

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 683**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2003** **E 11190776 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2457999**

54 Título: **Medio de cultivo de células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

16.12.2002 US 433619 P

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

26.03.2019

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:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 705 683 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo de células madre pluripotentes

5 La presente divulgación se refiere a métodos de preparación de estirpes de células madre embrionarias humanas usando sistemas de cultivo libres de xenocontaminantes y libres de células alimentadoras (por ejemplo, capa de células alimentadoras, también conocida como capa de alimentación) y de células madre que pueden mantenerse en un estado no diferenciado, pluripotente y proliferativo en cultivo que esté libre de xenocontaminantes y de células alimentadoras.

10 Las células madre embrionarias (ESC), que son totipotentes, tienen el potencial de desarrollarse en cualquier tipo de célula y generar cualquier tipo de tejido, órgano o parte del cuerpo, incluyendo un organismo completo. Como tal, se espera que la capacidad de proporcionar ESC humanas clonales normales a demanda y de manipular su diferenciación proporcione una poderosa herramienta que pueda impulsar avances radicales en los campos de la
15 Biomedicina, industrial y científico. Las posibles aplicaciones de las ESC son de largo alcance, e incluyen el descubrimiento y ensayo de fármacos, la generación de células, tejidos y órganos para su uso en trasplantes, producción de biomoléculas, ensayo de toxicidad y/o teratogenicidad de compuestos y facilitar el estudio de procesos evolutivos y de otros procesos biológicos. Por ejemplo, las enfermedades que actualmente se espera que puedan tratarse con trasplante terapéutico de ESC o células derivadas de ESC incluyen la enfermedad de Parkinson, infartos
20 cardíacos, diabetes mellitus de aparición juvenil y leucemia (Gearhart *J. Science* 1998, 282:1061; Rossant y Nagy, *Nature Biotech.* 1999, 17:23).

Hay, sin embargo, importantes obstáculos para el aprovechamiento práctico de las ESC humanas.

25 Para mantener las ESC humanas en un estado no diferenciado, los cultivos de ES deben complementarse con factores que mantengan la proliferación celular, inhiban la diferenciación de las ES y conserven la pluripotencia.

Además, para las terapias de replazo celular y de regeneración tisular, las ESC humanas deben cultivarse en un medio completo no animal y en presencia de condiciones de cultivo bien definidas que permitan una reproducción
30 completa de cultivos de ES.

En la actualidad, los métodos de cultivo de las células ES que se ponen en práctica se basan principalmente en el uso de capas de células alimentadoras que segregan factores necesarios para la proliferación de las células madre, aunque al mismo tiempo, inhiben su diferenciación. En el cultivo de células ES, también se han usado sistemas libre
35 de células alimentadoras, y dichos sistemas utilizan matrices complementadas con suero, citocinas y factores de crecimiento como un sustituto de la capa de células alimentadoras.

Cultivos basados en capas alimentadoras

40 *Capas alimentadoras de ratón* - El método más común para el cultivo de células ES se basa en los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) como una capa de células alimentadoras complementada con medio de cultivo tisular que contiene suero o factor inhibidor de la leucemia (LIF), que mantiene la proliferación y la pluripotencia de las células ES [Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts". *Science* 282: 1145-7; Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong
45 C., Trounson A., Bongso A. (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*". *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404]. Las células de MEF proceden de embriones de ratón de 12-13 días en medio complementado con suero bovino fetal. En estas condiciones, las células ES de ratón pueden mantenerse en cultivo como células madre pluripotentes, conservando sus características fenotípicas y funcionales. Sin embargo, a diferencia de las células ES de ratón, la presencia de LIF añadido exógenamente no impide la diferenciación de células
50 ES humanas (Thomson *et al.*, 1998, *Science* 282: 1145-7; Reubinoff *et al.*, 2000, *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404). Por otra parte, el uso de células alimentadoras aumenta sustancialmente el coste de producción, y hace que la producción a mayor escala del cultivo de células ES humanas no sea viable. Además, las células alimentadoras se inactivan metabólicamente para impedir la excrecencia de las células madre, por tanto, en cada división de cultivo de ES humanas es necesario tener células alimentadoras recientes. Hasta la fecha, la separación de los componentes de
55 las células alimentadoras de las células embrionarias preparadas en cultivo a granel no puede realizarse de manera eficaz, los cultivos de ES preparados con capas de células alimentadoras no son adecuados para la terapia humana.

Las células ES también pueden cultivarse en MEF, en condiciones libres de suero usando sustitutivo del suero complementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) [Amit M., Carpenter M. K., Inokuma M. S., Chiu C. P., Harris C. P., Waknitz M. A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J. A., (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture". *Dev. Biol.* 227: 271-
60 8]. En estas condiciones, la eficiencia de la clonación de las células ES es 4 veces superior que con suero bovino fetal. Además, además, tras 6 meses de cultivo en sustitutivo del suero, las células ES siguen conservando su pluripotencia, como lo indica su capacidad para formar teratomas que contienen las tres capas germinales embrionarias. Aunque este sistema usa unas condiciones de cultivo mejor definidas, la presencia de células de ratón en el cultivo expone al cultivo humano a patógenos, lo que limita su uso en terapia a base de células.

Fibroblastos embrionarios humanos o células epiteliales adultas de trompas de Falopio como capas de células alimentadoras – Las células ES humanas pueden crecer y mantenerse usando fibroblastos embrionarios humanos o células epiteliales adultas de trompas de Falopio. Cuando crecen en estas células alimentadoras humanas, las células ES humanas presentan cariotipos normales, presentan actividad fosfatasa alcalina, expresan Oct-4 y otros marcadores de superficie de células embrionarias, incluyendo SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y GCTM-2, forman teratomas *in vivo*, y conservan todas las características morfológicas clave [Richards M., Fong C. Y., Chan W. K., Wong P. C., Bongso A. (2002). "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells". *Nat. Biotechnol.* 20: 933-6]. Sin embargo, la principal desventaja del uso de fibroblastos embrionarios humanos o de células epiteliales adultas de trompas de Falopio como células alimentadoras es que estas dos estirpes celulares tienen una capacidad de pasadas limitada de solo 8 a 10 veces, por lo que se limita la capacidad de un período de crecimiento de ES prolongado. Durante un período de cultivo prolongado, las células ES deben crecer en células alimentadoras humanas originadas de diversos sujetos, lo que produce un aumento de la variabilidad en las condiciones de cultivo.

Capas alimentadoras de prepucio – Las células ES humanas pueden cultivarse en capas alimentadoras de prepucio humano, según lo desvelado en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/368.045. Las capas de células alimentadoras procedentes de prepucio consisten en un medio completo no animal adecuado para el cultivo de células ES humanas. Además, las células de prepucio pueden mantenerse en cultivo durante tanto tiempo como 42 pasadas desde su obtención, proporcionando a las células ES un medio relativamente constante. En estas condiciones, se descubrió que las células ES humanas no eran funcionalmente distintas de las células desarrolladas con protocolos alternativos (por ejemplo, MEF). Tras la diferenciación, las células ES expresaron genes asociados con las tres capas germinales embrionarias, *in vitro*, y formaron teratomas *in vivo*, que consistían en tejido originado de las tres capas germinales. Además, a diferencia de las células epiteliales humanas de trompas de Falopio o fibroblastos embrionarios humanos, las células ES humanas cultivadas en capas alimentadoras de prepucio se mantuvieron en cultivo en un estado pluripotente e no diferenciado durante al menos 87 pasadas. Sin embargo, aunque las células de prepucio pueden mantenerse en cultivo durante largos períodos (es decir, 42 pasadas), el sistema de cultivo de células de prepucio no está bien definido debido a diferencias entre diferentes lotes. Además, los sistemas de cultivos basados en capas alimentadoras humanas todavía requerirían el crecimiento simultáneo de tanto capas alimentadoras como de células hES. Por lo tanto, se han desarrollado sistemas de cultivo libres de células alimentadoras.

Cultivos libre de células alimentadoras

Las células madre pueden crecer en una superficie sólida tal como una matriz extracelular (por ejemplo, Matrigel^{RTM} o laminina) en presencia de un medio de cultivo. A diferencia de los cultivos a base de células alimentadoras que requieren el crecimiento simultáneo de células alimentadoras y de células madre, y que pueden dar lugar a poblaciones celulares mixtas, las células madre que crecen en sistemas libres de células alimentadoras se separan fácilmente de la superficie. El medio de cultivo usado para cultivar las células madre contiene factores que inhiben de un modo eficaz la diferenciación y potencian su crecimiento, tal como medio acondicionado con MEF y bFGF. Sin embargo, los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras usados normalmente utilizan una matriz animal (por ejemplo, Matrigel^{RTM}) complementada con suero bovino o de ratón, o con medio acondicionado con MEF [Xu C., *et al.* (2001). "Feeder cells-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells". *Nat Biotechnol.* 19: 971-4] que presentan el riesgo de transferencia cruzada con patógenos animales con las células ES humanas, comprometiendo de este modo las futuras aplicaciones clínicas.

Como se desvela además en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/368.045, las células madre se pueden cultivar en una superficie de matriz complementada con un medio acondicionado derivado del prepucio. Sin embargo, este medio, aunque presente un sistema no animal, todavía no está completamente definido en términos de composición de cultivo.

Los recientes intentos por cultivar células madre embrionarias humanas en una composición de cultivo más definida utilizaron superficies de Matrigel o laminina y una mezcla de factores de crecimiento. Sin embargo, según lo desvelado en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20030017589 en estas condiciones, solo el 50-70 % de las células presentaban una morfología celular no diferenciada. Además, las células madre mostraron además un tiempo de duplicación relativamente corto de 19 horas, lo que sugiere que las células madre se volvieron tumorigénicas (véase Amit *et al.*, 2000, *Dev. Biol.* 227: 271-8).

Así pues, existe una necesidad ampliamente reconocida de, y sería muy ventajoso tener, un sistema de cultivo libre de xenocontaminantes y libre de células alimentadoras, capaz de mantener las células ES humanas en un estado proliferativo, pluripotente e no diferenciado sin las limitaciones anteriores.

El documento WO 0017321 proporciona un método mejorado para expandir células para su uso en ingeniería de tejidos. En particular, el método proporciona factores bioquímicos específicos para complementar el medio de cultivo celular durante el proceso de expansión para reproducir los eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario con el objetivo de regenerar tejidos equivalentes que se asemejen a los tejidos naturales tanto estructural como funcionalmente. Estos factores bioquímicos específicos mejoran la proliferación de las células y son capaces de desdiferenciar las células maduras aisladas del tejido para preservar el potencial de diferenciación de las células. Las

moléculas bioactivas también mantienen la capacidad de respuesta de las células hacia otras moléculas bioactivas. Específicamente, proporciona métodos para expandir los condrocitos en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos 2 para su uso en la regeneración del tejido cartilaginoso.

5 El documento WO 0121766 se refiere a células hematopoyéticas, y más específicamente, a métodos y dispositivos para obtener células de linaje no hematopoyético a partir de células progenitoras hematopoyéticas. Las células de linaje no hematopoyético obtenidas mediante los métodos anteriores de la invención son útiles en el tratamiento terapéutico de una variedad de afecciones patológicas en seres humanos y otras especies.

