas sobrevivieron durante 7 días o más, y no se observó una formación significativa de agregados de células flotantes.

Así, se encontró que el inhibidor de ROCK no alteraba la potencia de diferenciación de las células ES humanas, y las células humanas tratadas con el inhibidor de ROCK podían diferenciarse de manera muy eficiente.

Referencia

- 15 Ejemplo 6: Cultivo de células ES humanas disociadas individualmente mediante cultivo libre de alimentadoras suplementado con el inhibidor de ROCK.

(Método)

- Para demostrar si el tratamiento con inhibidor de ROCK permite el cultivo de disociación única de células ES humanas también mediante cultivo libre de alimentador sin usar células alimentadoras tales como fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se cultivaron células ES humanas sobre una matriz extracelular preparada con MEF según el método conocido por la bibliografía (Xu C-H et al., Nature Biotechnol., 19, 971 - 974 (2001)). Específicamente, de acuerdo con la bibliografía anterior, las células MEF cultivadas hasta confluencia se lisaron en un plato de cultivo mediante un método de desoxicolato para dejar solo la matriz extracelular. Células ES humanas disociadas individualmente (500 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) se sembraron sobre ellas bajo tratamiento con Y-2763 (10 μ M o 0 μ M) por el mismo método que para el cultivo de rutina en células MEF (Ejemplo anteriormente mencionado). El medio condicionado, en el cual el medio de mantenimiento de células ES humanas y el MEF se cultivaron preliminarmente durante un día, se usó como medio de cultivo. Se contó el número de colonias de células ES humanas formadas 5 días después.
- 20
- 25

(Resultado)

- 30 Se observó una alta eficacia de clonación (10,2%) por célula ES humana sembrada en el grupo tratado con Y-27632. Por otra parte, la eficacia de clonación en el grupo no tratado con Y-27632 fue inferior al 0,2%. Las colonias formadas en el grupo tratado con Y-27632 fueron fuertemente positivas para el marcador de estado no diferenciado, fosfatasa alcalina. Estos hallazgos indican que el inhibidor de ROCK tuvo efecto no en las células alimentadoras sino directamente en las células ES humanas, para promover la formación de colonias. Además, incluso sin utilizar el cocultivo con células alimentadoras, se demostró que el inhibidor de ROCK permitía el cultivo de disociación simple de células ES humanas cuando se cultivaban en una matriz extracelular adecuadamente preparada en presencia de factores líquidos (por ejemplo, factores contenidos en el medio acondicionado).
- 35

Referencia.

- 40 Ejemplo 7: cultivo de mantenimiento de células ES humanas disociadas individualmente mediante tratamiento con inhibidor de ROCK a corto plazo.

(Método)

- En cuanto al cultivo de mantenimiento de células ES humanas disociadas individualmente, para examinar si Y-27632 promueve la supervivencia de las células en la fase temprana del cultivo de disociación, el tiempo de tratamiento con Y-27632 se dividió en los tres grupos que siguen para comparar efectos de promoción de supervivencia celular en el cultivo de mantenimiento.
- 45

Grupo 1: el tratamiento con Y-27632 (10 μ M, el mismo a continuación) se realizó como un pretratamiento de una hora y solo durante las primeras 12 horas de cultivo después de la disociación en el proceso de cultivo de disociación de las células ES humanas.

- 50 Grupo 2: el tratamiento con Y-27632 se realizó como un pretratamiento de 1 hora y durante el período completo de cultivo después de la disociación en el proceso de cultivo de disociación de células ES humanas.

Grupo 3: no se realizó tratamiento con Y-27632.

En estos grupos, las células supervivientes el día 3 por células sembradas (5 x 10⁴ células por pocillo de una placa de

6 pocillos) se contaron en el sistema de cultivo de mantenimiento en la capa MEF.

(Resultado)

5 En el Grupo 3 no tratado con Y-27632, no más del 1% de las células sembradas en total sobrevivieron en el día 3. En el Grupo 1 tratado con Y-27632 durante 12 horas después de la disociación, se contaron el 270% de las células sembradas; en el Grupo 2 tratado con Y-27632 continuamente, se contaron el 290% de las células sembradas. Estos resultados indican que el tratamiento con Y-27632 tiene un efecto de promoción suficientemente elevado en el primer medio día después del comienzo del cultivo de disociación en cultivo de mantenimiento de células ES humanas mediante cultivo de adhesión.

Referencia.

10 Ejemplo 8: Actividad promotora del crecimiento celular mediante el tratamiento inhibidor de ROCK en cultivo de mantenimiento de células ES humanas.

(Método)

15 En el mismo experimento que en el Ejemplo 7 anterior, se examinó el efecto de Y-27632 sobre el crecimiento celular durante 6 días después del comienzo del cultivo de disociación en los Grupos 1 y 2 prolongando el periodo de cultivo a 6 días.

(Resultado)

20 El número de células en el día 6 aumentó a un 670% y un 860% del número de células sembradas inicialmente en los Grupos 1 y 2, respectivamente. El tiempo de duplicación de la población, basado en el número de células durante los días 2 a 6 después del comienzo del cultivo de disociación, fue 49,0 horas para el Grupo 1 y 41,5 horas para el Grupo 2; el tiempo de duplicación se acortó a la mitad para el Grupo 2. En ambos Grupos 1 y 2, el porcentaje de apoptosis (el porcentaje de células activas Caspasa 3-positivas) en los días 3 y 5 fue menos del 1% de las células totales. Estos resultados indican que, además de la actividad de soporte de la supervivencia celular inmediatamente después del comienzo del cultivo de disociación, Y-27632 tiene actividad promotora del crecimiento celular en las células de supervivencia a partir de ahí.

25 Así pues, las células madre se cultivan en presencia de un inhibidor de ROCK y la invención proporciona métodos de cultivo y medios para los mismos.

Referencias.

- WO 2005/123902 Watanabe et al., Nature Neuroscience 8, 288 - 296 (2005)
- Frisch et al., Curr. Opin. Cell Biol. 13, 555 - 562 (2001)
- 30 Riento et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 446 - 456 (2003)
- Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976 - 983 (2000)
- Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273 - 284 (2000)
- Minambres et al., J. Cell Sci. 119, 271 - 282 (2006)
- Kobayashi et al., J. Neurosci. 24, 3480 - 3488 (2004)
- 35 Rattan et al., J. Neurosci Res. 83, 243 - 255 (2006)
- Svoboda et al., Dev Dyn. 229, 579 - 590 (2004).

