

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 401**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2007** **E 13185969 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 2733203**

54 Título: **Métodos de expansión de células madre embrionarias en un cultivo en suspensión**

30 Prioridad:

02.08.2006 US 834795 P
29.08.2006 US 840692 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.03.2019

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION LTD. (100.0%)
Senate House, Technion City
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 704 401 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

Métodos de expansión de células madre embrionarias en un cultivo en suspensión

- 5 La presente divulgación se refiere a un método de expansión y mantenimiento de células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés) en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión y, más en particular, a métodos de uso de dichas ESC para la generación de células específicas de linaje que puedan usarse para terapia a base de células.
- 10 Las células madre embrionarias humanas (hESC, por sus siglas en inglés) son células madre indiferenciadas y proliferativas capaces de diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias. Como tales, las hESC son prometedoras para diversas aplicaciones, incluyendo la terapia a base de células, la selección farmacéutica, la identificación de dianas farmacológicas y la entrega de compuestos a base de células que requieren cantidades casi indefinidas de hESC proliferativas, aunque pluripotentes.
- 15 Para facilitar el aprovechamiento de las hESC tanto en la terapia a base de células como en el uso en la industria farmacéutica para la selección de fármacos, la identificación de dianas farmacológicas y la entrega de compuestos a base de células, los cultivos de hESC deben aumentarse a escala y optimizarse. Sin embargo, el cultivo de hESC en cualquiera de los sistemas de cultivo bidimensionales (2-D) actualmente disponibles (es decir, capas alimentadora o
- 20 matrices sin células alimentadoras) limita la capacidad de expansión de las células. Por otro lado, cuando a las ESC se les retiran sus capas alimentadora o matrices sin células alimentadoras y se transfieren a cultivos en suspensión comunes, las células pierden su estado indiferenciado y se diferencian rápidamente (Thomson et al., 1998). Por tanto, el cultivo de hESC en suspensión en placas de Petri por lo general da como resultado la formación de agregados que contienen células diferenciadas denominadas cuerpos embrioides (EB, por sus siglas en inglés)
- 25 [Itskovitz-Eldor et al, 2000].
- Para superar dichas limitaciones, Fok y Zandstra (Fok EY y Zandstra PW, *Stem Cells*. 2005, 23: 1333-42) desarrollaron cultivos en suspensión agitada en los que las ESC se fijan a microtransportadores de vidrio. Sin embargo, aunque las ESC cultivadas en dichas condiciones presentaron patrones de expresión de ESC típicos y
- 30 conservaron el potencial de desarrollo de la población celular de partida, las dificultades técnicas asociadas a la adherencia y disociación de las ESC de la superficie del microtransportador limitan el potencial de robustez de dicho método de cultivo. Otro estudio realizado por Gerecht-Nir e Itskovitz-Eldor (desvelado en el documento PCT/IL03/01017) describe un sistema de cultivo dinámico para diferenciar cuerpos embrioides o expandir ESC en condiciones de indiferenciación. En este sistema, las ESC se siembran en un biorreactor diseñado para ejercer
- 35 fuerzas de gravedad aleatorias. Sin embargo, el documento PCT/IL03/01017 no enseña sistemas de cultivo de suspensión no dinámicos. Otro estudio de Cormier J. et al. (*Tissue Engineering* 12: 3233-3245, 2006) describe el cultivo durante 6 días de células madre embrionarias de ratón (mESC) en un cultivo en suspensión en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés) y suero bovino con agitación constante. En una publicación posterior (Zur Nieden NI, et al., 2007; *J. of Biotechnology* 129: 421-432), los autores informaron que las
- 40 mESC cultivadas en suspensión en condiciones estáticas y usando tripsina para el pase cada 2 días presentaron una fuerte disminución en la expresión de marcadores indiferenciados tales como Oct-4 y no pudieron mantener la pluripotencia detectada por la expresión de marcadores de diferenciación ectodérmicos y endodérmicos tempranos. Además, el tiempo de duplicación de las mESC que se cultivaron en los cultivos en suspensión dinámica o estática fue de solo 15 horas (Zur Nieden, et al., citado anteriormente), lo que puede conducir a inestabilidad y anormalidad
- 45 cromosómica (Cowan CA. et al., 2004, *N. Engl. J. Med.* 350: 1353-1356). Además, a diferencia de las mESC, se sabe que el LIF no puede mantener las ESC humanas en un estado indiferenciado (Thomson et al, 1998; Reubinof et al, 2000). Por tanto, hasta la fecha, nunca se ha demostrado el cultivo continuo de ESC humanas indiferenciadas en suspensión en condiciones desprovistas de adherencia al sustrato (por ejemplo, un transportador).
- 50 El documento WO 2004044158 se refiere a cultivos de células madre embrionarias pluripotenciales humanas, ya que son células alimentadoras humanas útiles para el crecimiento de células madre embrionarias humanas, medio acondicionado obtenido a partir de cultivos de células alimentadoras humanas y factores derivados del medio acondicionado. También se proporcionan métodos de cultivo de células madre embrionarias humanas en presencia de células alimentadoras humanas, el medio acondicionado, los factores derivados del medio acondicionado o una
- 55 combinación de los mismos. Además de los cultivos de células madre embrionarias humanas cultivadas de acuerdo con dichos métodos, se proporcionan células madre embrionarias humanas obtenidas a partir de dichos cultivos de células madre embrionarias humanas, así como métodos de uso de dichas células aisladas.
- El documento WO 2006070370 se refiere a sistemas y métodos para proporcionar cultivos de células humanas. Las
- 60 realizaciones específicas se refieren a cultivos de células alimentadoras para su uso en tecnología de células madre, así como a cultivos, sistemas de cultivo y métodos para el mantenimiento y la propagación de células madre en un estado indiferenciado, así como para el desarrollo de cultivos de células somáticas a partir de células madre, estando los cultivos de células somáticas libres de células extraembrionarias.
- 65 El documento WO 2007002086 proporciona un sistema mejorado para el cultivo de células madre embrionarias humanas. Las células se cultivan en suspensión para maximizar la capacidad de producción del entorno de cultivo.

El nuevo sistema de cultivo de la presente invención permite la proliferación en masa de células hES de una manera más rentable, lo que facilita la producción comercial de productos importantes para su uso en terapia humana.

AMIT M ET AL, se refiere a "Capa de células alimentadoras y cultivo sin suero de células madre embrionarias humanas", *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, NUEVA YORK, NY [U.A.]: ACADEM. PRESS, EE.UU., (20040101), vol. 70, n.º 3.

XU C ET AL, se refiere al "Crecimiento sin células alimentadoras de células madre embrionarias humanas indiferenciadas", *NATURE BIOTECHNOLOGY*, NATURE PUBLISHING GROUP, NUEVA YORK, NY, EE.UU., (20011001), vol. 19, n.º 10.

AMIT MICHAL ET AL, se refiere a "Cultivo sin alimentador de células madre embrionarias humanas", *METHODS IN ENZYMOLOGY*; [*METHODS IN ENZYMOLOGY*], ACADEMIC PRESS, EE.UU., (20060101), vol. 420.

HUMPHREY ROHAN K ET AL, se refiere a "El mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias humanas es independiente de STAT3", *STEM CELLS*, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, EE.UU., (20040101), vol. 22, n.º 4.

AMIT MICHAL ET AL, se refiere a "Cultivo dinámico en suspensión para la expansión escalable de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas", *NATURE PROTOCOLS*, NATURE PUBLISHING GROUP, REINO UNIDO, vol. 6, n.º 5.

Por tanto, sería altamente ventajoso tener y existe una necesidad ampliamente reconocida de un método de obtención de un cultivo escalable de hESC sin las limitaciones anteriores.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de expansión y mantenimiento de células madre embrionarias humanas (hESC) en un estado indiferenciado, comprendiendo el método cultivar células madre embrionarias humanas durante al menos 5 pases en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovisto de adherencia a un sustrato externo y que permite la expansión de al menos el 50 % de las células madre embrionarias humanas en el estado indiferenciado, en el que dicho sustrato externo comprende componentes de matriz extracelular, un microtransportador de vidrio o perlas y en el que dichas condiciones de cultivo comprenden un medio de cultivo sin xenógenos y sin suero definido seleccionado entre el grupo que consiste en: un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), un receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) en una concentración de al menos 10 nanogramos por mililitro (ng/ml) e interleucina 6 soluble (IL6), un medio de cultivo que comprende bFGF y al menos 1000 unidades por mililitro (u/ml) de factor inhibidor de la leucemia (LIF), un medio de cultivo que comprende bFGF y una quimera IL6RIL6 y un medio de cultivo que comprende bFGF y una isoforma TGFβ, y en el que dichas condiciones de cultivo comprenden el cultivo de células madre embrionarias humanas en un recipiente de cultivo que tiene una superficie interna diseñada de manera que las hESC cultivadas en el mismo no puedan adherirse o fijarse a dicha superficie, expandiendo y manteniendo de este modo las células madre embrionarias humanas en el estado indiferenciado.

La presente invención se refiere también a un método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre embrionarias humanas, comprendiendo el método:

- (a) cultivar células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión de acuerdo con el método de la reivindicación 1, para obtener de este modo células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas; y
- (b) someter dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;

generando de este modo las células específicas de linaje a partir de las células madre embrionarias humanas.

La presente invención se refiere también a un método de generación de cuerpos embrioides a partir de células madre embrionarias humanas, comprendiendo el método:

- (a) cultivar células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión de acuerdo con el método de la reivindicación 1, para obtener de este modo células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas; y
- (b) someter dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre embrionarias humanas en cuerpos embrioides;

generando de este modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre embrionarias humanas.

La presente invención se refiere también a un método de generación de células específicas de linaje a partir de

células madre embrionarias, comprendiendo el método:

- (a) cultivar las células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión de acuerdo con el método de la reivindicación 1, para obtener de este modo células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas;
- (b) someter dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas en cuerpos embrioides; y
- (c) someter células de dichos cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;

generando de este modo las células específicas de linaje a partir de células madre embrionarias humanas.

Preferentemente, dicha isoforma de TGF β es una isoforma 1 de TGF β (TGF β_1).

Preferentemente, dicha isoforma de TGF β es una isoforma 3 de TGF β (TGF β_3).

Preferentemente, dicho sIL6R está presente en una concentración de 15-30 ng/ml.

Preferentemente, dicho LIF está presente en una concentración de al menos 2000 unidades por mililitro (u/ml).

Preferentemente, dicho cultivo se efectúa en condiciones sin xenógenos.

Preferentemente, dicho TGF β_1 está presente en una concentración de al menos 0,06 ng/ml.

Preferentemente, dicho TGF β_3 está presente en una concentración de al menos 0,5 ng/ml.

Preferentemente, dicho bFGF está en una concentración de al menos 2 ng/ml.

Preferentemente, dicho bFGF está en una concentración de al menos 4 ng/ml.

Preferentemente, dicha quimera IL6RIL6 está en una concentración de al menos 25 ng/ml.

Breve descripción de los dibujos

La divulgación se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntas. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente divulgación solamente, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la divulgación. A este respecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la divulgación más detalladamente de lo que es necesario para una comprensión fundamental de la divulgación, haciendo evidente la descripción tomada con los dibujos para los expertos en la materia cómo las diversas formas de la divulgación pueden realizarse en la práctica.

En los dibujos:

Las figuras 1a-d son fotomicrografías que representan la morfología de colonias de hES indiferenciadas y células individuales de hES cultivadas en diversos sistemas de cultivo en presencia de los medios de cultivo que contienen TGF β . Figura 1a - hESC I4 cultivadas durante 28 pases en una matriz Matrigel™ en presencia del medio D1; figura 1b - hESC I4 cultivadas durante 9 pases en MEF en presencia del medio HA16; figura 1c - hESC I4 cultivadas durante 20 pases en fibroblastos de prepucio en presencia del medio D2; figura 1d - hESC I4 cultivadas durante 11 pases en una matriz de fibronectina humana en presencia del medio D2. Obsérvese la morfología indiferenciada después de un cultivo prolongado con los tipos de medios únicos que contienen TGF β sin suero, sin reemplazo de suero y sin transportadores de proteínas. Los aumentos fueron X15 para las figuras 1a-d.

Las figuras 2a-c son fotomicrografías que representan colonias de hES indiferenciadas teñidas con marcadores de superficie específicos para la etapa indiferenciada de hESC. Se cultivaron hESC I4 durante 36 pases en una matriz Matrigel™ en presencia del medio D1 y se tiñeron con TRA-1-60 (figura 2a), SSEA4 (figura 2b) y TRA-1-81 (figura 2c); los aumentos fueron X20 para las figuras 2a-c.

Las figuras 3a-b son fotomicrografías que representan la derivación de una nueva estirpe de hESC en condiciones sin xenógenos en fibroblastos de prepucio usando el medio HA16. Figura 3a - el embrión cultivado en el primer pase (p-1), puntas de flecha en la masa celular interna (ICM, por sus siglas en inglés); figura 3b: la ICM aislada en el pase 2 (p-2). Los aumentos fueron X20 para las figuras 3a-b.

Las figuras 4a-c son fotomicrografías que representan la inmunotinción de hESC cultivadas durante tres pases en suspensión en presencia del medio D2. Se muestra la expresión de Oct4 (figura 4a), TRA-1-60 (figura 4b) y TRA-1-81 (figura 4c); los aumentos fueron X63 para las figuras 4a-c.

Las figuras 5a-g son fotomicrografías que representan secciones histológicas y la morfología de un cultivo de

hESC suspendidas. Figura 5a - Histología de un grupo de hESC (la estirpe hESC I4) cultivado durante 3 pases en suspensión en presencia del medio D1 y teñido con H&E. Obsérvese que el grupo de hESC es homogéneo, que contiene células pequeñas con núcleos grandes típicos de la morfología de hESC. El aumento fue X 20. Figuras 5b-c - Se cultivaron hESC I4 durante 3 pases en suspensión en presencia del medio D2 y después se volvieron a cultivar en MEF. Se muestra la morfología de las colonias (según se fotografió usando un microscopio invertido) después de volver a cultivar en MEF (aumento X15 para las figuras 15b-c). Obsérvese la morfología indiferenciada típica de las hESC. Figuras 5d-e - Se cultivaron hESC I4 durante 16 pases en suspensión en presencia del medio CM100F y después se volvieron a cultivar en MEF. Se muestra la morfología de las colonias después de volver a cultivar en MEF. Obsérvese la morfología indiferenciada típica de las hESC. Aumento X15 para las figuras 15d-e. Figuras 5f-g - Se cultivaron hESC I4 durante 7 pases en suspensión en presencia del medio HA19 (figura 5f) o durante 10 pases en presencia del medio CM100F (figura 5g). Aumento X10 para las figuras 15f-g.

Las figuras 6a-d son análisis por RT-PCR que representan la expresión de genes representativos del estado indiferenciado de hESC cultivadas en suspensión en presencia de los medios HACM100, CM100F o HA19. Calle 1 - hESC I-4 cultivadas durante 1 pase en suspensión en presencia del medio HACM100 (medio que contiene IL6RIL6 sin suero o sin reemplazo de suero). Calle 2 - hESC I-4 cultivadas durante 1 pase en suspensión en presencia del medio CM100F (medio que contiene IL6RIL6 y reemplazo de suero). Calle 3 - hESC I-4 cultivadas durante 7 pases en suspensión en presencia del medio HA19 (medio que contiene TGFβ₃ sin suero o sin reemplazo de suero y sin transportadores de proteínas). Calle 4 - hESC I-4 cultivadas durante 2 pases en suspensión en presencia del medio HA19 y después vueltas a cultivar en MEF durante 6 pases adicionales. Figura 6a - Oct4; figura 6b - Rex1; figura 6c - Sox2; figura 6d - Nanog; se sometió a ensayo una mezcla de RT y se descubrió negativa para todos los genes sometidos a ensayo. Todas las muestras se sometieron a ensayo para determinar β-actina y se descubrieron uniformemente positivas.

Las figuras 7a-f son fotomicrografías que representan la morfología de hESC cultivadas en suspensión en condiciones no dinámicas (es decir, cultivo estático) o cultivos bidimensionales (2D) en presencia del medio CM100F (que incluye la quimera IL6RIL6) (a menos que se indique lo contrario). Figura 7a - Imagen de contraste de fases de una colonia de hESC indiferenciada de 13 estirpes celulares cultivadas durante 12 pases en fibronectina humana (un cultivo 2-D). Barra 200 μm; figura 7b - Imagen de estructuras similares a neuroesferas que representan un "fondo" de diferenciación que se produce en hasta el 5 % de las células hES I6 cuando se cultivan en suspensión. Barra 300 μm; figura 7c: células 13 hES indiferenciadas, cultivadas en suspensión durante 43 pases. Barra 300 μm; figura 7d - Sección histológica de un grupo de células indiferenciadas a partir de células 13 hES cultivadas en suspensión durante 32 pases. Barra 50 μm; figura 7e - Imagen de contraste de fases de una colonia de hESC formada por 13 células cultivadas durante 10 pases en suspensión y vueltas a cultivar en MEF (pase uno con MEF). Barra 200 μm; figura 7f - Colonia de hESC formada por 13 células cultivadas durante 36 pases en suspensión y vueltas a cultivar en fibronectina (pase 10). Barra 150 μm.

Las figuras 8a-d son análisis de inmunotinción fluorescente que representan la expresión de marcadores indiferenciados por hESC cultivadas en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F (que incluye la quimera IL6RIL6). Figura 8a - estirpe de hESC 13 cultivada durante 42 pases en suspensión y teñida con anticuerpos anti-Oct4. Barra 200 μm; figura 8b - estirpe de hESC 13 cultivada durante 42 pases en suspensión y teñida con anticuerpos anti-TRA-1-60. 200 μm; figura 8c - estirpe de hESC 13 cultivada durante 32 pases en suspensión y teñida con anticuerpos anti-TRA-1-81. 150 μm; figura 8d - estirpe de hESC 13 cultivada durante 32 pases en suspensión y teñida con anticuerpos anti-SSEA4. 200 μm.

La figura 9 representa un análisis por RT-PCR que muestra la expresión de marcadores indiferenciados (Oct4, Nanog, Rex1, FGF4 y Sox2) en hESC cultivadas en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F. Las hESC I4 se cultivaron durante 10 (10 p), 15 (15 p) y 20 (20 p) pases en suspensión. Se mostraron resultados similares para las hESC I3 e I6 cuando se cultivaron en suspensión en el mismo medio de cultivo, cada uno durante 10, 15 y 20 pases (datos no mostrados). La mezcla de RT para todos los genes fue negativa.

Las figuras 10a-c son análisis por citometría de flujo de hESC cultivadas en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F y teñidas con SSEA4. Figura 10^a - La I6 en el pase 20 en suspensión; figura 10b - la I4 en el pase 30 en suspensión; figura 10c - La I3 en el pase 34 en suspensión. Los porcentajes de células positivas para SSEA4 (que indican células indiferenciadas) en cada cultivo celular fueron los siguientes: I6, 94,7 %; I4, 94,5 %; I3 87,8 %. Cabe señalar que los grupos de hESC diferenciadas en el cultivo de 13 (que consistían en el 12 % de las células en el pase 34) se retiraron del cultivo y después de 3 pases adicionales el 95 % de las hESC 13 expresaron el marcador SSEA4 (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que, como en los cultivos 2-D, es posible retirar colonias diferenciadas y continuar el cultivo de las ESC humanas indiferenciadas.

Las figuras 11a-b son análisis por PCR en tiempo real que representan la expresión relativa de Oct4 en hESC I6 (figura 11a) e I4 (figura 11b) que se cultivaron durante 10 pases en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F. Los niveles de expresión se compararon con células de la misma estirpe celular cultivadas continuamente en MEF, que se usó como calibrador. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron células cultivadas durante 15 y 20 pases en suspensión (datos no mostrados).

Las figuras 12a-d son fotomicrografías que representan secciones histológicas representativas de EB (figura 12a) y teratomas (figuras 12b-d). Figura 12a - EB quístico de 14 días formado por hESC I4 cultivadas durante 8 pases en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F. Barra 200 μm. Las secciones de teratomas formadas por hESC I4 cultivadas durante 9 pases en suspensión en presencia del medio CM100F

crearon tejidos que representaban las tres capas germinales embrionarias, incluyendo; nervio mielinizado (ectodermo) (figura 12b), tejido cartilaginoso (mesodermo) (figura 12c) y estructuras similares a glándulas secretoras (endodermo) (figura 12d). Barra 250 μ M para la figura 12a y 200 μ M para las figuras 12b-d.

Las figuras 13a-h representan el crecimiento celular (figuras 13a-d) y la apoptosis (figuras 13e-h). Para medir la cinética del sistema de cultivo se usaron hESC I4 cultivadas durante más de 20 pases en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F. Las células se cultivaron sin dividir durante 14 días y se midieron los siguientes parámetros: aumento del diámetro de los grupos (medido en μ m) durante 14 días de cultivo continuo (figura 13a); grupos cultivados durante 2, 6 y 14 días que representan el aumento de tamaño (figuras 13b-d). Barra 300 μ M; porcentaje de apoptosis de las células cultivadas durante 14 días en suspensión (figura 13e); y células apoptóticas dentro de grupos cultivados durante 2, 6 y 14 días (figuras 13f-h). Obsérvese que las células apoptóticas en grupos de 14 días de edad se concentran en el centro. Barra 150 μ M.

Las figuras 14a-h son fotomicrografías que representan el cultivo dinámico usando Erlenmeyer. Figura 14a - grupos de hESC 13 cultivadas durante 1 mes en Erlenmeyer en presencia del medio CM100F. Barra 400 μ M; figura 14b - colonia formada por las células de la figura 14a después de volver a cultivar durante 1 pase (aproximadamente 5 días) en MEF. Barra 200 μ M. Figuras 14c-e - Imágenes de análisis por inmunotinción fluorescente de hESC 13 cultivadas durante 4 meses en Erlenmeyer en presencia del medio CM100F usando Oct4 (figura 14c), SSEA4 (figura 14d) y TRA-1-60 (figura 14e). Obsérvese que las hESC cultivadas se tiñeron positivamente con Oct4, SSEA4 y TRA-1-60, marcadores del estado indiferenciado. Barras de tamaño 200 μ M. Cuando las células (después de 1 mes de cultivo en Erlenmeyer) se transfirieron a un medio que contenía suero, formaron EB. Los EB se volvieron a colocar en Gelatina y se tiñeron positivamente con β -tubulina (figura 14f), troponina (figura 14g) y PSA-NCAM (figura 14h). Barras de tamaño 100 μ M.

Las figuras 15a-d son análisis por transferencia Western para STAT3 (figura 15b), STAT3 fosforilado (figura 15a), gp130 (figura 15c) y β -actina (control) (figura 15d), que muestran la posible participación de la quimera IL6RIL6 en el auto-mantenimiento de las células mientras se cultivan en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F. Se cultivaron ESC humanas durante 24 horas en el medio CM100F sin la quimera IL6RIL6 y después en CM100F con la quimera como se indicó durante 0, 30 minutos, 180 minutos y 24 horas. El experimento de activación mostró un aumento en la expresión de proteínas 30 minutos después de recuperar la quimera IL6RIL6, que se mantiene después de 24 horas. Calle 1 - I3 cultivadas durante 44 pases en suspensión en presencia de la quimera IL6RIL6; calle 2: células I3 cultivadas durante 37 pases en suspensión 24 horas después de retirar la quimera; calle 3 - células I3 cultivadas durante 37 pases en suspensión 30 minutos después de que la quimera se devolviera al medio; calle 4 - 3 horas después de que la quimera se devolviera al medio y calle 5 - 24 horas después de que la quimera se devolviera al medio de cultivo.

La figura 16 es un gráfico que representa los porcentajes de grupos de diferenciación mientras se cultivan en suspensión en condiciones no dinámicas en presencia del medio CM100F con concentraciones crecientes de anti-gp130 agregado al medio de cultivo. Obsérvese el aumento en la diferenciación celular después de concentraciones crecientes del anticuerpo anti-gp130.

Las figuras 17a-b son imágenes de grupos que representan la morfología del grupo hESC mientras se cultivan en presencia del medio CM100F y 250 ng/ml del anticuerpo anti-gp130. Figura 17a - representa la morfología de grupos de hESC indiferenciados en presencia del anticuerpo. Figura 17b - representa la morfología del grupo de hESC diferenciado en presencia del anticuerpo. Barra 150 μ M.

Las figuras 18a-e representan ESC humanas indiferenciadas cultivadas en suspensión (en condiciones no dinámicas con los medios de cultivo yFIL25+ (figura 18a), yFL1 (figura 18b), TLF (figuras 18c y e) y yFL3 (figura 18d). Figura 18a - Grupos de células I4 cultivadas durante 16 pases en suspensión con medio yFIL25+; figura 18b - Grupos de células I3 cultivadas durante 18 pases en suspensión con medio yFL1; figura 18c - colonia de hESC 13 cultivadas con TLF en MEF durante 13 pases después de 10 pases en suspensión; figura 18d - grupos de células I3 cultivadas durante 1 pase en suspensión con medio yFL3; figura 18e - grupos de células I4 cultivadas durante 18 pases en suspensión con medio TLF.

Las figuras 19a-d son fotomicrografías que representan ESC humanas indiferenciadas cultivadas en condiciones no dinámicas (estáticas) en suspensión en presencia de yFIL25+ (figura 19a), TLF (figuras 19b-c) y yFL3 (figura 19d). La figura 19a es una microfotografía que muestra grupos de hESC I4 cultivadas durante 18 pases en suspensión con medio yFIL25+ y teñidas con oct4; la figura 19b es una fotomicrografía que representa grupos de células ESC I4 humanas cultivadas durante 31 pases en suspensión con medio TLF y teñidas con SSEA4; la figura 19c es una fotomicrografía que representa grupos de células I4 cultivadas durante 31 pases en suspensión con medio TLF y teñidas con TRA-1-60; la figura 19d - es una fotomicrografía que muestra grupos de células I4 cultivadas durante 18 pases en suspensión con medio yFL3 y teñidas con TRA-1-81.

La figura 20 es una fotomicrografía que representa EB formados a partir de ESC I4 humanas que se cultivaron durante 24 pases en suspensión en condiciones estáticas con medio TLF. Para la formación de EB, las hESC se transfirieron a un medio que contenía suero (que está desprovisto de LIF y TGF β 1).

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación es un método de expansión y mantenimiento de células madre embrionarias (ESC) en el estado indiferenciado en un cultivo en suspensión. Además, la presente divulgación es de métodos de generación de células específicas de linaje a partir de ESC que se expandieron mediante el método de la presente divulgación y que pueden usarse en terapia a base de células.

Los principios y el funcionamiento del método de expansión y mantenimiento de ESC en un cultivo en suspensión de acuerdo con la presente divulgación pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la divulgación en detalle, ha de comprenderse que la divulgación no se limita en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La divulgación es susceptible de otras realizaciones o de ser puesta en marcha o de realizarse de varias maneras. Además, ha de comprenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento tienen fines de descripción y no han de considerarse limitantes.

Para facilitar el aprovechamiento de las hESC tanto en la terapia a base de células como en el uso en la industria farmacéutica para la selección de fármacos, la identificación de dianas farmacológicas y la entrega de compuestos a base de células, los cultivos de hESC deben aumentarse a escala y optimizarse. Sin embargo, el cultivo de hESC en cualquiera de los sistemas de cultivo bidimensionales (2-D) actualmente disponibles (es decir, capas alimentadora o matrices sin células alimentadoras) limita la capacidad de expansión de las células. Por otro lado, cuando a las ESC se les retiran sus capas alimentadora o matrices sin células alimentadoras y se transfieren a cultivos de suspensión comunes, las células pierden su estado indiferenciado y se diferencian rápidamente (Thomson et al., 1998).

Para superar dichas limitaciones, Fok y Zandstra (Fok EY y Zandstra PW, *Stem Cells*. 2005, 23: 1333-42) desarrollaron cultivos en suspensión agitada en los que las ESC se fijan a microtransportadores de vidrio. Sin embargo, aunque las ESC cultivadas en dichas condiciones presentaron patrones de expresión de ESC típicos y conservaron el potencial de desarrollo de la población celular de partida, las dificultades técnicas asociadas a la adherencia y disociación de las ESC de la superficie del microtransportador limitan el potencial de robustez de dicho método de cultivo. Otro estudio realizado por Gerecht-Nir e Itskovitz-Eldor (desvelado en el documento PCT/IL03/01017) describe un sistema de cultivo dinámico para diferenciar cuerpos embrioides o expandir ESC en condiciones de indiferenciación. En este sistema, las ESC se siembran en un biorreactor diseñado para ejercer fuerzas de gravedad aleatorias. Sin embargo, el documento PCT/IL03/01017 no enseña sistemas de cultivo de suspensión no dinámicos. Otro estudio de Cormier J. et al. (*Tissue Engineering* 12: 3233-3245, 2006) describe el cultivo durante 6 días de células madre embrionarias de ratón (mESC) en un cultivo en suspensión en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés) y suero bovino con agitación constante. En una publicación posterior (Zur Nieden NI, et al., 2007; *J. of Biotechnology* 129: 421-432), los autores informaron que las mESC cultivadas en suspensión en condiciones estáticas perdieron su estado indiferenciado y pluripotente. Además, el tiempo de duplicación de las mESC que se cultivaron en los cultivos en suspensión dinámica o estática usando tripsina para pases casa 2 días fue de solo 15 horas (Zur Nieden, et al., citado anteriormente), lo que puede conducir a inestabilidad y anomalía cromosómica (Cowan CA. et al., 2004, *N. Engl. J. Med.* 350: 1353-1356). Además, a diferencia de las mESC, se sabe que el LIF no puede mantener las ESC humanas en un estado indiferenciado (Thomson et al, 1998; Reubinof et al, 2000). Por tanto, hasta la fecha, nunca se ha demostrado el cultivo continuo de ESC humanas indiferenciadas en suspensión en condiciones desprovistas de adherencia al sustrato (por ejemplo, un transportador).