10 El documento US 5612211 se refiere a factores de crecimiento de fibroblastos que se usan *in vivo*, *in situ* e *in vitro* para estimular las células madre, la hemopoyesis, el sistema inmunitario, las células donantes de trasplante, el cultivo y/o injerto, en el que se desvela el uso de factores de crecimiento de fibroblastos para la estimulación de células madre o células hematopoyéticas, células de soporte y su progenie, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, así como los correspondientes sitios de injerto *in vivo*.

15 El documento WO 0151616 proporciona un sistema mejorado para cultivar células madre pluripotentes (pPS) humanas en ausencia de células alimentadoras. El papel de las células alimentadoras puede reemplazarse apoyando el cultivo en una matriz extracelular y cultivando las células en un medio acondicionado. Se proporcionan estirpes celulares permanentes que pueden producir medio acondicionado a escala comercial. También se ha descubierto que los métodos alteran genéticamente las células pPS introduciendo las células con un vector vírico o complejo de ADN/lípido. El sistema descrito en la presente divulgación permite la proliferación masiva de células pPS para su uso en el estudio de la biología de la diferenciación de células pPS y la generación de productos importantes para su uso en terapia humana.

25 XU CHUNHUI *et al.*, titulado "Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells" se refiere al crecimiento de células madre embrionarias humanas no diferenciadas libre de células alimentadoras, NATURE BIOTECHNOLOGY, (200110), vol. 19, no.º 10.

30 AMIT M. *et al.*, titulado "Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells", se refiere a un cultivo de células madre embrionarias humanas libre de células alimentadoras y libre de suero, BIOLOGY OF REPRODUCTION, NUEVA YORK, NY [U.A.] : ACADEM. PRESS, EE.UU., (200401), vol. 70.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a un medio de cultivo seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y suero humano o sustitutivo del suero, medio de cultivo que está esencialmente libre de contaminantes animales, medio de cultivo que es capaz de mantener células madre pluripotentes humanas en un estado no diferenciado; y

40 (ii) un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y albúmina libre de contaminantes animales y que carece de suero, medio de cultivo que está esencialmente libre de contaminantes animales y dicho medio de cultivo que puede mantener células madre pluripotentes humanas en un estado no diferenciado.

45 Preferentemente, el medio de cultivo está además esencialmente libre de contaminantes de células alimentadoras, y en la que dicho bFGF se proporciona a una concentración de al menos 2 ng/ml. Preferentemente, el medio de cultivo comprende además el factor inhibidor de la leucemia (LIF).

50 Preferentemente, el medio de cultivo está esencialmente libre de contaminantes de células alimentadoras.

Preferentemente, dicho bFGF se proporciona a una concentración de al menos 2 ng/ml.

Preferentemente, dicho TGF β_1 se proporciona a una concentración de al menos 0,06 ng/ml.

55 Preferentemente, el medio de cultivo de la reivindicación 1 (ii), comprende además sustitutivo del suero.

Preferentemente, dicho sustitutivo del suero comprende albúmina o sustitutos de albúmina, aminoácidos, vitaminas, transferrinas o sustitutos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno y elementos traza.

Preferentemente, dicho TGF β_1 se proporciona en un intervalo de concentración de 0,06-0,24 ng/ml.

60 Preferentemente, dicho bFGF se proporciona en un intervalo de concentración de 2-8 ng/ml.

65

Preferentemente, dicho LIF se proporciona a una concentración de al menos 500 u/ml.

Preferentemente, dicho LIF se proporciona en un intervalo de concentración de 500-2.000 u/ml.

5 Preferentemente, dicho sustitutivo del suero se proporciona en un intervalo de concentración del 1 % al 40 %.

Preferentemente, dicho sustitutivo del suero se proporciona a una concentración de al menos el 10 %.

10 Preferentemente, dicho suero humano se proporciona en un intervalo de concentración del 1 % al 40 %.

Preferentemente, dicho suero humano se proporciona a una concentración del al menos 10 %.

Preferentemente, dicho medio de cultivo es capaz de mantener células madre pluripotentes en un estado no diferenciado durante al menos 5 pasadas.

15 Breve descripción de los dibujos

La divulgación se describe en el presente documento, a modo de ejemplo únicamente, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora referencia específicamente a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son solamente a modo de ejemplo y con fines de describir de forma ilustrativa las realizaciones preferidas de la presente divulgación, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se considera la descripción más útil y fácil de entender de los principios y aspectos conceptuales de la divulgación. En este sentido, no se intenta mostrar detalles estructurales de la divulgación más detalladamente de lo necesario para una comprensión fundamental de la divulgación, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo se pueden realizar las diversas formas de la divulgación en la práctica.

En los dibujos:

30 Las FIG. 1a-d son micrografías que ilustran el crecimiento de colonias de células ES y de células ES individuales sobre una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema libre de células alimentadoras. Se muestran imágenes de campo claro de las diversas estirpes de células ES que crecen en fibronectina en presencia de sustitutivo del suero y diversas combinaciones de factores de crecimiento. Figura 1a - crecimiento de la estirpe I-6 de células ES en presencia de TGFβ₁, LIF y bFGF (TLF) durante 31 pasadas (el tamaño de la barra representa 100 μm); Figura 1b - crecimiento de la estirpe I-3 de células ES en TLF durante 21 pasadas (el tamaño de la barra representa 50 μm); Figura 1c - crecimiento de la estirpe I-6 de células ES en TLF durante 31 pasadas (el tamaño de la barra representa 50 μm); Figura 1d - crecimiento de la estirpe I-3 de células ES en TGFβ₁ y bFGF (TF) durante 20 pasadas (el tamaño de la barra representa 38 μm). Cabe señalar los espacios entre las células (Figuras 1a-c) y la alta proporción del núcleo con respecto al citoplasma típica de las células ES humanas (Figura 1d).

40 Las FIG. 1e-h son micrografías inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de marcadores de superficie típicos de células no diferenciadas en las estirpes I-3 e I-6 de células ES humanas que crecen en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema libre de células alimentadoras. Se muestran imágenes fluorescentes de células ES humanas (estirpe I-3) que crecen en presencia de TF durante 17 pasadas y marcadas con anticuerpos anti-SSEA4 (Figura 1e, el tamaño de la barra representa 50 μm), estirpe I-3 de células ES que crecen en presencia de TLF durante 38 pasadas y marcadas con anticuerpos anti-SSEA4 (Figura 1f, el tamaño de la barra representa 6 μm), estirpe I-6 de células ES que crecen en presencia de TLF durante 30 pasadas y marcadas con anticuerpos anti-TRA-60 (Figura 1g, el tamaño de la barra representa 6 μm), estirpe I-3 de células ES que crecen en presencia de TF durante 21 pasadas y marcadas con anticuerpos anti-TRA-81 (Figura 1h, el tamaño de la barra representa 6 μm). Se capturaron imágenes fluorescentes usando un microscopio fluorescente invertido (Figura 1e) o un microscopio confocal (Figuras 1f-h).

50 Las FIG. 2a-c ilustran la diferenciación *in vitro* de células hES que crecen en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema libre de células alimentadoras. Se muestran secciones histológicas de cuerpos embrionarios (CE) derivados de células que crecen en el sistema de cultivo libre de células alimentadoras. Figura 2a - un CE simple de 24 horas de vida procedente de la estirpe celular I-3 tras crecer durante 28 pasadas en TF (el tamaño de la barra representa 100 μm); Figura 2b - un CE de 14 días de vida procedente de la estirpe celular I-3 que crece durante 28 pasadas en TF (el tamaño de la barra representa 50 μm); Figura 2c - un CE de 14 días de vida derivado de la estirpe celular I-3 que crece durante 30 pasadas en TLF (el tamaño de la barra representa 25 μm). Cabe señalar el epitelio protector externo (Figura 2b, flecha) del CE y la estructura de tipo bola que consiste en epitelio columnar rodeado de tejido mesenquimático (Figura 2c).

60 Las FIG. 2d-f ilustran la expresión de marcadores representativos de mesodermo y ectodermo en células derivadas de CE de 14 días de vida formados a partir de células ES que crecen en diversos medios en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema libre de células alimentadoras de la presente divulgación. Las células de CE derivadas de diversas estirpes de células ES se tiñeron con inmunotinción fluorescente con diversas sondas de anticuerpo. Figura 2d - la estirpe celular I-6 creció en TLF durante 22 pasadas y se tiñó con inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra tubulina específica neuronal (el tamaño de la barra representa 6 μm). Figura 2e - la estirpe celular I-3 creció en TLF durante 30 pasadas y se tiñó con inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra la actina de músculo liso (el tamaño de la barra representa 6 μm). Figura 2f - la estirpe celular I-3 creció en

TF durante 28 pasadas y se tiñó con inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra CD-31 (el tamaño de la barra representa 6 μm).

La FIG. 3 ilustra la determinación con RT-PCR de la fase de diferenciación de las células ES, de las estirpes I-3 o I-6, que crecieron en una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema libre de células alimentadoras y de los cuerpos embrionarios (CE) derivados de las mismas. La reacción RT-PCR se realizó en muestras de ARN extraídas de células ES I-3, I-6 o de CE derivados de las mismas. Carril 1 - células ES I-3 que crecen en TF durante 19 pasadas; carril 2 - células ES I-3 que crecen en TLF durante 20 pasadas; carril 3 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TLF durante 23 pasadas; carril 4 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TF durante 28 pasadas; carril 5 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TLF durante 30 pasadas; carril 6 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TLF durante 29 pasadas; carril 7 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-6 que crecen en TLF durante 22 pasadas. La especificidad de la reacción se verificó en ausencia de ARN (Figura 3, carril 8). Cabe señalar que las muestras de CE de los carriles 3-6 procedían de cuatro lotes diferentes de células ES de la estirpe I-3.

Las FIG. 4a-c ilustran secciones histológicas de teratomas procedentes de las estirpes I-3 y I-6 de células ES que crecen durante 26 y 19 pasadas, respectivamente, en TLF sobre una matriz de fibronectina de origen bovino en un sistema libre de células alimentadoras. Las secciones de teratoma incluyen nervios mielinizados (Figura 4a), detalles de cartílago hialino (Figura 4b) y epitelio secretor rico en células caliciformes (Figura 4c). El tamaño de la barra representa 25 μm .

Las FIG. 5a-c son micrografías morfológicas que ilustran colonias de células ES que crecen en una matriz de fibronectina de origen humano en un sistema libre de células alimentadoras. Se muestran imágenes de campo claro de la estirpe I-3 de células ES que crece en fibronectina celular humana durante 22 pasadas en presencia de sustitutivo del suero y de la combinación de factores de crecimiento TF.

Las FIG. 5d-f son micrografías inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de marcadores de superficie típicos de células no diferenciadas en las estirpes I-3 y H-9 de células ES humanas que crecen sobre una matriz de fibronectina de origen humano en un sistema libre de células alimentadoras. Se muestran imágenes fluorescentes de la estirpe I-3 humana de células ES cultivada en fibronectina celular humana en presencia de TF durante 16 pasadas y marcada con anticuerpos anti-TRA-1-60 (Figura 5d) o anti-TRA-1-81 (Figura 5e) y de la estirpe H-9 humana de células ES cultivada en fibronectina de plasma humano en presencia de TLF durante 10 pasadas y marcada con anti-SSEA4 (Figura 5f).