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar células madre pluripotentes humanas, que comprende tratar las células madre con un inhibidor de ROCK (Rho-quinasa).
2. El método según la reivindicación 1, en el que las células madre están disociadas.
- 5 3. El método según la reivindicación 2, en el que las células madre son células madre individuales o células madre agregadas.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células madre se cultivan en cultivo adherente o en cultivo en suspensión.
- 10 5. Un método para producir una célula diferenciada a partir de una célula madre que tiene una tasa de supervivencia y/o una potencia de proliferación mejoradas, o una célula madre que tiene una eficacia de diferenciación mejorada, comprendiendo dicho método cultivar una célula madre pluripotente humana en presencia de un inhibidor de ROCK.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor de ROCK es Y-27632, Fasudil o H-1152.
7. Un preparado celular que comprende una célula madre pluripotente humana y un inhibidor de ROCK.
- 15 8. Un preparado celular según la reivindicación 7, en el que la célula madre está disociada.
9. Un preparado celular según la reivindicación 7 u 8, en el que el inhibidor de ROCK es Y-27632, Fasudil o H-1152.
- 20 10. Uso de un inhibidor de ROCK (i) para promover y/o mejorar la eficacia de clonación o la eficacia del pasaje en un cultivo de células madre pluripotentes humanas, (ii) para promover y/o mejorar la formación de colonias en un cultivo de células madre pluripotentes humanas, y/o iii) para promover y/o mejorar la supervivencia de células madre pluripotentes humanas en un cultivo.
11. Un uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el inhibidor de ROCK es Y-27632, Fasudil o H-1152.