Mientras reducían la presente divulgación a la práctica, los presentes inventores han descubierto, a través de experimentaciones laboriosas, que las hESC pueden cultivarse en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión desprovisto de adherencia al sustrato y que las células cultivadas en dichas condiciones mantienen todas las características típicas de las hESC, incluyendo la proliferación ilimitada en el estado indiferenciado conservando al mismo tiempo la capacidad pluripotente.

Como se muestra en las figuras 4a-c, 5a-g, 6a-d, 8a-d, 9, 10a-c, 11a-b y 18a-e y se describen en los Ejemplos 2, 3 y 4 de la sección de Ejemplos a continuación, las hESC cultivadas en un cultivo en suspensión desprovisto de adherencia al sustrato en presencia de un medio que contiene TGF-beta [β] (por ejemplo, el medio D1, D2 o HA19), el medio que contiene quimera IL6RIL6 (por ejemplo, CM100F o HACM100), receptor de IL6 soluble e IL6 (por ejemplo, el medio yFIL25) o el factor inhibidor de leucemia (LIF) (por ejemplo, los medios yFL1, yFL2 o yFL3) presentaron la morfología típica de hESC (por ejemplo, células redondas con núcleos grandes; por ejemplo, las figuras 5a-g, 18a-e) y expresaron marcadores específicos de hESC del estado indiferenciado tales como Oct 4, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4, Rex1, Sox2, Nanog y FGF4 (figuras 4a-c, 6a-d, 8a-d, 9, 10a-c, 11a-b y datos no mostrados). Además, las hESC cultivadas en los cultivos en suspensión mantuvieron su capacidad pluripotente como se demuestra por su capacidad para formar cuerpos embrioides (EB) o teratomas que contienen tejidos representativos de las tres capas germinales embrionarias (figuras 12a-d y datos no mostrados). Por tanto, estos resultados muestran, por primera vez, un método para obtener un cultivo aumentable a escala de hESC en un medio definido sin xenógenos que es adecuado para la terapia a base de células.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de expansión y mantenimiento de células madre embrionarias en un estado indiferenciado. El método se realiza mediante el cultivo de las células madre embrionarias en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovisto de adherencia al sustrato y que permiten la expansión de las células madre embrionarias en el estado indiferenciado, expandiendo y manteniendo de este modo las células madre embrionarias en el estado indiferenciado.

Como se usa en el presente documento, la frase "células madre embrionarias" se refiere a células embrionarias que son capaces de diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias (es decir, endodermo, ectodermo y mesodermo) o permanecer en un estado indiferenciado. La frase "células madre embrionarias" puede comprender células madre obtenidas del tejido embrionario formado después de la gestación y células germinales embrionarias (EG, por sus siglas en inglés) que se obtienen del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferentemente antes de las 10 semanas de gestación. Las células madre embrionarias preferidas de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación son de origen humano o de primate (por ejemplo, mono).

Las células madre embrionarias de la presente divulgación pueden obtenerse usando métodos de cultivo celular bien conocidos.

Se apreciará que también pueden usarse células madre embrionarias disponibles en el mercado con este aspecto de la presente divulgación. Las ESC humanas pueden adquirirse en el registro de células madre embrionarias humanas del NIH (<http://es-cr.nih.gov>).

Las células EG se preparan a partir de células germinales primordiales obtenidas de fetos de aproximadamente 8 a 11 semanas de gestación (en el caso de un feto humano) usando técnicas de laboratorio conocidas por cualquier experto en la materia. Las crestas genitales se disocian y se cortan en trozos pequeños que después se desagregan en células mediante disociación mecánica. Después, las células EG se cultivan en matraces de cultivo de tejidos con el medio apropiado. Las células se cultivan con reemplazo diario de medio hasta que se observa una morfología celular compatible con las células EG, normalmente después de 7-30 días o 1-4 pases. Para detalles adicionales acerca de los métodos de preparación de células EG humanas, véase Shamblo et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 95: 13726, 1998 y la Pat. de los EE.UU. N.º 6.090.622.

Se apreciará que las células madre embrionarias en un estado indiferenciado tienen una morfología distinta, que los expertos en la materia pueden distinguir claramente de las células diferenciadas de origen embrionario o adulto. Normalmente, las células madre embrionarias indiferenciadas tienen unas altas relaciones nucleares/citoplásmicas, nucléolos prominentes y una formación de colonias compactas con uniones celulares poco perceptibles. Se describen adicionalmente a continuación características adicionales del estado indiferenciado de las células madre embrionarias.

Como se usa en el presente documento, la frase "células madre embrionarias en expansión" se refiere a la obtención de una pluralidad de células madre embrionarias a partir de una única célula madre embrionaria o a partir de una población de células madre embrionarias. Preferentemente, la expansión de células madre embrionarias también se refiere al aumento del número de células madre embrionarias durante el período de cultivo. Se apreciará que el número de células que pueden obtenerse a partir de una única célula madre embrionaria depende de la capacidad de proliferación de la célula. La capacidad de proliferación de una célula madre embrionaria puede calcularse mediante el tiempo de duplicación de la célula (es decir, el tiempo necesario para que una célula experimente una división mitótica en el cultivo) y el período de tiempo en el que la célula madre puede mantenerse en el estado indiferenciado mientras está en cultivo (que es equivalente al número de pases multiplicado por los días entre cada pase).

Por ejemplo, como se describe en el ejemplo de referencia 2 de la sección de ejemplos de referencia a continuación, las hESC pudieron mantenerse en el cultivo en suspensión de la presente divulgación durante al menos 80 días mientras se sometían a 17 pases en serie (división de cultivos) que se produjeron cada 4-6 días. Dado que las hESC cultivadas en suspensión presentaron un tiempo de duplicación de 36 horas (por ejemplo, cuando se cultivaron en el medio CM100F), una sola hESC cultivada en estas condiciones podría expandirse para dar lugar a 2^{45} hESC (es decir, $3,5 \times 10^{13}$ hESC).

Como se ha mencionado, el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se efectúa mediante el cultivo de las células madre embrionarias en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovisto de adherencia al sustrato y que permiten la expansión de las células madre embrionarias en el estado indiferenciado.

Como se usa en el presente documento, la frase "cultivo en suspensión" se refiere a un cultivo en el que las células madre embrionarias se suspenden en un medio en lugar de adherirse a una superficie.

Por tanto, el cultivo de la presente divulgación está "desprovisto de adherencia al sustrato" en el que las células madre embrionarias son capaces de expandirse sin adherirse a un sustrato externo tal como los componentes de la matriz extracelular, un microtransportador de vidrio o perlas.

El cultivo de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se efectúa mediante el cultivo en placas de las células madre en un recipiente de cultivo a una densidad celular que promueva la supervivencia y la proliferación celulares pero que limite la diferenciación. Normalmente, se usa una densidad de placa de entre aproximadamente 5×10^4 - 2×10^5 células por ml. Se apreciará que, aunque por lo general se siembran suspensiones de una única célula de células madre, también pueden usarse grupos pequeños tales como 10-200 células.

Con el fin de proporcionar a las ESC un suministro suficiente y constante de nutrientes y factores de crecimiento mientras se encuentran en el cultivo en suspensión, el medio de cultivo puede reemplazarse a diario o, con un calendario predeterminado, tal como cada 2-3 días. Por ejemplo, el reemplazo del medio de cultivo puede realizarse sometiendo el cultivo en suspensión de ESC a centrifugación durante aproximadamente 3 minutos a 80 g y resuspensión del sedimento de ESC formado en un medio recién preparado. Adicionalmente o como alternativa, puede emplearse un sistema de cultivo en el que el medio de cultivo se someta a filtración constante o diálisis para proporcionar un suministro constante de nutrientes o factores de crecimiento a las ESC.

Puesto que grupos grandes de ESC pueden provocar la diferenciación celular, se toman medidas para evitar los agregados grandes de ESC. Preferentemente, los grupos de ESC formados se disocian cada 5-7 días y las células individuales o los grupos pequeños de células se dividen en recipientes de cultivo adicionales (es decir, se hacen pases) o permanecen en el mismo recipiente de cultivo aún con medio de cultivo adicional. Para la disociación de grupos grandes de ESC, puede someterse un gránulo de ESC (que puede conseguirse mediante centrifugación como se ha descrito en el presente documento anteriormente) o un grupo de ESC aislado a digestión enzimática y/o disociación mecánica.

La digestión enzimática del grupo o grupos de ESC puede realizarse sometiendo el grupo o grupos a una enzima tal como la colagenasa de tipo IV ((Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.) y/o dispasa (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). El tiempo de incubación con la enzima depende del tamaño de los grupos de células presentes en el cultivo en suspensión. Normalmente, cuando los grupos de células hESC se disocian cada 5-7 días mientras están en el cultivo en suspensión, la incubación de 20-60 minutos con colagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml da como resultados grupos pequeños de células que pueden cultivarse adicionalmente en el estado indiferenciado. Como alternativa, los grupos de ESC pueden someterse a una incubación de aproximadamente 25 minutos con colagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml seguida de una incubación de cinco minutos con dispasa 1 mg/ml, esencialmente como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" de la sección de ejemplos de referencia a continuación. Cabe señalar que hacer pases de ESC humanas con tripsina puede dar como resultado inestabilidad y anomalías cromosómicas (véase, por ejemplo, Mitalipova MM., et al., *Nature Biotechnology*, 23: 19-20, 2005 y Cowan CA et al., *N. Engl. J. of Med.* 350: 1353-1356, 2004) y por tanto debe evitarse.

La disociación mecánica de grandes grupos de ESC puede realizarse usando un dispositivo diseñado para romper los grupos en un tamaño predeterminado. Un dispositivo de este tipo puede obtenerse de CellArtis Goteborg, Suecia. Adicionalmente o como alternativa, la disociación mecánica puede realizarse manualmente usando una aguja tal como una aguja de 27g (BD Microlance, Drogheda, Irlanda) mientras se observan los grupos bajo un microscopio invertido.

Preferentemente, después de la disociación enzimática o mecánica de los grupos grandes de células, los grupos de ESC disociadas se rompen adicionalmente en grupos pequeños usando puntas de pipeta Gilson de 200 µl (por ejemplo, pipeteando hacia arriba y hacia abajo las células).

El recipiente de cultivo utilizado para cultivar las ESC en suspensión de acuerdo con el método de este aspecto de la presente divulgación puede ser cualquier recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, con un grado de pureza adecuado para el cultivo de ESC) que tenga una superficie interna diseñada de manera que las ESC cultivadas en el mismo sean incapaces de adherirse o fijarse a dicha superficie (por ejemplo, células tratadas con cultivo no tisular, para evitar la fijación o adherencia a la superficie). Preferentemente, con el fin de obtener un cultivo aumentable a escala, el cultivo de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se efectúa usando un sistema de cultivo controlado (preferentemente un sistema de cultivo controlado por ordenador) en el que parámetros de cultivo tales como temperatura, agitación, pH y pO₂ se obtienen automáticamente usando un dispositivo adecuado. Una vez que se registran los parámetros de cultivo, el sistema se configura para el ajuste automático de los parámetros de cultivo según sea necesario para la expansión de las ESC.

Se apreciará que el cultivo de acuerdo con el método de este aspecto de la presente divulgación puede realizarse en condiciones dinámicas (es decir, en condiciones en las que las ESC se someten a movimiento constante mientras se encuentran en el cultivo en suspensión) o en condiciones no dinámicas (es decir, un cultivo estático). Para el cultivo no dinámico de ESC, las ESC pueden cultivarse en placas de Petri sin recubrimiento de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Para el cultivo dinámico de ESC, las ESC pueden cultivarse en matraces giratorios [por ejemplo, de 200 ml a 1000 ml, por ejemplo 250 ml que pueden obtenerse de CellSpin de Integra Biosciences, Fernwald, Alemania; de 100 ml que puede obtenerse de Bellco, Vineland, NJ; o en un Erlenmeyer de 125 ml (Corning Incorporated, Corning NY, EE.UU.)] que puede conectarse a una unidad de control y, por tanto, presenta un sistema de cultivo controlado.

El medio utilizado para cultivar las ESC en suspensión de acuerdo con el método de este aspecto de la presente divulgación puede ser cualquier medio de cultivo capaz de soportar el crecimiento de las ESC mientras se mantienen en un estado indiferenciado. Un medio de cultivo de este tipo puede ser un medio a base de agua que incluye una combinación de sustancias tales como sales, nutrientes, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas tales como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, todas las cuales son necesarias para

la proliferación celular y son capaces de mantener las ESC en un estado indiferenciado. Por ejemplo, un medio de cultivo de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede ser un medio de cultivo de tejido sintético tal como Ko-DMEM (productos de Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE.UU.), DMEM/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), medio Mab ADCB (HyClone, Utah, EE.UU.) o DMEM/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) complementado con los aditivos necesarios como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento. Preferentemente, todos los ingredientes incluidos en el medio de cultivo de la presente divulgación son sustancialmente puros, con una calidad de cultivo tisular.

Preferentemente, con el fin de obtener un cultivo de ESC sin xenógenos bien definido que pueda ser fácilmente aumentable a escala y que sea adecuado tanto para la terapia a base de células como para su uso en la industria farmacéutica (por ejemplo, para la selección de fármacos, la identificación de dianas farmacológicas y la entrega de compuestos a base de células), el medio de cultivo utilizado mediante el método de este aspecto de la presente divulgación debe estar bien definido (es decir, con componentes conocidos y constantes) y sin xenógenos (es decir, sin contaminantes xenógenos).

Preferentemente, el medio de cultivo utilizado mediante el método de este aspecto de la presente divulgación es sin suero, sin reemplazo de suero, sin xenógenos, sin alimentador (es decir, desprovisto de células alimentadoras) y sin transportadores de proteínas.

Por lo general se añade suero o reemplazo de suero a la mayoría de los medios de cultivo que se diseñan para cultivar células madre y, en particular, células madre embrionarias, con el fin de proporcionar a las células un ambiente óptimo, similar al presente *in vivo* (es decir, dentro del organismo del que derivan las células, por ejemplo, un blastocisto de un embrión o un tejido adulto de un individuo posnatal). Sin embargo, mientras que el uso de suero derivado de una fuente animal (por ejemplo, suero bovino) o una fuente humana (suero humano) está limitado por las variaciones significativas en los componentes del suero entre individuos y el riesgo de tener contaminantes xenógenos (en el caso de un suero animal), el uso de la composición más definida, tal como el reemplazo de suero disponible actualmente (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE.UU.) puede estar limitado por la presencia de Albumax (albúmina de suero bovino enriquecida con lípidos) que es de una fuente animal dentro de la composición (Publicación de Patente Internacional N°. WO 98/30679 de Price, P.J. et al).

Un transportador de proteína se refiere a una proteína que actúa en la transferencia de proteínas o nutrientes (por ejemplo, minerales tales como el cinc) a las células en el cultivo. Dichos transportadores de proteínas pueden ser, por ejemplo, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero bovino), Albumax (albúmina enriquecida con lípidos) o plasmanato (proteínas aisladas en plasma humano). Puesto que estos transportadores derivan de fuentes humanas o animales, su uso en cultivos de hESC está limitado por variaciones específicas de lotes y/o exposición a patógenos. Por otro lado, la albúmina humana recombinante, que es sustancialmente pura y está desprovista de contaminantes animales es muy cara, por lo que no se usa habitualmente en los cultivos de hESC. Por tanto, un medio de cultivo que está desprovisto de un transportador proteico es altamente ventajoso puesto que permite un medio verdaderamente definido que puede fabricarse a partir de materiales recombinantes o sintéticos.

Preferentemente, un medio de cultivo que es sin suero, sin reemplazo de suero, sin xenógenos, sin alimentador y sin transportadores de proteínas puede ser un medio de cultivo que comprenda una isoforma TGF β (para ejemplos no limitantes véanse los medios de cultivo D1, D2, HA16 o HA19 que se describen en los Ejemplos 1 y 2 de la sección de Ejemplos a continuación).

Como se usa en el presente documento, la frase "isoforma TGF β " se refiere a cualquier isoforma del factor de crecimiento transformante beta (β) incluyendo TGF β 1 (por ejemplo, TGF β 1 de homo sapiens, n.º de acceso de GenBank NP_000651), TGF β 2 (por ejemplo, TGF β 2 de homo sapiens, n.º de acceso de GenBank NP_003229) y TGF β 3 (por ejemplo, TGF β 3 de homo sapiens, n.º de acceso de GenBank NP_003230) que actúan a través del mismo sistema de señalización del receptor en el control de la proliferación, la diferenciación y otras funciones en muchos tipos celulares. TGF β actúa induciendo la transformación y también actúa como un factor de crecimiento autocrino negativo. De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente divulgación la isoforma de TGF β que se incluye en el medio de cultivo de la presente divulgación es TGF β 1 o TGF β 3. Dichas isoformas de TGF β pueden obtenerse de diversas fuentes comerciales tales como R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.

Como se describe en el ejemplo de referencia 2 de la sección de ejemplos de referencia a continuación, los presentes inventores han utilizado diversos medios de cultivo que contenían TGF β 1 (por ejemplo, el medio D1 que contiene TGF β 1 0,12 ng/ml) o TGF β 3 (por ejemplo, el medio D2, el medio HA16 o el medio HA19 que contienen TGF β 3 2 ng/ml) para cultivar hESC satisfactoriamente en un cultivo en suspensión y mantenerlas en estado indiferenciado.

Preferentemente, el TGF β 1 que se incluye en el medio de cultivo de este aspecto de la presente divulgación está presente en una concentración de al menos 0,06 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,07 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,08 ng/ml, más preferentemente al menos 0,09 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,1 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,11 ng/ml, incluso más preferentemente, al menos 0,12 ng/ml.

Preferentemente, el TGF β_3 que se incluye en el medio de cultivo de este aspecto de la presente divulgación está presente en una concentración de al menos 0,5 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,6 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,8 ng/ml, más preferentemente, al menos 0,9 ng/ml, más preferentemente, al menos 1 ng/ml, más preferentemente, al menos 1,2 ng/ml, más preferentemente, al menos 1,4 ng/ml, más preferentemente, al menos 1,6 ng/ml, más preferentemente, al menos 1,8 ng/ml, incluso más preferentemente, al menos 2 ng/ml.

Preferentemente, el medio de cultivo que contiene TGF β de este aspecto de la presente divulgación incluye adicionalmente el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). El bFGF puede obtenerse de cualquier proveedor comercial de ingredientes para cultivos de tejidos tales como los productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.

Preferentemente, el bFGF que se incluye en el medio de cultivo que contiene TGF β de este aspecto de la presente divulgación está presente en una concentración de al menos 2 ng/ml, al menos 3 ng, al menos 4 ng/ml, al menos 5 ng/ml, al menos 6 ng/ml, al menos 7 ng, al menos 8 ng/ml, al menos 9 ng/ml, al menos 10 ng/ml.

Como alternativa, un medio de cultivo que se basa en la quimera IL6RIL6 y es sin suero o reemplazo de suero, sin xenógenos y sin transportadores de proteínas también puede usarse junto con el método de este aspecto de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "IL6RIL6" se refiere a un polipéptido quimérico que comprende la porción soluble del receptor de interleucina 6 (IL-6-R, por ejemplo, la IL-6-R humana según lo establecido por el n.º de acceso de GenBank AAH89410) (por ejemplo, una porción de los receptores de IL6 solubles según lo establecido por los aminoácidos 112-355 del n.º de acceso de GenBank AAH89410) y la interleucina 6 (IL6) (por ejemplo, IL-6 humana según lo establecido por el n.º de acceso de GenBank CAG29292) o una fracción biológicamente activa de la misma (por ejemplo, un dominio de unión al receptor). Preferentemente, la quimera IL6RIL6 utilizada mediante el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación es capaz de soportar el crecimiento indiferenciado de células madre embrionarias humanas, mientras mantienen su capacidad pluripotente. Se apreciará que cuando se construye la quimera IL6RIL6 las dos porciones funcionales (es decir, la IL6 y su receptor) pueden fusionarse directamente (por ejemplo, fijarse o fusionarse traduccionalmente, es decir, codificadas por un solo marco de lectura abierto) entre sí o pueden conjugarse (fijarse o fusionarse traduccionalmente) a través de un enlazador adecuado (por ejemplo, un enlazador polipeptídico). Preferentemente, el polipéptido quimérico IL6RIL6 presenta una cantidad y un patrón de glicosilación similares a la IL6 y el receptor de IL6 de origen natural. Por ejemplo, una quimera IL6RIL6 adecuada es la que se establece en la SEQ ID NO: 31 y en la figura 11 del documento WO 99/02552 de Revel M., et al.

Preferentemente, la quimera IL6RIL6 que se incluye en el medio de cultivo de este aspecto de la presente divulgación está presente en una concentración de al menos 25 ng/ml, preferentemente al menos 50 ng/ml, preferentemente, al menos 100 ng/ml, preferentemente, al menos 200 ng/ml, preferentemente, al menos 300 ng/ml. Debe observarse que la concentración de la quimera IL6RIL6 puede variar dependiendo de la pureza del polipéptido quimérico después de su síntesis o expresión recombinante y los expertos en la materia son capaces de ajustar la concentración óptima dependiendo de dicha pureza.

Preferentemente, el medio de cultivo que contiene IL6RIL6 de este aspecto de la presente divulgación incluye bFGF al menos 2 ng/ml, al menos 3 ng/ml, al menos 4 ng/ml, al menos 5 ng/ml, al menos 6 ng/ml, al menos 7 ng, al menos 8 ng/ml, al menos 9 ng/ml, bFGF al menos 10 ng/ml.

Por ejemplo, un medio de cultivo adecuado que contiene IL6RIL6 que puede usarse para cultivar las ESC en un cultivo en suspensión puede ser el medio de cultivo HACM100 descrito en "Materiales generales y métodos experimentales" y en el ejemplo de referencia 2 de la sección de ejemplos de referencia a continuación, que se mostró capaz de mantener las hESC en un estado indiferenciado durante al menos 1-2 pases.

Como alternativa, también puede usarse un medio de cultivo que se basa en el receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) [por ejemplo, n.º de acceso de GenBank NM_000565.2, NM_181359.1, NP_000556.1, NP_852004.1] y la interleucina 6 soluble (IL6) [por ejemplo, n.º de acceso de GenBank NM_000600.1, NP_000591.1] (por separado) junto con el método de la presente divulgación. Por ejemplo, como se describe en el ejemplo de referencia 4 de las secciones de ejemplos de referencia a continuación, puede usarse un medio de cultivo tal como el yFIL25 que comprende 25 ng de IL6 y 25 ng de sIL6R para cultivar, expandir y mantener las ESC humanas en un estado pluripotente, proliferativo y indiferenciado durante al menos 19 pases. Por tanto, las ESC humanas cultivadas en dicho medio de cultivo expresaron marcadores característicos del estado indiferenciado, presentaron un cariotipo cromosómico normal (según se sometió a ensayo después de 14 pases) y fueron capaces de formar EB que incluían las tres capas germinales embrionarias (pluripotentes). Preferentemente, el sIL6R está presente en una concentración de al menos 10 nanogramos por mililitro (ng/ml), más preferentemente, al menos 15 ng/ml, más preferentemente, al menos 20 ng/ml, por ejemplo, al menos 22 ng/ml, 25 ng/ml, 27 ng/ml o 30 ng/ml. Por ejemplo, sIL6R puede estar presente en una concentración de 15-30 ng/ml, por ejemplo, 25 ng/ml. Pueden obtenerse sIL6R e IL6, por ejemplo, de R&D systems, Minneapolis, MN, EE.UU.

Aún como alternativa, también puede usarse un medio de cultivo que se basa en el factor inhibidor de la leucemia (LIF) [por ejemplo, n.º de acceso de GenBank NM_002309.2 (ARNm) o NP_002300.1 (proteína)] junto con el método de la presente divulgación. Por ejemplo, como se describe en el ejemplo de referencia 4 de las secciones de ejemplos de referencia a continuación, puede usarse un medio de cultivo tal como yFL1, yFL2 o yFL3 para cultivar, expandir y mantener las ESC humanas en un estado pluripotente, proliferativo e indiferenciado durante al menos 18 pases. Por tanto, las ESC humanas cultivadas en un medio de cultivo de este tipo expresaron marcadores característicos del estado indiferenciado, presentaron un cariotipo cromosómico normal (según se sometió a ensayo después de 14 pases) y fueron capaces de formar EB que incluían las tres capas germinales embrionarias (pluripotentes). Preferentemente, el LIF está presente en una concentración de al menos 1000 unidades/ml, más preferentemente, al menos 2000 unidades/ml, más preferentemente, al menos 3000 unidades/ml. El factor inhibidor de la leucemia recombinante humana (hrLIF) puede obtenerse de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.

Aún como alternativa, puede usarse un medio de cultivo que se basa en el factor inhibidor de la leucemia (LIF) [por ejemplo, n.º de acceso de GenBank NM_002309.2 (ARNm) o NP_002300.1 (proteína)] y TGFβ1 junto con el método de la presente divulgación. Por ejemplo, como se describe en el ejemplo de referencia 4 de las secciones de ejemplos de referencia a continuación, puede usarse un medio de cultivo tal como el medio TLF para cultivar, expandir y mantener las ESC humanas en un estado pluripotente, proliferativo e indiferenciado durante al menos 31 pases. Por tanto, las ESC humanas cultivadas en dicho medio de cultivo expresaron marcadores característicos del estado indiferenciado, presentaron un cariotipo cromosómico normal (como se sometió a ensayo después de 18 pases) y fueron capaces de formar EB que incluían las tres capas germinales embrionarias (pluripotentes).

Se apreciará que cualquiera de los factores proteicos utilizados en el medio de cultivo de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera IL6RIL6, bFGF, TGFβ1, TGFβ3, LIF, sIL6R e IL6) puede expresarse recombinantemente o sintetizarse bioquímicamente. Además, pueden purificarse factores proteicos naturales tales como bFGF y TGFβ a partir de muestras biológicas (por ejemplo, a partir de suero humano, cultivos celulares) usando métodos bien conocidos en la técnica.

La síntesis bioquímica de los factores proteicos de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera IL6RIL6) puede realizarse usando técnicas en fase sólida convencionales. Estos métodos incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de síntesis en fase sólida parcial, la condensación de fragmentos y la síntesis en solución clásica.

La expresión recombinante de los factores proteicos de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera IL6RIL6) puede generarse usando técnicas recombinantes tales como las descritas por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310: 511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680, Brogli et al., (1984) *Science* 224: 838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463. Específicamente, la quimera IL6RIL6 puede generarse como se describe en la publicación PCT WO 99/02552 de Revel M., et al. y Chebath J, et al., 1997.

Por ejemplo, para generar la quimera IL6RIL6, una secuencia de polinucleótidos que codifica la quimera IL6RIL6 (por ejemplo, el polipéptido que se establece en la SEQ ID NO: 31) se liga preferentemente en una construcción de ácido nucleico adecuada para la expresión en una célula hospedadora [es decir, una célula en la que se expresa el polinucleótido que codifica el polipéptido de elección (por ejemplo, la quimera IL6RIL6)]. Preferentemente, para generar una quimera IL6RIL6 con la cantidad y el patrón de glicosilación a partir de IL6 e IL6-R de origen natural, la célula hospedadora empleada es una célula hospedadora eucariótica, más preferentemente una célula hospedadora de mamífero tal como una célula humana o una célula CHO).

Para la expresión en células de mamíferos [por ejemplo, células CHO, células HEK 293 humanas (ATCC CRL 1573)] pueden usarse varios vectores de expresión de mamíferos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, pADNc3, pADNc3.1 (+/-), pGL3, pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Strategene, pTRES que está disponible en Clontech y sus derivados

También pueden usarse vectores de expresión que contengan elementos reguladores de virus eucarióticos, tales como retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA y los vectores derivados del virus de Epstein Bar incluyen pHEBO y p205. Otros vectores de ejemplo incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV-40, el promotor tardío SV-40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus tumoral mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de polihedrina u otros promotores que se mostraron eficaces para la expresión en células eucariotas.

Pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente divulgación en células hospedadoras. Dichos métodos se describen en general en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory*

Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, la transfección estable o transitoria, la lipofección, la electroporación y la infección con vectores víricos recombinantes. Además, véase la patente de los EE.UU. N.º 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positivos-negativos.

Las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permitan la expresión de altas cantidades del polipéptido recombinante (por ejemplo, la quimera IL6RIL6). Después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación del polipéptido recombinante. La frase "recuperación del polipéptido recombinante" utilizada en el presente documento se refiere a recoger el medio de fermentación completo que contiene el polipéptido y no implica necesariamente etapas adicionales de separación o purificación.

Por tanto, pueden purificarse polipéptidos de la presente divulgación usando una diversidad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como, pero no limitadas a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con Concanavalina A, cromatografía de exclusión y solubilización diferencial.

El polipéptido de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera IL6RIL6) se recupera preferentemente en forma "sustancialmente pura". Como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente puro" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz del polipéptido de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera IL6RIL6) para mantener las células madre embrionarias humanas en un estado indiferenciado mientras se encuentran en cultivo.

Aunque actualmente son menos preferidos, pueden usarse otros medios de cultivo que comprendan la quimera IL6RIL6, pero también incluyan suero o remplazo de suero™ (por ejemplo, el medio CM100F o medios similares con otras concentraciones de la quimera IL6RIL6 tales como 200 o 300 ng/ml como se describe en la sección de ejemplos de referencia a continuación) mediante el método de este aspecto de la presente divulgación. En este caso, el suero (por ejemplo, el suero humano) o el remplazo de suero™ pueden proporcionarse a diversas concentraciones, tales como una concentración de al menos el 10 %, por ejemplo, una concentración de al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 % o al menos 30 %.