Las FIG. 6a-c ilustran la diferenciación *in vitro* de células hES que crecen en una matriz de fibronectina humana en condiciones libres de células alimentadoras y de xenocontaminantes. Se muestran imágenes de CE de 14 días de vida derivados de células ES de la estirpe I-3 que crecen en diversas condiciones de cultivo. La Figura 6a - matriz de fibronectina celular humana en presencia de los factores de crecimiento TLF durante 17 pasadas; Figura 6b - matriz de fibronectina celular humana en presencia de los factores de crecimiento TF durante 17 pasadas; Figura 6c - matriz de fibronectina de plasma humano en presencia de los factores de crecimiento TLF durante 16 pasadas.

La FIG. 7 ilustra la determinación con RT-PCR de la fase de diferenciación de las células ES, de la estirpe I-3, que crecieron en una matriz de fibronectina de origen humano en un sistema libre de células alimentadoras y de los cuerpos embrionarios (CE) derivados de las mismas. La reacción RT-PCR se realizó en muestras de ARN extraídas de células ES I-3 de CE derivados de las mismas. Carril 1 - células ES I-3 que crecen en TF durante 22 pasadas; carril 2 - células ES I-3 que crecen en TLF durante 18 pasadas; carril 3 - células ES I-3 que crecen en TLF durante 17 pasadas; carril 4 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TF durante 17 pasadas; carril 5 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TLF durante 17 pasadas; carril 6 - CE de 14 días de vida derivadas de células ES I-3 que crecen en TLF durante 16 pasadas; La especificidad de la reacción se verificó en ausencia de ARN (Figura 7, carril 7).

Las FIG. 8a-c ilustran velocidades de crecimiento de las estirpes I-3 (Figura 8a), I-6 (Figura 8b) y H-9 (Figura 8c) de células hES, en diversas condiciones de cultivo. Se muestran las velocidades de crecimiento de las estirpes I-3, I-6 y H-9 de células hES cuando se cultivan sobre las matrices de fibronectina de origen bovino en presencia de TLF (Figuras 8a, b y c, respectivamente, curvas rosas) o de las combinaciones de factores de crecimiento TF (Figuras 8a, b y c, respectivamente, curvas negras), sobre la matriz de fibronectina de origen humano en presencia de la combinación de factores de crecimiento TF (Figuras 8a, b y c, respectivamente, curvas azul claro) o en las células alimentadoras de MEF (Figuras 8a, b y c, respectivamente, curvas azul oscuro).

La FIG. 8d es un gráfico de barras que ilustra la capacidad de diversas condiciones de cultivo para mantener el crecimiento de células hES no diferenciadas. Se cultivaron células ES humanas en las siguientes condiciones de cultivo: fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibronectina de origen bovino en presencia de TGF β , LIF y bFGF (TLF BF), fibronectina de origen humano en presencia de TGF β , LIF y bFGF (TLF HF), fibronectina de origen bovino en presencia de TGF β y bFGF (TF BF), fibronectina de origen humano en presencia de TGF β y bFGF (TF HF), fibronectina de origen bovino en presencia de LIF y TGF β (LT), fibronectina de origen bovino en presencia de LIF y bFGF (LF), fibronectina de origen bovino en presencia solo de TGF β (T) y fibronectina de origen bovino en presencia solo de bFGF (F). Los porcentajes de células no diferenciadas se determinaron en incrementos de dos días.

Las FIG. 9a-f ilustran células ES humanas y colonias de células ES humanas que crecen en sistemas libre de células alimentadoras en diversas condiciones de cultivo. Se muestran imágenes de campo claro de las diversas estirpes de células ES que crecen en sistemas libres de células alimentadoras. Figura 9a - crecimiento de la estirpe celular I-6 sobre matriz de prepuicio en presencia de TLF durante 5 pasadas (el tamaño de la barra representa 75 μm); Figura 9b - crecimiento de la estirpe celular I-3.2 en Matrigel^{RTM} durante 12 pasadas en presencia de

medio acondicionado con MEF (el tamaño de la barra representa 50 μm); Figura 9c - crecimiento de la estirpe celular I-6 en matriz con MEF en presencia de TLF durante varias pasadas (el tamaño de la barra representa 75 μm); Figura 9d - crecimiento de la estirpe celular I-3 en fibronectina durante 21 pasadas en presencia de TF (el tamaño de la barra representa 50 μm); Figura 9e - crecimiento de la estirpe celular I-6 en Matrigel^{RTM} durante 12 pasadas en presencia de TLF (el tamaño de la barra representa 75 μm); Figura 9f - crecimiento de la estirpe celular I-3 en fibronectina en presencia de TF durante 20 pasadas (el tamaño de la barra representa 38 μm).

Las FIG. 10a-f ilustran secciones histológicas de teratomas en ratones SCID de color beis procedentes de las estirpes I-6 y I-3 de ES que crecen en fibronectina (Figuras 10a y b), en matriz de MEF (Figuras 10c, e, y f) o en Matrigel^{RTM} (Figura 10d). Las secciones de teratoma, teñidas con hematoxilina y eosina, incluyen epitelio de tipo intestinal que incluye células caliciformes (Figura 10a), tejido de cartílago maduro (Figuras 10b y c), miotubos embrionarios (Figura 10d), epitelio estratificado (Figura 10e) y nervios mielinizados (Figura 10f). El tamaño de las barras representa 40 μm .

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación es de métodos para establecer y propagar estirpes de células madre embrionarias humanas empleando condiciones de cultivo libres de células alimentadoras y de xenocontaminantes. La presente divulgación es además de estirpes de células madre embrionarias humanas que están libres de xenocontaminantes y que pueden mantenerse en un estado no diferenciado, pluripotente y proliferativo en cultivo y, por lo tanto, son muy adecuadas para la terapia humana.

Los principios y el funcionamiento de los métodos de preparación de la estirpe de células madre embrionarias humanas carentes de células alimentadoras y de xenocontaminantes de acuerdo con la presente divulgación pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones que se acompañan.

Antes de explicar al menos una realización de la divulgación en detalle, debe entenderse que la divulgación no se limita en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La divulgación es capaz de otras realizaciones, o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de varias maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento tienen fines descriptivos, y no deben considerarse limitantes.

Para mantener las células ES humanas en un estado no diferenciado, los cultivos de ES deben proporcionar a las células condiciones que mantengan la proliferación celular, inhiban la diferenciación de las ES y conserven la pluripotencia. Dichas condiciones de cultivo normalmente se logran utilizando capas de células alimentadoras que secretan factores necesarios para la proliferación de células madre, aunque al mismo tiempo, inhiben su diferenciación.

Con el fin de atravesar las limitaciones asociadas con el uso de la capa de células alimentadoras, tales como la contaminación de las células alimentadoras y los sistemas de cultivo indefinidos, se han desarrollado sistemas de cultivo libres de células alimentadoras más definidos. Los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras emplean una matriz, a la que se unen las células ES, y un medio de cultivo, que proporciona a las células ES las citocinas y los factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular, mientras que al mismo tiempo inhibe la diferenciación celular.

Las matrices de uso común incluyen la preparación de la membrana basal extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (por ejemplo, Matrigel^{RTM}) o fibronectina bovina/laminina. Dichas matrices normalmente se complementan con un medio acondicionado de fibroblasto embrionario de ratón (MEF) o un medio sintético complementado con suero bovino y factores de crecimiento.

Los intentos anteriores para cultivar células ES humanas usando sistemas de cultivo libres de células alimentadoras emplearon matrices de Matrigel^{RTM} o laminina complementadas con medio de cultivo reciente y una mezcla de factores de crecimiento (solicitud de patente de EE. UU. n.º 20030017589). Sin embargo, estas matrices libres de células alimentadoras se derivaron de tejidos animales y, por lo tanto, pueden exponer las células humanas a patógenos animales. Además, estos experimentos usaron una combinación de seis factores de crecimiento diferentes a concentraciones extremadamente altas que pueden dañar irreversiblemente las células cultivadas. De hecho, como se demuestra en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20030017589, el tiempo de duplicación de las células ES fue de aproximadamente 19 horas, lo que sugiere un fenotipo tumorigénico. Además, en estas condiciones, solo el 50-70 % de las células presentaron una morfología celular no diferenciada tras 14 pasos en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras.

Aunque dichas condiciones de cultivo podrían ser adecuadas con fines de investigación, las células ES humanas deben cultivarse en condiciones de cultivo bien definidas que están esencialmente libres de material animal cuando se utilizan para la terapia de reemplazo celular o la regeneración de tejidos en seres humanos.

Mientras se reduce la presente divulgación a la práctica, los presentes inventores han ideado condiciones de cultivo libres de células alimentadoras que carecen de xenocontaminantes y, sin embargo, son capaces de mantener células

madre humanas en cultivo durante al menos 38 pasadas. Como se ilustra en el siguiente apartado de ejemplos, las estirpes de células madre cultivadas en dichas condiciones mantuvieron todas las características de las células ES, incluyendo la pluripotencia, la inmortalidad, la capacidad de proliferación no diferenciada y el cariotipo normal. Por lo tanto, el sistema de cultivo libre de células alimentadoras de la presente divulgación proporciona, por primera vez, un entorno de cultivo completo no animal, que es capaz de mantener células ES humanas durante al menos 38 pasadas en un estado proliferativo mientras se preserva la pluripotencia de las ES. Además, más del 85 % de las células ES cultivadas en dichas condiciones mostraron una morfología celular no diferenciada con un tiempo de duplicación de 30-35 horas.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un método para establecer una estirpe de células madre embrionarias humanas que puede mantenerse en un estado no diferenciado, pluripotente y proliferativo, y que está esencialmente libre de xenocontaminantes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "estirpe de células madre" se refiere a células capaces de diferenciarse en otros tipos de células que tienen una función especializada particular (es decir, células "totalmente diferenciadas") o a células capaces de mantenerse en un estado no diferenciado, en lo sucesivo "células madre pluripotentes".

Las células madre de la presente divulgación pueden ser células madre hematopoyéticas obtenidas del tejido de la médula ósea de un individuo de cualquier edad o de la sangre del cordón umbilical de un individuo recién nacido, las células madre embrionarias (ES) obtenidas del tejido embrionario formado tras la gestación (por ejemplo, blastocisto) o células germinales embrionarias (EG). La derivación y preparación de células madre se describen más detalladamente a continuación. Las células madre preferidas de la presente divulgación son células madre embrionarias humanas.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, el método se efectúa obteniendo células madre embrionarias humanas y cultivando células madre embrionarias humanas en condiciones de cultivo libres de células alimentadoras que incluyen una matriz y un medio de cultivo de tejidos que incluye factores de crecimiento para establecer así una estirpe de células madre embrionarias humanas.

De acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, el cultivo se efectúa sembrando en placas las células madre en una matriz a una densidad celular que potencie la supervivencia y proliferación celular, pero limite la diferenciación. Por lo general, se usa una densidad de placa de entre aproximadamente 15.000 células/cm² y aproximadamente 200.000 células/cm².

Se apreciará que, aunque normalmente se siembran suspensiones monocelulares de células madre, también se pueden usar pequeñas agrupaciones. Con este fin, la digestión enzimática utilizada para la ruptura de agrupaciones (véase el Ejemplo 1 del siguiente apartado de ejemplos) se termina antes de que las células madre se dispersen por completo y las células se trituren con una pipeta de manera que se formen grupos (es decir, 10-200 células). Sin embargo, se toman medidas para evitar grandes grupos que causen la diferenciación celular.