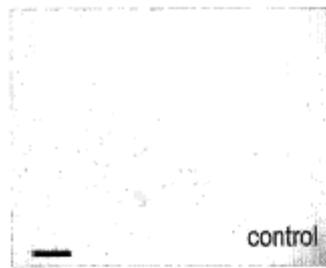


Fig.1a

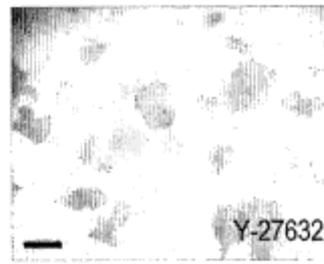


Fig.1b

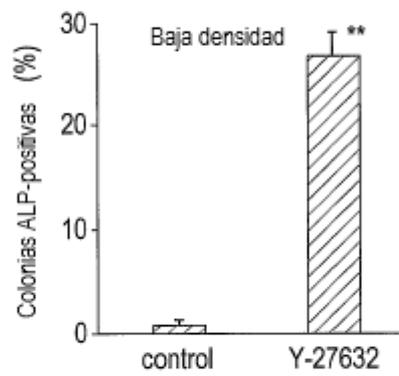


Fig.1c

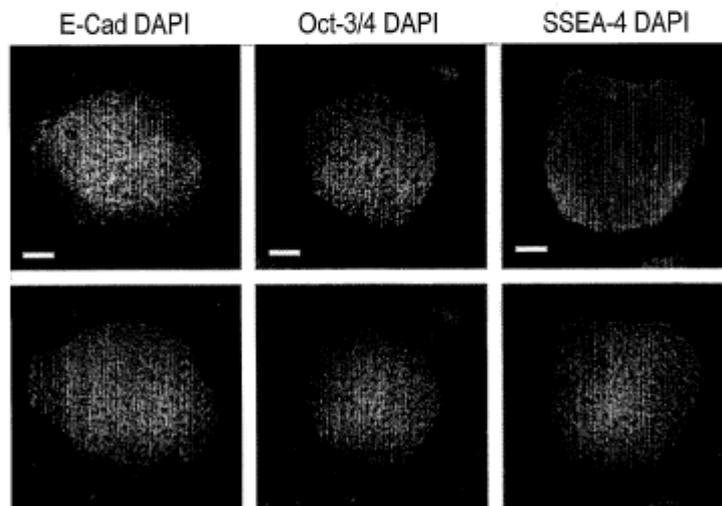


Fig.1d

Fig.1e

Fig.1f

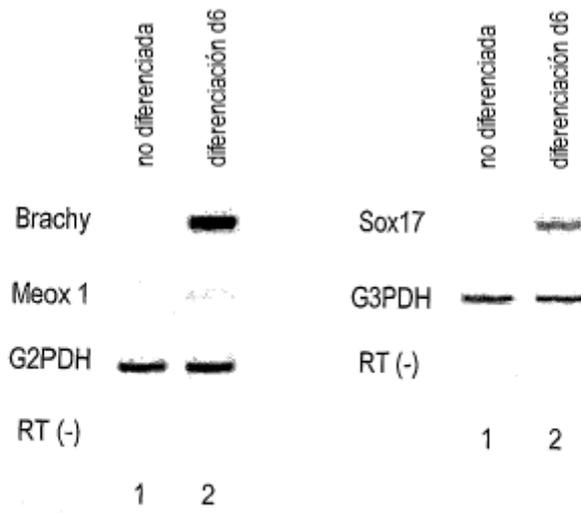


Fig.1g

Fig.1h

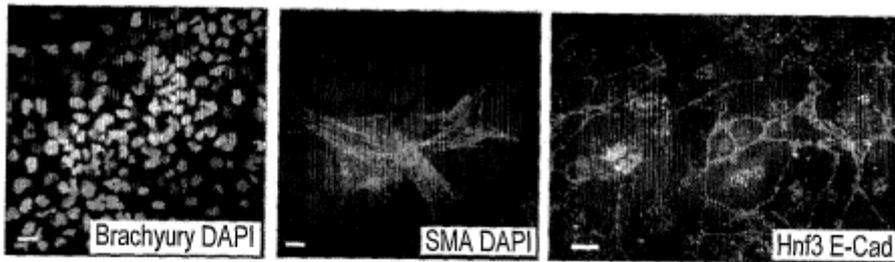


Fig.1i

Fig.1j

Fig.1k

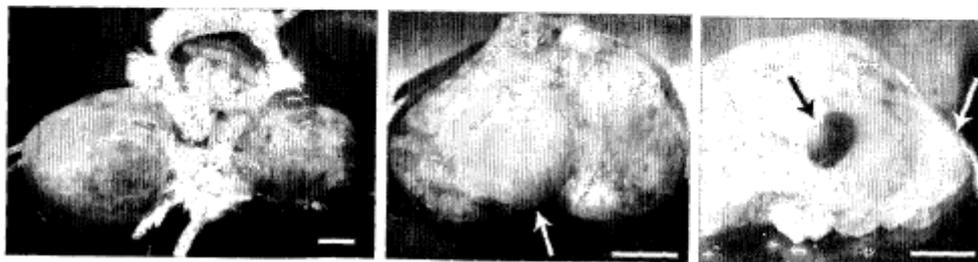


Fig.1l

Fig.1m

Fig.1n



Fig.2a

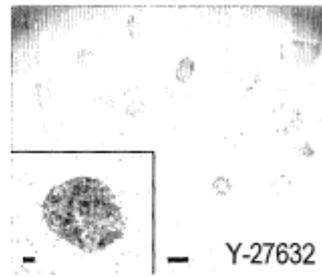