El remplazo de suero™ incluye albúmina o sustitutos de albúmina, aminoácidos, vitaminas, transferrinas o sustitutos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno y elementos traza (Publicación de Patente Internacional N.º WO 98/30679 de Price, P.J. et al). Para proporcionar condiciones de cultivo sin componentes animales, la albúmina o sustitutos de albúmina derivan preferentemente de una fuente humana y/o se preparan usando técnicas recombinantes en células hospedadoras como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Cuando se cultivan de acuerdo con el método de este aspecto de la presente divulgación, se controla el crecimiento de las células madre embrionarias para determinar su estado de diferenciación. El estado de diferenciación puede determinarse usando diversos enfoques incluyendo, por ejemplo, la evaluación morfológica (por ejemplo, como se muestra en las figuras 5a-g) y/o la detección del patrón de expresión de marcadores típicos del estado indiferenciado usando técnicas inmunológicas tales como la citometría de flujo para marcadores unidos a la membrana, la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia para marcadores extracelulares e intracelulares y el inmunoensayo enzimático, para marcadores moleculares secretados. Por ejemplo, la inmunofluorescencia empleada en hESC cultivadas de acuerdo con el método de este aspecto de la presente divulgación reveló la expresión de Oct4, antígeno embrionario específico de etapa (SSEA) 4, el antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81 (figuras 4a-c y datos no mostrados). Adicionalmente, el nivel de transcritos de marcadores de indiferenciación específicos (por ejemplo, Oct 4, Nanog, Sox2 y Rex1 como se muestra en las figuras 6a-d) o marcadores de diferenciación (por ejemplo, albúmina, glucagones, α -actina cardíaca, β -globulina, AC133 y neurofilamento) puede detectarse usando técnicas basadas en ARN tales como el análisis por RT-PCR y/o el análisis de micromatriz de ADNc.

La determinación de la diferenciación de las células ES también puede efectuarse a través de mediciones de la actividad de la fosfatasa alcalina. Las células ES humanas indiferenciadas tienen actividad de fosfatasa alcalina que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4 % y desarrollándose con el kit de sustrato Vector Red de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.).

Preferentemente, las células madre embrionarias cultivadas en cualquiera de los medios de cultivo en suspensión descritos anteriormente presentan un cariotipo cromosómico normal después de al menos 1 pase, preferentemente, después de al menos 2 pases, preferentemente, después de al menos 3 pases, preferentemente, después de al menos 4 pases, preferentemente, después de al menos 5 pases, preferentemente, después de al menos 7 pases, preferentemente, después de al menos 10 pases, preferentemente, después de al menos 12 pases, preferentemente, después de al menos 15 pases, preferentemente, después de al menos 20 pases, preferentemente, después de al menos 25 pases, preferentemente, después de al menos 30 pases (por ejemplo, las hESC presentaron un cariotipo normal después de al menos 14, 18, 23 o 36 pases), representando de este modo

estirpes de ESC humanas genéticamente estables.

Preferentemente, las células madre embrionarias cultivadas en cualquiera de los medios de cultivo en suspensión descritos anteriormente presentan un tiempo de duplicación de al menos 20 horas, más preferentemente, un tiempo de duplicación que está entre 20 y 40 horas (por ejemplo, aproximadamente 36 horas), representando de este modo ESC humanas genéticamente estables no oncógenas.

Debe observarse que la presente divulgación proporciona, por primera vez, un cultivo celular que comprende células madre embrionarias y un medio de cultivo que comprende el receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) y la interleucina 6 (IL6) (por separado) en el que el IL6R soluble está presente en una concentración de al menos 10 (ng/ml) (por ejemplo, 25 ng/ml) y mientras que el medio de cultivo es capaz de mantener las células madre embrionarias en un estado indiferenciado durante al menos 5 pases (véase el ejemplo de referencia 4 de la sección de ejemplos de referencia a continuación, que muestra hESC indiferenciadas después de 19 pases).

De manera similar, la presente divulgación proporciona, por primera vez, un cultivo celular que comprende células madre embrionarias humanas y un medio de cultivo que comprende LIF (en una concentración de al menos 1000 u/ml), en el que el medio de cultivo es capaz de mantener las ESC humanas en un estado indiferenciado durante al menos 18 pases (véase el ejemplo de referencia 4 de la siguiente sección de ejemplos de referencia).

Se apreciará que el cultivo de suspensión nuevamente definido anteriormente descrito en el presente documento también puede usarse para derivar nuevas estirpes de hESC en un sistema de cultivo aumentable a escala, sin xenógenos y completo.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de derivación de una estirpe de células madre embrionarias. El método se efectúa (a) obteniendo una célula madre embrionaria y (b) cultivando la célula madre embrionaria en un cultivo en suspensión, en condiciones de cultivo que permiten la expansión de las células madre embrionarias en un estado indiferenciado, derivando de este modo la estirpe de células madre embrionarias.

El término "derivar" como se usa en el presente documento se refiere a generar una estirpe de células madre embrionarias de al menos una célula madre embrionaria.

Como se usa en el presente documento, la frase "estirpe de células madre embrionarias" se refiere a células madre embrionarias que derivan de una sola célula madre embrionaria o de un grupo de células madre embrionarias de un solo organismo y que se caracterizan por la capacidad de proliferar en cultivo mientras mantienen el estado indiferenciado y la capacidad pluripotente.

La obtención de una célula madre embrionaria a partir de, por ejemplo, un tejido genital de un feto puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica.

Cuando se usa el tejido genital de un feto, las crestas genitales se disocian y se cortan en pequeños trozos que después se desagregan en células mediante disociación mecánica. Después, las células EG individuales se cultivan en cultivo en suspensión con un medio de cultivo adecuado (por ejemplo, el medio CM100F, HA16 o D2) durante 4-10 días.

Una vez obtenidas, las ESC se cultivan adicionalmente en suspensión en condiciones que permiten la expansión de las células madre embrionarias en el estado indiferenciado, esencialmente como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, el cultivo celular de la presente divulgación se caracteriza por al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 % de células madre embrionarias indiferenciadas.

Se apreciará que una estirpe de células madre embrionarias establecida puede someterse a ciclos de congelación/descongelación sin obstaculizar la capacidad proliferativa de las células en el estado indiferenciado, conservando al mismo tiempo su capacidad pluripotente. Por ejemplo, como se muestra en la sección de ejemplos de referencia a continuación, usando SR al 15 % y DMSO al 10 %, las hESC se congelaron y descongelaron satisfactoriamente.

Como se describe en el ejemplo de referencia 2 de la sección de ejemplos de referencia a continuación, las hESC que se expandieron y se mantuvieron en el cultivo en suspensión descrito anteriormente son pluripotentes (es decir, capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares de las tres capas germinales embrionarias, el ectodermo, el endodermo y el mesodermo) como se muestra *in vitro* (mediante la formación de EB). Por tanto, las hESC cultivadas de acuerdo con el contenido de la presente divulgación pueden usarse como una fuente para generar células específicas de linaje diferenciadas. Dichas células pueden obtenerse directamente a partir de las ESC sometiéndolas a diversas señales de diferenciación (por ejemplo, citoquinas, hormonas, factores de crecimiento) o

indirectamente, a través de la formación de cuerpos embrioides y la posterior diferenciación de células de los EB en células específicas de linaje.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional más de la presente divulgación, se proporciona un método de generación de cuerpos embrioides a partir de células madre embrionarias. El método se realiza (a) cultivando las células madre embrionarias en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo que permiten la expansión de las células madre embrionarias en un estado indiferenciado para obtener de este modo células madre embrionarias expandidas e indiferenciadas; y (b) someter las células madre embrionarias expandidas e indiferenciadas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar las células madre embrionarias en cuerpos embrioides; generando de este modo los cuerpos embrioides de las células madre embrionarias.

Como se usa en el presente documento, la frase "cuerpos embrioides" se refiere a estructuras morfológicas compuestas de una población de ESC y/o células germinales embrionarias (EGC) que han experimentado diferenciación. La formación de EB se inicia después de la retirada de los factores de bloqueo de diferenciación de los cultivos de células ES. En la primera etapa de la formación de EB, las ESC proliferan en pequeñas masas de células que después continúan con la diferenciación. En la primera fase de diferenciación, después de 1-4 días en cultivo para las ESC humanas, se forma una capa de células endodérmicas en la capa externa de la masa pequeña, dando como resultado "EB simples". En la segunda fase, después de 3-20 días posteriores a la diferenciación, se forman "EB complejos". Los EB complejos se caracterizan por una amplia diferenciación de células ectodérmicas y mesodérmicas y tejidos derivados.

Por tanto, el método de este aspecto de la presente divulgación implica el cultivo de ESC en un cultivo en suspensión usando cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento con el fin de obtener células madre embrionarias expandidas e indiferenciadas y después someter las ESC expandidas e indiferenciadas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar las ESC en cuerpos embrioides. Dichas condiciones de cultivo están desprovistas sustancialmente de factores inhibidores de la diferenciación que se emplearon durante la etapa (a), por ejemplo, una isoforma de TGF β o la quimera IL6RIL6.

Para la formación de EB, las ESC se transfieren desde los cultivos en suspensión que incluyen un medio de cultivo capaz de mantener las ESC en un estado indiferenciado a un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y está desprovisto de factores inhibidores de la diferenciación, esencialmente como se describe en los "Materiales generales y métodos experimentales" de la sección de ejemplos a continuación. Por ejemplo, un medio de cultivo adecuado para la formación de EB puede incluir un medio de cultivo básico (por ejemplo, Ko-DMEM o DMEM/F12) complementado con FBSd al 20 % (HyClone, Utah, EE.UU.), L-glutamina 1 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM y solución madre de aminoácidos no esenciales al 1 %.

El control de la formación de EB puede efectuarse mediante evaluaciones morfológicas (por ejemplo, tinción histológica como se describe en el Ejemplo 2) y la determinación de la expresión de marcadores específicos de diferenciación [usando, por ejemplo, técnicas inmunológicas o análisis basados en ARN (por ejemplo, RT-PCR, micromatriz de ADNc)]. Los ejemplos no limitantes de marcadores específicos de diferenciación de las tres capas germinales embrionarias incluyen albúmina y glucagón (típico del endodermo embrionario), α -actina cardíaca, β -globulina y Fikl (típico del mesodermo embrionario) y AC133 y neurofilamento (NFH) (típico del ectodermo embrionario).

Se apreciará que con el fin de obtener células específicas de linaje a partir de los EB, las células de los EB pueden someterse adicionalmente a condiciones de cultivo adecuadas para células específicas de linaje.

Preferentemente, el método de este aspecto de la presente divulgación incluye adicionalmente la etapa (c): someter células de los cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje; generando de este modo las células específicas de linaje a partir de las células madre embrionarias.

Como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje" se refiere a una combinación de un sistema de cultivo, por ejemplo, capas alimentadora, matriz sin células alimentadoras o un cultivo en suspensión y un medio de cultivo que son adecuados para la diferenciación y/o expansión de linajes celulares específicos derivados de células de los EB. Se describen adicionalmente a continuación ejemplos no limitantes de dichas condiciones de cultivo.

Preferentemente, el método de este aspecto de la presente divulgación incluye adicionalmente el aislamiento de células específicas de linaje después de la etapa (b).

Como se usa en el presente documento, la frase "aislamiento de células específicas de linaje" se refiere al enriquecimiento de una población mixta de células en un cultivo con células que muestran predominantemente al menos una característica asociada a un fenotipo de linaje específico. Se apreciará que todos los linajes celulares derivan de las tres capas germinales embrionarias. Por tanto, por ejemplo, los hepatocitos y las células pancreáticas derivan del endodermo embrionario; el tejido óseo, cartilaginoso, elástico, tejidos conjuntivos fibrosos, miocitos,

células miocárdicas, células de la médula ósea, células vasculares (en concreto, células musculares lisas y endoteliales) y células hematopoyéticas se diferencian a partir del mesodermo embrionario; y las células neurales, retinianas y epidérmicas derivan del ectodermo embrionario.

- 5 De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el aislamiento se efectúa clasificando las células de los EB mediante un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

Se conocen en la técnica métodos de aislamiento de células diferenciadas derivadas de EB mediante análisis por FACS. De acuerdo con un método, los EB se desagregan usando una solución de tripsina y EDTA (al 0,025 % y al 10 0,01 %, respectivamente), se lavan con suero bovino fetal (FBS) al 5 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incuban durante 30 minutos en hielo con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos contra antígenos de la superficie celular característicos para un linaje celular específico. Por ejemplo, se aíslan células endoteliales fijando un anticuerpo dirigido contra la molécula 1 de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM1) tal como los anticuerpos PECAM1 marcados con fluorescencia (30884X) disponibles en PharMingen 15 (PharMingen, Becton Dickinson Bio Sciences, San Jose, CA, EE.UU.) como se describe en Levenberg, S. et al., (*Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. 99: 4391-4396). Las células hematopoyéticas se aíslan usando anticuerpos marcados de forma fluorescente tales como CD34-FITC, CD45-PE, CD31-PE, CD38-PE, CD90-FITC, CD117-PE, CD15-FITC, FITC de clase I, todos los cuales IgG1 está disponible en PharMingen, CD133/1-PE (IgG1) (disponible en Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y glicoforina A-PE (IgG1), 20 disponible en Immunotech (Miami, FL). Las células vivas (es decir, sin fijación) se analizan en un FACScan (Becton Dickinson Bio Sciences) usando yoduro de propidio para excluir las células muertas con el software PC-LYSIS o CELLQUEST. Se apreciará que las células aisladas pueden enriquecerse adicionalmente usando anticuerpos secundarios marcados magnéticamente y columnas de separación magnética (MACS, Miltenyi) como describe Kaufman, D.S. et al. (*Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98: 10716-10721).

De acuerdo con una realización preferida más de la presente divulgación, el aislamiento se realiza mediante una separación mecánica de células, tejidos y/o estructuras similares a tejidos contenidos dentro de los EB.

30 Por ejemplo, los cardiomiocitos latentes pueden aislarse de los EB como se describe en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20030022367 de Xu et al. Los EB de cuatro días de la presente divulgación se transfieren a placas recubiertas de gelatina o portaobjetos de cámara y se les permite fijarse y diferenciarse. Las células que se contraen espontáneamente, que se observan a partir del día 8 de diferenciación, se separan mecánicamente y se recogen en un tubo de 15 ml que contiene medio con bajo contenido de calcio o PBS. Las células se disocian usando digestión 35 con collagenasa B durante 60 a 120 minutos a 37 °C, dependiendo de la actividad de la collagenasa. Después, las células disociadas se resuspenden en un medio de diferenciación KB (KCl 85 mM, K₂HPO₄ 30 mM, MgSO₄ 5 mM, EGTA 1 mM, creatina 5 mM, glucosa 20 mM, Na₂ATP 2 mM, piruvato 5 mM y taurina 20 mM, tamponados a pH 7,2, Maltsev et al., *Circ. Res.* 75: 233, 1994) y se incuban a 37 °C durante 15-30 minutos. Después de la disociación, las células se siembran en portaobjetos de cámara y se cultivan en el medio de diferenciación para generar 40 cardiomiocitos individuales capaces de latir.

De acuerdo con realizaciones preferidas adicionales de la presente divulgación, el aislamiento se efectúa sometiendo los EB a factores de diferenciación para inducir de este modo la diferenciación de los EB en células diferenciadas específicas de linaje.

45 A continuación, se presenta una descripción no limitante de varios procedimientos y enfoques para inducir la diferenciación de EB en células específicas de linaje.

Para diferenciar los EB de la presente divulgación en precursores neurales, se cultivan EB de cuatro días durante 5- 12 días en placas de cultivo de tejidos que incluyen medio DMEM/F-12 con insulina 5 mg/ml, transferrina 50 mg/ml, 50 cloruro de selenio 30 nM y fibronectina 5 mg/ml (medio ITSFn, Okabe, S. et al., 1996, *Mech. Dev.* 59: 89-102). Los precursores neurales resultantes pueden trasplantarse adicionalmente para generar células neurales *in vivo* (Brüstle, O. et al., 1997. *In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 14809-14814). Se apreciará que antes de su trasplante, los precursores neurales se tripsinizan y se 55 trituran en suspensiones de células individuales en presencia de ADNasa al 0,1 %.

Los EB de la presente divulgación pueden diferenciarse en oligodendrocitos y células de mielina mediante el cultivo de las células en medio SATO modificado, es decir, DMEM con albúmina sérica bovina (BSA), piruvato, progesterona, putrescina, tiroxina, triyodotirona, insulina, transferrina, selenita sódica, aminoácidos, neurotrofina 3, 60 factor neurotrófico ciliar y Hepes (Bottenstein, J. E. & Sato, G. H., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 514-517; Raff, M. C., Miller, R. H. y Noble, M., 1983, *Nature* 303: 390-396]. Brevemente, los EB se disocian usando tripsina al 0,25 %/EDTA (5 min a 37 °C) y se trituran en suspensiones de células individuales. Las células suspendidas se siembran en matraces que contienen medio SATO complementado con suero equino al 5 % y suero de ternera fetal (FCS) al 5 %. Después de 4 días en cultivo, los matraces se agitan suavemente para suspender las células 65 adheridas (principalmente oligodendrocitos), mientras que los astrocitos permanecen adheridos a los matraces y además producen medio acondicionado. Los oligodendrocitos primarios se transfieren a nuevos matraces que

contienen medio SATO durante dos días adicionales. Después de un total de 6 días en cultivo, las oligoesferas se disocian parcialmente y se resuspenden en medio SATO para el trasplante de células o se disocian completamente y se siembran en placas en un medio acondicionado con oligoesferas que deriva de la etapa de agitación previa [Liu, S. et al., (2000). *Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6126-6131].

Para la diferenciación de los mastocitos, se transfieren EB de dos semanas de la presente divulgación a placas de cultivo de tejidos que incluyen medio DMEM complementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 mg/ml, medio acondicionado con células WEHI-3 al 20 % (v/v) y factor de células madre de rata recombinantes 50 ng/ml (rrSCF, Tsai, M. et al., 2000. *In vivo immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: An approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice in vivo. Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 9186-9190). Los cultivos se expanden semanalmente transfiriendo las células a nuevos matraces y reemplazando la mitad del medio de cultivo.

Para generar células hemato-linfoideas a partir de los EB de la presente divulgación, se transfirieron EB de 2-3 días de edad a placas de cultivo permeables al gas en presencia de CO₂ al 7,5 % y O₂ al 5 % usando una incubadora con contenido de oxígeno ajustable. Después de 15 días de diferenciación, las células se recogen y se disocian mediante una digestión suave con collagenasa (0,1 unidades/mg) y dispasa (0,8 unidades/mg), ambas disponibles de F. Hoffman-La Roche Ltd, Basilea, Suiza. Las células positivas para CD45 se aíslan usando anticuerpo monoclonal anti-CD45 (mAb) M1/9.3.4.HL.2 y microperlas paramagnéticas (Miltenyi) conjugadas con inmunoglobulina anti-rata de cabra como se describe en Potocnik, A.J. et al., (*Immunology Hemato-lymphoid in vivo reconstitution potential of subpopulations derived from in vitro differentiated embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 94: 10295-10300). Las células positivas para CD45 aisladas pueden enriquecerse adicionalmente usando un solo pase sobre una columna MACS (Miltenyi).

Se apreciará que las condiciones de cultivo adecuadas para la diferenciación y expansión de las células específicas de linaje aisladas incluyen diversos medios de cultivo tisular, factores de crecimiento, antibióticos, aminoácidos y similares y está dentro de la capacidad de un experto en la materia para determinar qué condiciones deben aplicarse con el fin de expandir y diferenciar tipos celulares particulares y/o linajes celulares.

Adicionalmente o como alternativa, pueden obtenerse células específicas de linaje induciendo directamente las ESC indiferenciadas expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para la diferenciación del linaje celular específico.

Además de los cultivos primarios específicos de linaje, los EB de la presente divulgación pueden usarse para generar estirpes celulares específicas de linaje que sean capaces de una expansión ilimitada en cultivo.

Las estirpes celulares de la presente divulgación pueden producirse inmortalizando las células derivadas de EB mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la expresión de un gen de telomerasa en las células (Wei, W. et al., 2003. *Mol Cell Biol.* 23: 2859-2870) o co-cultivando las células con células productoras retrovíricas NIH 3T3 hph-HOX11 (Hawley, R.G. et al., 1994. *Oncogene* 9: 1-12).

Se apreciará que, puesto que las células o estirpes celulares específicas de linaje obtenidas de acuerdo con el contenido de la presente divulgación se desarrollan mediante procesos de diferenciación similares a los que se producen naturalmente en el embrión humano, pueden usarse adicionalmente para terapia a base de células humanas y regeneración de tejidos.

Por tanto, la presente divulgación prevé el uso de las células o estirpes celulares específicas de linaje expandidas y/o diferenciadas de la presente divulgación para tratar un trastorno que requiera una terapia de reemplazo celular.

Por ejemplo, pueden usarse precursores de oligodendrocitos para tratar trastornos de la mielina (*Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models. Molecular Medicine Today.* 1997. págs. 554-561), pueden usarse condrocitos o células mesenquimales en el tratamiento defectos del hueso y del cartílago (Patente de los EE.UU. N.º US 4.642.120) y pueden usarse células del linaje epitelial en la regeneración de la piel de una herida o quemadura (Patente de los EE.UU. N.º 5.716.411).

Para determinados trastornos, tales como los trastornos genéticos en los que falta un producto genético específico [por ejemplo, la falta del producto del gen CFTR en pacientes con fibrosis quística (Davies JC, 2002. *New therapeutic approaches for cystic fibrosis lung disease. J. R. Soc. Med.* 95 Supl. 41: 58-67)], las células derivadas de ESC se manipulan preferentemente para sobreexpresar el gen mutado antes de su administración al individuo. Se apreciará que, para otros trastornos, las células derivadas de ESC deben manipularse para excluir determinados genes.

La sobreexpresión o la exclusión de genes puede realizarse usando construcciones insertadas y/o inactivadas [véase, por ejemplo, Fukushige, S. e Ikeda, J.E.: *Trapping of mammalian promoters by Cre-lox site-specific recombination. DNA Res* 3 (1996) 73-50; Bedell, M.A., Jerkins, N.A. y Copeland, N.G.: *Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. Genes and Development* 11 (1997) 1-11;

Bermingham, J. J., Scherer, S. S., O'Connell, S., Arroyo, E., Kalla, K. A., Powell, F. L. y Rosenfeld, M. G.: *Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. Genes Dev* 10 (1996) 1751-62].

Además de la terapia de reemplazo celular, las células específicas de linaje de la presente divulgación también pueden utilizarse para preparar una biblioteca de ADNc. Se prepara ARNm mediante técnicas convencionales a partir de las células específicas de linaje y se transcribe de forma inversa adicionalmente para formar ADNc. La preparación de ADNc puede sustraerse con nucleótidos de fibroblastos embrionarios y otras células de especificidad no deseada, para producir una biblioteca de ADNc sustraída mediante técnicas conocidas en la técnica.

Las células específicas de linaje de la presente divulgación pueden usarse para detectar factores (tales como fármacos de moléculas pequeñas, péptidos, polinucleótidos y similares) o condiciones (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a la diferenciación del precursor de linaje en células diferenciadas terminalmente. Por ejemplo, las sustancias que afectan el crecimiento, las toxinas o los posibles factores de diferenciación pueden someterse a ensayo mediante su adición al medio de cultivo.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a \pm el 10 %.

Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente divulgación se harán evidentes para un experto en la materia tras examinar los siguientes ejemplos, que no tienen por objeto ser limitante. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente divulgación, como se describe más adelante en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

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

En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas de moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "*Molecular Cloning: A laboratory Manual*" Sambrook et al., (1989); "*Current Protocols in Molecular Biology*" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., Ed. (1994); Ausubel et al., "*Current Protocols in Molecular Biology*", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "*A Practical Guide to Molecular Cloning*", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "*Recombinant DNA*", Scientific American Books, New York; Birren et al. (Eds.) "*Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "*Cell Biology: A Laboratory Handbook*", Volúmenes I-III Cellis, J. E., Ed. (1994); "*Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique*" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "*Current Protocols in Immunology*" Volúmenes I-III Coligan J. E., Ed. (1994); Stites et al. (Eds.), "*Basic and Clinical Immunology*" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (Eds.), "*Selected Methods in Cellular Immunology*", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen inmunoensayos disponibles ampliamente en la patente y en la bibliografía científica; véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "*Oligonucleotide Synthesis*" Gait, M. J., Ed. (1984); "*Nucleic Acid Hybridization*" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1985); "*Transcription and Translation*" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "*Animal Cell Culture*" Freshney, R. I., Ed. (1986); "*Immobilized Cells and Enzymes*" IRL Press, (1986); "*A Practical Guide to Molecular Cloning*" Perbal, B., (1984) y "*Methods in Enzymology*" Vol. 1-317, Academic Press; "*PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "*Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

MATERIALES GENERALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Cultivo de ESC - Se cultivaron células madre embrionarias humanas (hESC) estirpes I-6, I4 e I-3 [Amit&Itskovitz-Eldor, 2002] con fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (MEF) durante 40-60 pases en un "medio de cultivo de hESC básico" que consiste en DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) complementado con reemplazo de suero (SR) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácido no esencial y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son de los productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Este medio de cultivo básico se usó para el cultivo habitual de hESC en cultivos 2D con MEF como control.

Medios sometidos a ensayo en los cultivos con capa alimentadora, sin células alimentadoras o en suspensión – El medio sometido a ensayo fue como se indica a continuación:

Medios que contienen TGFβ

(i) **Medio D1** - Medio Mab ADCB (Hyclone, Utah, EE.UU.) complementado con L-glutamina 2 mM (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.), TGFβ₁ 0,12 ng/ml, (de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.), y bFGF 10 ng/ml (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

(ii) **Medio D2** - Medio Mab ADCB (HyClone, Utah, EE.UU.) complementado con L-glutamina 2 mM (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.), TGFβ₃ 2 mg/ml y bFGF 10 ng/ml (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

(iii) **Medio HA16** - DMEM al 96 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) complementado con dilución 1:1000 de la Premezcla ITS [la premezcla ITS es una solución madre X1000 obtenida de BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU. y consiste en 12,5 mg de insulina, 12,5 mg de transferrina y 12,5 mg de ácido selenio], L-glutamina 2 mM, TGFβ₃ 2 ng/ml (de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.), bFGF 4 ng/ml, ácido ascórbico 500 ng/ml (Sigma, Steinheim, Alemania) y una dilución 1:1000 de una mezcla de lípidos (N.º de Cat. de Sigma L5146, Steinheim, Alemania) (todos excepto los especificados de otra manera se obtuvieron de los productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

(iv) **Medio HA19** - DMEM al 96 %/F12 (Biological Industries, Beth Haemek, Israel) complementado con dilución 1:1000 de la premezcla ITS (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.), L-glutamina 2 mM, TGFβ₃ 2 ng/ml (de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.), bFGF 4 ng/ml, ácido ascórbico 500 ng/ml (Sigma, Steinheim, Alemania), una dilución 1:1000 de una mezcla de lípidos (N.º de Cat. de Sigma L5146, Steinheim, Alemania) y una dilución 1:100 de Simfronic 68 (solución de Pluronic F-68, P5556 de Sigma, Steinheim, Alemania, la solución madre es al 10 %, el F-68 en cultivo se proporciona en una concentración del 0,1 %) (Sigma, Steinheim, Alemania) (todos excepto los especificados de otra manera se obtuvieron de los productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

Medio que contiene quimera IL6RIL6

(i) **Medio CM100F** - DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) complementado con reemplazo de suero (SR) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, factor de crecimiento de fibroblastos básico 4 ng/ml (bFGF) y quimera IL6RIL6 100 ng/ml (un regalo del Prof. Revel M, Weizmann Inst. Rehovot, Israel; Chebath J, et al., 1997 y el documento WO 99/02552 de Revel M., et al., SEQ ID NO: 31) (todos, excepto los especificados de otra manera, se obtuvieron de los productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Como control, se usaron los mismos medios de cultivo con la retirada de los factores de crecimiento (excepto por el bFGF que permaneció en el medio de cultivo de control) y la quimera IL6RIL6.

(ii) **Medio HACM100** - DMEM al 96 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) complementado con una dilución 1:1000 de la premezcla ITS (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.), L-glutamina 2 mM, bFGF 4 ng/ml, ácido ascórbico 500 ng/ml (Sigma, Steinheim, Alemania), una dilución 1:1000 de una mezcla de lípidos (N.º de Cat. de Sigma L5146, Steinheim, Alemania) y quimera IL6RIL6 100 ng/ml.

(iii) **Medio CM6** - Ko-DMEM al 85 % (o DMEM al 85 %/F12, Biological Industries, Biet Haemek, Israel), complementado con reemplazo de suero (SR) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales y bFGF 4 ng/ml, interleucina 6 (IL6) 0,3 ng/ml y receptor soluble de IL6 0,5 ng/ml (ambos de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.) (todos productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

(iv) **"Quimera de IL6-receptor de IL-6 (IL6RIL6)"** - Ko-DMEM al 85 %, complementado con reemplazo de suero (SR) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml y 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml o 300 ng/ml de quimera IL6RIL6 (Chebath J, et al., 1997 y el documento WO 99/02552 de Revel M., et al. SEQ ID NO: 31) (todos productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Cuando se usa con 100 ng/ml de la quimera IL6RIL6, este medio también se llama CM100.

(v) **Medio de control** - Ko-DMEM al 85 %, complementado con reemplazo de suero (SR) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml (todos productos de Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

Capas de células alimentadoras o sistemas de cultivo sin células alimentadoras – Para someter a ensayo la capacidad de diversos medios de cultivo para soportar el crecimiento de hESC en un estado indiferenciado pero pluripotente, las hESC se transfirieron a varios sistemas de cultivo:

(i) **Sistema de cultivo sin células alimentadoras de fibronectina** - 50 µg por 10 cm² de placas cubiertas de fibronectina (fibronectina plasmática humana, Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.);

(ii) **Sistema de cultivo sin células alimentadoras Matrigel™** - Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.);

(iii) **MEF** - sistema de capas alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratones;

(iv) **Fibroblastos de prepucios** - Sistema de capa alimentadora de fibroblastos de prepucio.