Las células madre de la presente divulgación se pueden obtener usando métodos de cultivo celular bien conocidos. Por ejemplo, las células madre embrionarias humanas pueden aislarse de blastocistos humanos. Los blastocistos humanos normalmente se obtienen de embriones humanos de preimplantación *in vivo* o de embriones fertilizados *in vitro* (FIV). Como alternativa, un embrión humano monocelular puede expandirse a la etapa de blastocisto. Para el aislamiento de células ES humanas, se retira la zona pelúcida del blastocisto, y se aísla la masa celular interna (ICM) mediante inmunocirugía, en la que se lisan las células del trofoblasto y se retiran de la ICM intacta mediante un pipeteo suave. Luego, se siembra el ICM en un matraz de cultivo de tejidos que contiene el medio apropiado que permita su crecimiento. Tras de 9 a 15 días, la excrecencia derivada de la ICM se disocia en agrupaciones, ya sea por disociación mecánica o por degradación enzimática, y las células se vuelven a sembrar en un medio de cultivo de tejidos reciente. Las colonias que muestran una morfología no diferenciada se seleccionan individualmente con una micropipeta, se disocian mecánicamente en agrupaciones y se vuelven a sembrar. Las células ES resultantes se dividen de forma habitual cada 1-2 semanas. Para más detalles sobre los métodos de preparación de células ES humanas, véase Thomson *et al.*, [patente de EE.UU. n.º 5.843.780; *Science* 282: 1145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38: 133, 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 7844, 1995]; Bongso *et al.*, [*Hum Reprod* 4: 706, 1989]; Gardner *et al.*, [*Fertil. Steril.* 69: 84, 1998].

Se apreciará que las células madre disponibles en el mercado también se pueden usar con este aspecto de la presente divulgación. Las células ES humanas se pueden adquirir en el registro de células madre embrionarias humanas NIH (<http://escr.nih.gov>). Los ejemplos no limitantes de estirpes de células madre embrionarias disponibles en el mercado son BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03 y TE32.

Las células madre usadas por la presente divulgación también pueden derivar de células germinales embrionarias (EG) humanas. Las células EG humanas se preparan a partir de células germinales primordiales obtenidas de fetos humanos de aproximadamente 8 a 11 semanas de gestación usando técnicas de laboratorio conocidas por cualquier experto en la materia. Se disocian las crestas genitales y se cortan en pequeños fragmentos que luego se desagregan

en células mediante disociación mecánica. Se cultivan las células EG en matraces de cultivo de tejidos con el medio apropiado. Las células se cultivan con reemplazo diario del medio hasta que se observa una morfología celular coincidente con las células EG, normalmente, tras 7-30 días o 1-4 pasadas. Para detalles adicionales sobre los métodos de preparación de células EG humanas, véase Shamblo *et al.*, [*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95: 13726, 1998] y la patente de EE.UU. n.º 6.090.622.

Como se ha mencionado anteriormente, las células madre pueden cultivarse preferentemente en un sistema de cultivo libre de células alimentadoras que incluya una matriz en lugar de una capa de células alimentadoras. Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a cualquier matriz que puede sustituir la función de unión celular de las células alimentadoras. Dicha matriz normalmente contiene componentes extracelulares a los que se pueden unir las células madre y, por lo tanto, proporciona un sustrato de cultivo adecuado.

Son particularmente adecuados para su uso con la presente divulgación los componentes de la matriz extracelular derivados de la membrana basal o los componentes de la matriz extracelular que forman parte de los acoplamientos de receptor-ligando de la molécula de adhesión. Matrigel® es un ejemplo de una matriz disponible en el mercado (Becton Dickinson, EE.UU.), que es adecuada para su uso con la presente divulgación. Matrigel® es un preparado soluble de células tumorales de Engelbreth-Holm-Swarm que se gelifica a temperatura ambiente, formando una membrana basal reconstituída; Matrigel® también se encuentra disponible como un preparado con factor de crecimiento reducido. Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes que son adecuados para su uso con la presente divulgación incluyen laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano y similares, solos o en varias combinaciones. Las matrices preferidas de la presente divulgación son matrices derivadas de fibronectina.

En los casos en los que se desean condiciones de cultivo completas libres de contaminantes animales, la matriz se deriva preferentemente de una fuente humana o se sintetiza usando técnicas recombinantes. Dichas matrices incluyen, por ejemplo, fibronectina recombinante de origen humano, laminina de origen humano, matriz de fibroblastos de prepucio o una matriz de fibronectina sintética. La fibronectina de origen animal puede ser de fibronectina plasmática o fibronectina celular, ambas pueden obtenerse de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. La laminina de origen humano y la matriz de fibroblastos de prepucio se pueden obtener de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. Se puede obtener una matriz de fibronectina sintética de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.

La síntesis recombinante de proteínas de la matriz puede efectuarse usando vectores de expresión. Los segmentos de polinucleótidos que codifican la proteína de la matriz (por ejemplo, fibronectina plasmática humana) pueden ligarse a un sistema de vector de expresión disponible en el mercado adecuado para transformar células de mamíferos tales como las células HeLa y para dirigir la expresión de esta enzima dentro de las células transformadas. Se apreciará que dichos sistemas de vectores disponibles en el mercado pueden modificarse fácilmente a través de técnicas recombinantes comúnmente usadas para reemplazar, duplicar o mutar secuencias promotoras o potenciadoras existentes y/o introducir cualquier secuencia de polinucleótidos adicional tal como, por ejemplo, secuencias que codifiquen marcadores de selección adicionales o secuencias que codifican polipéptidos indicadores, etc.

Los vectores de expresión de mamífero adecuados incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Stratagene, pTRES que está disponible en Clontech y sus derivados.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente divulgación, el medio de cultivo incluye citocinas y factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular [por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor inhibidor de la leucemia (LIF)], y factores tales como factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1) que inhibe la diferenciación de células madre.

Dicho medio de cultivo puede ser un medio de cultivo tisular sintético tal como Ko-DMEM (Gibco-Invitrogen Corporation products, Grand Island, NY, EE.UU.) complementado con suero, sustitutivo del suero y/o factores de crecimiento.

El suero puede ser de cualquier fuente, incluyendo suero bovino fetal, suero de cabra o suero humano. Preferentemente, se utilizan suero humano o serum replacement™ (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY EE.UU.) para proporcionar a las células ES humanas un medio no animal.

Serum replacement™ incluye albúmina o sustitutos de albúmina, aminoácidos, vitaminas, transferrinas o sustitutos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno y oligoelementos (Publicación de patente internacional n.º WO 98/30679 de Price, P.J. *et al.*). Para proporcionar condiciones de cultivo no animales, la albúmina o los sustitutos de albúmina proceden preferentemente de una fuente humana y/o son proteínas recombinantes.

El medio de cultivo, el suero y el sustitutivo del suero pueden obtenerse de cualquier proveedor comercial de productos de cultivo tisular, los ejemplos incluyen Gibco-Invitrogen Corporation (Grand Island, NY EE.UU.), Sigma (St. Louis MO, EE.UU.) y ATCC (Manassas, VA EE.UU.).

El suero o sustitutivo del suero usados por la presente divulgación se proporcionan a un intervalo de concentración del 1 % al 40 %, más preferentemente, del 5 % al 35 %, lo más preferentemente, del 10 % al 30 %.

5 De acuerdo con realizaciones preferidas en la actualidad, el sustitutivo del suero se proporciona a una concentración del 15 % (véanse los Ejemplos 1 y 4 del apartado de ejemplos).

10 Los factores de crecimiento de la presente divulgación pueden usarse en cualquier combinación y pueden proporcionarse a las células madre a cualquier concentración adecuada para la proliferación de células ES, aunque al mismo tiempo inhiben la diferenciación de las células ES.

15 Los factores de crecimiento adecuados de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor inhibidor de la leucemia (LIF) recombinante humano, factor neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina M humana recombinante, ligando Flt-3 de interleucina 6 (IL-6), factor de células madre (SCF) y similares. Dichos factores de crecimiento pueden obtenerse en cualquiera de los proveedores de reactivos de cultivo tisular tales como Gibco Invitrogen Corporation Products, EE.UU., R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, EE.UU. y Chemicon International Inc., Temecula, CA, EE.UU.

20 Como se observa en el Ejemplo 1 y en el apartado de ejemplos que figura más adelante, cuando se cultivan células ES en fibronectina de origen bovino en presencia de medio de cultivo complementado con sustitutivo del suero al 20 %, la combinación de ambos factores de crecimiento TGF β_1 y bFGF (TF), y el TGF β_1 , la combinación de los factores de crecimiento LIF y bFGF (TLF) puede mantener células ES humanas durante al menos 53 y 56 pasadas, respectivamente.

25 Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones preferidas de la presente divulgación, los factores de crecimiento usados para complementar las células ES cuando se cultivan en un sistema libre de células alimentadoras incluyen TGF β_1 , bFGF y/o LIF.

30 En sistemas de cultivo libres de células alimentadoras, el TGF β_1 se proporciona en un intervalo de concentración de 0,06-0,24 ng/ml, más preferentemente a 0,10 -0,20 ng/ml, lo más preferentemente a 0,12 ng/ml, LIF se proporciona en un intervalo de concentración de 500-2.000 u/ml, más preferentemente a 750-1.500 u/ml, lo más preferentemente a 1.000 u/ml, y bFGF se proporciona en un intervalo de concentración de 2-8 ng/ml, más preferentemente a 3-6 ng/ml, lo más preferentemente a 4 ng/ml.

35 Aunque menos preferido, el cultivo de células hES puede efectuarse, como alternativa, usando un medio acondicionado en lugar de suero o medio complementado con sustitutivo del suero. El medio acondicionado es el medio de crecimiento de un cultivo celular monocapa (es decir, células alimentadoras) presente tras un determinado período de cultivo. El medio acondicionado incluye factores de crecimiento y citocinas segregados por las células del cultivo monocapa.

40 El medio acondicionado puede recogerse de una variedad de células que forman monocapas en cultivo. Los ejemplos incluyen medio acondicionado con MEF, medio acondicionado con prepucio, medio acondicionado con fibroblastos embrionarios humanos, medio acondicionado con células epiteliales humanas de trompas de Falopio y similares.

45 En particular, el medio acondicionado adecuado es aquel medio derivado de células humanas, tal como medio acondicionado de prepucio que se produce cultivando células de prepucio humano en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para producir el medio acondicionado.

50 Dicho medio de cultivo puede ser cualquier medio adecuado para cultivar células alimentadoras. El medio de cultivo puede complementarse con factores nutricionales, tales como aminoácidos, (por ejemplo, L-glutamina), antioxidantes (por ejemplo, beta-mercaptoetanol) y factores de crecimiento, que benefician el crecimiento de células madre en un estado no diferenciado. El suero y los sustitutivos del suero se añaden a intervalos de concentración eficaces según lo descrito en cualquier parte (solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/368.045).

55 Las células alimentadoras se cultivan en el medio de cultivo durante un tiempo suficiente para permitir la acumulación adecuada de factores segregados para mantener la proliferación de células madre en un estado no diferenciado. Por lo general, el medio se acondiciona cultivando durante 4-24 horas a 37 °C. Sin embargo, el período de cultivo puede graduarse evaluando el efecto del medio acondicionado sobre el crecimiento y la diferenciación de las células madre.

60 La selección de los aparatos de cultivo para acondicionar el medio se basa en la escala y en el fin del medio acondicionado. Preferentemente, la producción a gran escala implica el uso de dispositivos específicos. En Furey (2000) *Genetic Eng. News* 20:10, se revisan sistemas de cultivo celular continuos.