Fig.2b

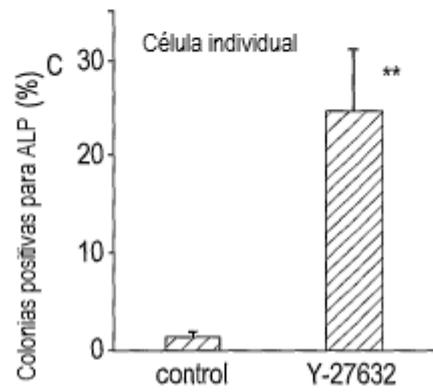


Fig.2c

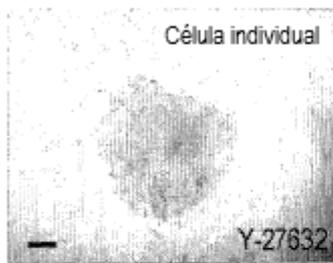


Fig.2d

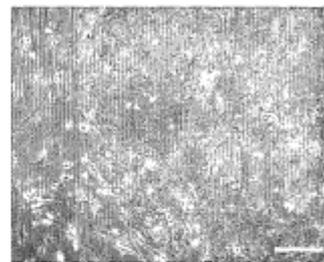


Fig.2e

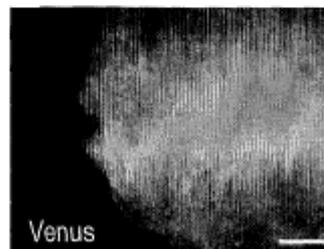


Fig.2f

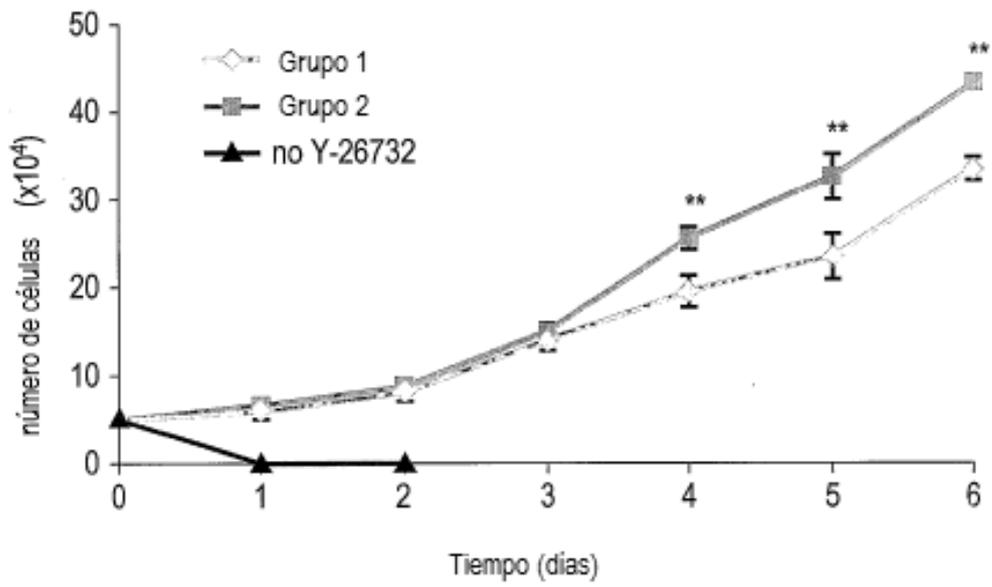


Fig.2g

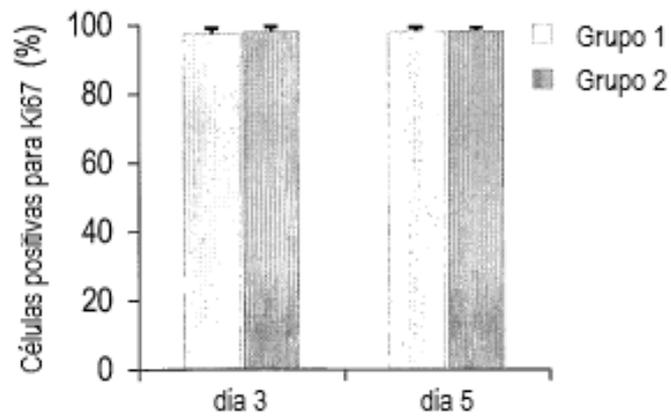
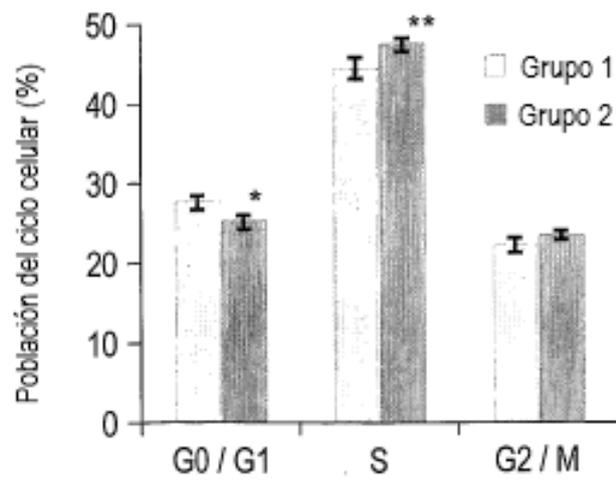
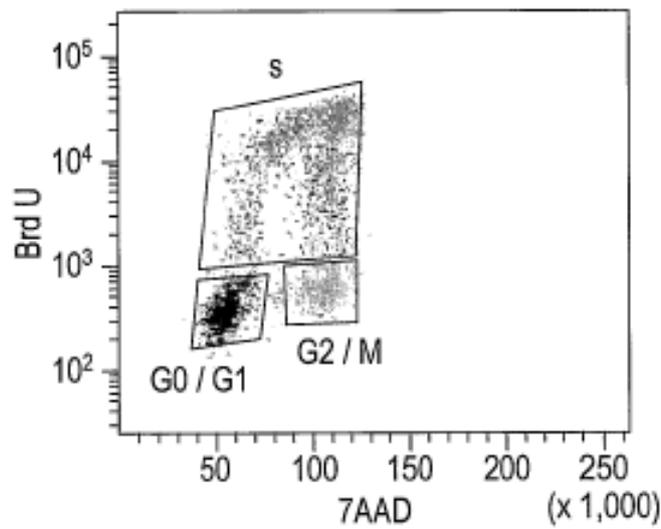
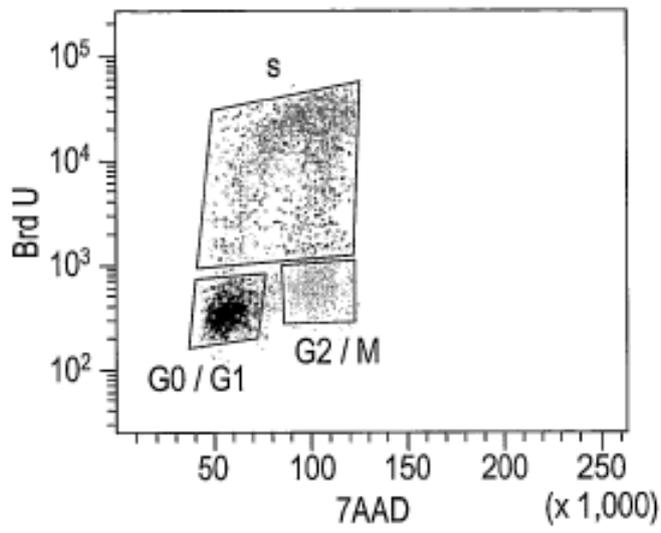