Pases de hESC en capas alimentadora o sistemas de cultivo sin células alimentadoras – Se hicieron pases de las células cada cuatro a seis días usando colagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml (Worthington biochemical corporation,

Lakewood, NJ, EE.UU.). Las células se congelaron en nitrógeno líquido usando una solución de congelación que consistía en DMSO al 10 % (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.), suero humano al 40 % (HyClone, Utah, EE.UU.) y DMEM al 50 %/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel).

- 5 **Cultivo en suspensión** - Para examinar la posibilidad de usar el medio que contiene TGF β que está desprovisto de suero, reemplazo de suero y albúmina para el cultivo aumentable a escala de hESC en suspensión, se cultivaron hESC en suspensión en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en una densidad celular de 5×10^4 - 2×10^5 células/ml. El medio HA16 se complementó con F68 al 0,1 % (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.) para el cultivo suspendido. El medio de cultivo en el cultivo en suspensión se cambió a diario. Los medios básicos utilizados para cultivar hESC en suspensión (que pueden complementarse adicionalmente con el aditivo y los factores de crecimiento descritos anteriormente) fueron medio DMEM, ko-DMEM, DMEM/F12, MabADCB o NCTC.

- 15 **"Pases" de hESC en cultivo en suspensión** – Se hicieron pases de las células cada 5-7 días usando una incubación de 30-60 minutos con colagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml (Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.) o una incubación de 25 minutos con colagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml seguida de cinco minutos de incubación con dispasa 1 mg/ml (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.) y después se rompieron en grupos pequeños usando puntas de pipeta Gilson de 200 μ l. Como alternativa, se hicieron pases de las células mecánicamente usando agujas de 27 g.

- 20 Después del cultivo continuo en estas condiciones, las células se sometieron a ensayo para determinar las características de hESC.

- 25 **Análisis por RT PCR** - Se aisló el ARN total de hESC cultivadas durante 10-15 pases en el cultivo en suspensión usando Tri-Reagent (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc a partir de 1 μ g de ARN total usando RNasa H menos de transcriptasa inversa de MMLV (Promega, Madison WI, EE.UU.). Las reacciones de PCR incluyeron desnaturalización durante 5 minutos a 94 °C seguida de ciclos repetidos de 94 °C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos a una temperatura de hibridación como se especifica en la Tabla 1, a continuación, y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Los cebadores de PCR y las condiciones de reacción utilizadas se describen en la Tabla 1, a continuación. Los productos de la PCR se fraccionaron por tamaño usando electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se usaron marcadores de ADN para confirmar el tamaño de los fragmentos resultantes.

Tabla 1: Condiciones de RT-PCR

Producto génico (número de acceso)	Cebadores directos (D) e inversos (I) (SEQ ID NO:)	Condición de reacción	Tamaño (pb)
Oct-4 (S81255)	D: 5'-GAGAACAAATGAGAACCTTCAGGA (SEQ ID NO: 1) I: 5'-TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA (SEQ ID NO: 2)	30 ciclos a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	219
Albúmina (AF542069)	D: 5'-TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG (SEQ ID NO: 3) I: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGCCATCTCAT (SEQ ID NO: 4)	35 ciclos a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	302
α -fetoproteína (BC027881)	D: 5'-GCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAA (SEQ ID NO: 5) I: 5'-TCCCTGAAGAAAATTGGTTAAAT (SEQ ID NO: 6)	30 ciclos a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	216
NF-68KD (NFH (AY156690; X15307; X15309)	D: 5'-GAGTGAAATGGCACGATACCTATA (SEQ ID NO: 7) I: 5'-TTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC (SEQ ID NO: 8)	30 ciclos a 60 °C en MgCl ₂ 2 mM	473
α -actina cardíaca (NM_ 005159)	D: 5'-GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC (SEQ ID NO: 9) I: 5'-AGTGGTGACAAAG GAGTAGCCA (SEQ ID NO: 10)	35 ciclos a 65 °C en MgCl ₂ 2 mM	486
β -Actina (NM_001101)	D: 5'-ATCTGGCACCACACCTCTTACAATGAGCTGCG (SEQ ID NO: 11) I: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC (SEQ ID NO: 12)	35 ciclos a 62 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	838
Sox2 (Z31560)	5' CCCCCGGCGGCAATAGCA (SEQ ID NO: 13) 3' TCGGCGCCGGGGAGATACAT (SEQ ID NO: 14)	35 ciclos a 60 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	448
Rex1 (AF450454)	5' GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA (SEQ ID NO: 15) 3' CAGCATCCTAAACAGCTCGCAGAAT (SEQ ID NO: 16)	35 ciclos a 56 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	306
CX43 (NM_000165)	5' TACCATGCGACCACTGGTGCCT (SEQ ID NO: 17) 3' GAATTCTGGTTATCATCGGGGAA (SEQ ID NO: 18)	35 ciclos a 61 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	295
FGF4 (NM_002007)	5' CTACAACGCCTACGAGTCCTACA (SEQ ID NO: 19) 3' GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG (SEQ ID NO: 20)	35 ciclos a 52 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	370
Glucagón (X03991)	5' CTCAGTGATCCTGATCAGATGAACG (SEQ ID NO: 21) 3' AGTCCCTGGCGGCAAGATTATCAAG (SEQ ID NO: 22)	35 ciclos a 65 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	370

Producto génico (número de acceso)	Cebadores directos (D) e inversos (I) (SEQ ID NO:)	Condición de reacción	Tamaño (pb)
β-globulina (V00499)	5' ACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCAGTCTGC (SEQ ID NO: 23) 3' TAGCCACACCACCACACC (SEQ ID NO: 24)	35 ciclos a 65 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	410
Flkl (NM_002253)	5' ATGCACGGCATCTGGGAATC (SEQ ID NO: 25) 3' GCTACTGTCCTGCAAGTTGCTGTC (SEQ ID NO: 26)	35 ciclos a 65 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	537
AC133 (NM_006017)	5' CAGTCTGACCAGCAGCGTGAAAA (SEQ ID NO: 27) 3' GGCCATCCAAATCTGTCCTA (SEQ ID NO: 28)	Ciclos: 65 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	200
Nanog (NG_00 AC)	5' ACTAACATGAGTGTGGATCC (SEQ ID NO:29) 3' TCATCTTCACACGTCTTCAG (SEQ ID NO: 30)	35 ciclos a 61 °C en MgCl ₂ 1,5 mM	800

Tabla 1: Se proporcionan cebadores de RT-PCR y condiciones de PCR junto con los números de acceso de GenBank de los transcritos amplificados.

- 5 **Inmunohistoquímica** - Las hESC indiferenciadas cultivadas en el sistema de cultivo sometido a ensayo se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se expusieron a los anticuerpos primarios (1:50) durante la noche a 4 °C. Se usaron antígeno embrionario específico de etapa (SSEA) 1, 3 y 4 (Hybridoma Bank, Iowa, EE.UU.), antígeno de reconocimiento de tumores (TRA) 1-60 y TRA1-81 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.) y Oct 4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) como anticuerpos primarios. Se usaron anticuerpos conjugados con Cys 3 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.) como anticuerpos secundarios (dilución 1:200).

- 10 **Análisis de cariotipo** - El análisis de cariotipo (bandas G) se realizó en al menos 20 células de cada muestra, dos muestras por ensayo, como se ha descrito anteriormente [Amit et al, 2003]. Los cariotipos se analizaron y publicaron de acuerdo con el "Sistema internacional para la nomenclatura citogenética humana" (ISCN, por sus siglas en inglés).

- 15 **Formación de EB a partir de hESC cultivadas en suspensión** - Para la formación de EB, se transfirieron de una a tres placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania) que contenían ESC en cultivos en suspensión a nuevas placas de Petri de 58 mm que contenían medio de diferenciación de EB que consistía en DMEM al 80 %/F12 (Biological Industries Beit Haemek, Israel), complementado con FBSd al 20 % (HyClone, Utah, EE.UU.) y L-glutamina 1 mM (Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Como alternativa, antes de su transferencia al medio de diferenciación de EB, las ESC se sometieron a tratamiento con colagenasa de tipo IV 1 mg/ml y se dividieron en grupos pequeños usando puntas de pipeta Gilson de 1000 µl. Se recogieron EB de 10 días de edad para el aislamiento de ARN y el examen histológico.

- 20 **Formación de EB a partir de hESC cultivadas en 2-D (sin células alimentadoras o capas alimentadora)** - Para la formación de EB, se usaron tres pocillos confluentes en una placa de seis pocillos (30 cm²). Las ESC se retiraron de su placa de cultivo usando colagenasa de tipo IV 1 mg/ml, se dividieron en grupos pequeños usando puntas de pipeta Gilson de 1000 µl y se cultivaron en suspensión en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Los EB se cultivaron en medio de diferenciación que consistía en DMEM al 80 %/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), complementado con FBSd al 20 % (HyClone, Utah, EE.UU.) y L-glutamina 1 mM (Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.).

- 25 **Formación de teratomas** - Para la formación de teratomas, se inyectaron células cultivadas en los métodos de cultivo ofrecidos durante más de 15 pases en el músculo de la pata trasera de ratones SCID-beige machos de 4 semanas de edad (dos ratones para cada sistema de cultivo sometido a ensayo). Los números de células oscilaron entre 5 x 10⁶ células y 10⁷ células por inyección. De tres a ocho a 12 semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y los teratomas resultantes se examinaron histológicamente.

- 30 **Derivación de nuevas estirpes de hESC en un cultivo en suspensión con el medio que contiene TGFβ desprovisto de suero, reemplazo de suero y albúmina**

- 35 **Cultivo de blastocistos** - Se donaron cigotos por parejas sometidas a un diagnóstico genético preimplantacional (PGD) o fertilización *in vitro* (FIV) en Cornell Medical College, NY, que firmaron los formularios de consentimiento informado. Las parejas se sometieron al procedimiento tradicional de FIV después de la estimulación ovárica con gonadotropinas y la recuperación de ovocitos. Los cigotos se cultivaron hasta la etapa de blastocisto de acuerdo con el protocolo de laboratorio convencional de FIV: con aceite usando medios C1/C2 especializados para la inseminación, el crecimiento y el desarrollo de blastocistos (Cornell).

- 40 **Derivación de estirpes de hESC en un cultivo en suspensión** - Después de la retirada de la zona pelúcida usando una solución ácida de Tyrode (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.), la capa de trofoblasto se retira específicamente mediante inmunocirugía o mecánicamente con agujas de 27 g. La ICM expuesta se cultiva adicionalmente en cultivo en suspensión con un medio de cultivo adecuado (por ejemplo, el CM100F, HA16 o D2)

durante 4-10 días. Inicialmente, las células se dividen mecánicamente con agujas de 27 g.

Derivación de estirpes de hESC en fibroblastos de prepucio - Después de la digestión de la zona pelúcida mediante solución ácida de Tyrode (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.) o su retirada mecánica, los blastocistos expuestos se colocaron en su totalidad en una capa alimentadora de fibroblastos de prepucio mitóticamente inactivados (estirpe F21 que se cultivó en un medio sin componentes animales desde su derivación hasta su uso). Para la derivación y los pases iniciales, las células se cultivaron en el medio de cultivo D2 o HA16. Se hicieron pases de las células inicialmente de forma mecánica cada cuatro a diez días.

Ejemplo 1

CULTIVO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN SISTEMAS DE CULTIVO SIN ALIMENTACIÓN CON UN MEDIO QUE CONTIENE ISOFORMAS DE TGF-BETA Y QUE ESTÁN DESPROVISTOS DE SUERO, REEMPLAZO DE SUERO Y ALBÚMINA

Resultados experimentales

En este estudio, se examinó la capacidad de algunas combinaciones de medios, HA16, HA1, D1 y CM100 para apoyar el cultivo indiferenciado y prolongado de hESC en diferentes condiciones de cultivo. El medio básico, D1 o D2, es un diseño de medio comercial con fines industriales y clínicos para el cultivo de hibridomas en suspensión. El medio es sin componentes animales, productos séricos y proteínas. HA16 y HA19 se basan únicamente en materiales definidos. El medio CM100 contiene la químera IL6RIL6 y reemplazo de suero.

Se examinó el efecto de dos isoformas de TGF β , TGF β_1 y TGF β_3 , en el apoyo del cultivo indiferenciado de hESC. Inicialmente, se usaron dos medidas para estimar la capacidad de las hESC para crecer en varios sistemas de cultivo, en concreto, el porcentaje de diferenciación y la tasa de crecimiento. El sistema de cultivo utilizado fue: (1) método sin capa alimentadora basado en fibronectina o *Matrigel*TM, que son las matrices más utilizadas; (2) MEF y (3) fibroblasto de prepucio. Basándose en estos dos parámetros, se descubrió que los medios complementados con TGF β_3 , D2, HA16 y HA19, eran los más adecuados para soportar la proliferación de hESC indiferenciadas en todos los métodos de cultivo sometidos a ensayo. El medio de cultivo complementado con bFGF 10 ng/ml solo, no pudo soportar el cultivo prolongado de hESC, en ninguna de las condiciones de cultivo sometidas a ensayo. Aunque el 60 % de las hESC permanecieron en la etapa indiferenciada en estas condiciones durante unos pocos pases, la tasa de proliferación fue baja y con cada pase el número de hESC supervivientes disminuyó y el porcentaje de diferenciación de fondo aumentó.

El medio D1 en un sistema sin capa alimentadora es capaz de mantener todas las características de la hESC junto con una alta tasa de proliferación - Cuando se cultivaron en los sistemas sin capa alimentadora en presencia del medio D1, que se complementó con TGF β_1 , las hESC mantuvieron todas las características de hESC incluyendo altas tasas de proliferación. Cuando se cultivaron en las capas alimentadora sometidas a ensayo en presencia del medio D1, las hESC mostraron una tasa de diferenciación de fondo relativamente alta del 20 % y una baja capacidad de proliferación en comparación con las hESC cultivadas en los mismos sistemas de capas alimentadora con el medio D2 HA19 o HA16.

Los medios D1, D2 y HA16 en la capa sin células alimentadoras son capaces de mantener las hESC en un estado proliferativo, indiferenciado, con estabilidad cromosómica y pluripotencia - Se cultivaron de forma continua ESC humanas cultivadas en presencia del medio D1, D2 o HA16 en condiciones sin capa alimentadora durante hasta 53, 24 o 10 pases, respectivamente, mientras mantenían sus características de ESC, incluida la proliferación indiferenciada, la estabilidad cromosómica (como se sometió a ensayo por análisis de cariotipo, no mostrado) y la pluripotencia. Se descubrió que las tasas de diferenciación de fondo eran inferiores al 10 %, lo que es similar a las tasas de diferenciación que se producen cuando las hESC se cultivan en el sistema de cultivo tradicional basado en MEF como capa alimentadora y medio complementado con reemplazo de suero y bFGF 4 ng/ml [Amit et al, 2000]. En las figuras 1a-d se ilustran ejemplos de colonias indiferenciadas cultivadas con medio D1, D2 o HA16 en condiciones sin la capa alimentadora y con el medio D2 o HA16 con las capas alimentadora sometidas a ensayo.

Las hESC cultivadas en sistemas sin capas alimentadora en presencia del medio D1 o D2 están desprovistas de células autoalimentadoras - De forma interesante, cuando las hESC se cultivaron en el medio D1 o D2 en el sistema sin capas alimentadora, las células no se diferenciaron en la periferia de las colonias y no formaron un crecimiento de células similares a alimentadoras (también denominadas "autoalimentadoras") (figura 1d), como se describe en otros informes acerca de métodos de cultivo sin capas alimentadora para hESC (Xu et al, 2001). No se pudieron observar diferencias morfológicas entre las colonias que crecieron en el sistema de cultivo sin capa alimentadora y las que crecieron con capas alimentadora (figuras 1a-d). En consecuencia, las características morfológicas se mantuvieron sin cambios en el nivel de una sola célula, volviendo las células pequeñas y redondas y presentando una alta relación de núcleo a citoplasma, con una presencia notable de uno a tres nucleolos y un espaciamiento típico entre las células (figuras 1a-d).

Los medios D1, D2 o HA16 son capaces de mantener las hESC con una duplicación de la población normal -

Similares a las células cultivadas en MEF, se hicieron pases de las células cultivadas con medio D2 o HA16 en todos los métodos de cultivo sometidos a ensayo y el medio D1 en los sistemas sin capa alimentadora, de forma habitual cada cuatro a seis días, en la misma relación de 1/2 o 1/3, lo que indica un tiempo de duplicación de la población similar a la de las hESC cultivadas en MEF. Los pases de las células se hicieron con la misma eficiencia de siembra de aproximadamente 1 millón de células por 10 cm², con la misma tasa de viabilidad de más del 95 %. Usando suero humano al 40 % y DMSO al 10 %, las células se congelaron y descongelaron satisfactoriamente.

El análisis de cariotipo reveló el cariotipo normal de las hESC cultivadas con los medios D1, D2, CM100 o

HA16 –15 pases y más después de transferir las células a los entornos sometidos a ensayo, se realizó un análisis de cariotipo mediante bandas Giemsa en dos cultivos separados, que representan las cuatro condiciones del medio, D1, D2, CM100 y HA16 en los diferentes métodos de cultivo. Se sometieron a ensayo al menos 20 células de cada muestra, 40 células de cada combinación de medio. Se descubrió que todas las células sometidas a ensayo mantuvieron un cariotipo normal de 46, XX para las estirpes celulares 13 y 14 y 46, XY para la estirpe celular I6 (datos no mostrados). En general, estos resultados sugieren que el cariotipo de las células permanece estable en las condiciones sometidas a ensayo, de manera similar a las ESC cultivadas con MEF usando métodos tradicionales (Amit et al, 2000).

Las hESC cultivadas con D1, D2 o HA16 expresan marcadores típicos de la superficie celular –

Se examinaron varios marcadores superficie típicos de células ES indiferenciadas de primates usando tinción inmunofluorescente (Thomson et al, 1995, 1996, 1998). Se observó que las hESC cultivadas con el medio D1, D2 o HA16 durante más de 20 pases, mientras se usaban las condiciones de cultivo sometidas a ensayo, eran muy positivas para los marcadores de superficie TRA-1-60 (figura 2a), SSEA4 (figura 2b), TRA-1-81 (figura 2c) y Oct 4 (datos no mostrados). Como en otras células ES de primate, la tinción con SSEA3 fue débil y negativa para SSEA1 (datos no mostrados).

Las hESC cultivadas con el medio D1, D2 o HA16 son pluripotentes según se sometió a ensayo mediante la formación de EB in vitro -

El potencial de desarrollo de las células después del cultivo prolongado en los métodos de cultivo sometidos a ensayo se examinó *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrioides (EB). Después de más de 15, 20 y 30 pases en el medio D1, D2 y HA16, respectivamente, las hESC formaron EB similares a los creados por las hESC cultivadas en MEF (no mostradas). Dentro de estos EB, las células madre se diferenciaron en tipos de células representativas de las tres capas germinales embrionarias como se describe para los EB formados a partir de las hESC cultivadas en otros sistemas de cultivo (Itskovitz-Eldor et al, 2000).

Los EB formados a partir de las hESC cultivadas en el medio D1, D2 o HA16 son capaces de diferenciarse en los linajes de células de ectodermo, endodermo y mesodermo -

Mientras que las células indiferenciadas cultivadas en el medio sometido a ensayo, capas alimentadora y matrices, expresaron marcadores genéticos indiferenciados tales como Oct 4, Nanog, Sox2, Rex1, Cx43 y FGF4 (no mostrado) [Bhattacharya et al, 2004], las células recogidas de EB de 10 días de edad expresaron genes tales como la albúmina y el glucagón (endodermo), α -actina cardíaca, β -globulina y *Fli1* (mesodermo) y AC133 y neurofilamento (ectodermo) como se demostró mediante el análisis por RT-PCR (datos no mostrados).

Las hESC cultivadas con el medio D1, D2 o HA16 son pluripotentes según se somete a ensayo mediante la formación de teratomas in vivo -

La pluripotencia de las células también se sometió a ensayo in vivo mediante formación de teratomas. Las hESC cultivadas durante más de 12 pases en el medio HA16, D1 o D2, en los sistemas de cultivo sometidos a ensayo formaron teratomas después de su inyección en ratones SCID-Beige. Dentro de estos teratomas, las hESC se diferenciaron en tejidos representativos de las tres capas germinales embrionarias, incluyendo: cartílago, músculo, hueso y grasa (mesodermo), epitelio estratificado, melanina que contiene epitelio (ectodermo) y estructura tipo riñón (endodermo y mesodermo) y epitelio de origen endodérmico (datos no mostrados). Las tasas de formación de teratomas del 90 % y el número de células inyectadas fueron idénticos a los mostrados por las células cultivadas usando métodos tradicionales (Amit et al, 2000).

Los medios HA16 y D2 son adecuados para la derivación de la estirpe hESC en capas alimentadora de fibroblastos de prepucio en un sistema completo sin xenógenos -

Las combinaciones de medios de la presente divulgación también se sometieron a ensayo para determinar la capacidad para soportar la derivación de la estirpe hESC. Usando el medio HA16 o D2 sobre fibroblastos de prepucio como capa de soporte, derivaron satisfactoriamente nuevas estirpes de hESC y se mantuvieron durante al menos 2 pases (en presencia del medio D2) o al menos 18 pases (en presencia del medio HA16). La estirpe hESC derivada en prepucio en presencia del medio de cultivo HA16 mostró la morfología de las células madre en la etapa 18 (y el cultivo aún está en curso), el cariotipo XY normal y la pluripotencia como lo demuestra la formación de EB (figuras 3a-b y datos no mostrados). Las tasas de crecimiento y éxito fueron similares a las obtenidas usando los métodos de cultivo tradicionales. Puesto que la estirpe de fibroblastos de prepucio utilizada, F21, se derivó sin ningún producto animal, estas nuevas estirpes de hESC se derivaron en condiciones completas sin xenógenos. Por tanto, las nuevas estirpes de hESC presentan tasas típicas de morfología y proliferación de hESC, cariotipo normal y pluripotencia como lo demuestra la formación de EB.

En conjunto, estos resultados muestran que las células hESC sometidas a un cultivo prolongado en los sistemas de cultivo sometidos a ensayo mostraron todas las características de las hESC, incluyendo: pluripotencia, estabilidad cromosómica, expresión de genes específicos y marcadores de superficie y proliferación indefinida como células indiferenciadas.

Ejemplo 2

EL MEDIO DE CULTIVO QUE CONTIENE TGFβ O IL6RIL6 ES CAPAZ DE SOPORTAR EL CULTIVO DE hESC EN SUSPENSIÓN CELULAR

Puesto que el nuevo medio de cultivo que contiene TGFβ que se describe en el Ejemplo 1, anteriormente en el presente documento, está diseñado para el cultivo de células masivo (bajo contenido de proteínas), adecuado para la producción celular con fines industriales y clínicos, se examinó la capacidad de los medios D1, D2, HA19 y HA16 para soportar el cultivo en suspensión de hESC indiferenciadas. Además, también se examinó la capacidad de un medio que contiene la quimera IL6RIL6, tal como el medio CM100F o HACM100 (como se describe en los Materiales generales y métodos experimentales) para soportar un cultivo en suspensión de hESC. Cabe señalar que, si bien el medio CM100F contiene reemplazo de suero, el medio HACM100 no tiene reemplazo de suero o suero y, por tanto, presenta un cultivo bien definido, medio de cultivo sin xenógenos.

Resultados experimentales

Los medios CM100F, HA16, D1, D2 y HA19 son adecuados para cultivar hESC en suspensión - Se cultivaron hESC en suspensión usando los tipos de medios que contienen TGFβ recientemente desarrollados desprovistos de suero, reemplazo de suero y albúmina. Hasta la fecha, el mayor número de pases de hESC cultivadas en suspensión en los tipos de medio sometidos a ensayo fueron 3 pases en el medio D1, 7 pases en el medio D2, 10 pases en el medio HA19 y 17 pases en el medio CM100F. Todos las hESC mostraron una morfología indiferenciada en estos pases y pueden cultivarse adicionalmente en estos medios y mantener las características de las hESC. Las secciones histológicas de los grupos de hESC formados en los cultivos en suspensión ilustraron una población de células homogéneas, de células redondas con núcleo grande (figuras 5a-g). Además, cuando las células se colocaron en placas de MEF, crearon colonias con la morfología típica de hESC (figuras 5b-e) y si se devolvieron a los cultivos en suspensión, continuaron la proliferación como células indiferenciadas (datos no mostrados). Cuando se cultivaron hESC en un cultivo en suspensión en presencia de suero o medio sin reemplazo de suero, HACM100 que contenía IL6RIL6, las células se expandieron y se mantuvieron en estado indiferenciado durante al menos 1-2 pases (datos no mostrados).

Las hESC cultivadas en suspensión en presencia de los medios D1, D2, HA19 o CM100F expresan marcadores de hESC indiferenciadas - Las células cultivadas en suspensión en presencia del medio D2 durante 3 pases como grupos pequeños de 200-1500 células expresaron marcadores de células madre tales como Oct 4 (figura 4a), TRA-1-60 (figura 4b), TRA-1-81 (figura 4c) y SSEA4 (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares con el medio CM100F, D1 o D2 en el pase 5 (p-5) (datos no mostrados). Cuando se cultivaron en cultivo en suspensión en presencia del medio CM100F o HA19, las células expresaron altos niveles de marcadores de células madre típicos tales como Oct 4 (figura 6a), Rex1 (figura 6b), Sox2 (figura 6c), Nanog (figura 6d) y FGF4 (datos no mostrados) como se demostró mediante análisis por RT-PCR.

Las ESC cultivadas en suspensión son capaces de formar EB - Cuando se retiran del medio D1, D2 o HA16 y se transfieren a medio de EB (DMEM al 80 %/F12 complementado con FBSd al 20 % y L-glutamina 1 mM), las células formaron EB que contenían tejidos representativos de tres capas germinales embrionarias (como lo muestra el análisis histológico, datos no mostrados).

Las ESC de macaco también pueden cultivarse en los cultivos en suspensión de la presente divulgación - Se obtuvieron resultados similares con ESC de macaco (células madre embrionarias de mono, estirpe R366.4, Universidad de Wisconsin, centro de primates, Thomson Lab, Madison, Wisconsin), que se consideran buenas candidatas para el modelo transgénico para enfermedades humanas, cuando las ESC de macaco se cultivaron en suspensión en los medios de cultivo que contenían TGFβ HA16, D1 y D2 (datos no mostrados).

Por tanto, el nuevo medio que contiene TGFβ, que está desprovisto de suero, reemplazo de suero y albúmina, o el medio que contiene IL6RIL6 es capaz de soportar el cultivo indiferenciado de hESC, al tiempo que mantiene las características de hESC y proporciona métodos para el cultivo masivo de estas células con fines industriales y clínicos.

Análisis y discusión

Las hESC, como las células ES de ratón, se cultivan tradicionalmente con MEF, que pueden exponerlos a patógenos animales. En este estudio, los presentes inventores han mostrado, por primera vez, un sistema de cultivo sin componentes animales, suero ni capa alimentadora para hESC, basado en el uso de medio comercial complementado ya sea con TGFβ₃ o TGFβ₁ y bFGF y matriz de fibronectina humana como sustituto. Este medio

está diseñado para el cultivo masivo de células en GMP con fines industriales o clínicos. Todos los tipos de medios de la presente divulgación (con TGFβ₃ o TGFβ₁) soportan el cultivo de hESC. Cuando se usa el medio de cultivo con isoforma 3 de TGFβ, los resultados son mejores; menos diferenciación de fondo. Todos los tipos de medios de la presente divulgación apoyan el cultivo con células alimentadoras tan bien como con los medios normales que contienen suero. Las células conservaron las mismas tasas de proliferación y los mismos porcentajes de diferenciación de fondo que las hESC cultivadas con MEF usando métodos de cultivo tradicionales. Además, el medio también puede usarse para el cultivo masivo en suspensión de hESC indiferenciadas.

Se sometieron a ensayo dos isoformas de TGFβ, TGFβ₃ y TGFβ₁ para determinar su capacidad para mantener hESC en un estado indiferenciado usando diversas condiciones de cultivo. Se descubrió que TGFβ₃ (medio D2 y HA16) es el complemento de medio más adecuado, soportando el cultivo indiferenciado de hESC usando al mismo tiempo todas las posibilidades de cultivo sometidas a ensayo. Todos las hESC, de tres estirpes celulares diferentes, continuaron proliferando conservando al mismo tiempo las características normales de hESC a lo largo del cultivo prolongado. Se demostró que el medio complementado con TGFβ₁ (Medio D1), por el contrario, soporta el cultivo de hESC indiferenciadas solo cuando se usan sistemas de cultivo sin capa alimentadora.

Las células cultivadas mientras se usaban estos medios (D1, D2 y HA16) mantuvieron todas las características de las ESC. Después de un cultivo prolongado de más de 20 pases, las células permanecieron indiferenciadas, como lo demuestran la morfología de las colonias y las células individuales y la expresión de marcadores típicos de ESC de primates indiferenciadas [Thomson et al, 1995, 1996, 1998; Reubinoff et al, 2000]. Además, aunque se cultivaron en estas condiciones, las hESC expresaron marcadores específicos para la etapa indiferenciada tales como Oct 4, Sox 2, Rex1 y Nanog, como se demostró mediante RT-PCR.

El análisis de cariotipo realizado en muestras de células representativas mostró que el cariotipo de hESC se mantuvo estable en las condiciones propuestas. Ninguna de las células examinadas presentó anomalías de cariotipo.

La pluripotencia de las células se examinó *in vitro*. Las células cultivadas en los sistemas de cultivo sometidos a ensayo durante más de 10 pases formaron EB similares a los creados cuando se cultivaron en MEF [Itskovitz-Eldor et al, 2000]. El análisis por RT-PCR mostró que las células dentro de estos EB se diferenciaban en diferentes tipos de células representativas de las tres capas germinales. Además, después de su inyección en ratones SCID-Beige, las hESC cultivadas en presencia de los medios D1 y D2 formaron teratomas que contenían una multitud de tipos de tejidos. Las hESC cultivadas en presencia del medio HA16 también formaron teratomas y su evaluación histológica está en proceso. Las tasas de formación de teratoma fueron idénticas a las de las células cultivadas con MEF. Por tanto, la pluripotencia del cultivo de células de forma continua en los métodos de cultivo sometidos a ensayo se mantuvo intacta.