65 Tras la acumulación de factores adecuados en el medio, el medio de cultivo (es decir, medio acondicionado) se separa de las células alimentadoras y se recoge. Se apreciará que las células alimentadoras pueden usarse repetidas veces para acondicionar lotes de medio adicionales durante períodos de cultivo adicionales, siempre que las células conserven su capacidad para acondicionar el medio.

Preferentemente, el medio acondicionado se esteriliza (por ejemplo, por filtración, usando un filtro de 20 μm) antes de su uso. El medio acondicionado de la presente divulgación puede aplicarse directamente a las células madre o extraerse para concentrar el factor eficaz tal como mediante filtración salina. Para su uso futuro, el medio acondicionado se almacena preferentemente congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 De acuerdo con el método de la presente divulgación, las células madre se cultivan en condiciones de cultivo libres de células alimentadoras para establecer una estirpe de células madre embrionarias humanas.

10 Una estirpe de células madre embrionarias humanas establecida se caracteriza por células madre no diferenciadas. De acuerdo con la presente divulgación, una estirpe de células madre no diferenciadas comprende al menos el 50 %, al menos el 60 %, más preferentemente al menos del 70 %, más preferentemente al menos del 80 %, lo más preferentemente, al menos el 85 % de células madre no diferenciadas.

15 Como se describe en los Ejemplos 1 y 4 del apartado de ejemplos que figura más adelante, las células madre no diferenciadas son de distinta morfología, lo que permite a un experto en la materia distinguirlas claramente de las células diferenciadas de origen embrionario o adulto. Por lo general, las células madre no diferenciadas tienen altas proporciones nucleares/citoplasmáticas, nucleolos prominentes y formación de colonias compactas con uniones celulares poco distinguibles. Más adelante en el presente documento, se describen características adicionales de las células madre no diferenciadas.

20 Cuando se cultivan de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación, se controla el crecimiento de las células madre para determinar su estado de diferenciación. Varios enfoques, incluyendo, por ejemplo, la determinación morfológica, se pueden usar para determinar la diferenciación celular de las células cultivadas como se describe en el presente documento.

25 De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente divulgación, las condiciones de cultivo proporcionan a las células madre un medio completo libre de células alimentadoras ni xenocontaminantes, que puede mantener a las células madre en un estado proliferativo, incluso en un estado no diferenciado indefinidamente. Por lo tanto, las condiciones de cultivo incluyen una matriz de origen humano (o recombinante) y un medio de cultivo complementado con los factores de crecimiento $\text{TGF}\beta_1$, LIF y bFGF.

30 Como se muestra en los Ejemplos 4 y 5 del apartado de ejemplos que figura más adelante, los presentes inventores han ilustrado que las células ES pueden cultivarse en matrices de fibronectina de origen humano, complementarse con suero humano o sustitutivo del suero, proporcionando de este modo cultivos de células madre pluripotentes que carecen de patógenos animales o de cualquier otro contaminante. En estas condiciones la estirpe de células ES generada usando las enseñanzas de la presente divulgación mantuvo un estado proliferativo y no diferenciado durante al menos 38 pasadas.

35 Durante la etapa de cultivo, también se controla el estado de diferenciación de las células madre. La diferenciación celular puede determinarse examinando marcadores específicos de células o de tejidos, que se sabe que son indicativos de diferenciación. Por ejemplo, las células ES de primates pueden expresar el antígeno embrionario específico de la fase (SSEA) 4, el antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81.

40 Como se muestra en los Ejemplos 2 y 4 del apartado de ejemplos que figura más adelante, las células ES cultivadas en cultivos libres de células alimentadoras complementados con medio de cultivo libre de xenocontaminantes y factores de crecimiento seleccionados expresaron los marcadores de la superficie celular SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 típicos de las células no diferenciadas.

45 Los marcadores específicos de tejidos/células pueden detectarse usando técnicas inmunológicas muy conocidas en la materia [Thomson J. A. *et al.*, (1998). *Science* 282: 1145-7]. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo para marcadores unidos a la membrana, inmunohistoquímica para marcadores extracelulares e intracelulares e inmunoensayo enzimático, para marcadores moleculares secretados.

50 La determinación de la diferenciación de células ES también puede efectuarse mediante la medición de la actividad fosfatasa alcalina. Las células ES humanas no diferenciadas tienen actividad fosfatasa alcalina que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4 % y revelando con el kit de sustrato Vector Red de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.).

55 Como se ha mencionado anteriormente, la estirpe de células madre de la presente divulgación mantiene la pluripotencia durante al menos 38 pasadas. Dicha pluripotencia se puede controlar *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrionarios (CE), así como mediante la formación *in vivo* de teratomas.

60 Los cuerpos embrionarios se forman tras la retirada de las células ES de las capas alimentadoras o de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras. La retirada de las células ES puede efectuarse usando tratamiento con colagenasa de tipo IV durante un tiempo limitado. Tras la disociación de la superficie de cultivo, las células se transfirieron a placas de cultivo tisular que contienen un medio de cultivo complementado con suero y aminoácidos.

65

5 Como se muestra en los Ejemplos 3 y 5 del apartado de ejemplos que figura más adelante, tras 14 días en un cultivo en suspensión, las células ES generadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación se diferencian en CE que contienen mesodermo, ectodermo y endodermo embrionario, demostrando claramente que la estirpe de células ES de la presente divulgación conserva la pluripotencia en las condiciones de cultivo libres de células alimentadoras usadas por la presente divulgación.

10 El nivel de diferenciación de las células CE puede controlarse siguiendo la pérdida de expresión de Oct-4, y el aumento del nivel de expresión de otros marcadores tales como α -fetoproteína, NF-68 kDa, α -actina cardiaca y albúmina. Los métodos útiles para controlar el nivel de expresión de genes específicos son muy conocidos en la técnica e incluyen RT-PCR, hibridación *in situ* de ARN, análisis de transferencia Western e inmunohistoquímica.

15 La capacidad pluripotente de la estirpe de células ES también puede confirmarse inyectando células en ratones SCID [Evans M. J. y Kaufman M. (1983). "Pluripotential cells grown directly from normal mouse embryos". *Cancer Surv.* 2: 185-208], que tras la inyección forman teratomas. Los teratomas se fijan usando paraformaldehído al 4 % y las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) se examinan histológicamente.

20 Como se muestra en el Ejemplo 3 del apartado de ejemplos que se presenta a continuación, las células ES cultivadas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras a base de fibronectina complementados con las combinaciones de factores de crecimiento seleccionadas de la presente divulgación (es decir, las combinaciones de TF y de TLF) forman teratomas funcionales, lo que demuestra la capacidad pluripotente de las células ES para diferenciarse *in vivo*.

25 Además de controlar un estado de diferenciación, con frecuencia, las células madre también se controlan en cuanto a su cariotipo, para verificar euploidia citológica, en la que todos los cromosomas están presentes y no se alteran de manera detectable durante el cultivo. Las células madre cultivadas pueden cariotiparse usando una tinción Giemsa convencional y compararse con cariotipos publicados de la especie correspondiente.

30 Las células madre cultivadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación conservan un cariotipo normal tras 30 y 32 pasadas en matriz de fibronectina cuando se complementan con el TF o la combinación de factores de crecimiento TLF, respectivamente (véase el Ejemplo 2 del apartado de ejemplos).

Su pluripotencia y capacidad para mantener un estado proliferativo y no diferenciado durante al menos 38 pasadas hacen que los cultivos de células ES generados de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación sean una excelente fuente para la clonación de una sola célula.

35 Por lo tanto, el método descrito anteriormente puede incluir además una etapa adicional de cultivo de una sola célula derivada de la estirpe de células madre embrionarias humanas descrita anteriormente en las condiciones de cultivo de la presente divulgación que están preferentemente libres de xenocontaminantes y carentes de células alimentadoras para establecer así un cultivo de ES derivado de una sola célula.

40 Los métodos de clonación de células individuales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.548.655, Amit *et al.*, 2000, *Dev. Biol.* 227: 271-8). Dichos métodos normalmente incluyen la selección de un grupo de células de un cultivo celular, la disociación del grupo de células en células individuales y el crecimiento de las células individuales por separado en condiciones que potencian la proliferación celular, aunque al mismo tiempo, inhiben la diferenciación celular. Una vez obtenidos, los clones de células individuales se pueden expandir en una estirpe de células ES en condiciones de cultivo adecuadas.

Dado que la estirpe de células ES de la presente divulgación carece de xenocontaminantes y de contaminantes alimentadores, se puede usar para la terapia a base de células humanas y la regeneración de tejidos.

50 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que necesita un reemplazo celular y/o regeneración de tejido, que comprende administrar el preparado de células madre hES libre de xenocontaminantes y de contaminantes alimentadores en el individuo.

55 Preferentemente, el método comprende además una etapa de preparación del preparado de células hES usando la metodología descrita anteriormente en el presente documento.

60 Como se usa en el presente documento, "tratar a un individuo que necesita un reemplazo celular y/o regeneración tisular" se refiere a tratar a un individuo que padece un trastorno tal como un trastorno neurológico, un trastorno muscular, un trastorno cardiovascular, un trastorno hematológico, un trastorno cutáneo, un trastorno del hígado y similares que requieren el reemplazo de células y la regeneración de tejidos.

65 La expresión "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección y/o causar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección en un individuo que padece o es diagnosticado de, la enfermedad, el trastorno o la afección. Los expertos en la materia conocerán diversas metodologías y ensayos que pueden usarse para evaluar el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección,

y, de manera similar, diversas metodologías y ensayos que pueden usarse para evaluar la reducción, la remisión o la regresión de una enfermedad, el trastorno o la afección.

5 Como se usa en el presente documento, "administrar" se refiere a medios para proporcionar el preparado de células ES humanas a un individuo, usando cualquier vía adecuada, por ejemplo, oral, sublingual intravenosa, subcutánea, transcutánea, intramuscular, intracutánea, intratecal, intraperitoneal, intraesplénica, intrahepática, intrapancreática, intracardiaca, epidural, intraocular, intracraneal, por inhalación, rectal, vaginal y similares.

10 Las células madre generadas en el presente documento pueden administrarse como tales (es decir, un preparado no diferenciado) o tras una diferenciación parcial o total. Las células ES humanas cultivadas se pueden diferenciar en células de linaje de desarrollo restringido, o células diferenciadas terminalmente. La diferenciación de las células madre se puede iniciar permitiendo la excrecencia de células ES humanas no diferenciadas en cultivo en suspensión, formando cuerpos embrioides o sembrando en placas células ES en condiciones que potencien la diferenciación de una manera particular. Dichas condiciones pueden incluir la retirada o adición de nutrientes, factores de crecimiento o citocinas del/al medio, cambiando la presión de oxígeno, o modificando el sustrato sobre la superficie de cultivo.

15 Las células madre no diferenciadas o diferenciadas pueden utilizarse en el tratamiento de diversos trastornos. Por ejemplo, se pueden usar células ES parcialmente diferenciadas del linaje de oligodendrocitos para tratar trastornos de la mielina ("Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models". *Molecular Medicine Today*. 1997. pág. 554-561), células ES parcialmente diferenciadas de los condrocitos o linajes mesenquimáticos se pueden usar en el tratamiento de los defectos de los huesos y cartílagos (patente de EE. UU. n.º 4.642.120) y las células ES parcialmente diferenciadas del linaje epitelial se pueden usar en la regeneración de la piel de una herida o quemadura (patente de EE. UU. n.º 5.716.411).