Fig.2h



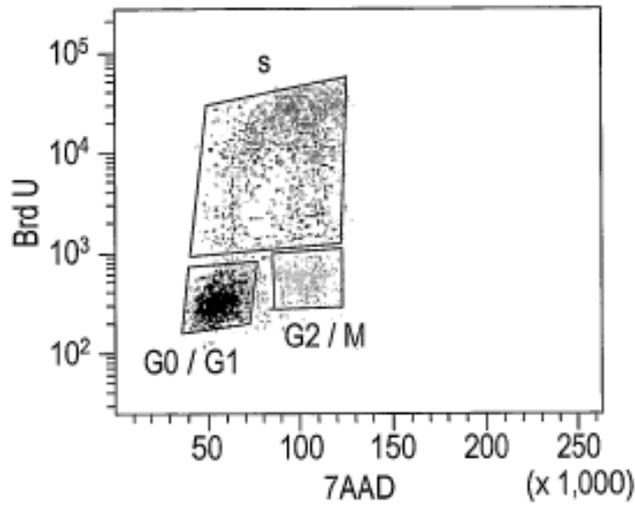


Fig. 2l

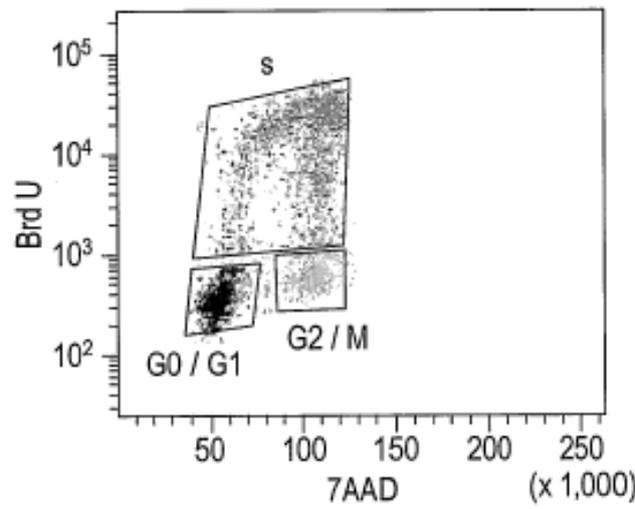


Fig. 2m

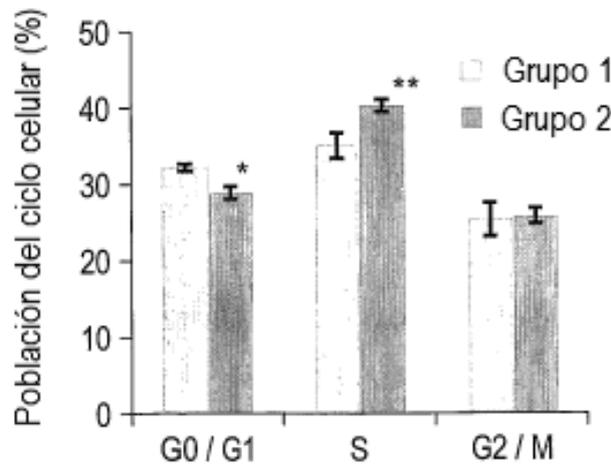


Fig. 2n

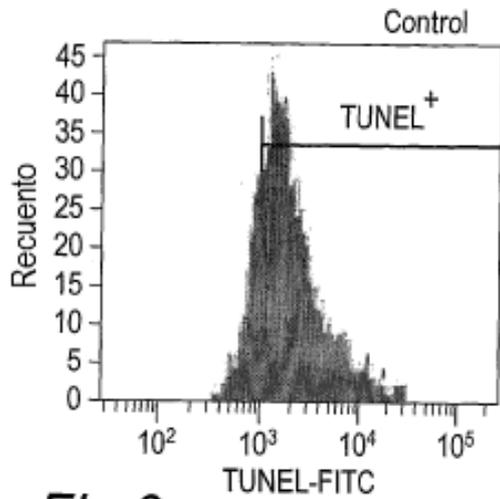


Fig.3a

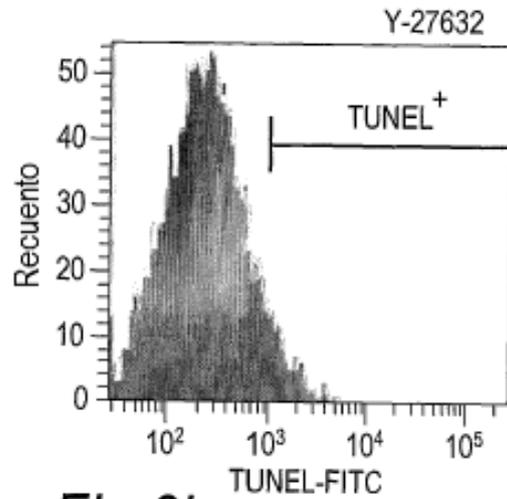


Fig.3b

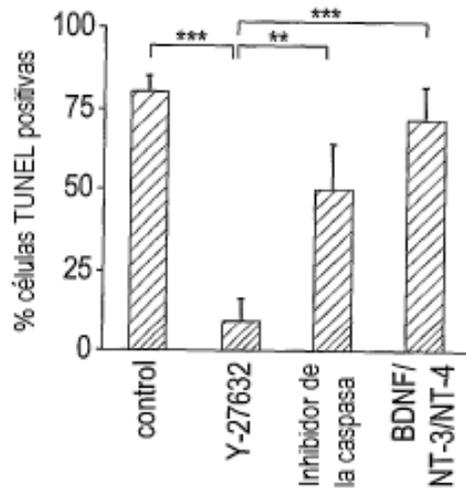


Fig.3c

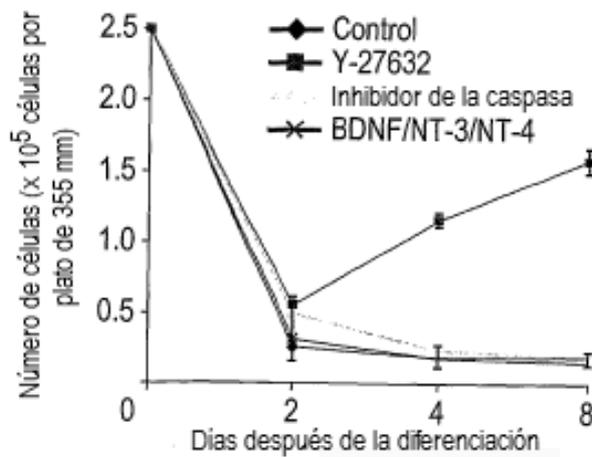


Fig.3d

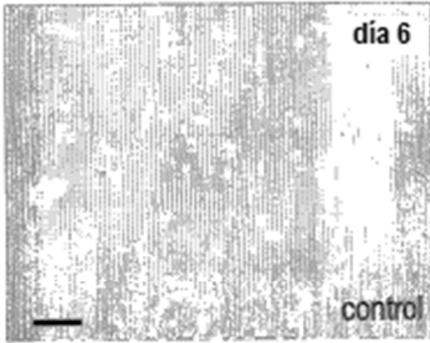


Fig.3e

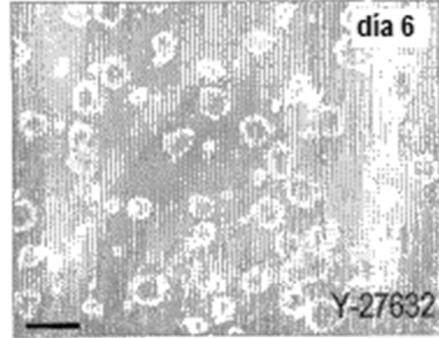


Fig.3f