Adicionalmente, y de forma más importante, se usaron las mismas medidas para caracterizar las células cultivadas con los medios D1, D2 y HA16 en suspensión. El cultivo celular en estas condiciones durante más de 7 pases presentó marcadores indiferenciados y cuando se transfirió a condiciones que promovían la diferenciación, mostró pluripotencia. Por tanto, estos medios pueden permitir el cultivo masivo de hESC indiferenciadas y facilitar el desarrollo de bioprocesos de control en biorreactores industriales.

Estos resultados muestran que las hESC pueden mantenerse como células indiferenciadas en la combinación propuesta de medio sin componentes animales y sin suero definido, sin ninguna célula alimentadora (D1, D2 y HA16) o, como alternativa, con capas alimentadora aceptables habitualmente utilizadas (D2 y HA16). Por tanto, estos medios pueden facilitar el cultivo de hESC con fines de investigación, industriales y clínicos. Además, se descubrió que estos nuevos medios de cultivo soportan el cultivo suspendido de hESC indiferenciadas, la primera y principal etapa en el desarrollo de un sistema de cultivo masivo para su crecimiento y aumento a escala, una etapa crucial para cualquier uso industrial y clínico.

El mecanismo por el cual las hESC se mantienen a sí mismos todavía no está claro. La acumulación de datos sugiere la implicación de los miembros de la familia TGFβ en la renovación de hESC [Amit et al, 2004; Ludwig et al, 2006; James et al, 2005; Chen et al, 2006, Valdimarsdottir y Mummery, 2006]. Se requiere investigación complementaria adicional para explicar los mecanismos de acción subyacentes de TGFβ a nivel de transducción de señales y el hecho de que TGFβ₃ sea más potente que TGFβ₁.

Los usos clínicos futuros de hESC requerirán un sistema de cultivo reproducible, bien definido y sin xenógenos. El método de cultivo descrito en este estudio que usa fibronectina como matriz sin células alimentadoras y medio D1, D2 o HA16 y fibroblasto de prepucio satisface estas necesidades. Los medios bien definidos mostrados en el presente estudio son adecuados para el cultivo de hESC y pueden ser ventajosos para realizar investigaciones acerca de los mecanismos de mantenimiento de las ESC, especialmente de las posibles funciones de la vía TGFβ. Otros estudios que utilizan hESC, tales como la investigación acerca de vías y mecanismos de diferenciación, se beneficiarán de la disponibilidad de un sistema de cultivo reproducible y bien definido.

Por tanto, la presente divulgación divulga por primera vez:

1. Un sistema de cultivo que permite el cultivo de hESC en suspensión como indiferenciadas sin transportador.
2. Un sistema de cultivo aumentable a escala, adecuado para el desarrollo de bioprocesos de control en biorreactores industriales.
3. Un sistema sin xenógenos adecuado tanto para el cultivo como para la derivación de hESC. Derivación de nuevas estirpes de hESC directamente en suspensión.
4. Tres combinaciones de medios definidas, altamente eficaces para soportar el cultivo de hESC en una diversidad de condiciones de cultivo. Prioridad de TGFβ₃ sobre TGFβ. Nunca se ha demostrado que TGFβ₃ promueva la auto-renovación de las células madre.

Ejemplo 3

CULTIVO PROLONGADO DE CÉLULAS HUMANAS INDIFERENCIADAS PLURIPOTENTES EN SUSPENSIÓN EN PRESENCIA DE LA QUIMERA IL6RIL6

Materiales y métodos experimentales

Cultivos de hESC

Se cultivaron estirpes de hESC I-3, I-4 e I-6 [Amit & Itskovitz-Eldor, 2002] con MEF inactivado durante 54-89 pases como se ha descrito anteriormente [Amit et al, 2000]. Las siguientes combinaciones de medios de cultivo se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para soportar el cultivo en suspensión de hESC:

Medio de cultivo básico - que consistía en DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), que contenía reemplazo de suero (SR) al 15 % inactivado, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales y bFGF 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Este medio de cultivo básico se usó para el cultivo habitual de hESC en cultivos 2D con MEF como control.

Medio CM100F - que consistía en el medio de cultivo básico complementado con quimera IL6RIL6 100 ng/ml [Chebath J, et al., 1997 y documento WO 99/02552 de Revel M., et al. SEQ ID NO: 31].

Medio CM6* - que consistía en el medio de cultivo básico con IL6 100 ng/ml y receptor soluble de IL6 0,5 ng/ml (ambos de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.).

Medio CMLIF - que consistía en el cultivo básico complementado con 1000 unidades/ml de factor inhibidor de leucemia recombinante humano (LIF) (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.).

Cultivo en cultivo en suspensión no dinámico (estático) - Las hESC se retiraron de su placa de cultivo usando collagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml (Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.) y se rompieron en grupos pequeños usando puntas de pipeta Gilson de 200 µl y se cultivaron en suspensión en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en una densidad celular de 1×10^5 - 5×10^6 células/placa. El medio en el cultivo en suspensión se cambió a diario y se hicieron pases de las células cada 5-7 días, ya sea mediante corte manual usando agujas de 27 g o mediante pipeteado suave usando puntas de pipeta Gilson de 20 µl.

Cultivo en Erlenmeyer (cultivo en suspensión dinámico) - Las células cultivadas en suspensión durante al menos un pase se transfirieron a un Erlenmeyer de 125 ml (Corning Incorporated, Corning NY, EE.UU.) en 25 ml de medio CM100F y se agitaron de forma continua a 90 rpm usando un agitador (S3.02.10L, ELMi Ltd, Riga, Letonia). El medio se cambió a diario. Cada 5-7 días, los grupos se rompieron con un suave pipeteado y se dividieron en una relación de 1:2.

Inmunohistoquímica - Las hESC indiferenciadas cultivadas en suspensión o re-cultivadas en MEF y las células diferenciadas disociadas usando tripsina-EDTA de EB de 10 días se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se expusieron al anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Se usaron anticuerpos conjugados con Cys 3 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.) como anticuerpos secundarios (1:200). Los anticuerpos primarios (1:50) incluyen antígeno embrionario específico de etapa (SSEA) 1, 3 y 4 (Hybridoma Bank, Iowa, EE.UU.), antígeno de reconocimiento de tumores (TRA) 1-60 y TRA1-81 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.), Oct 4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), Tubulina (Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.), Troponina (Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.), PSA-NCAM (Chemicon International, Temecula, CA, USA).

Análisis del cariotipo - Se realizó un análisis del cariotipo (bandas G) en al menos 10 células de cada muestra, dos muestras por ensayo, como se ha descrito anteriormente [Amit et al, 2003]. Los cariotipos se analizaron y se publicaron de acuerdo con el "Sistema internacional para la nomenclatura citogenética humana" (ISCN, por sus siglas en inglés).

Formación de EB - Para la formación de EB, se hicieron pases de las hESC como se ha descrito y se transfirieron a placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Las EB se cultivaron en un medio que consistía en DMEM al 80 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), complementado con FBSd al 10 % (HyClone, Utah, EE.UU.), reemplazo de suero (SR) al 10 %, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM y solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales (Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Se recogieron EB de 10-14 días para aislamiento del ARN y el examen histológico. Para la tinción, se colocaron en gelatina y se cultivaron durante 7-14 días adicionales. Para el análisis histológico, los EB se fijaron en formol tamponado neutro al 10 %, se deshidrataron en alcohol graduado (70 %-100 %) y se incluyeron en parafina. Las

secciones de 1-5 µm se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E).

RT PCR - Se aisló el ARN total de las hESC cultivadas durante 10, 15 y 20 pases en suspensión y de los EB de 10-14 días de edad formados a partir de células cultivadas en suspensión o células cultivadas en MEF) usando Tri-Reagent (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total usando RNasa H menos de transcriptasa inversa de MMLV (Promega, Madison WI, EE.UU.). Las reacciones de PCR incluyeron desnaturalización durante 5 minutos a 94 °C seguida de ciclos repetidos de 94 °C durante 30 segundos, hibridación a una temperatura de hibridación (como se muestra en la Tabla 1) durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Los cebadores de PCR y las condiciones de reacción fueron las que se han descrito en la Tabla 1 anteriormente en el presente documento, excepto porque se realizaron 30 ciclos de amplificaciones para los productos de PCR Nanog, Rex1, FGF4 y Sox2. Los productos de la PCR se fraccionaron por tamaño usando electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se usaron marcadores de ADN para confirmar el tamaño de los fragmentos resultantes.

PCR en tiempo real - Se aisló ARN de células indiferenciadas cultivadas en MEF y de células cultivadas en suspensión durante 10, 15 y 20 pases de forma continua. El ADNc de la primera cadena se sintetizó como se ha descrito anteriormente (RT-PCR). Se usaron mezcla de PCR TaqMan Universal PCR Master Mix y sondas de expresión Assay-on-Demand Agene Expression Probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para Oct4 y β-actina de acuerdo con las directrices del fabricante. La reacción se realizó con el sistema de detección de secuencias de ADN Applied Biosystems 7000 DNA Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión relativa de Oct4 se normalizó con respecto a la expresión de β-actina para la misma muestra. El ADNc de células cultivadas en MEF se usó como calibrador y la expresión relativa de Oct4 se calculó en consecuencia usando el método de curva patrón descrito por el fabricante. Se realizaron tres repeticiones biológicas para cada muestra.

Citometría de flujo - Los grupos de hESC cultivadas en suspensión se disociaron en células individuales usando triple-Express (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE.UU.). Las células se tiñeron con Ab anti-h/mSSEA4 conjugado con ficoeritrina, se usó IgG2B de rata conjugada con ficoeritrina como control de isotipo [ambos de R&D systems, Minneapolis, MN, EE.UU.]. Después, las células teñidas se analizaron con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.) usando el software CellQuest de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Formación de teratoma - Se recogieron células de cuatro a seis placas de 58 mm y se inyectaron en los músculos de las extremidades posteriores de un macho de cuatro semanas de edad con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés). Diez semanas después de la inyección, los teratomas resultantes se recogieron y se prepararon para el análisis histológico usando el mismo método mencionado para los EB.

Análisis por transferencia Western - Los sedimentos celulares se lisaron usando tampón RIPA (Roche diagnostics, Penzberg, Alemania) complementado con un cóctel inhibidor de fosfatasa (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.). Se extrajeron proteínas de 13 ESC cultivadas en suspensión durante 29 pases, de células cultivadas solo en MEF, de células que se cultivaron en suspensión durante 10 pases y después se volvieron a cultivar en MEF y de células del experimento del grupo activador. La proteína total se midió mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis por transferencia Western, las proteínas se separaron en una electroforesis en mini gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida (SDS-page) con gradiente del 6-10 % (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Después de 1,5 horas de bloqueo en leche desnatada al 5 % (Nestlé, Suiza), la membrana se incubó con anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente para β-actina (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.) y toda la noche a 4 °C para gp-130, p-STAT-3 y STAT-3 (todos de Sigma, San Luis, MO, EE.UU.). La membrana se lavó tres veces con Tween-TBS (T-TBS) durante 10 minutos, después se incubó durante 1 hora con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno research, Baltimore, PA, EE.UU.), seguido de incubación durante 3 minutos con sustrato quimioluminiscente HRP (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). La detección se realizó mediante el análisis por transferencia Western ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU.) y se visualizó mediante ImageMaster VDS-CL (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, Inglaterra).

Experimentos de activación - Cuarenta y ocho horas después de la división, las células cultivadas en suspensión se transfirieron al medio de cultivo (control; medio de cultivo básico) sin la adición de la quimera IL6RIL6. 24 horas después, se añadió la quimera (en una concentración de 100 ng/ml) al medio de cultivo y las células se recogieron inmediatamente, después de 30 minutos, después de 3 horas y después de 24 horas. Las células que se cultivaron de forma continua con la quimera IL6RIL6 se usaron como control.

Análisis de apoptosis - Se examinaron los niveles de apoptosis mediante el kit de detección de muerte celular *in situ* (In Situ Cell Death Detection Kit), AP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en los días 2º, 4º, 6º, 8º, 10º y 14º de crecimiento continuo sin división. Las células apoptóticas se detectaron mediante incubación durante 3 minutos con Tripsina-EDTA (10x) (Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.) de 1 ml de células por sedimento, tratamiento con 4 ml de solución de Hank y fijación en el portaobjetos seco de las células individuales antes de usar el kit. Las células apoptóticas se contaron mediante microscopía fluorescente Zeiss Axiovert 200 invertida. Al mismo tiempo, se recogieron muestras de células del mismo cultivo, se rompieron con tripsina usando el mismo método y se tiñeron con azul de tripano para evaluar el número de células viables. Las células se contaron con el microscopio Zeiss Axiovert 200 invertido.

Bloqueo de los experimentos con el receptor gp130 - Se cultivaron células en suspensión con medio CM100F. Se añadieron concentraciones crecientes de anticuerpos anti-gp130 (Santa Cruz Biotechnology, Santa

Cruz, CA, EE.UU.) de 100 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml, directamente a las placas a diario. El número de grupos diferenciados se contó días más tarde basándose en la morfología usando el microscopio invertido Olympus IX70. Las características de los grupos diferenciados incluían la formación de quistes y las estructuras en forma de bola en lugar de las estructuras en forma de disco.

5

Resultados experimentales

La quimera IL6RIL6, pero no las concentraciones bajas de IL6, IL6 soluble o LIF, son capaces de mantener las hESC en un estado indiferenciado cuando se cultivan en fibronectina (2-D)

10 Se sometieron a ensayo tres citocinas clave de la familia IL6 (LIF, IL6 y quimera IL6RIL6) para determinar su capacidad para soportar el cultivo de hESC indiferenciadas en suspensión. La capacidad de las diversas citocinas para mantener la auto-renovación de hESC se evaluó por primera vez en el sistema de cultivo sin capa alimentadora 2-D usando fibronectina como matriz. Mientras que la diferenciación de fondo de las hESC cultivadas en presencia de LIF o IL6 a las concentraciones utilizadas (es decir, 1000 u/ml para LIF; 100 ng/ml para IL6 y 0,5 ng/ml para el receptor de IL6 soluble) fue tan alta como del 50 %, fue de solo el 22 % en el cultivo 2-D en presencia de la quimera IL6RIL6 (en una concentración de quimera IL6RIL6 100 ng/ml), principalmente mediante la creación de "células autoalimentadoras" como se notifica para otros sistemas de cultivo sin capa alimentadora de hESC (datos no mostrados, demostrado mediante el análisis por FACS). Usando 100 ng/ml de quimera IL6RIL6 y fibronectina como matriz fue posible cultivar las hESC de forma continua durante más de 40 pases, mientras se mantenía el cariotipo estable, la expresión de marcadores de indiferenciación y la formación de EB y teratoma. Un ejemplo de las células cultivadas en fibronectina en presencia del medio CM100F se ilustra en la figura 7a.

La quimera IL6RIL6, pero no las concentraciones bajas de IL6 e IL6 soluble, son capaces de mantener cultivos de hESC en suspensión en un estado indiferenciado

25 Después se examinó la capacidad de las citocinas para soportar el cultivo de hESC indiferenciadas en suspensión. Con la suplementación con medio de IL6 100 ng/ml y receptor soluble de IL6 0,5 ng/ml (medio CM6*), las células formaron EB o estructuras similares a neuroesferas a los cinco a siete días de cultivo (datos no mostrados). Las estructuras similares a neuroesferas mostraron una morfología redonda cuando se cultivaron en suspensión y varios días después de haberse cultivado en placas en fibronectina se observaron estructuras similares a neuronas teñidas positivamente con nestina o β -tubulina (datos no mostrados). Con 100 ng/ml de quimera IL6RIL6 (el medio CM100F), las células crearon estructuras similares a discos 24 horas después de haber sido cultivadas en suspensión (figura 7c). Las secciones histológicas de estos grupos revelaron una población homogénea de células pequeñas con núcleos grandes (figura 7d). Los grupos se dividieron cada 5-7 días mientras mantenían su morfología durante al menos 54 pases (es decir, durante al menos un año de cultivo continuo). Las tres estirpes celulares utilizadas para este experimento, hESC I-3, I-4 y I-6 no mostraron variabilidad morfológica. Cuando se volvieron a cultivar los MEF o la fibronectina después de 10 o 25 pases en suspensión, el 100 % de los grupos se adhirieron a los MEF o la fibronectina y después de 24 a 48 horas mostraron la morfología típica de las colonias de hESC, presentando una alta relación de núcleo a citoplasma con una presencia notable de uno a tres nucleolos y con el espaciado típico entre las células (figuras 7e y f). El fondo de diferenciación de las hESC cultivadas en suspensión en presencia del medio CM100F consistía en hasta un 5 % e incluía estructuras similares a neuroesferas como se muestra en la figura 7b.

45 ***Las hESC cultivadas en suspensión en presencia de la quimera IL6RIL6 presentan un cariotipo normal*** - Se realizaron análisis de cariotipo mediante bandas Giemsa en cada estirpe celular después de 23, 18 y 36 pases en suspensión, para I-6, I-3 y I-4, respectivamente, y se descubrió que eran normales (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares cuando las células se volvieron a cultivar en MEF; todas las muestras excepto una de I-3 (pase 12 en MEF después de 10 pases en suspensión) mostraron un cariotipo normal. El cultivo original de I-3 que permaneció en suspensión mostró un cariotipo normal. Por tanto, el cariotipo del cultivo celular suspendido se mantuvo estable.

Las hESC cultivadas en suspensión en presencia de la quimera IL6RIL6 presentan un patrón de expresión de estado indiferenciado

50 Se examinaron varios marcadores de superficie típicos de ESC indiferenciadas de primates usando tinción de inmunofluorescencia [como se describe en Thomson et al, 1995, 1996, 1998]. Se descubrió que las ESC humanas cultivadas en suspensión con medio CM100F durante 42 y 43 pases eran muy positivas para los marcadores de superficie SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 y *Oct 4* (figuras 8a-d). Como en otras ESC de primates, la tinción con SSEA3 fue débil y negativa para SSEA1. Se obtuvieron resultados similares para las células cultivadas en suspensión y devueltas a los MEF. Las primeras se sometieron a ensayos adicionales para detectar marcadores típicos de indiferenciación mediante RT-PCR. De manera similar a las células cultivadas con MEF, las células cultivadas en suspensión durante 10, 15 y 20 pases expresaron marcadores genéticos de pluripotencia *Oct 4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1* y *FGF4* (figura 9) [Bhattacharya et al, 2004]. No se detectaron diferencias entre las células cultivadas con diversas duraciones, ni entre las células que se volvieron a cultivar en MEF después de un cultivo continuo en suspensión.

El análisis por citometría de flujo para SSEA4 reveló que el 94,5 % de las hESC I-4, en el pase 30 en suspensión (en presencia del medio CM100F) y el 94,7 % de las hESC I-6 en el pase 20 en suspensión (en presencia del medio CM100F) fueron positivas para SSEA4. Para las hESC I-3, el 87,8 % de las células en el pase 34 en suspensión (en presencia del medio CM100F) fueron positivas para SSEA4, lo que demuestra un ligero aumento en la diferenciación

de fondo (figuras 10a-c). Cuando aumentó la diferenciación de fondo, se retiraron los grupos de diferenciación usando un microscopio de disección en función de su morfología y se restableció un nivel de expresión alto (> 90 %, por ejemplo, > 95 %) de marcadores de indiferenciación tales como SSEA4 (datos no mostrados). El análisis de PCR en tiempo real para el nivel de expresión del gen de Oct4 no demostró una diferencia significativa entre las células cultivadas en suspensión y las cultivadas en MEF y entre diferentes pases (10, 15, 20) de cultivo en suspensión (figuras 11a-b).

Las hESC cultivadas en suspensión en presencia de la quimera ILRIL6 conservan su pluripotencia como se demuestra por la formación de EB - El potencial de desarrollo de las células después de un cultivo prolongado en suspensión se examinó *in vitro* mediante la formación de EB. Cuando se transfirieron células cultivadas en suspensión durante más de 20 pases a un medio que contenía suero donde se retiró la quimera del receptor IL6L6, después de un lapso de 7-10 días, las hESC formaron EB quísticos similares a los creados por las hESC cultivadas con MEF (figuras 12a-b). Dentro de estos EB, las células madre se diferenciaron en tipos de células representativas de las tres capas germinales embrionarias [Itskovitz-Eldor et al, 2000]. Las células recogidas de EB de 21 días de edad expresaron genes tales como albúmina (endodermo), α -actina cardíaca, β -globulina y *Flk1* (mesodermo) y AC133 y neurofilamento (ectodermo) como se demostró mediante RT-PCR (datos no mostrados).

Las hESC cultivadas en suspensión en presencia de la quimera ILRIL6 conservan su pluripotencia como se demuestra por la formación de teratoma - La pluripotencia de las células *in vivo* se demostró mediante la formación de teratoma. Se inyectaron células cultivadas en presencia del medio CM100F en suspensión durante 9, 10, 14 o 26 pases en ratones SCID Beige, que representaban las tres estirpes celulares analizadas y después de 10 semanas se formaron tumores en los cuatro ratones inyectados. Dentro de estos teratomas se observaron tejidos representativos de las tres capas germinales (figuras 12a-b). Se obtuvieron resultados similares cuando las células cultivadas durante al menos 10 pases en suspensión se devolvieron a los MEF y se cultivaron durante 5-10 pases adicionales (datos no mostrados).

La cinética del cultivo se sometió a ensayo midiendo el tamaño promedio de los grupos cada dos días durante un cultivo continuo de 14 días. En el día 7, el diámetro aumentó de 150 μ m a 300 μ m y en el día 14 se midió 500 μ m (figuras 13a-d). Cada uno de estos grupos contenía 2×10^5 células vivas en el día 2; $3,32 \times 10^5$ células el día de la división (día 6); y 9×10^5 células en el día 14. El pase mecánico dio como resultado un nivel de apoptosis del 16 % (figura 13e). Durante los siguientes seis días, el nivel promedio de apoptosis se redujo al 4,8 % y aumentó nuevamente al 30 % en el día 14 de cultivo continuo (figura 13e). Como se esperaba, la mayoría de las células apoptóticas y necróticas estaban ubicadas en el centro del grupo debido a la difusión limitada (figuras 13f-h). Se descubrió que la viabilidad de las células era del 90 % hasta el día 10 y del 80 % en el día 14. El aumento en el diámetro de los grupos y el bajo nivel de apoptosis indican que los días 5-7 son de hecho el momento óptimo para la división, ya que la división de las células en este punto temporal evita una gran pérdida de células por apoptosis y permite la proliferación celular continua.

Las células se cultivaron en suspensión en el Erlenmeyer agitado durante tres meses. Un examen después de un mes mostró que, morfológicamente, los grupos de estructuras esféricas similares a discos seguían siendo similares a las células cultivadas estáticamente (figura 14a), aunque su tamaño parecía más homogéneo. El diámetro esférico promedio en el sistema dinámico fue de $112 \pm 14,47 \mu$ m, conteniendo cada esfera $3,75 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$ células. Cuando se volvieron a cultivar en MEF, los grupos se volvieron a unir, formaron colonias típicas de hESC, como ocurrió con las células que se cultivan estáticamente usando placas de Petri (figura 14b) y se tiñeron positivamente con marcadores de indiferenciación (figuras 14c-e). El cultivo de las esferas en placas de Petri con medio complementado con suero sin la quimera del receptor IL6L6 dio como resultado la formación de EB y cuando este último se volvió a cultivar en placa en gelatina, las células se tiñeron positivamente para troponina, PSA-NCAM, insulina y β -tubulina (figuras 14f-h). Se descubrió que el cariotipo de las hESC I3 cultivadas durante un mes en el Erlenmeyer era normal. Finalmente, la proliferación de las células se sometió a ensayo para evaluar la idoneidad de este sistema de cultivo para la producción en masa de hESC. El número total de esferas aumentó de $1,33 \times 10^4 \pm 461$ en el día de siembra a $3,5 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$ después de 10-11 días en el cultivo dinámico, un aumento de 25 veces y el número total de células aumentó de 5×10^8 a $1,31 \times 10^{10}$.

Con el fin de obtener una idea de la posible contribución de la quimera IL6RIL6 al mecanismo de auto-mantenimiento de las hESC, se realizaron experimentos de activación. Se pudo observar un claro aumento en los niveles de STAT3 fosforilado tres horas después de volver a añadir la quimera IL6RIL6, seguido de un aumento en los niveles de receptor gp130, como se demostró mediante el análisis de transferencia Western (figuras 15a-d). El aumento en los niveles de receptores de gp-130 y STAT3 fosforilado aún pudieron observarse después de 24 horas. Se obtuvo respaldo adicional para la implicación de la quimera IL6RIL6 en el auto-mantenimiento de las células a partir de un experimento de competencia en el que se añadió anticuerpo anti-gp130 al medio de cultivo con concentraciones crecientes. El nivel de diferenciación de fondo aumentó en paralelo al aumento de la concentración de anticuerpos del 5 %, cuando no se añadió ningún anticuerpo, al 67 % cuando se añadió anticuerpo 500 ng/ml (figura 16). Las figuras 17a-b representan ejemplos de grupos de hESC diferenciados (figura 17b) e indiferenciados (figura 17a) en presencia del anticuerpo anti-gp130.

Ejemplo 4

ENSAYOS DE MEDIOS ADICIONALES PARA CULTIVAR ESCS HUMANAS EN SUSPENSIÓN

Materiales y métodos experimentales

5 Medios de cultivo para ESCs humanas en cultivos en suspensión

yFIL25+ - DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) al 15 % inactivado, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.), IL6 25 ng/ml y sIL6-R 25 ng/ml (R&D systems, Minneapolis, MN, EE.UU.).

yFL3 - DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) al 15 % inactivado, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.) y factor inhibidor de la leucemia recombinante humana (hrLIF) 3000 u/ml (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.).

yFL2 - DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) al 15 % inactivado, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.) y 2000 u/ml hrLIF (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.).

yFL1 -DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) al 15 % inactivado, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.) y 1000 u/ml hrLIF (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.).

TLF -DMEM al 85 %/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) al 15 % inactivado, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre al 1 % de aminoácidos no esenciales, bFGF 4 ng/ml (todos excepto los mencionados son productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.), hrLIF 1000 u/ml (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.) y TGF β_1 0,12 ng/ml (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.).

Resultados experimentales

Las nuevas combinaciones de medios son adecuadas para cultivar las ESC humanas en cultivo en suspensión - Se sometieron a ensayo cuatro medios de cultivo adicionales para determinar su capacidad para soportar el cultivo en suspensión de hESC; TLF, yFIL25+, yFL3 y yFL1. Usando estos medios de cultivo, las ESC humanas crearon esferas o estructuras similares a discos, 24 horas después haberse cultivado en suspensión usando condiciones de cultivo no dinámico (figura 18a-e). Los grupos se dividieron cada 5-7 días mientras mantenían su morfología y hasta el día de redacción de este informe alcanzaron 31, 19, 18 y 18 pases para TLF, yFIL25+, yFL3 y yFL1, respectivamente. Se sometieron a ensayo dos estirpes de hESC (13 e 14) con cada uno de los medios TLF, yFIL25+, yFL3, excepto el medio yFL1 que se sometió a ensayo solo con la estirpe de hESC13. Cuando las hESC que se cultivaron durante 10 pases en suspensión con medios TLF o yFIL25+ se volvieron a cultivar en MEF o fibronectina, el 100 % de los grupos se adhirieron a los MEF o fibronectina y después de 24 a 48 horas demostraron la morfología de colonia de hESC típica, presentando una relación elevada de núcleo a citoplasma con una presencia notable de uno a tres nucleolos y con un espaciamiento típico entre las células (figura 18c).

Las ESC humanas cultivadas en suspensión en presencia de los medios de cultivo TLF, yFIL25+ o yFL3 presentan un cariotipo normal - Se realizaron análisis de cariotipo por bandas Giemsa en cada estirpe celular después de 18 pases en el medio TLF, 14 pases en el medio yFIL25+ y 14 pases en el medio yFL3 y se descubrieron normales.

Las ESC humanas cultivadas en suspensión en presencia de los medios TLF, yFIL25+, yFL3 o yFL1 presentaron un estado indiferenciado como se demuestra por la expresión de los marcadores de superficie SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 y Oct4 – Se examinaron varios marcadores de superficie típicos de ESC indiferenciadas de primates usando tinción de inmunofluorescencia de acuerdo con los métodos descritos en otra parte [Thomson et al, 1995, 1996, 1998]. Se descubrió que las ESC humanas cultivadas en suspensión con medio TLF, yFIL25+, yFL3 e yFL1 durante 31, 18, 18 y 18 pases, respectivamente, eran fuertemente positivas para los marcadores de superficie SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 y Oct 4 (figuras 19a-d).

Las ESC humanas cultivadas en suspensión en presencia de los medios de cultivo TLF, yFIL25+, yFL3 o yFL1 expresan marcadores de pluripotencia - Las ESC humanas se cultivaron en suspensión en condiciones de cultivo no dinámico y se sometieron a ensayo adicionalmente para detectar marcadores de indiferenciación típicos usando análisis por RT-PCR. De forma similar a las células cultivadas con MEF, las células cultivadas en suspensión durante 18, 16, 16 o 18 pases en presencia de medio TLF, yFIL25+, yFL3 o yFL1, respectivamente,

expresaron los marcadores genéticos de pluripotencia Oct 4, Nanog, Sox2, Rex1 y FGF4 (datos no mostrados).

Las ESC humanas cultivadas en suspensión en presencia de TLF, yFL25+, yFL3 o yFL1 son capaces de formar EB que representan las tres capas germinales embrionarias - El potencial de desarrollo de las células

después de un cultivo prolongado en suspensión se examinó *in vitro* mediante la formación de EB. Cuando las células cultivadas en suspensión durante más de 10 pases se transfirieron a un medio que contenía suero donde se retiraron los factores de crecimiento, después de un retraso de 7-10 días, las hESC formaron EB quísticos (datos no mostrados). Dentro de estos EB, las células madre se diferencian en tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias. Las células recogidas de EB de 21 días de edad expresaron genes tales como albúmina (endodermo), α -actina cardíaca, β -globulina y Fikl (mesodermo) y AC133 y neurofilamento (ectodermo) como se demostró mediante RT-PCR (datos no mostrados).