25 Además de la terapia de reemplazo celular, la estirpe de células ES de la presente divulgación también puede utilizarse para preparar una genoteca de ADNc relativamente no contaminada con ADNc de células alimentadoras. El ARNm se prepara mediante técnicas convencionales a partir de células ES, y se transcribe de forma inversa para formar el ADNc. La preparación de ADNc se puede sustraer con nucleótidos de fibroblastos embrionarios y otras células de especificidad no deseada, para producir una biblioteca de ADNc sustraída mediante técnicas conocidas en la materia.

30 La estirpe celular ES de la presente divulgación se puede usar para detectar factores (tales como fármacos de moléculas pequeñas, péptidos, polinucleótidos y similares) o condiciones (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan las características de las células madre. Por ejemplo, las sustancias que afectan el crecimiento, las toxinas o los posibles factores de diferenciación pueden ensayarse mediante su adición al medio de cultivo.

35 Objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente divulgación se harán evidentes para un experto en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente divulgación, según lo esbozado anteriormente en el presente documento y como se reivindica en el apartado de reivindicaciones que figura más adelante, encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

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

50 En general, la nomenclatura que se usa en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación, incluyen técnicas 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, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías se exponen en las patentes de 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" por 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 y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las patentes de 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., ed. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., ed. (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); "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach" Robertson E. J., ed. (1987), Oxford: IRL Press; "Manipulating the Mouse Embryo" Nagy A *et al.*, (2003) Cold Spring Harbor Lab Press, Tercera Edición; Thomson, J. A., Marshall, V. S. (1998) "Primate embryonic stem cells. Current Topics in Developmental Biology" 38, 133-165; Marshall, V. S., Waknitz, M. A., Thomson, J. A. (2001) "Isolation and maintenance of primate embryonic stem cells". *Methods in Molecular Biology* 158, 11-18. A lo largo del presente documento, se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos del presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan por comodidad para el lector.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

LOS SISTEMAS DE CULTIVO LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS COMPLEMENTADOS CON MEDIO SIN XENOCONTAMINANTES SON ADECUADOS PARA EL CRECIMIENTO DE ESTIRPES DE CÉLULAS ES

Se transfirieron células ES humanas a sistemas de cultivo a base de fibronectina en presencia de sustitutivo del suero y factores de crecimiento seleccionados para proporcionar un entorno bien definido, libre de células alimentadoras, para cultivos de células ES.

Materiales y métodos experimentales

Cultivos de células ES - Células ES humanas de las estirpes I-6, I-3 [Amit, M. y Itskovitz-Eldor, J. "Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells". *J Anat.* 200, 225-232 (2002)] y H-9 [Thomson, J. A., et al., "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts". *Science* 282, 1145-7 (1998)] se cultivaron con fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) durante 46, 39 y 25 pasadas, respectivamente, en un medio de cultivo que consistía en Ko-DMEM al 85 %, complementado con sustitutivo del suero (SS) al 15 %, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, solución madre de aminoácidos no esenciales al 1 % y bFGF a 4 ng/ml (todos ellos de Gibco Invitrogen corporation products, EE.UU.). A continuación, se transfirieron las células ES a placas cubiertas con fibronectina de origen bovino (50 μ g/10 cm², Biological Industries, Beth Haemek, Israel) en presencia de SS al 20 %, medio de cultivo al 80 % y una de las siguientes combinaciones de factores de crecimiento: "T"- TGF β ₁ a 0,12 ng/ml, (R&D Systems Inc. Mineápolis, MN, EE.UU.); "TF"- TGF β ₁ a 0,12 ng/ml, con bFGF a 4 ng/ml (Gibco Invitrogen corporation products, EE.UU.); "LF" - factor inhibidor de la leucemia a 1.000 u/ml (LIF, CHEMICON International, Inc., Temecula, CA, EE.UU.) con bFGF a 4 ng/ml; o "TLF" - TGF β ₁ a 0,12 ng/ml, LIF a 1.000 u/ml y bFGF a 4 ng/ml. Se dividieron células adherentes cada de cuatro a seis días usando colagenasa de tipo IV a 1 mg/ml (Gibco Invitrogen corporation products, EE.UU.) durante 30 min y se volvieron a sembrar en matraces que contienen medio reciente. De acuerdo con el protocolo de congelación, se congelaron las células en nitrógeno líquido usando solución de congelación que consistía en DMSO al 10 % (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), suero humano al 10 % (CHEMICON International, Inc., Temecula, CA, EE.UU.) o SS al 15 % y Ko-DMEM al 80 % (Gibco-Invitrogen corporation products, EE.UU.).

Evaluación morfológica – Con un microscopio invertido se examinaron células ES (células vivas), usando contraste de fase (Olympus, IX70, Japón).

Resultados experimentales

Capacidad de proliferación de las células hES en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras - Se transfirieron células ES de las estirpes I-3, I-6 y H-9 a placas cubiertas con fibronectina, en presencia de sustitutivo del suero complementado con factores de crecimiento seleccionados, como se ha detallado anteriormente en el apartado de métodos del presente documento. Cuando el medio de cultivo se complementó solo con bFGF o con LIF y bFGF (LF), la proliferación de las células siguió durante varias pasadas y luego cambió a la diferenciación. Además, cuando el medio de cultivo de ES se complementó solo con TGF β , las células ES permanecieron en la fase no diferenciada durante más de 10 pasadas, aunque proliferaron mal y se desvanecieron lentamente hasta la pasada 15. Por otro lado, cuando el medio de cultivo de ES se complementó con TGF β ₁ y bFGF (TF) o con TGF β ₁, LIF y bFGF (TLF), las células siguieron proliferando y mantuvieron las características normales de las células hES de manera similar a las células hES desarrolladas en MEF. Sin embargo, aunque las células que crecieron con la combinación de TF se dividieron en una sola placa durante cada pasada, las células que crecieron con la combinación de TLF se dividieron en 2-3 placas, de manera similar a las células ES desarrolladas en MEF, demostrando una alta velocidad de proliferación en presencia de la combinación de TLF. Por lo tanto, el sistema de cultivo libre de células alimentadoras complementado con la combinación de factores de crecimiento TLF pudo mantener el crecimiento normal de las células hES, con un tiempo de duplicación de al menos 25 horas, similar al del crecimiento de células ES desarrolladas en MEF.

Características morfológicas de colonias y células ES en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras - Las características morfológicas de las colonias de ES desarrolladas sobre el sistema de cultivo libre de células alimentadoras fueron indistinguibles de las de las colonias de ES desarrolladas en MEF, incluso tras más de 56 pasadas (más de 224 días) cuando se complementaron con la combinación de TLF, y de 53 pasadas (más de

212 días) cuando se complementaron con la combinación de factores de crecimiento TF (no mostrado). Además, el día cuatro desde su pasada sobre el sistema libre de células alimentadoras con fibronectina de la presente divulgación, los cultivos de células hES consistían en 85-90 % de células no diferenciadas con un tiempo de duplicación de 30-35 horas, lo que concuerda con el tiempo de duplicación de las células hES desarrolladas en MEF.

Cuando se observaron con mayor aumento, las células hES desarrolladas en el sistema de cultivo libre de células alimentadoras resultaron ser pequeñas y redondas con una proporción alta del núcleo con respecto al citoplasma, con una presencia notable de uno a tres nucleolos y una separación típica entre las células (Figuras 1a-d).

Las células ES que crecen en un sistema de cultivo libre de células alimentadoras tienen un índice de supervivencia similar al de las células ES que crecen en MEF - Para la conservación de ES, las células ES que crecieron en el sistema de cultivo libre de células alimentadoras se congelaron en presencia de SS al 15 % y DMSO al 10 %. Cuando las células ES congeladas se descongelaron posteriormente y se volvieron a sembrar en placas, mostraron un índice de supervivencia similar al de las células ES desarrolladas en MEF.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que las combinaciones de factores de crecimiento TF y TLF son adecuadas para los cultivos de hES, siendo la combinación de TF inferior a la combinación de TLF debido a una baja capacidad de proliferación. Por otra parte, las células ES desarrolladas en el sistema de cultivo libre de células alimentadoras presentaron características morfológicas y un índice de supervivencia similar al de las células ES desarrolladas en MEF.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

LOS SISTEMAS DE CULTIVO LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS COMPLEMENTADOS CON MEDIO LIBRE DE XENOCONTAMINANTES MANTIENEN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS ES FENOTÍPICAMENTE CONSISTENTES.

Las características fenotípicas de células hES desarrolladas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras complementados con medio libre de xenocontaminantes se evaluaron usando marcadores de superficie celular típicos de células no diferenciadas.

Materiales y métodos experimentales

Análisis de cariotipo - Se bloquearon las metafases de células ES usando colcemid (KaryoMax colcemid solution, Invitrogen, Grand island, NY, EE.UU.) y se realizó la lisis de las membranas nucleares en una solución hipotónica de acuerdo con protocolos convencionales (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN). El bandedo cromosómico G se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Giemsa, Merck). Se analizaron cariotipos de al menos 20 células por muestra y se informaron de acuerdo con el ISCN. *Inmunohistoquímica* - Las células se fijaron durante 20 min en paraformaldehído al 4 %, se bloquearon durante 15 min en suero normal de cabra al 2 % en PBS (Biological Industries, Bet Haemek, Israel) y se incubaron durante una noche a 4 °C con diluciones 1:50 de anticuerpos contra SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-60, TRA-81 (Hybridoma bank, Iowa, EE.UU.) humanos de ratón, proporcionados por el Profesor P. Andrews de la Universidad de Sheffield, Inglaterra. A continuación, se lavaron las células en PBS y se incubaron adicionalmente con diluciones 1:100 de anticuerpos de burro contra IgG de ratón conjugados con el fluorocromo Cys 3 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.). Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia invertido (Carl Zeiss, Alemania) o con un microscopio confocal (Bio-Rad laboratories, Hertfordshire, Inglaterra).

Resultados experimentales

Los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras basados en fibronectina complementados con medio de cultivo libre de xenocontaminantes proporcionan a las células ES un cariotipo coincidente como en otros protocolos basados en células alimentadoras - El análisis del cariotipo se realizó en células hES tras cultivo continuo en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras basados en fibronectina complementados con medio de cultivo libre de xenocontaminantes. El análisis del cariotipo se llevó a cabo en nueve cultivos distintos, que representaban las dos condiciones del medio, TF y TLF, y con las tres estirpes de células hES (I-3, I-6 y H-9) a diferentes fases de 6 a 32 pasadas en el sistema de cultivo libre de células alimentadoras. Este análisis reveló cariotipos normales en 136 células de las 140 células examinadas en la pasada 30 cuando se cultivaron en el medio de TF, y en la pasada 32 cuando se cultivaron en el medio de TLF. En cuatro células del mismo grupo, se encontró un cariotipo anómalo de 47, XXX. Estas cuatro células, cultivadas durante casi un año, fueron a la derivación tras la pasada 71 de la que 20 pasadas fueron en el sistema de cultivo libre de células alimentadoras complementado con TLF. Como se ha indicado anteriormente [Amit, M. *et al.*, "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture". *Dev Biol* 227: 271-8 (2000)], puede producirse inestabilidad cromosómica en las células ES cuando se cultivan durante ocho meses en MEF. En su conjunto, estos resultados sugieren que los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras de la presente divulgación mantienen un cariotipo normal y estable de células hES.