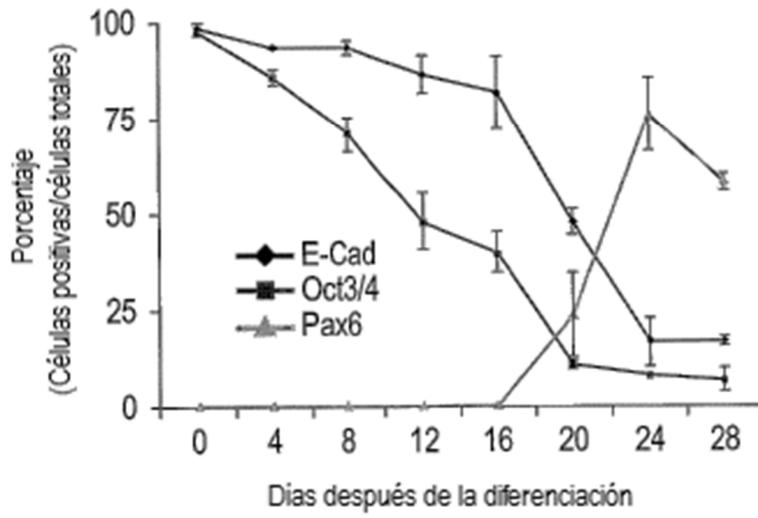


Fig.3g

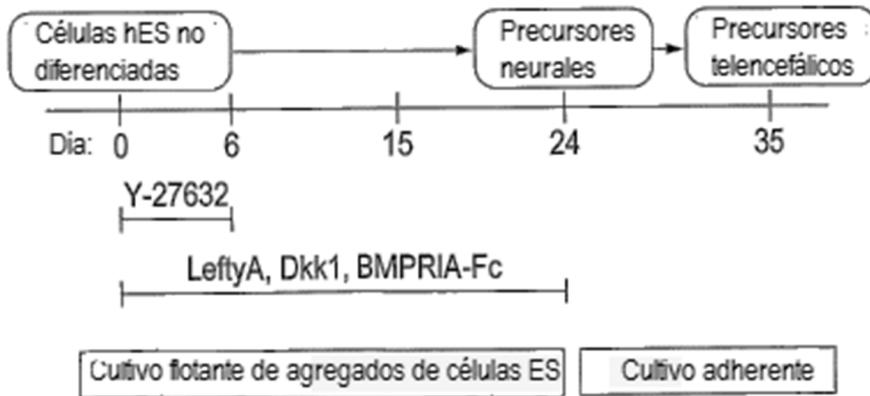


Fig.3h

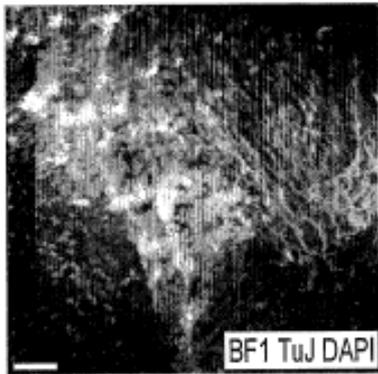


Fig.3i

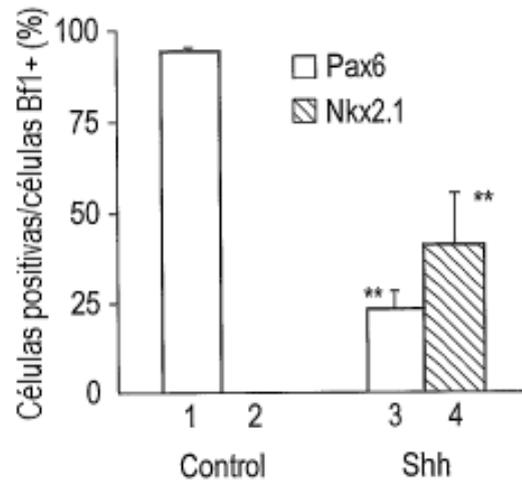


Fig.3j

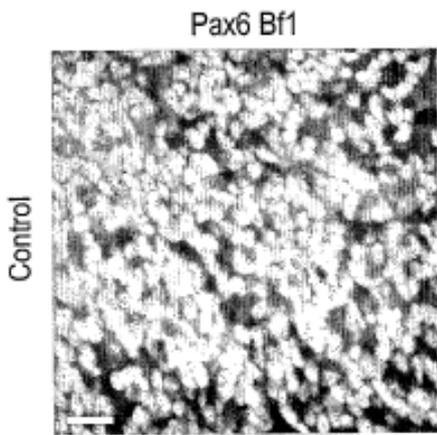


Fig.3k

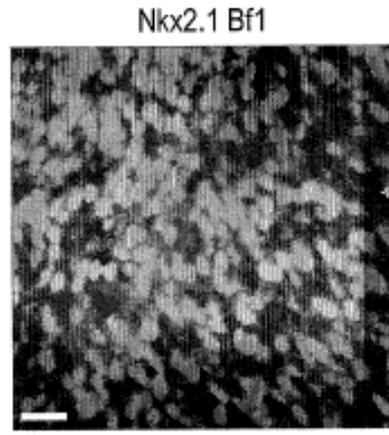


Fig.3l

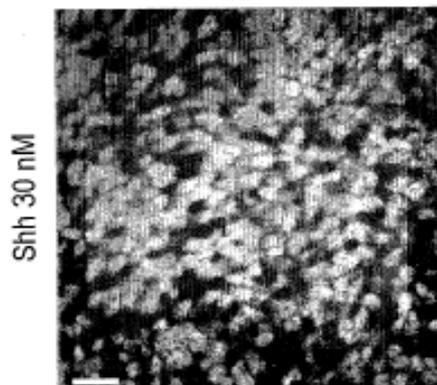


Fig.3m

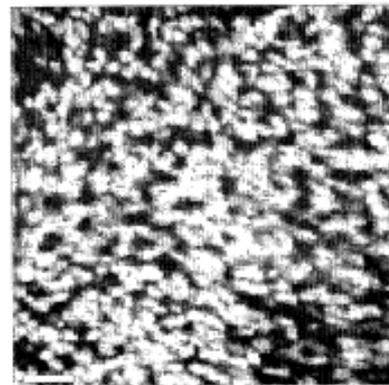


Fig.3n

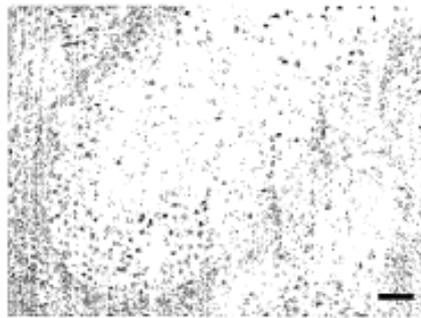
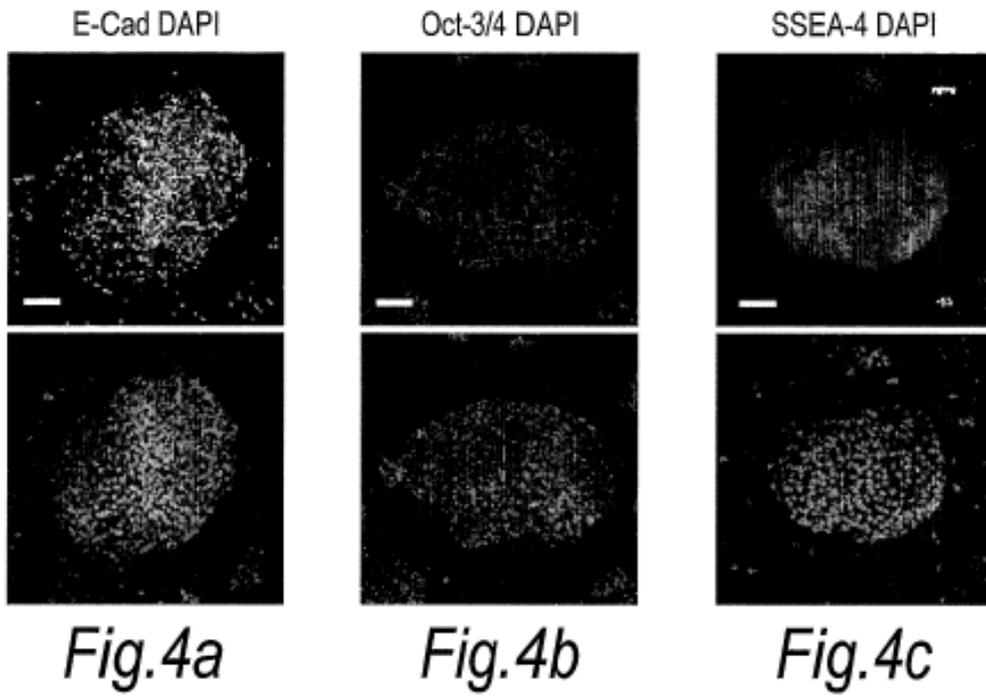