Análisis y discusión

Las hESC indiferenciadas se cultivan tradicionalmente en 2D en células de capa alimentadora o en matriz acelular. Este estudio muestra por primera vez un método para cultivar estas células como esferas flotantes libres durante períodos prolongados en un medio que consiste en reemplazo de suero, bFGF y quimera IL6RIL6.

Las ESC de ratón pueden cultivarse de forma continua sin capas alimentadora a condición de que el medio de cultivo esté complementado con factor inhibidor de leucemia (LIF), que se descubrió que está implicado en el auto-mantenimiento de ESC de ratón [Smith et al, 1988; Williams et al, 1988; Rose et al, 1994; Conover et al, 1993; Niwa et al, 1998]. La acumulación de datos con respecto a hESC sugiere que el LIF no tiene ningún efecto sobre la prevención de la diferenciación de hESC [Thomson et al, 1998; Reubinof et al, 2000]. Además, se descubrió que la activación de proteínas clave de la vía celular de LIF, tales como STAT3, es débil o está ausente en las hESC [Daheron et al, 2004; Sato et al, 2004]. Un candidato adicional para el auto-mantenimiento de hESC es la quimera IL6RIL6. Mientras que LIF actúa a través del complejo heteromérico de LIF-receptor y gp130, la quimera IL6RIL6 requiere solo gp130 para activar la vía intracelular que implica la activación de cinasas JAK y factores de transcripción STAT. En células de ratón, se sabe que la quimera IL6RIL6 es un potente inductor de la vía LIF/IL6, lo que da como resultado una mayor respuesta en comparación con el efecto provocado por la IL6 sola o incluso los componentes de la quimera añadidos por separado (IL6 y receptores solubles de IL6 IL6R) (Chebath et al, 1997).

Además, hasta la fecha, el único método para derivar nuevas estirpes ESC de ratón en condiciones sin capa alimentadora se basa en la adición de factores de la familia IL6 [Nichols et al, 1994] o la combinación de LIF y BMP4 cuando se usan condiciones sin suero [Ying QL et al, 2003]. De la familia IL6, se demostró que la quimera IL6RIL6 es el factor más potente en el soporte del aislamiento sin capa alimentadora de las estirpes de ESC de ratón (Nichols et al, 1994). La quimera tiene una afinidad mucho mayor por la gp130 humana que la mezcla de IL6 y sIL6R [Kollet et al, 1999]. Sin embargo, un estudio reciente demostró que, aunque activa la vía LIF/STAT en hESC, la quimera IL6RIL6 por sí sola es insuficiente para mantener la pluripotencia de hESC en el cultivo sin capa alimentadora bidimensional (2D) adhesivo [Humphrey et al, 2004].

En el presente estudio se sometieron a ensayo varias citocinas de la familia IL-6 (quimera IL6RIL6, LIF e IL6) para determinar su capacidad para mantener las hESC en su estado indiferenciado. El medio complementado con 100 ng/ml de la quimera IL6RIL6 cuando se usó junto con bFGF 4 ng/ml soportó el cultivo de tres estirpes de hESC en suspensión durante más de 40 pases y conservó las características normales de hESC, incluida la expresión de marcadores de superficie y genes típicos de hESC indiferenciadas según se detectó mediante FACS, RT-PCR e inmunotinción, cariotipo normal y formación de teratoma.

Se obtuvieron resultados similares cuando las células se volvieron a transferir a los MEF, incluyendo un grupo que se transfirió a los MEF y desde ellos y la suspensión cuatro veces y se mantuvo estable durante todo el proceso.

El mecanismo mediante el cual las hESC se auto-mantienen no se comprende completamente. En las ESC de ratón, el papel de LIF y otros miembros de la familia IL6, que actúan a través de gp130 y la vía JAK/STAT3, en el mantenimiento de cultivos prolongados de ESC indiferenciadas es bien conocido [Smith et al, 1988; Williams et al, 1988; Rose et al, 1994; Conover et al, 1993; Niwa et al, 1998]. Los estudios previos no demostraron ningún efecto significativo de la familia IL6, incluyendo una proteína de fusión de porciones de IL6 y el receptor de IL6, sobre el auto-mantenimiento de hESC indiferenciadas [Daheron et al, 2004; Humphrey et al, 2004; Sato et al, 2004]. En este estudio, los presentes inventores demuestran que la quimera IL6RIL6 sí soporta el cultivo de hESC en suspensión y, en menor medida, en cultivo de adhesión con fibronectina sirviendo de matriz. Los experimentos de activación demuestran que la quimera IL6RIL6 de hecho aumenta los niveles de fosforilación de STAT3 en cultivos tanto en suspensión como 2D (datos no mostrados). El bloqueo del efecto de la quimera IL6RIL6 por el anticuerpo anti-gp130, aumentó el nivel de diferenciación, indicando adicionalmente que la quimera IL6RIL6 está implicada en el auto-mantenimiento de las células.

Se requieren investigaciones adicionales para dilucidar los mecanismos subyacentes de acción de la quimera IL6RIL6 a nivel de la transducción de señales, su curso temporal y la intensidad en la que se activan diferentes vías (JAK/STAT, PI-3 cinasa, MAPK, véase Hirano et al, 1997) y para comprender por qué esta vía es menos eficaz

cuando las células indiferenciadas se cultivan en 2D.

También se descubrió que el sistema de cultivo descrito soporta la proliferación de hESC. Se descubrió que el tamaño de cada grupo durante el pase (5-7 días) aumentaba en 1,5 veces y se asociaba a niveles bajos de apoptosis y altas tasas de viabilidad. El número de células en cada esfera aumentó 1,66 veces durante cada pase (5-7 días). En conjunto, las características cinéticas del sistema de cultivo recientemente desarrollado indican que el sistema es tan competente como los sistemas de cultivo 2D y podría utilizarse como una base para el cultivo habitual de hESC indiferenciadas.

Un requisito importante para la aplicación clínica e industrial de las hESC es un sistema de cultivo aumentable a escala capaz de generar masas de células. El sistema de cultivo que se presenta en el presente documento también puede usarse como base para la producción en masa de hESC indiferenciadas usando sistemas dinámicos tales como matraces y biorreactores giratorios.

El desplazamiento de las hESC indiferenciadas de la adhesión a la suspensión facilitará el desarrollo de procesos de aumento a escala controlados. Además, la metodología presentada en el presente documento requiere placas de Petri y no requiere división enzimática, células de soporte ni medios acondicionados, lo que la hace un sistema rentable. Junto con su simplicidad, este enfoque es una opción atractiva para el cultivo habitual de hESC.

La experiencia de los presentes inventores con el sistema dinámico de Erlenmeyer indica que las hESC pueden cultivarse de forma continua y mantener sus características típicas, permitiendo al mismo tiempo un aumento a escala de 25 veces en 10 días. Aunque las concentraciones de siembra y los metabolitos del medio todavía deben optimizarse, los resultados presentados en el presente documento demuestran que este sistema podría servir como base para desarrollar un proceso controlado para la producción en masa de hESC en biorreactores.

Hasta la fecha, solo una publicación notifica un cultivo satisfactorio de ESC de ratón en un sistema en suspensión durante un pase, lo que dio como resultado una expansión de 31 veces en 5 días [Cormier JT., et al, 2006; Tissue Eng. Noviembre de 2006; 12 (11): 3233-45]. El sistema se basó en un medio complementado con suero de ternera y LIF1000 u/ml. Una publicación más reciente del mismo grupo demuestra que el mismo sistema de cultivo también podría usarse para un cultivo algo prolongado mediante la división de las células con tripsina [Zur Nieden et al, 2007]. Sin embargo, en estas condiciones, las mESC presentaron un tiempo de duplicación de 15 horas que puede conducir a inestabilidad cromosómica. Sin embargo, los autores no mostraron un análisis de cariotipo de las ESC cultivadas. Como se muestra en varias publicaciones, las ESC de ratón y humanas comparten solo algunas de sus características; difieren en la incapacidad para cultivar hESC en 2D usando el medio tradicional complementado con suero de ternera y LIF sin una capa alimentadora [Thomson et al, 1998]. La capacidad de la quimera IL6RIL6 para soportar el auto-mantenimiento de hESC en suspensión ilumina una vez más la cuestión del posible papel de la vía LIF-STAT3 en la auto-renovación de hESC.

Por tanto, este sistema de cultivo presentado en el presente documento es una etapa más hacia la creación de las condiciones de cultivo que harán posible cumplir la promesa de las hESC.

Se aprecia que determinadas características de la divulgación, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la divulgación, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

REFERENCIAS

- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu C-P, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. *Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture*. Dev Biol 2000; 227: 271-278.
- Amit M. & Itskovitz-Eldor J. *Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells*. J Anat. 2002; 200: 225-232.
- Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki C, Laevsky I, Coleman R y Itskovitz-Eldor J. *Human feeder layers for human embryonic stem cells*. Biol Reprod 2003; 68: 2150-2156.
- Amit M, Shariki K, Margulets V y Itskovitz-Eldor J. *"Feeder and serum-free culture system for human embryonic stem cells"*. Biol Reprod 70: 837-845, 2004.
- Bhattacharya B, Miura T, Brandenberg R, Mejido J, Luo Y, Yang AX, Joshi BH, Irene G, Thies RS, Amit M, Lyons I, Condie BG, Itskovitz-Eldor J, Rao MS, Puri RK. *"Gene expression in human embryonic stem cell lines. unique molecular signature"*. Blood 15; 103 (8): 2956-64, 2004.
- Cameron CM, Hu WS y Kaufman DS. (2006). *Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation*. Biotechnol Bioeng. 94 (5): 938-948.
- Chen S, Choo A, Chin A, Oh SK. *TGF-beta2 allows pluripotent human embryonic stem cell proliferation on E6/E7 immortalized mouse embryonic fibroblasts*. J Biotechnol. 2006, 122: 341-361.
- Chebath J, Fischer D, Kumar A, Oh JW, Kolett O, Lapidot T, Fischer M, Rose-John S, Nagler A, Slavin S, Revel M. *Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities*. Eur

- Cytokine Netw.* 1997; 8: 359-365.
- Cheng, L., Hammond, H., Ye, Z., Zhan, X., Dravid, G. (2003). *Human Adult Marrow Cells Support Prolonged Expansion of Human Embryonic Stem Cells in Culture.* *Stem Cells* 21, 131-142.
- 5 Cormier JT, zur Nieden NI, Rancourt DE, Kallos MS. *Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors.* *Tissue Eng.* Noviembre de 2006; 12 (11): 3233-45.
- Conover JC, Ip NY, Poueymirou WT, Bates B, Goldfarb MP, DeChiara TM, Yancopoulos GD. *Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells.* *Development.* 1993 119 (3): 559-65.
- Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch WM, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. *LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells.* *Stem Cells.* 2004; 22 (5): 770-8.
- 10 Gerecht-Nir S, Cohen S y Itskovitz-Eldor J. (2004) *Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation.* *Biotechnol Bioeng.* 86: 493-502.
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M, Ahrlund-Richter A. *A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells.* *Hum Reprod.* Julio de 2003; 18 (7): 1404-9.
- 15 Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, King CC, Firpo MT, Rose-John S, Hayek A. *Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent.* *Stem Cells.* 2004; 22 (4): 522-30. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers.* *Mol Med* 2000; 6: 88-95.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., Hemmati-Brivanlou, A. (2005). *TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells.* *Development.* 132, 1273-1282.
- 20 Kollet O., Aviram R, Chebath J, ben-Hur H, Nagler A, Shultz L, Revel M y Lapidot T. *The soluble Interleukin-6 (IL6) Receptor/IL6 fusion protein enhances in vitro maintenance and proliferation of human CD34+CD38-/low cells capable of repopulating Severe Combined Immunodeficiency mice.* *BLOOD* 1999; 94: 923-931.
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA. *Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions.* *Nat Biotechnol.* 2006, 24, 185-187.
- 25 Nichols J, Chambers I, Smith A. *Derivation of germline competent embryonic stem cells with a combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor.* *Exp Cell Res.* 1994 215 (1): 237-9.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3.* *Genes Dev.* 1 de Julio de 1998; 12 (13): 2048-60.
- 30 Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3.* 2003, *Cell*, 115 (3): 281-92.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong C, Trounson A., Bongso A. *Embryonic stem cell lines from human blastocysts. somatic differentiation in vitro.* *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
- 35 Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. *Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells.* *Nat Biotechnol* 2002; 20: 933-936.
- Rose TM, Weiford DM, Gunderson NL, Bruce AG. *Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro.* *Cytokine.* 1994 6 (1): 48-54.
- 40 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor.* *Nat Med.* Enero de 2004; 10 (1): 55-63.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. *Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.* *Nature.* 1988 336 (6200): 688-90.
- 45 Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. *Isolation of a primate embryonic stem cell line.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7844-7848.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. *Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts.* *Biol Reprod* 1996; 55: 254-259.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* *Science* 1998; 282: 1145-1147 [errata en *Science* 1998; 282: 1827].
- 50 Valdimarsdottir G, Mummery C. *Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells.* *APMIS.* 2005; 113: 773-789.
- Williams R, Hilton D, Pease S, Wilson T, Stewart C, Gearing D, Wagner E, Metcal, D, Nicola N, Gough N. *Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.* *Nature* 1988; 336: 684-687.
- 55 Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. *Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells.* *Nat Biotechnol* 2001, 19, 971-974.
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. *Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells.* *Nat Methods.* 2005; 2 (3): 185-190.
- 60 Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter MK. *Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium.* *Stem Cells.* 2005, 23: 315-23.
- Zandstra PW, Bauwens C, Yin T, Liu Q, Schiller H, Zweigerdt R, Pasumarthi KB y Field LJ. (2003) *Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* *Tissue Eng.* 9 (4): 767-78.
- 65 Zur Nieden NI, Cormier JT, Rancourt DE, Kallos MS. (2007). *Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors.* *J Biotechnol.* 129 (3): 421-32.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LTD. Amit, Michal Iskovitz-Eldor, Joseph
5	<120> MÉTODOS DE EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS EN UN CULTIVO EN SUSPENSIÓN
	<130> 41743
10	<160> 31
	<170> Patent In versión 3.3
15	<210> 1 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
	<400> 1 gagaacaatg agaacctca gga 23
25	<210> 2 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
35	<400> 2 ttctggcgcc gggtacagaa cca 23
40	<210> 3 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
	<400> 3 tgcttgaatg tgctgatgac aggg 24
50	<210> 4 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
55	<400> 4 aaggcaagtc agcagccatc tcat 24
60	<210> 5 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial
65	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
	<400> 5

gctggattgt ctgcaggatg gggaa 25

5 <210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

tcccctgaag aaaattggtt aaaat 25

15 <210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

gagtgaaatg gcacgatacc ta 22

25 <210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

tttcctctcc ttcttcacct tc 22

35 <210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

ggagttatgg tgggtatggg tc 22

45 <210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

agtggtgacaaaggagtagc ca 22

55 <210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

65 <400> 11

atctggcacc acaccttcta caatgagctg cg 32

5 <210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 12
cgtcatactc ctgcttgctg atccacatct gc 32

15 <210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 13
cccccggcgg caatagca 18

25 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 14
tcggcgccgg ggagatacat 20

35 <210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45 <400> 15
gcgtacgcaa attaaagtcc aga 23

50 <210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

55 <400> 16
cagcatccta aacagctcgc agaat 25

60 <210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 17

	taccatgcga ccagtgggtgc gct	23
	<210> 18	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
10		
	<400> 18	
	gaattctggt tatcatcggg gaa	23
	<210> 19	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 19	
	ctacaacgcc tacgagtct aca	23
25	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 20	
35	gttgcaccag aaaagtcaga gttg	24
	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 21	
45	ctcagtgatc ctgatcagat gaacg	25
	<210> 22	
	<211> 25	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
55	<400> 22	
	agtcctggc ggcaagatta tcaag	25
	<210> 23	
60	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 23	

acctgactcc tgaggagaag tctgc 25

5 <210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15 <400> 24
tagccacacc agccaccact ttctg 25

20 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

30 <400> 25
atgcacggca tctgggaatc 20

35 <210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45 <400> 26
gctactgtcc tgcaagttgc tgtc 24

50 <210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

60 <400> 27
cagtctgacc agcgtgaaaa 20

65 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 28
ggccatccaa atctgtccta 20

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 29

ES 2 704 401 T3

	actaacatga gtgtggatcc	20
	<210> 30	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 30	
	tcatcttcac acgtcttcag	20
	<210> 31	
15	<211> 543	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> IL6R/IL6 chimeric protein	
	<400> 31	

ES 2 704 401 T3

Met	Leu	Ala	Val	Gly	Cys	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro	1	5	10	15
Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Arg	Arg	Cys	Pro	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Arg	20	25	30	
Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Pro	35	40	45	
Gly	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Asn	Ala	Thr	Val	His	Trp	Val	Leu	Arg	Lys	50	55	60	
Pro	Ala	Ala	Gly	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Trp	Ala	Gly	Met	Gly	Arg	Arg	65	70	75	80
Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Val	Gln	Leu	His	Asp	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	85	90	95	
Tyr	Arg	Ala	Gly	Arg	Pro	Ala	Gly	Thr	Val	His	Leu	Leu	Val	Asp	Val	100	105	110	
Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Ser	Cys	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	115	120	125	
Asn	Val	Val	Cys	Glu	Trp	Gly	Pro	Arg	Ser	Thr	Pro	Ser	Leu	Thr	Thr	130	135	140	
Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Lys	Phe	Gln	Asn	Ser	Pro	Ala	Glu	Asp	145	150	155	160
Phe	Gln	Glu	Pro	Cys	Gln	Tyr	Ser	Gln	Glu	Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	Cys	165	170	175	
Gln	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Val	Ser	Met	180	185	190	
Cys	Val	Ala	Ser	Ser	Val	Gly	Ser	Lys	Phe	Ser	Lys	Thr	Gln	Thr	Phe	195	200	205	
Gln	Gly	Cys	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Asp	Pro	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	210	215	220	
Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Asn	Pro	Arg	Trp	Leu	Ser	Val	Thr	Trp	Gln	Asp	225	230	235	240

ES 2 704 401 T3

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320
 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335
 Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350
 Ser Leu Pro Val Glu Phe Met Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys
 355 360 365
 Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys
 385 390 395 400
 Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu
 405 410 415
 Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys
 420 425 430
 Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr
 435 440 445
 Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe
 450 455 460
 Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val
 465 470 475 480
 Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr
 485 490 495
 Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala
 500 505 510
 Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser
 515 520 525
 Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 530 535 540

REIVINDICACIONES

1. Un método de expansión y mantenimiento de células madre embrionarias humanas (hESC) en un estado indiferenciado, comprendiendo el método cultivar células madre embrionarias humanas durante al menos 5 pases en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia a un sustrato externo y que permiten la expansión de al menos el 50 % de las células madre embrionarias humanas en el estado indiferenciado, en el que dicho sustrato externo comprende componentes de matriz extracelular, un microtransportador de vidrio o perlas y en el que dichas condiciones de cultivo comprenden un medio de cultivo sin suero, sin xenógenos y definido seleccionado entre el grupo que consiste en: un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), un receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) en una concentración de al menos 10 nanogramos por mililitro (ng/ml) e interleucina 6 soluble (IL6), un medio de cultivo que comprende bFGF y al menos 1000 unidades por mililitro (u/ml) de factor de inhibidor de la leucemia (LIF), un medio de cultivo que comprende bFGF y una quimera IL6RIL6 y un medio de cultivo que comprende bFGF y una isoforma de TGFβ, y en el que dichas condiciones de cultivo comprenden el cultivo de células madre embrionarias humanas en un recipiente de cultivo que tiene una superficie interna diseñada de manera que las hESC cultivadas en el mismo no puedan adherirse o adherirse a dicha superficie, expandiendo y manteniendo de este modo las células madre embrionarias humanas en estado indiferenciado.
2. Un método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre embrionarias humanas, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar las células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión de acuerdo con el método de la reivindicación 1, para obtener de este modo células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas; y
 - (b) someter dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;
 generando de este modo las células específicas de linaje a partir de células madre embrionarias humanas.
3. Un método de generación de cuerpos embrioides a partir de células madre embrionarias humanas, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar las células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión de acuerdo con el método de la reivindicación 1, para obtener de este modo células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas; y
 - (b) someter dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre embrionarias humanas a cuerpos embrioides;
 generando de este modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre embrionarias humanas.
4. Un método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre embrionarias, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar las células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión de acuerdo con el método de la reivindicación 1, para obtener de este modo células madre embrionarias humanas expandidas e indiferenciadas;
 - (b) someter dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre embrionarias humanas indiferenciadas y expandidas en cuerpos embrioides; y
 - (c) someter células de dichos cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;
 generando de este modo las células específicas de linaje a partir de células madre embrionarias humanas.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha isoforma de TGFβ es una isoforma 1 de TGFβ (TGFβ₁).
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha isoforma de TGFβ es una isoforma 3 de TGFβ 3 (TGFβ₃).
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho sIL6R está presente en una concentración de 15-30 ng/ml.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicho LIF está presente en una concentración de al menos 2000 unidades por mililitro (u/ml).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho cultivo se efectúa en condiciones sin xenógenos.
10. El método de la reivindicación 5, en el que dicho TGFβ₁ está presente en una concentración de al menos

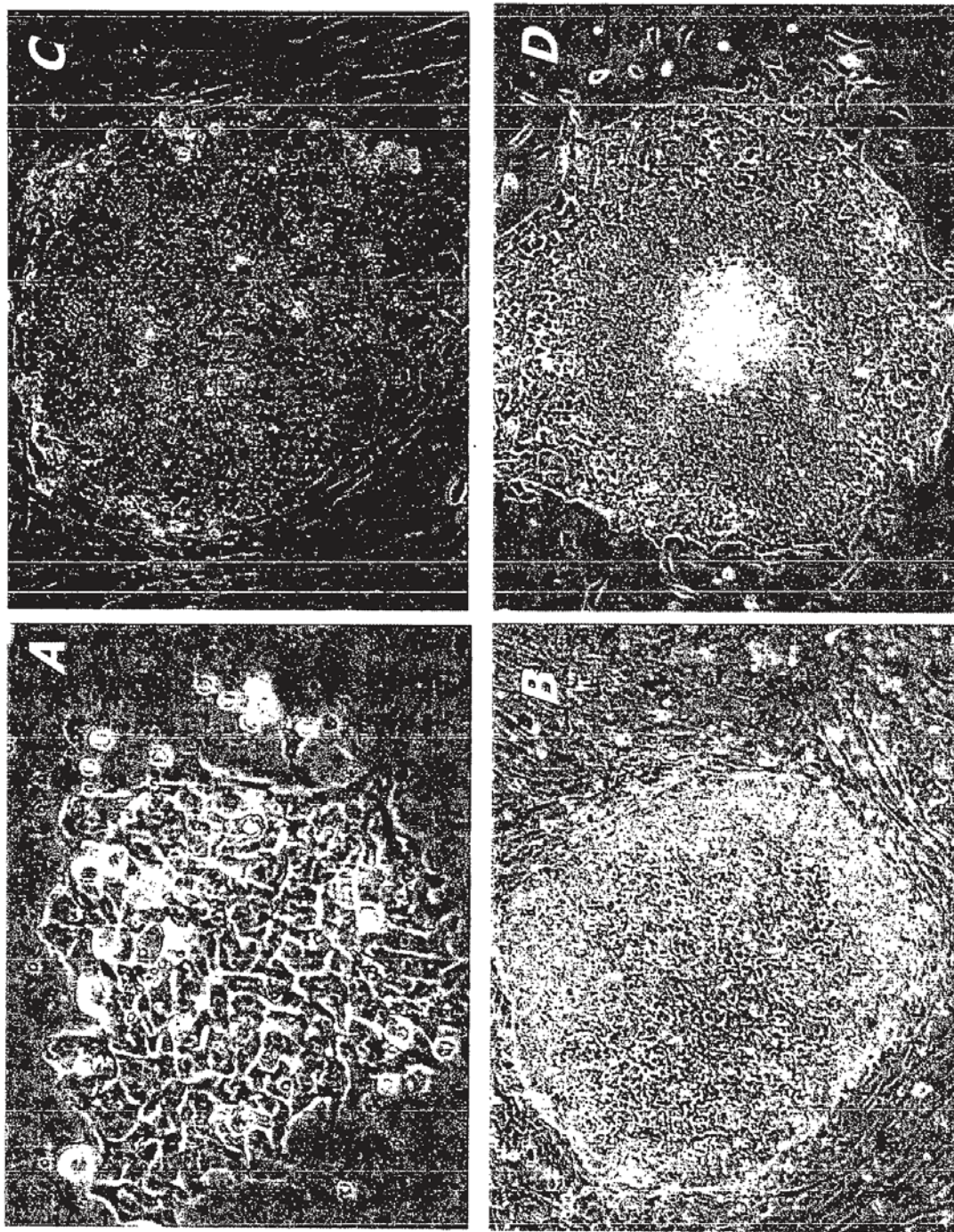
0,06 ng/ml.

11. El método de la reivindicación 6, en el que dicho $TGF\beta_3$ está presente en una concentración de al menos 0,5 ng/ml.

5 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho bFGF está en una concentración de al menos 2 ng/ml.

10 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho bFGF está en una concentración de al menos 4 ng/ml.