Las células ES humanas cultivadas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras complementados con medio libre de xenocontaminantes expresan marcadores de superficie embrionarios - Para caracterizar mejor la capacidad de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras basados en fibronectina para mantener el crecimiento normal de las células ES humanas, se realizó IHC en células ES humanas con anticuerpos marcadores de superficie embrionarios incluyendo TRA-1-60, SSEA4, TRA-1-81, SSEA3 y SSEA1. Tras 17 y 38 pasadas en cultivo complementado con los factores de crecimiento TF y TLF, respectivamente, las células ES humanas de las estirpes I-3, I-6 demostraron niveles altos de expresión del antígeno embrionario específico de la fase 4 (SSEA4), del antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81 (Figuras 1e-h). Estos marcadores son características típicas de las células ES no diferenciadas [Thomson J. A., *et al.* (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts". *Science* 282: 1145-7; Thomson J. A., *et al.* (1996). "Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts". *Biol Reprod* 55: 254-9; Thomson J. A., *et al.* (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 92: 7844-8]. De forma destacable, el antígeno embrionario específico de la fase 3 (SSEA3) solo se expresó de manera moderada, mientras que la expresión del antígeno embrionario específico de la fase 1 (SSEA1), un marcador exclusivo de células ES de ratón, no se detectó (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran que los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras complementados con los factores de crecimiento de TF o TLF pueden mantener células ES humanas en un estado no diferenciado incluso tras períodos de cultivo prolongados.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

LOS SISTEMAS DE CULTIVO LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS COMPLEMENTADOS CON MEDIO LIBRE DE XENOCONTAMINANTES MANTIENEN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS ES FUNCIONALES

Se ensayaron células ES humanas desarrolladas en los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras basados en fibronectina complementados con sustitutivo del suero y factores de crecimiento libres de xenocontaminantes para determinar su capacidad para formar cuerpos embrionarios *in vitro* y teratomas *in vivo*.

Materiales y métodos experimentales

Formación de cuerpos embrionarios (CE) de células ES humanas - Se retiraron células ES humanas desarrolladas en los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras de la placa de cultivo de 6 pocillos (40-60 cm²) con colagenasa de tipo IV (1 mg/ml) y se disociaron más en pequeños grupos usando puntas de pipeta Gilson de 1.000 µl. Posteriormente, se cultivaron las células disociadas en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Alemania) en un medio que consistía en Ko-DMEM al 80 %, complementado con suero bovino fetal al 20 % definido (FBSd, HyClone, Utah, EE.UU.), L-glutamina 1 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM y solución madre de aminoácidos no esenciales al 1 %. A menos que se indique de otra manera, todo se adquirió en Gibco Invitrogen corporation, EE.UU. Tras 14 días en suspensión, se examinó la formación de CE.

Formación de teratomas - Se extrajeron células ES de 6 pocillos confluentes en una placa de seis pocillos (60 cm²) y se inyectaron en el músculo de la pata trasera de ratones SCID macho beis de 4 semanas de vida (Harlan, Jerusalén, Israel). Se fijaron los teratomas resultantes en formaldehído y se examinaron histológicamente, al menos 12 semanas después de la inyección.

PCR acoplada a transcriptasa inversa (RT) - Se aisló ARN total de células ES humanas no diferenciadas desarrolladas en los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras durante 17-25 pasadas o de CE de 14 días creados a partir de células ES desarrolladas en condiciones libres de células alimentadoras, usando el kit Tri-Reagent (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, Estados Unidos), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó la síntesis de ADNc en un molde de ARN total de 1 µg usando MMLV RT-RNasa H-minus (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores y las condiciones de reacción de la PCR se describen en la Tabla 1, que se muestra más adelante en el presente documento. Todas las reacciones de PCR incluyeron una desnaturalización de cadena inicial durante 5 minutos a 94 °C. Los productos de la PCR se fraccionaron por tamaño usando electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Tabla 1: cebadores y condiciones de la PCR

Producto génico (Número de registro)	SEQ ID NO.	Cebadores directo (D) e inverso (I) (5'TI3')	Condiciones de reacción	Tamaño (pb)
Oct-4 (S81255)	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2	D: GAGAACAATGAGAACCTTCAGGA I: TTCTGGCGCCGTTACAGAACCA	30 ciclos, hibridación a 60 °C, en MgCl ₂ 1,5 mM	219

<i>Producto génico (Número de registro)</i>	<i>SEQ ID NO.</i>	<i>Cebadores directo (D) e inverso (I) (5'IT3')</i>	<i>Condiciones de reacción</i>	<i>Tamaño (pb)</i>
Albúmina (AF542069)	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4	D: TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG I: AAGGCAAGTCAGCAGCCATCTCAT	35 ciclos, hibridación a 60 °C, en MgCl ₂ 1,5 mM	302
α-fetoproteína (BC027881)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6	D: GCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAA I: TCCCCTGAAGAAAATTGGTTAAAAT	30 ciclos, hibridación a 60 °C, en MgCl ₂ 1,5 mM	216
NF-68KD (AY156690)	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8	D: GAGTGAAATGGCAGGATACCTA I: TTTCTCTCCTTCTTCACCTTC	30 ciclos, hibridación a 60 °C, en MgCl ₂ 2 mM	473
α-actina cardiaca (NM_005159)	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10	D: GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC I: AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA	35 ciclos, hibridación a 65 °C, en MgCl ₂ 2 mM	486
receptor de LIF (NM_002310)	SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 12	D: CAAAAGAGTGTCTGTGAG I: CCATGTATTTACATTGGC	35 ciclos, hibridación a 61 °C, en MgCl ₂ 1,5 mM	459
β-actina (NM_001101)	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14	D: ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG I: CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	35 ciclos, hibridación a 62 °C, en MgCl ₂ 1,5 mM	838

Resultados experimentales

5 *Las células ES se diferencian espontáneamente en tipos de células de la capa germinal embrionaria in vitro, tras su retirada de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras* - Para verificar que las células ES humanas cultivadas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras basados en fibronectina eran funcionalmente, así como fenotípicamente, coincidentes con las células ES humanas derivadas de protocolos basados en células alimentadoras, las células ES se retiraron de los cultivos libres de células alimentadoras tras de 22 a 30 pasadas en TLF, y de 28 pasadas en TF, y se desarrollaron en suspensión. Como resultado de ello, las células hES formaron

10 cuerpos embrionarios (CE) similares a los creados por las células ES desarrolladas en MEF (Figuras 2a-c). La funcionalidad de los CE aislados se ensayó adicionalmente mediante IHC usando diversos marcadores de células embrionarias. Como se muestra además en las Figuras 2d-f, los CE expresaron tubulina específica neutra, que es de origen ectodérmico, actina de músculo liso y el marcador CD-31 de origen mesodérmico.

15 Además, se verificó la expresión génica coincidente con las células ES dentro de los CE usando RT-PCR. Dentro de los CE, las células madre se diferenciaron en células representativas de las tres capas germinales embrionarias, es decir, mesodermo, endodermo y ectodermo. Tal como se muestra en la Figura 3, aunque las células no diferenciadas desarrolladas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras complementados con TLF o TF expresaron altos niveles de Oct 4 (Figura 3), un marcador de células madre embrionarias pluripotentes y células germinales [Pesce M, y Scholer H. R. Oct-4: "gatekeeper in the beginnings of mammalian development" (2001). *Stem Cells* 19: 271-8], las

20 células recogidas de CE de 14 días expresaron genes, que se asociaron con la diferenciación celular incluyendo neurofilamento (NF-68 kD), que está relacionado con el ectodermo embrionario, α-actina cardiaca, que está asociada con el mesodermo embrionario, y α-fetoproteína y albúmina, ambas de las cuales son indicadores del endodermo

embrionario. La expresión disminuida de Oct 4 en muestras de CE coincidía con los informes previos de expresión disminuida de Oct 4 la tras diferenciación de células totipotentes en estirpes somáticas [Thomson J. A., *et al.* (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts". *Science* 282: 1145-7, Reubinoff B. E., *et al.* (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*". *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404].

5 Como se ha publicado previamente en otro sitio [Schuldiner M. *et al.* "Effect of eight-growth factors on the differentiation of cells derived from human ES cells". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 97: 11307-12 (2000); Amit, M. *et al.*, "Human feeder layers for human embryonic stem cells". *Biol. Reprod.* 68: 2150-2156 (2003); Kehat, I. *et al.* "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes". *J Clin Invest* 108: 407-14 (2001)] los cultivos de células ES podrían tener algún grado de diferenciación de fondo. De hecho, algunos de los

10 genes específicos de células, como la albúmina y α -actina cardiaca, también se expresaron en las células ES no diferenciadas de la presente divulgación (Figuras 3).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que las células ES humanas desarrolladas en los cultivos libres de células alimentadoras de la presente divulgación pueden crear CE funcionales con células que se diferencian en los diversos linajes somáticos.

15

Las células ES humanas cultivadas en cultivos de células libres de células alimentadoras se diferencian en capas germinales embrionarias *in vivo* - Para confirmar mejor la capacidad de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras de la presente divulgación para mantener la diferenciación de las células ES humanas en capas germinales embrionarias, se analizó la formación *in vivo* de teratomas en las células ES. Tras la inyección a ratones SCID beis, las células I-3 y I-6 cultivadas en TLF durante 26 y 19 pasadas, respectivamente, pudieron formar teratomas. Cada teratoma contenía tejidos representativos de las tres capas germinales embrionarias, incluyendo nervio mielinizado de origen ectodérmico (Figura 4a), detalles de cartilago hialino, que es de origen mesodérmico (Figura 4b) y epitelio secretor rico en células calciformes, que está relacionado con un endodermo (Figura 4c).

20

25

En conclusión, las células ES humanas desarrolladas en los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras de la presente divulgación no eran funcionalmente distintas de las células desarrolladas en cultivos basados en células alimentadoras. Tras la diferenciación, las células ES expresaron genes asociados con las tres capas germinales embrionarias, *in vitro*, y formaron teratomas *in vivo*, que consistían en tejido procedente de las tres capas germinales, también. A diferencia de otros protocolos libres de células alimentadoras, los sistemas de cultivo de la presente divulgación contenidos en un medio de cultivo bien definido, libre de xenocontaminantes, son adecuados para propagar las células ES humanas.

30

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

35

LOS SISTEMAS DE CULTIVO COMPLETOS LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS Y LIBRES DE XENOCONTAMINANTES SON ADECUADOS PARA EL CRECIMIENTO FENOTÍPICAMENTE COINCIDENTE CON CÉLULAS ES HUMANAS

Dado que, para cualquier uso clínico futuro de las células ES humanas, es crucial un entorno no animal, se desarrolló un sistema de cultivo completo libre de células alimentadoras y libre de xenocontaminantes usando fibronectina de origen humano como una matriz para el cultivo de células hES y medio complementado libre de xenocontaminantes y factores de crecimiento.