Fig.4d

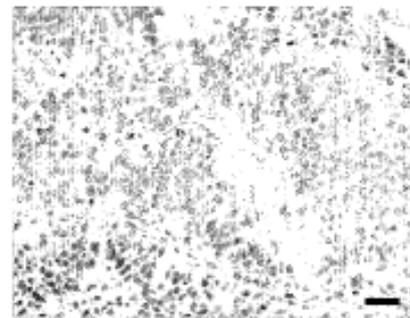


Fig.4e

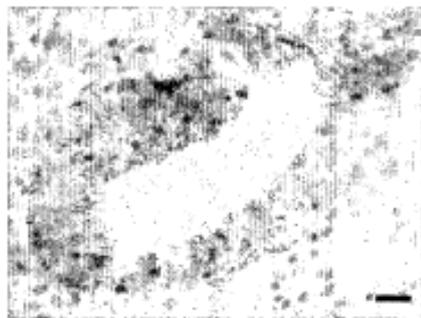


Fig.4f

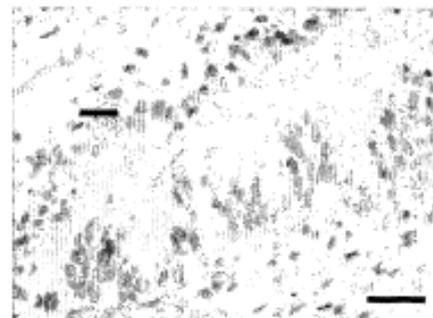


Fig.4g

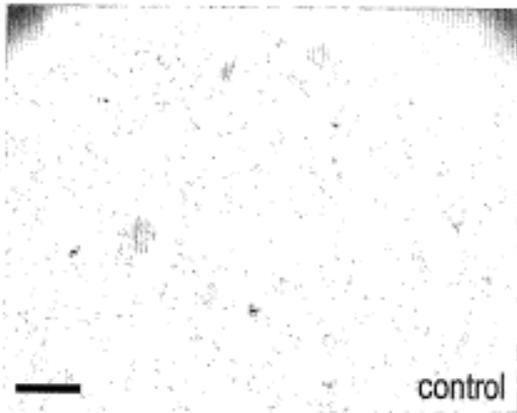


Fig.4h

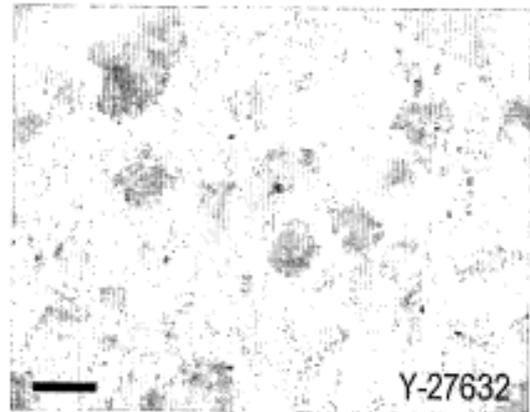


Fig.4i