14. El método de la reivindicación 1, en el que dicha quimera IL6RIL6 está en una concentración de al menos 25 ng/ml.



Figuras 1a-d

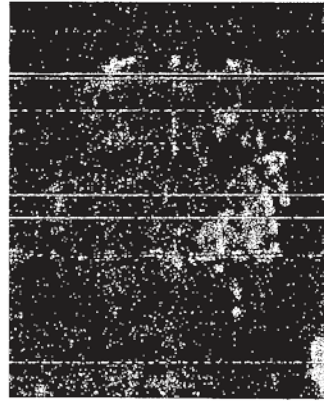


Fig. 2c

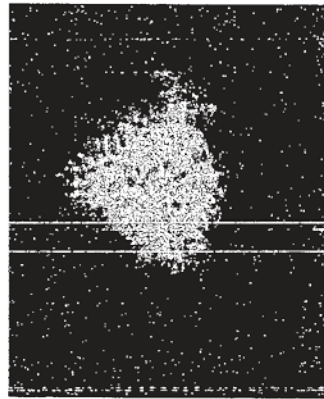


Fig. 2b

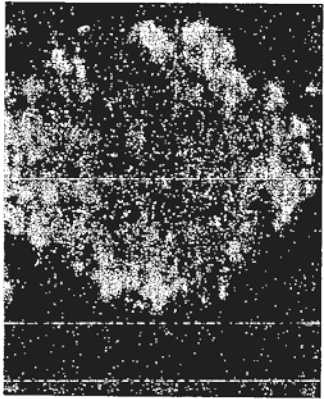


Fig. 2a

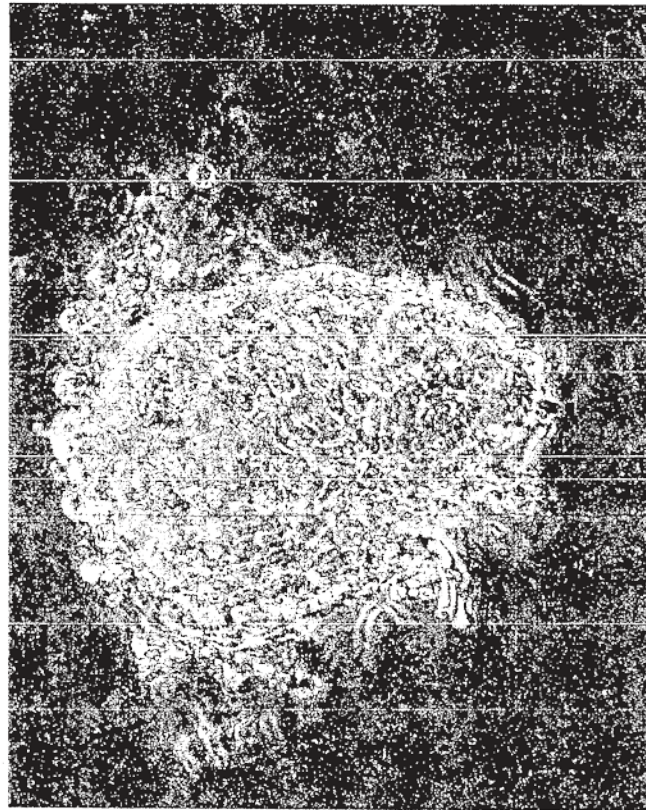


Fig. 3b

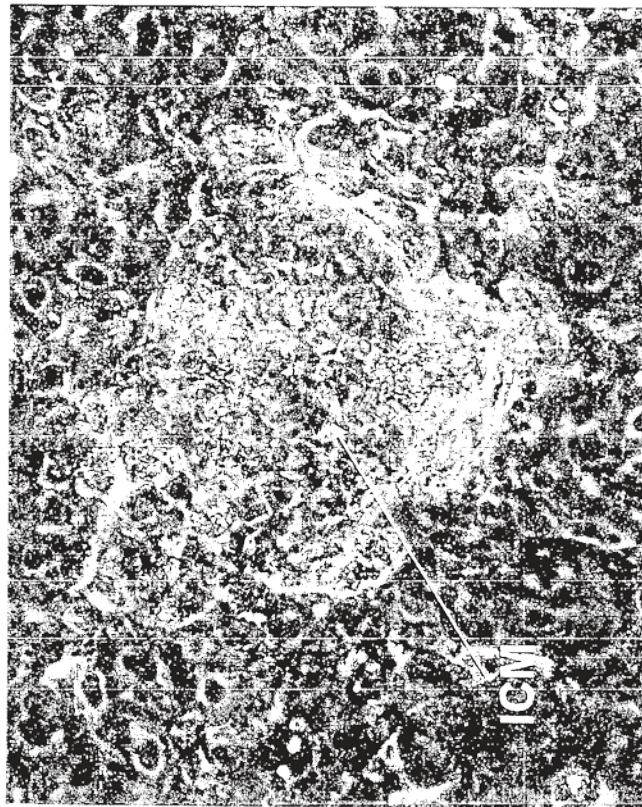


Fig. 3a

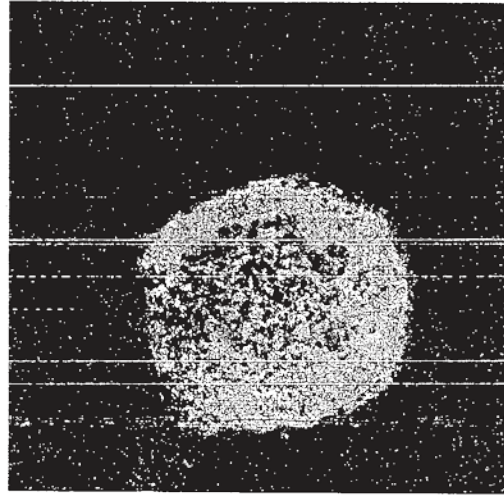


Fig. 4c

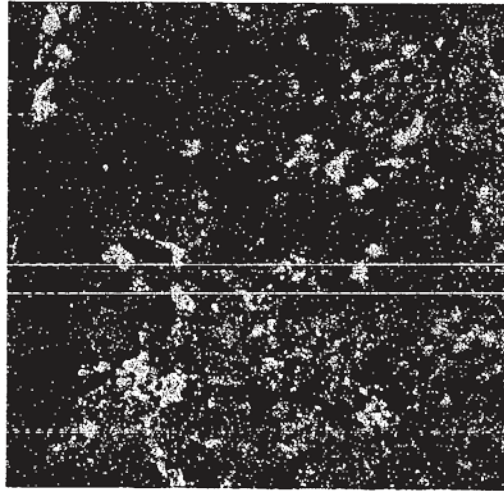


Fig. 4b

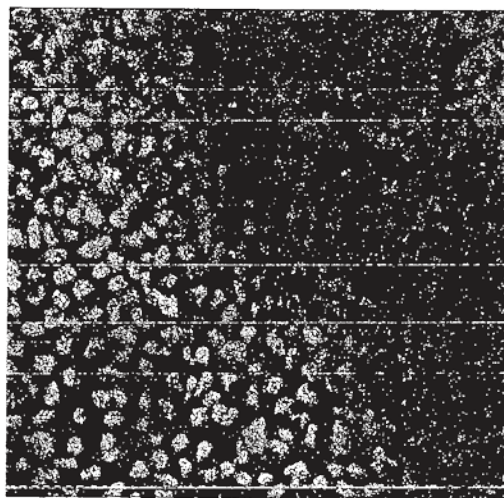


Fig. 4a

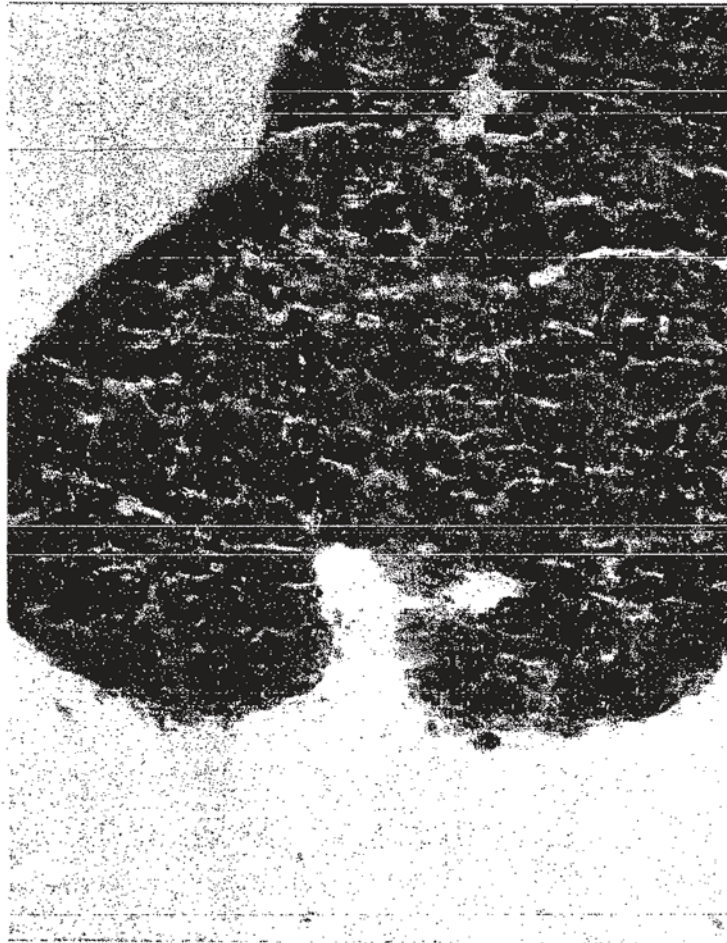


Fig. 5a

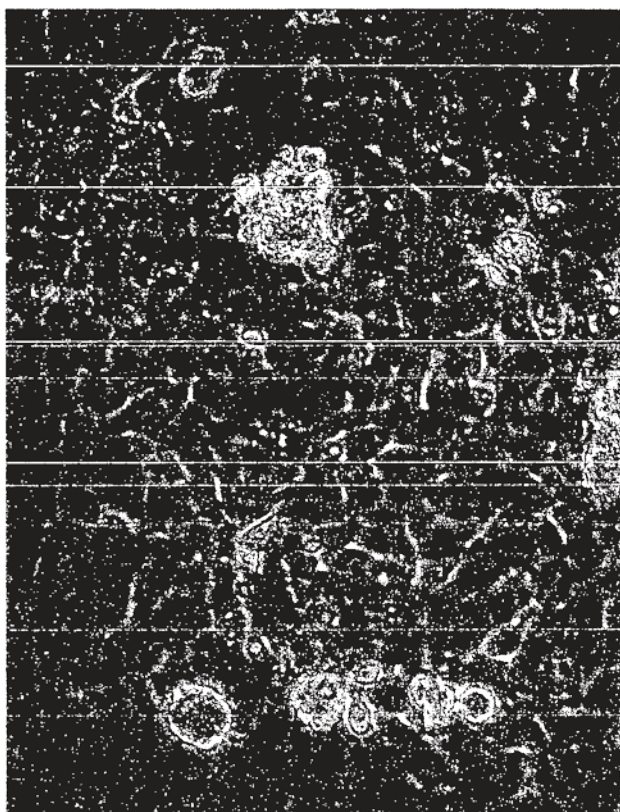


Fig. 5c

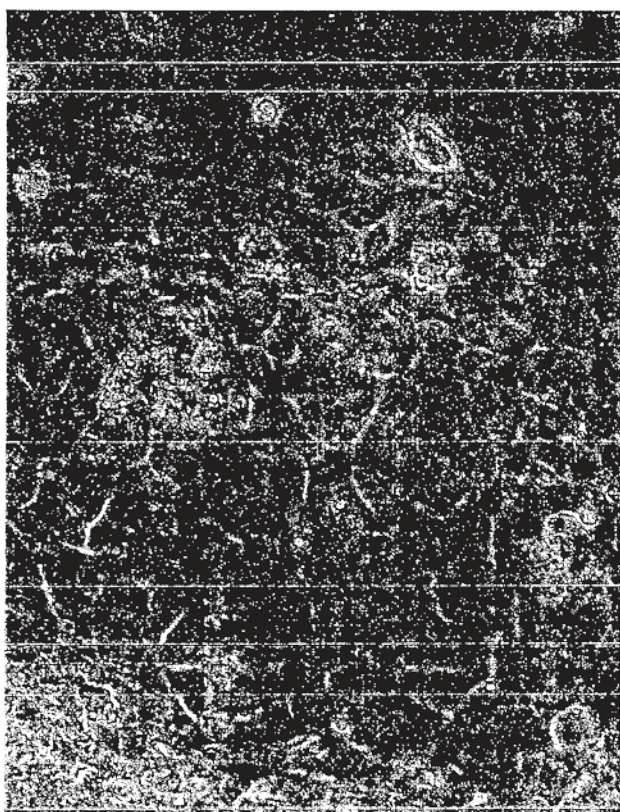


Fig. 5b

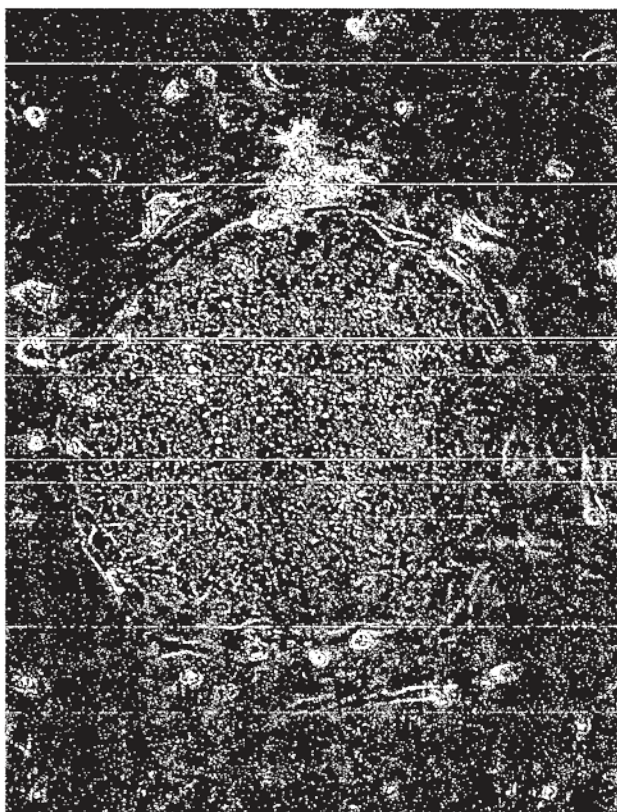


Fig. 5e

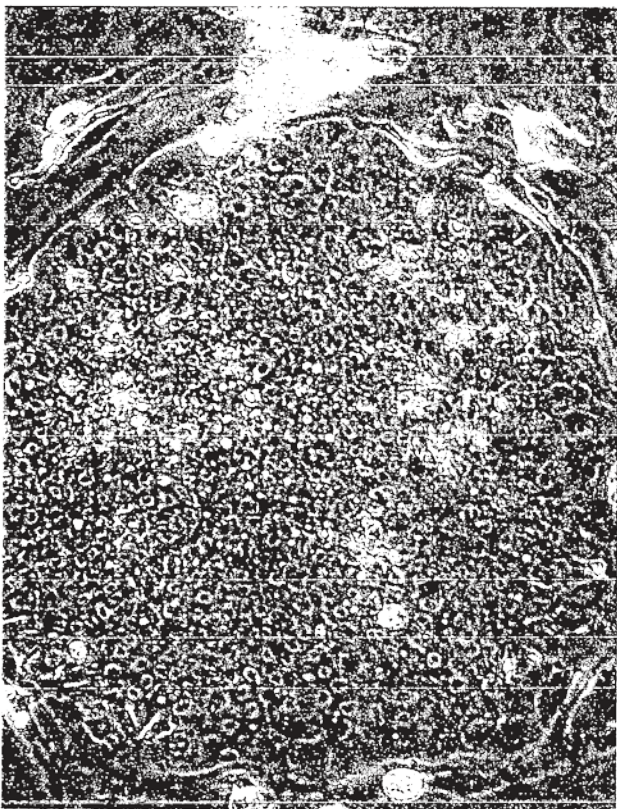


Fig. 5d

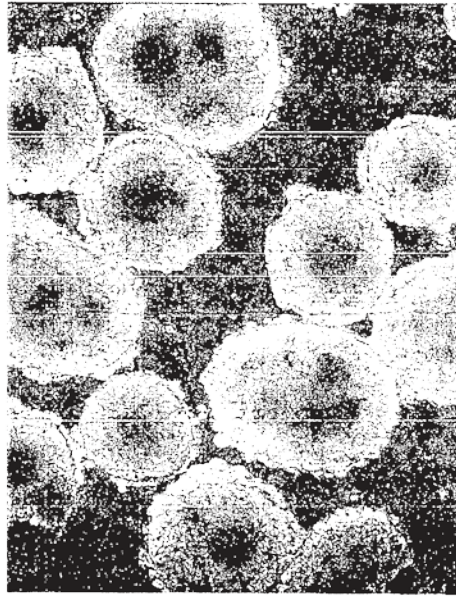
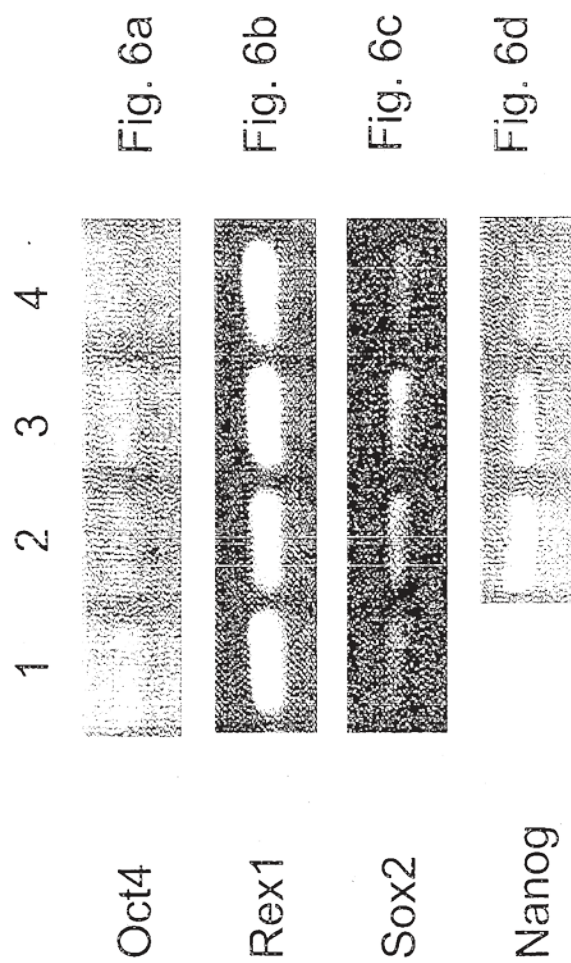


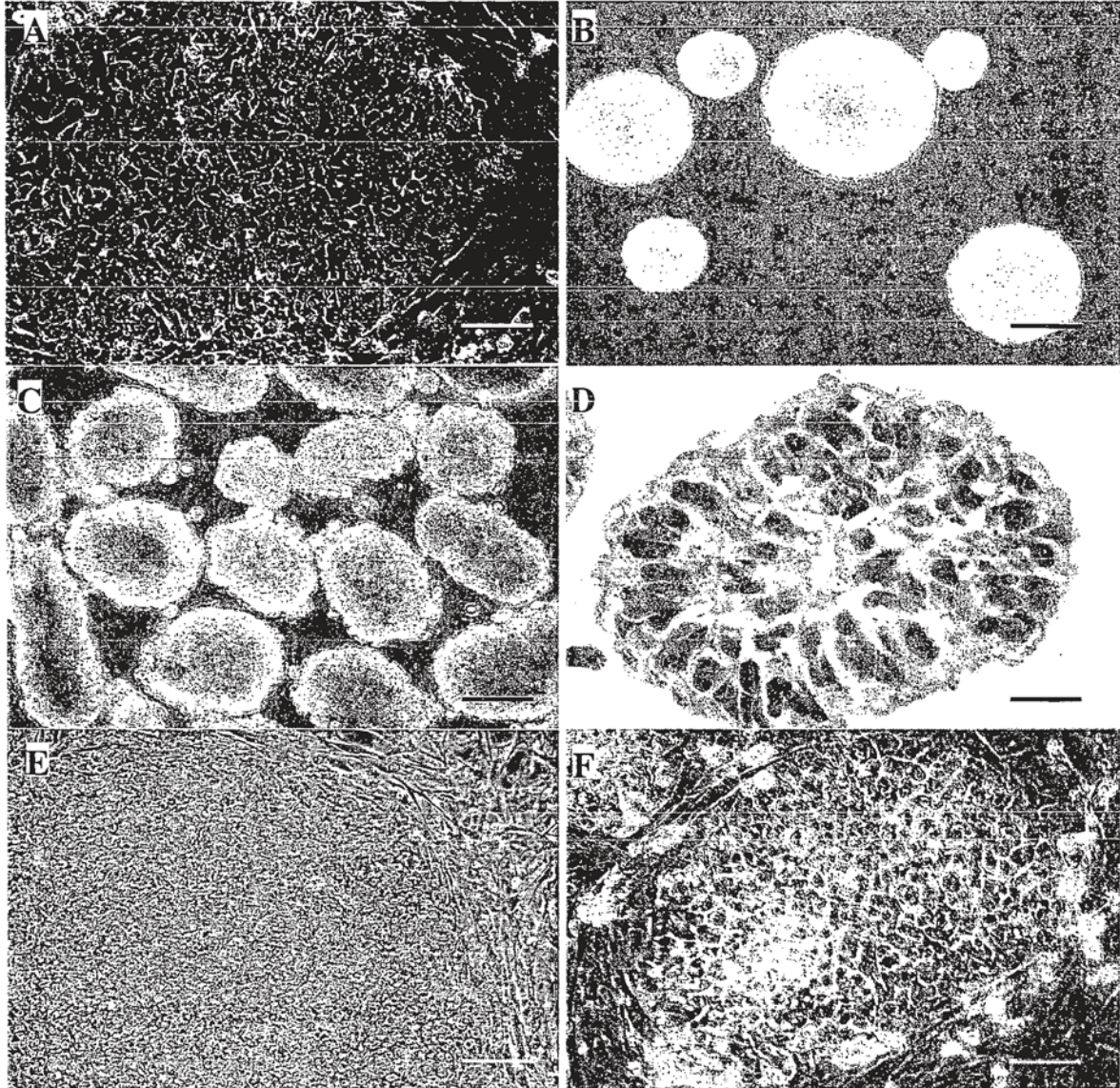
Fig. 5g



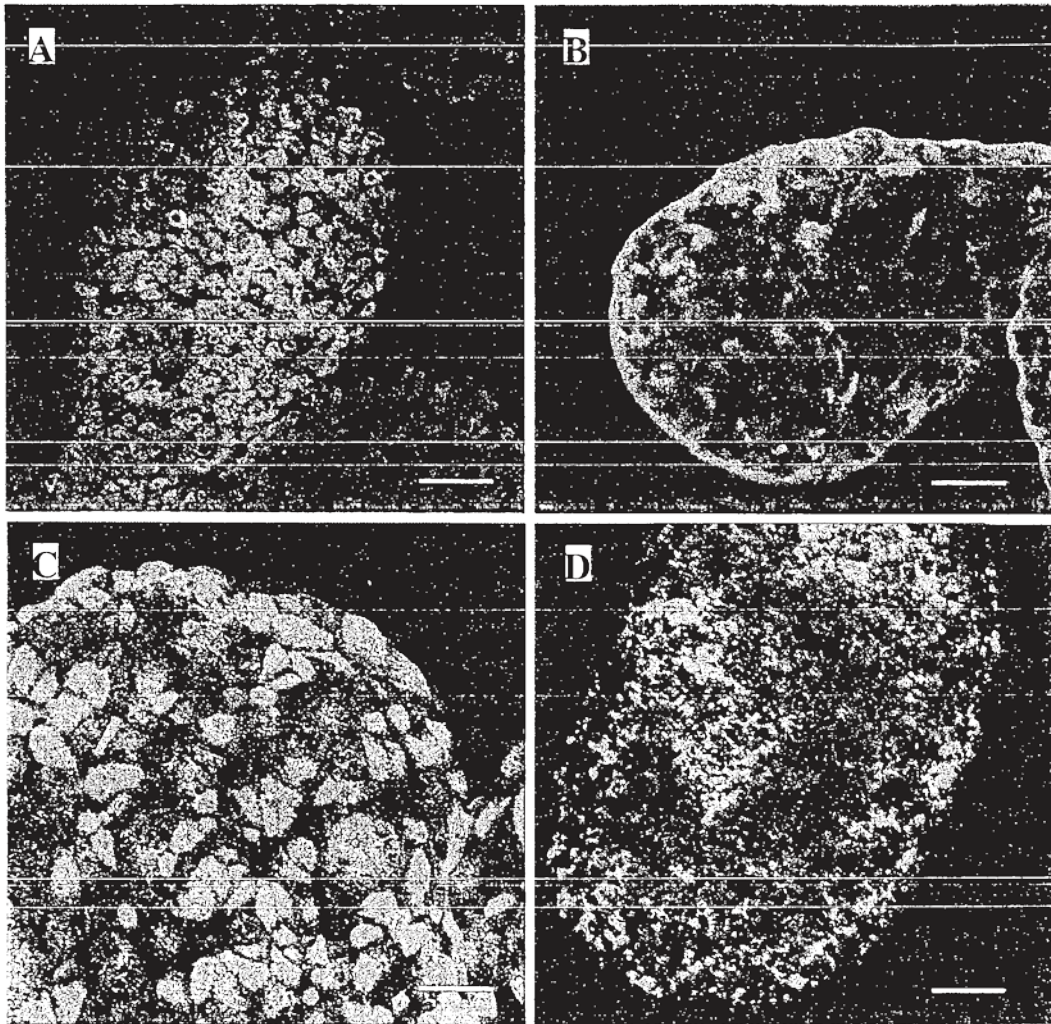
Fig. 5f



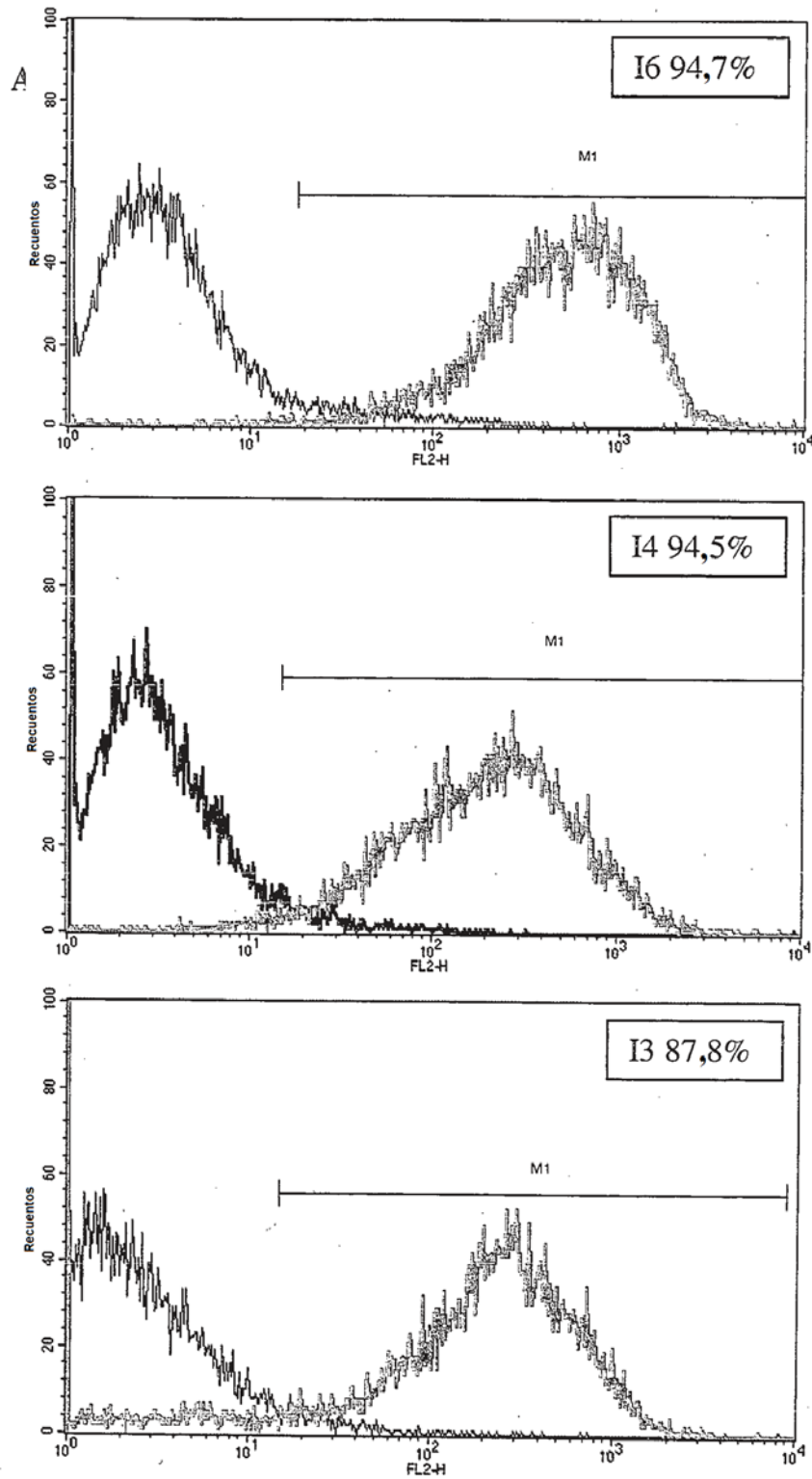
Figuras 7a-f



Figs. 8a-d



Figuras 10a-c



Figuras 11a-b

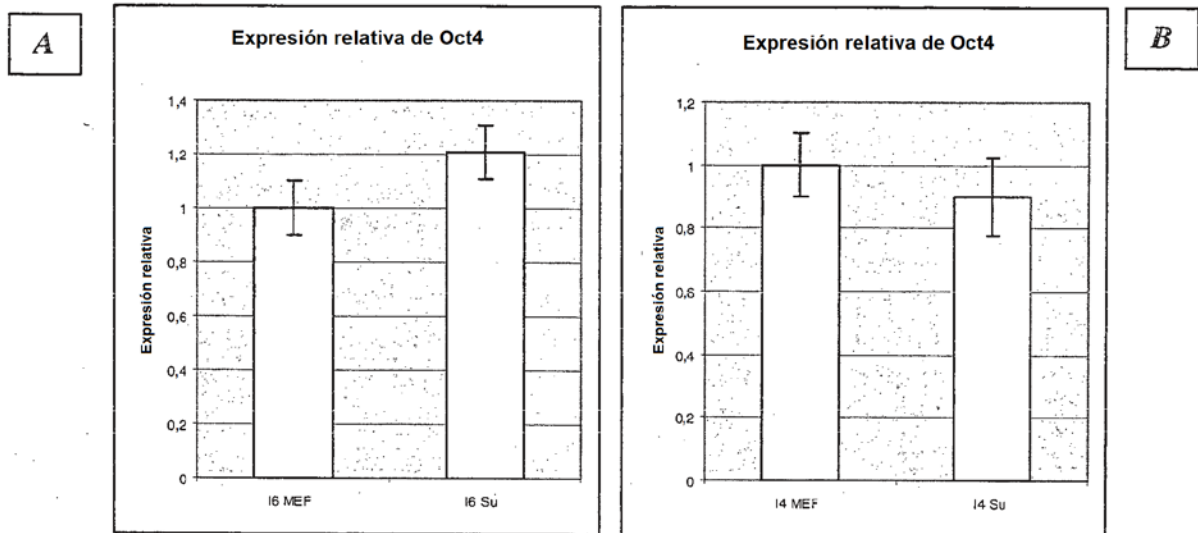


Fig. 9

	10 p	15 p	20 p
Oct4			
Nanog			
Rex1			
FGF4			
Sox2			

Figuras 12a-d

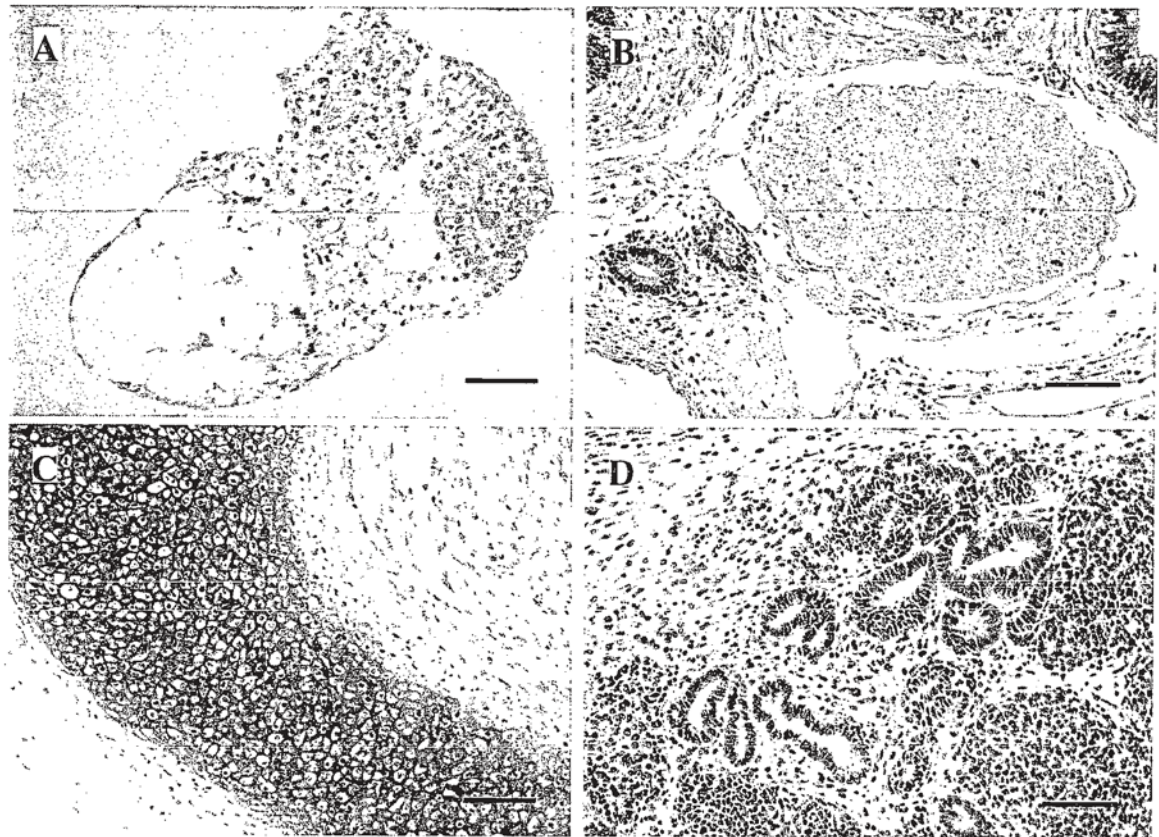
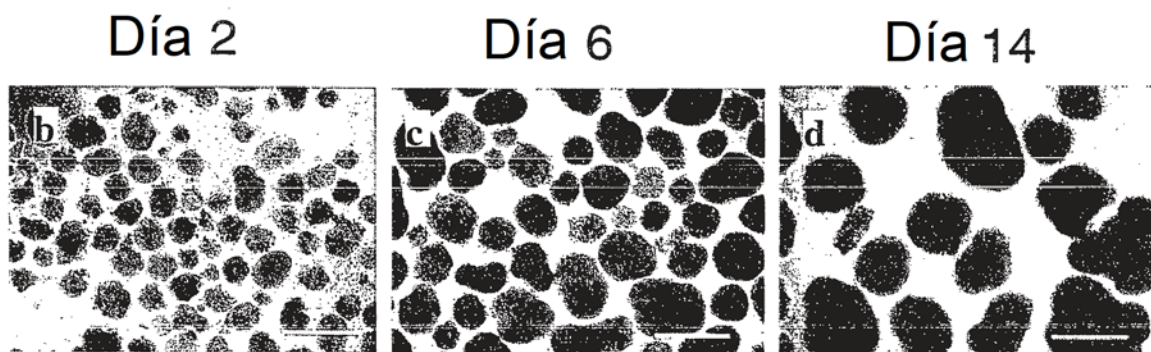
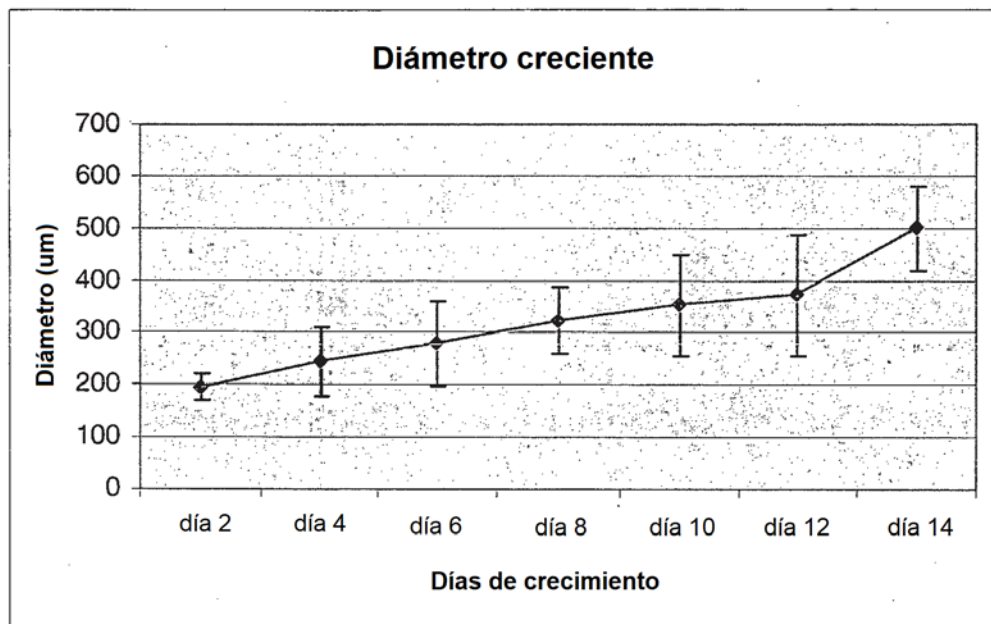


Fig. 13a



Figuras 13b-d

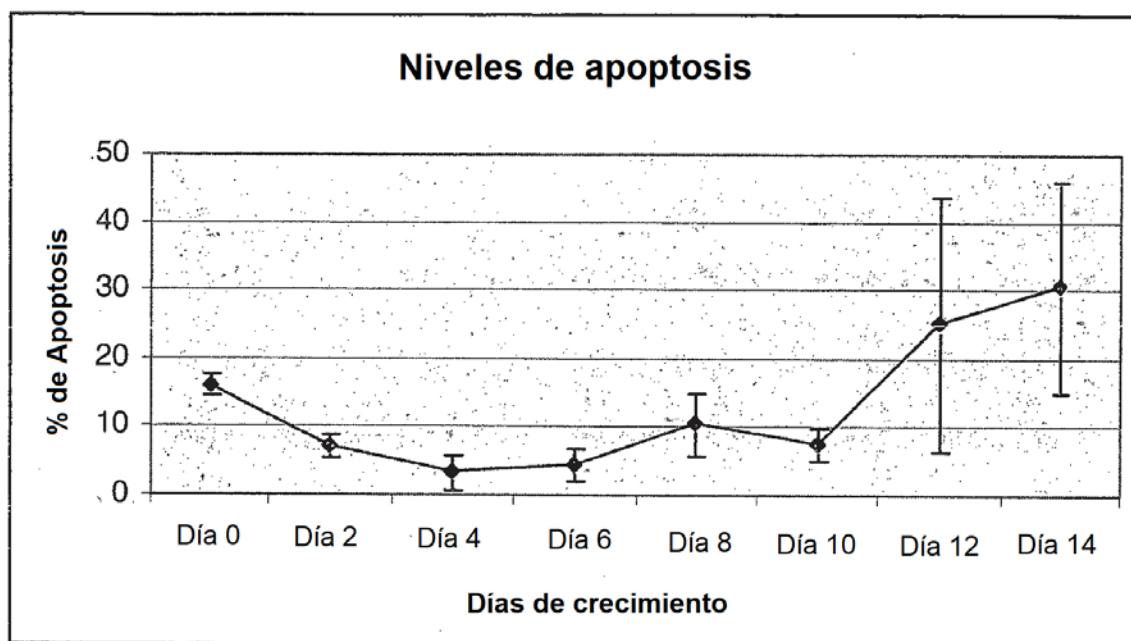
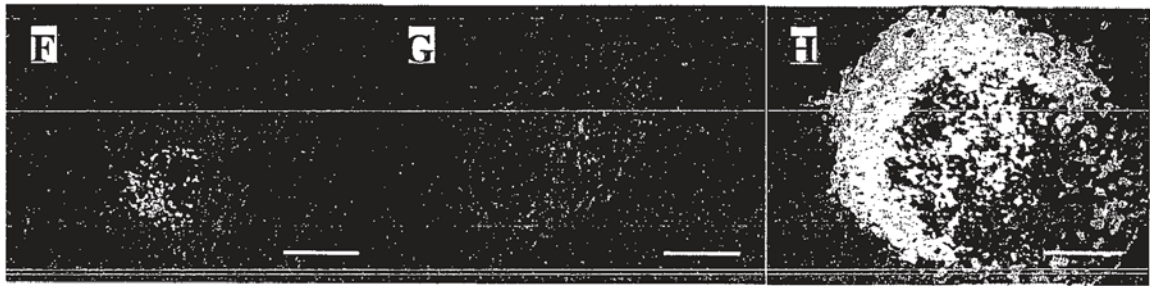
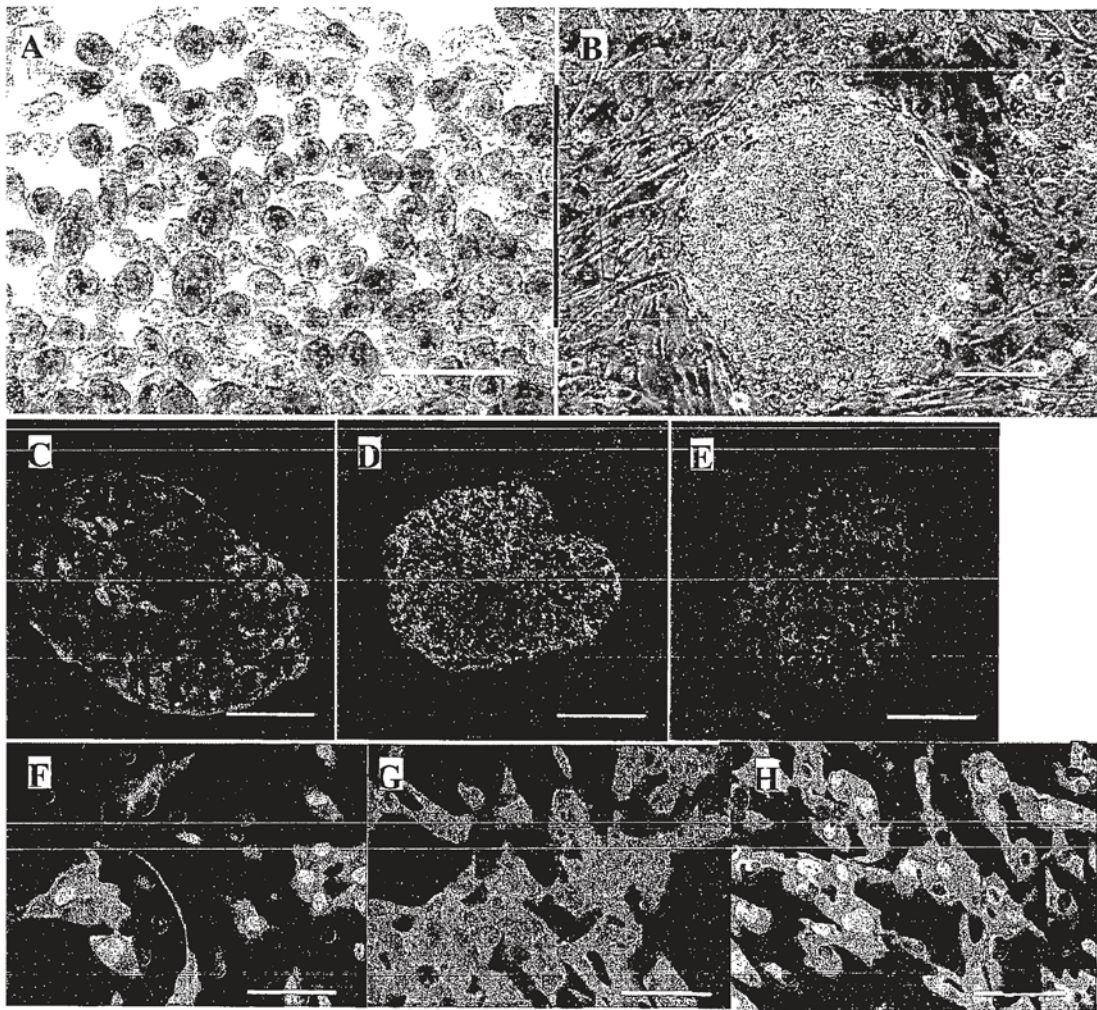


Fig. 13e



Figuras 13f-h

Figuras 14a-h



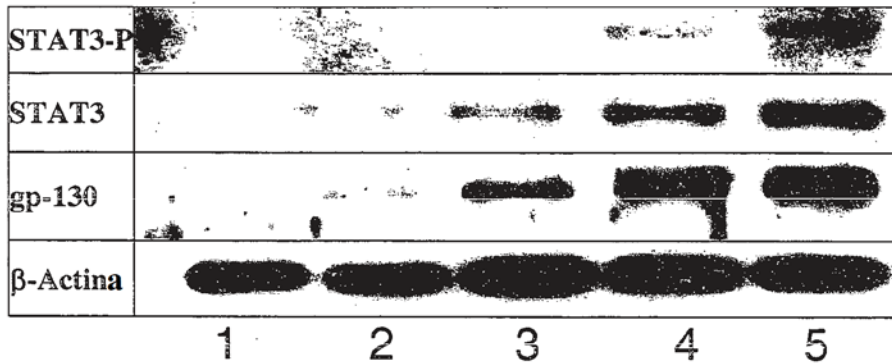


Fig. 15a

Fig. 15b

Fig. 15c

Fig. 15d

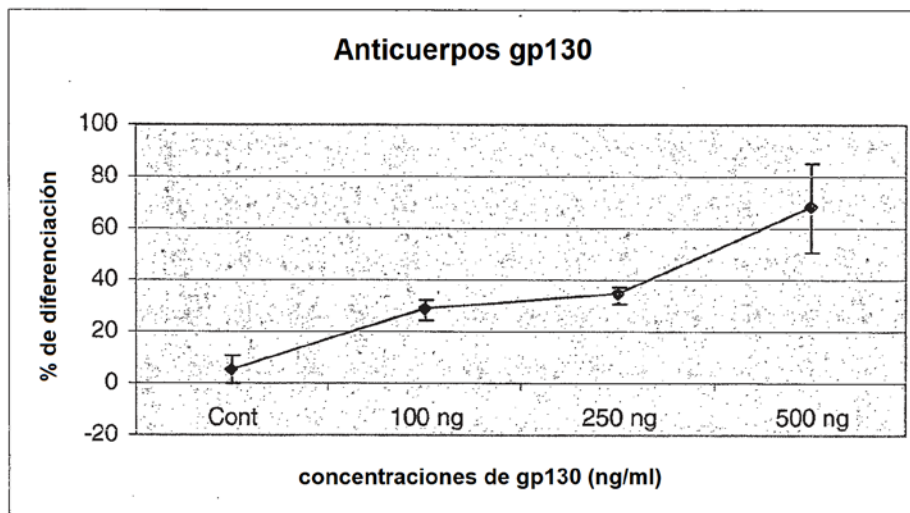


Fig. 16

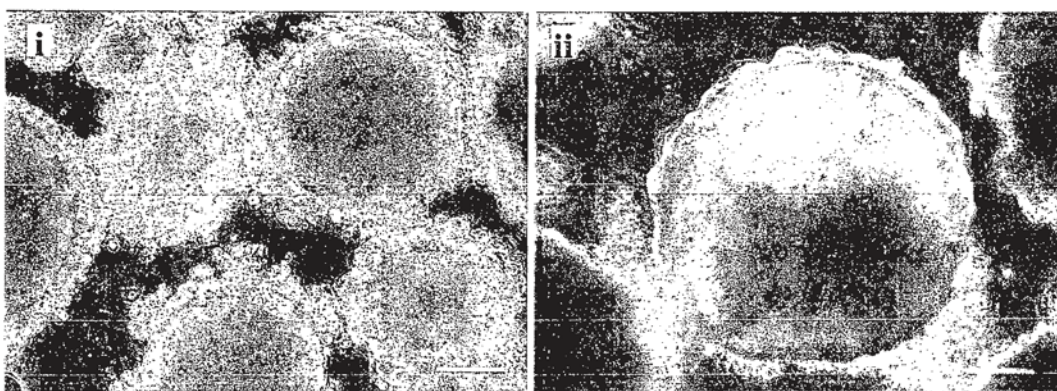


Fig. 17a

Fig. 17b

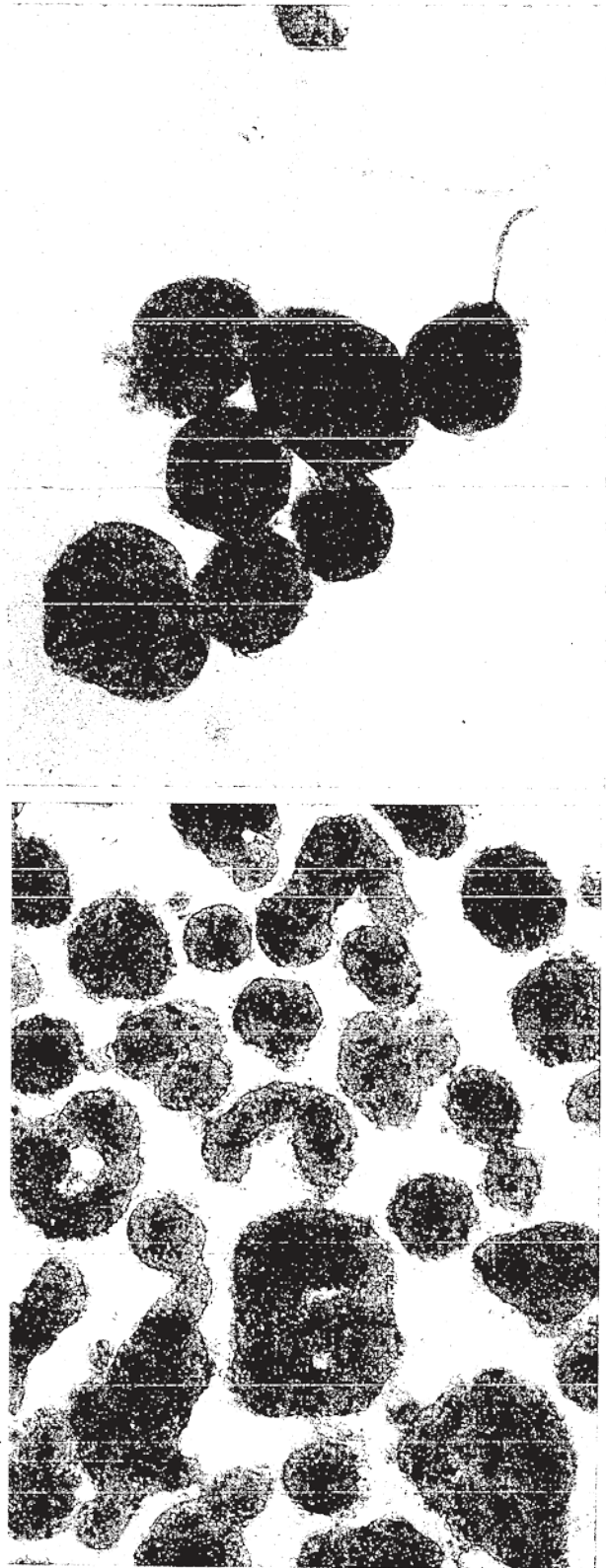


Fig 18a

Fig 18b

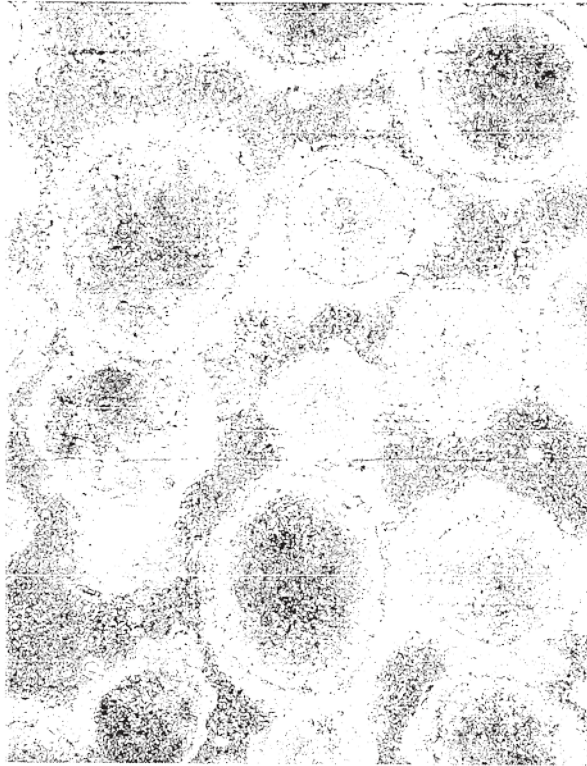


Fig. 18d

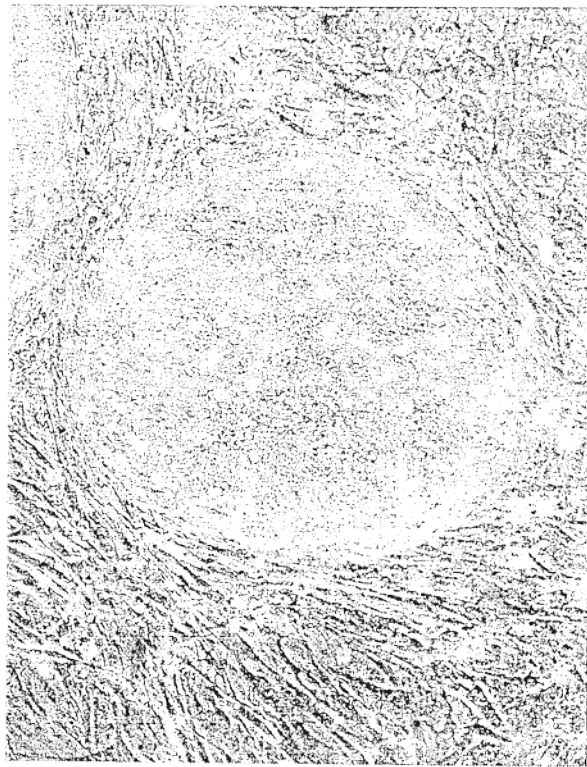


Fig. 18c



Fig. 18e

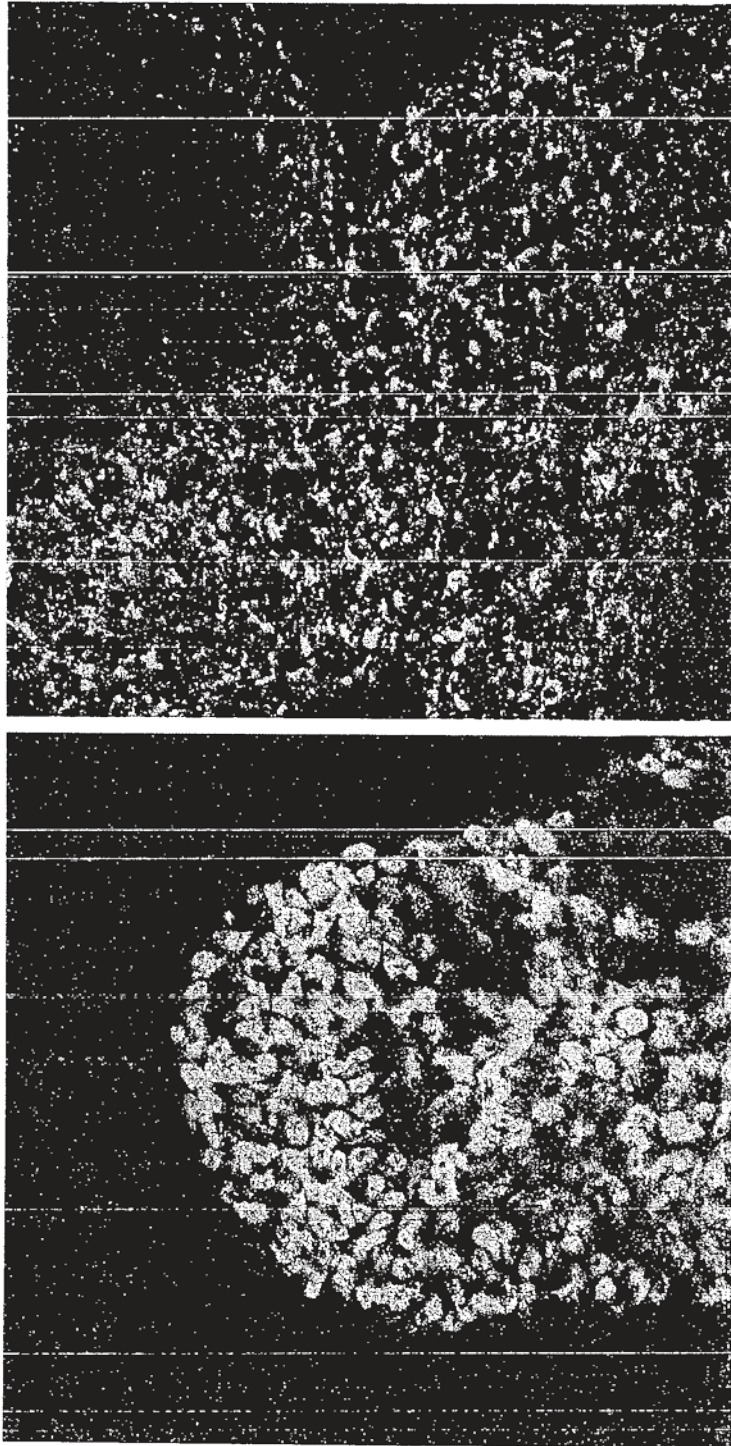


Fig. 19b

Fig. 19a

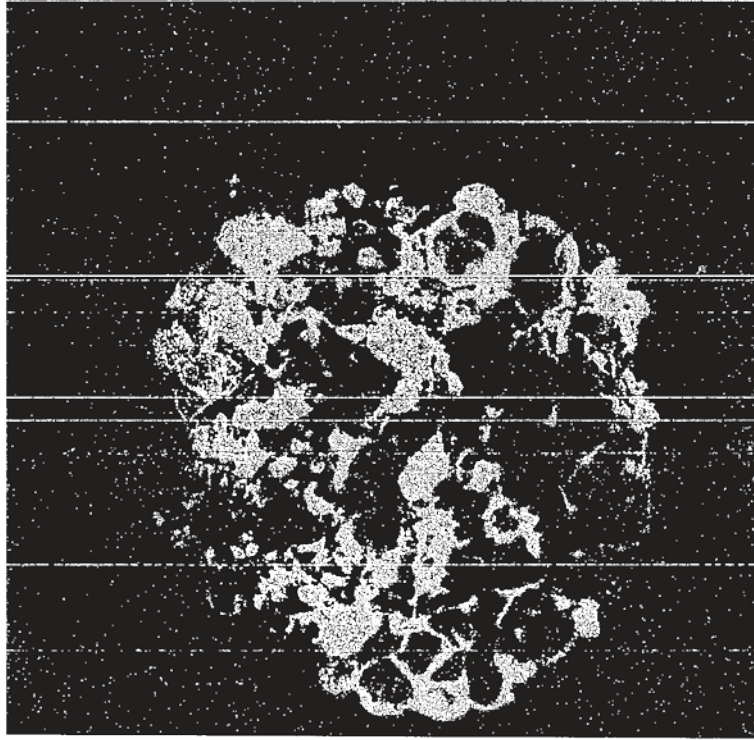


Fig. 19d

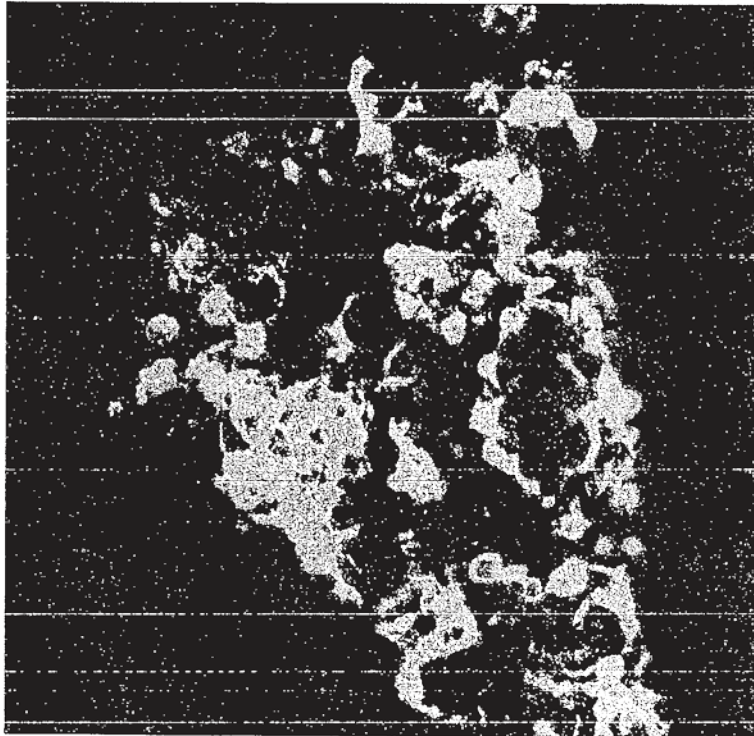


Fig. 19c

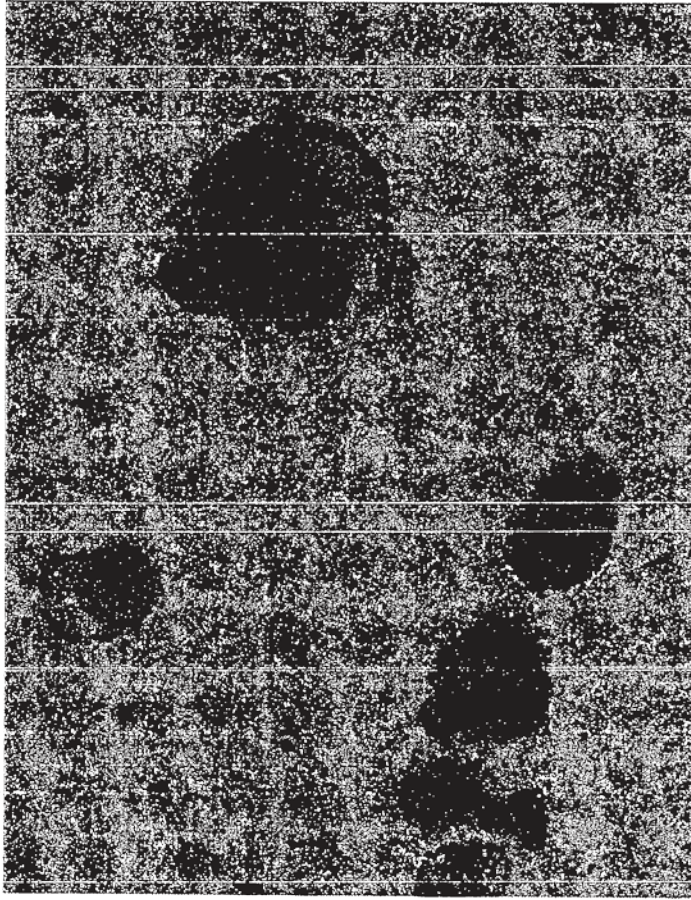


Fig. 20