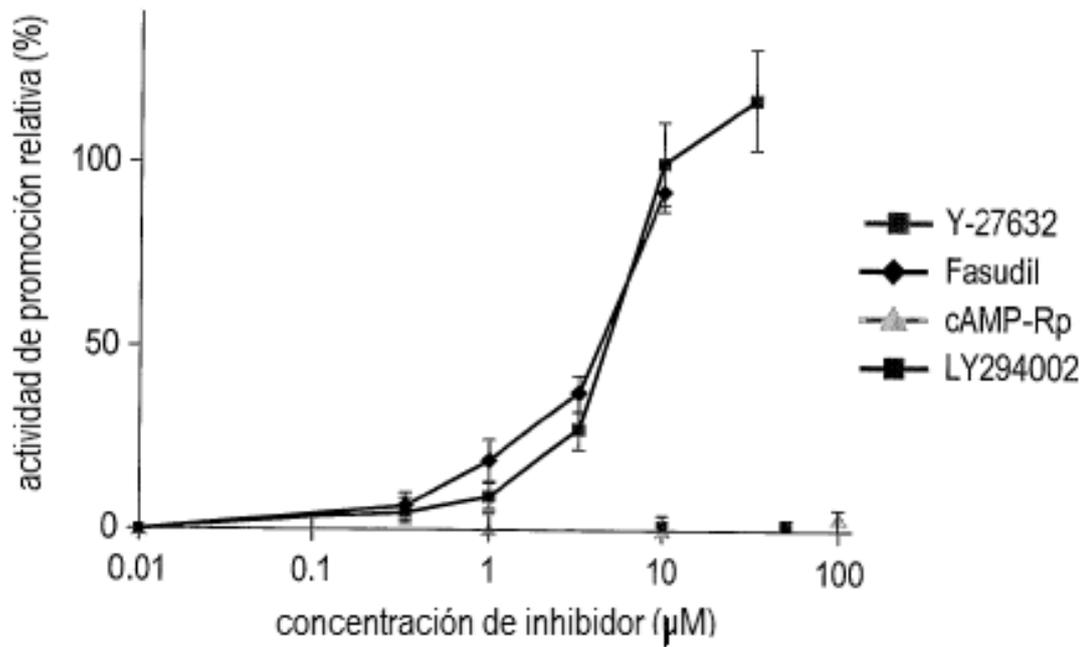


Fig.4j

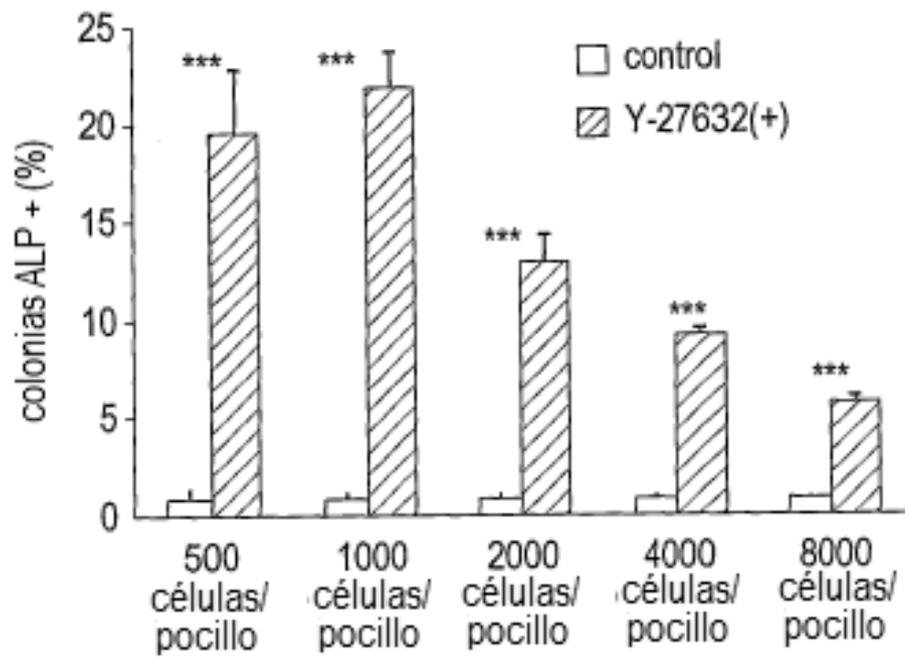


Fig.4k

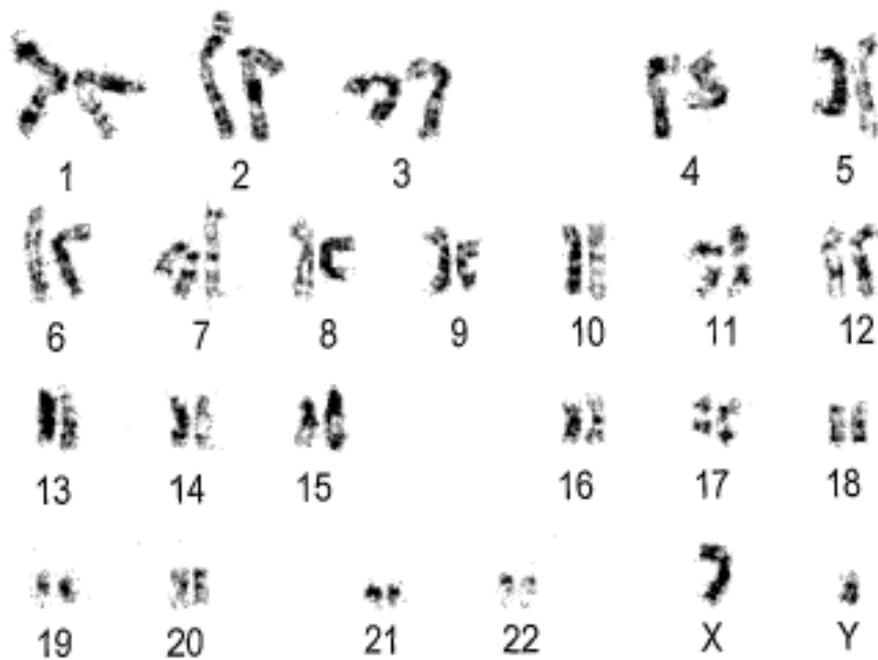


Fig.4l

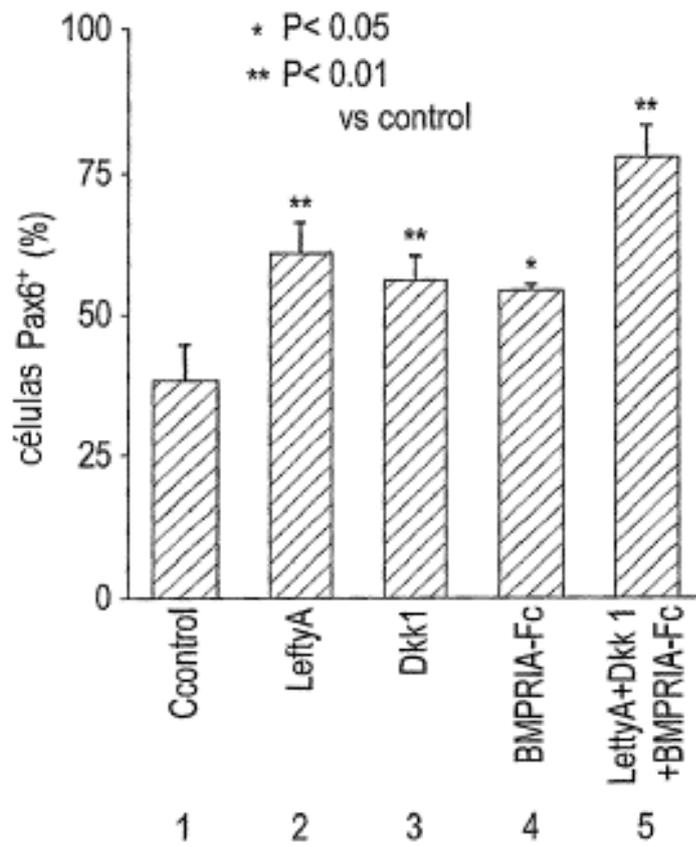


Fig.5a

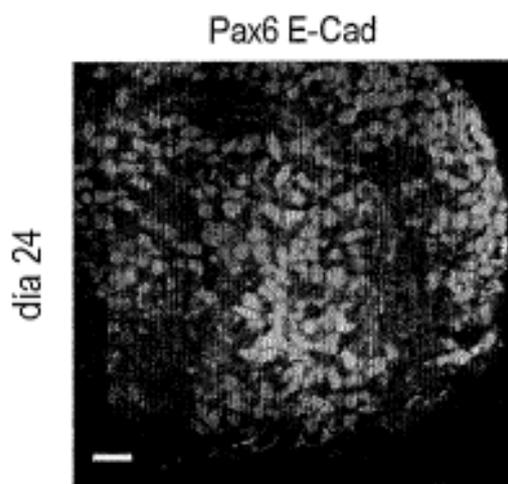


Fig.5b

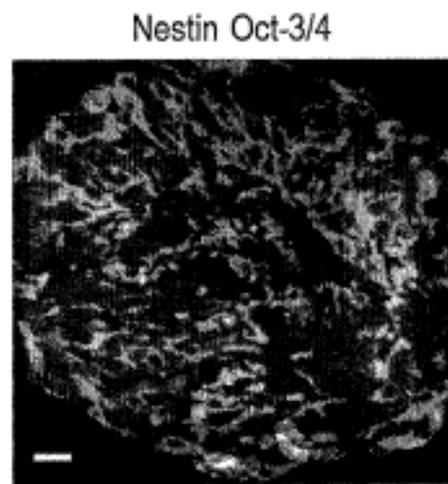


Fig.5c