40

Resultados experimentales

45

Los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras y de xenocontaminantes mantienen al crecimiento de células ES humanas - Para crear un entorno bien definido, completo, no animal para cultivos de células hES, se usó fibronectina de origen humano como sistema de cultivo libre de células alimentadoras. El medio de cultivo incluyó sustitutivo del suero (15 %) complementado con las combinaciones de factores de crecimiento T, LF, TF y TLF, según lo descrito anteriormente en el apartado de Materiales y métodos experimentales del Ejemplo 1 del presente documento. Se descubrió que tanto la fibronectina plasmática humana (fibronectina de plasma humano, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) como la fibronectina celular (fibronectina celular de células de fibroblasto de prepucio humano, St. Louis, MO, EE.UU.) mantuvieron el crecimiento no diferenciado de células hES durante al menos 38 pasadas (aproximadamente 110 duplicaciones) en presencia de las dos combinaciones de factores de crecimiento TF y TLF. Además, el día cuatro desde la pasada sobre el sistema libre de células alimentadoras con fibronectina de la presente divulgación, los cultivos de células hES consistían en 85-90 % de células no diferenciadas con un tiempo de duplicación de 30-35 horas, lo que concuerda con el tiempo de duplicación de las células hES desarrolladas en MEF, demostrando la capacidad de estos sistemas de cultivo libres de xenocontaminantes para propagar el crecimiento normal de células hES.

50

55

60

Estos resultados demuestran la capacidad de la fibronectina de origen humano complementada con un sistema de cultivo libre de xenocontaminantes para mantener el crecimiento de cultivos prolongados de células ES humanas proliferativas y no diferenciadas.

65

Las células ES humanas desarrolladas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras y de xenocontaminantes son fenotípicamente indistinguibles de las células ES desarrolladas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras con fibronectina de origen bovino – Las células desarrolladas durante 22 pasadas en sistemas de cultivo con fibronectina celular humana complementados con sustitutivo del suero y los factores de crecimiento TF conservaron una morfología celular no diferenciada. Las células ES eran pequeñas y redondas, con una alta proporción del núcleo con respecto al citoplasma, con una presencia notable de uno a tres nucleolos y una separación típica entre las células (Figuras 5a-c).

Además, se descubrió que las células ES humanas desarrolladas en un sistema de cultivo libre de células alimentadoras y de xenocontaminantes tenían un cariotipo normal tras 32 pasadas (no mostrado).

Además, como se reveló además mediante IHC, las células ES humanas cultivadas durante 16 pasadas en un sistema completo libre de células alimentadoras y de xenocontaminantes expresaron todos los marcadores de superficie embrionarios característicos incluyendo TRA-1-60, SSEA4, TRA-1-81 (Figuras 5d-f).

Por lo tanto, estos resultados demuestran la capacidad de los sistemas completos, libres de células alimentadoras, libres de xenocontaminantes para mantener células ES humanas de fenotipo coincidente, manteniendo cultivos altamente proliferativos con cariotipo normal y estable, y expresando todos los marcadores de superficie embrionarios típicos.

Estos resultados sugieren, por tanto, el uso de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras y libres de xenocontaminantes de la presente divulgación para la obtención y el cultivo de células ES humanas.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

LAS CÉLULAS ES HUMANAS DESARROLLADAS EN UN SISTEMA DE CULTIVO LIBRE DE CÉLULAS ALIMENTADORAS Y LIBRE DE XENOCONTAMINANTES SON FUNCIONALMENTE INDISTINGUIBLES DE LAS CÉLULAS ES DESARROLLADAS EN OTROS SISTEMAS DE CULTIVO

Se ensayaron células ES humanas desarrolladas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras basados en fibronectina humana complementados con sustitutivo del suero y factores de crecimiento libres de xenocontaminantes para determinar su capacidad para formar cuerpos embrionarios *in vitro*.

Las células ES se diferencian espontáneamente en tipos de células de la capa germinal embrionaria *in vitro*, tras su retirada de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras - Para verificar que las células ES humanas cultivadas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras y libres de xenocontaminantes eran funcionalmente, así como fenotípicamente, coincidentes con las células ES humanas derivadas de protocolos basados en células alimentadoras, se retiraron las células ES de los cultivos libres de células alimentadoras tras 17 y 16 pasadas en matrices de fibronectina celular humana - y plasmática humana, respectivamente. Como resultado de ello, las células hES formaron cuerpos embrionarios (CE) similares a los creados por las células ES desarrolladas en MEF (Figuras 6a-c).

Además, se verificó la expresión génica coincidente con las células ES dentro de los CE usando RT-PCR. Dentro de los CE, las células madre se diferenciaron en células representativas de las tres capas germinales embrionarias, es decir, mesodermo, endodermo y ectodermo. Tal como se muestra en la Figura 7, mientras que las células no diferenciadas desarrolladas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras y libres de xenocontaminantes complementados con TLF o TF expresaron niveles altos de Oct 4 y de receptor de LIF (Figura 7), las células recogidas de CE de 14 días de vida expresaron genes, que se asociaron con la diferenciación celular incluyendo neurofilamento (NF-68 kD), que está relacionado con el ectodermo embrionario, α -actina cardíaca, que está asociada con el mesodermo embrionario, y α -fetoproteína y albúmina, ambas de las cuales son indicadores del endodermo embrionario. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las células ES humanas desarrolladas en cultivos completos libres de células alimentadoras y libres de xenocontaminantes de la presente divulgación pueden crear CE funcionales con células que se diferencian en los diversos linajes somáticos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

LOS SISTEMAS DE CULTIVO LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS MANTIENEN VELOCIDADES DE CRECIMIENTO NORMALES Y ALTOS PORCENTAJES DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS NO DIFERENCIADAS

Para caracterizar mejor la capacidad de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras para propagar células madre embrionarias humanas, se determinó la velocidad de crecimiento y la fracción de células madre no diferenciadas en células hES en diversas condiciones de cultivo.

Los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras mantienen velocidades de crecimiento normales y altos porcentajes de células ES humanas no diferenciadas similares a los sistemas de cultivo basados en células

alimentadoras - Para determinar la capacidad de los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras de la presente divulgación para mantener el crecimiento de células hES, se determinó la velocidad de crecimiento y la fracción de células madre no diferenciadas en los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras. Como se muestra en las Figuras 8a-c, cuando las células hES se cultivaron en una matriz de fibronectina de origen bovino en presencia de la combinación de factores de crecimiento TLF, las velocidades de crecimiento de las estirpes I-3 (Figura 8a, curva rosa), I-6 (Figura 8b, curva rosa) y H-9 (Figura 8c, curva rosa) de células hES eran similares a las de las células hES cultivadas en MEF. Además, cuando las células hES se cultivaron en una matriz de fibronectina de origen humano en presencia solo de la combinación de factores de crecimiento TF, las velocidades de crecimiento de la estirpe I-3 (Figura 8a, curva azul claro), I-6 (Figura 8b, curva azul claro) y H-9 (Figura 8c, curva azul claro) de las células hES fueron similares a las de las células hES cultivadas en MEF. Por otro lado, cuando estas células se cultivaron en matriz de fibronectina de origen bovino en presencia de la combinación de factores de crecimiento TF, las velocidades de crecimiento de la estirpe I-3 (Figura 8a, curva negra), I-6 (Figura 8b, curva negra) y H-9 (Figura 8c, curva negra) de células hES fueron inferiores en comparación con las de las estirpes de células hES cultivadas en MEF. Por lo tanto, la matriz de fibronectina de origen bovino complementada con la combinación de factores de crecimiento TF y la matriz de fibronectina de origen humano complementada solo con la combinación de factores de crecimiento TF mantiene una velocidad de crecimiento alta y normal de células hES similar a la conseguida en MEF.

Las células ES humanas cultivadas en sistemas de cultivo libres de células alimentadoras mantienen altos porcentajes de células no diferenciadas - Para caracterizar mejor la capacidad de los sistemas libres de células alimentadoras de la presente divulgación con el fin de propagar estirpes de células hES no diferenciadas, se determinaron las fracciones de células no diferenciadas tras 4, 6 y 10 días de cultivo. Como se observa en la figura 8d, cuando se cultivaron células hES en matrices de fibronectina de origen humano o bovino en presencia de las combinaciones de factores de crecimiento TF o TLF, un alto porcentaje de las células (85-90 %) permaneció no diferenciado incluso tras seis días en cultivo. Por otro lado, cuando las células hES se cultivaron en matriz de fibronectina de origen bovino en presencia de las combinaciones de factores de crecimiento LT, LF, T o F, el porcentaje de células no diferenciadas fue del 77-85 % tras 4 días en cultivo y descendió hasta el 60-75 % tras 6 días en cultivo. Por lo tanto, estos resultados demuestran que los sistemas de cultivo libres de células alimentadoras de la presente divulgación que utilizan matrices de fibronectina y las combinaciones de factores de crecimiento TF o TLF, pueden mantener una alta fracción de células no diferenciadas, similar a la obtenida con MEF.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

LAS COMBINACIONES DE FACTORES DE CRECIMIENTO TLF Y TF SON ADECUADAS PARA MANTENER A LAS CÉLULAS ES EN OTROS SISTEMAS DE CULTIVO LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS

Para confirmar con mayor seguridad la capacidad de las combinaciones de factores de crecimiento TLF y TF para complementar otros sistemas libres de células alimentadoras, se han usado matrices adicionales.

Resultados experimentales

Se transfirieron células ES humanas originalmente cultivadas en MEF a los siguientes sistemas de cultivo libres de células alimentadoras: Matrigel^{RTM}, matriz de MEF de fabricación propia y matriz de fibroblastos de prepucio de fabricación propia, todas complementadas con sustitutivo del suero y con combinaciones seleccionadas de factores de crecimiento. Usando las combinaciones de factores de crecimiento TLF o TF, las células hES se desarrollaron satisfactoriamente en Matrigel^{RTM}, matriz de MEF y matriz de fibroblastos de prepucio (Figuras 9a-f). Cuando se utilizaron cualquiera de las matrices de Matrigel^{RTM} o MEF, las células superaron las 30 pasadas en la fase no diferenciada (más de 120 días), crearon CE y formaron teratomas (Figuras 10c-f). Estas matrices, sin embargo, no son no animales ni están bien definidas, quedando la fibronectina como la opción favorable.

Cuando las células ES se desarrollaron en matriz de fibroblastos de prepucio complementada con SS, y los factores de crecimiento TF y TLF, las células superaron las 5 pasadas en la fase no diferenciada (más de 20 días), conservando las características morfológicas típicas de las células ES (Figura 9a). Aunque esta matriz representa un sistema de cultivo libre de células alimentadoras y no animal, la matriz de fibroblastos de prepucio no es un sistema bien definido en comparación con la matriz de fibronectina.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el medio de cultivo bien definido libre de xenocontaminantes, que consiste en sustitutivo del suero y las combinaciones de factores de crecimiento TLF o TF, es adecuado para mantener y propagar las células hES en una variedad de sistemas de cultivo libres de células alimentadoras.

Se apreciará que determinadas características de la divulgación, que, en aras de la claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la divulgación, que, en aras de la brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Listado de secuencias

<110> Technion Research & Development Foundation Ltd.

5 <120> MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS LIBRES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS Y LIBRES DE XENOCONTAMINANTES, Y CULTIVOS DE CÉLULAS MADRE PREPARADOS USANDO DICHOS MÉTODOS

<130> FSS-12878-EP

10 <140> 03813286.6
<141> 7-diciembre-2003

<150> US 60/433.619

15 <151> 16-diciembre-2002

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1

30 gagaacaatg agaacctca gga 23

<210> 2
<211> 23
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

40 <400> 2
ttctggcgcc gggtacagaa cca 23

<210> 3
<211> 24
<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

50 <400> 3
tgcttgaatg tgctgatgac aggg 24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

60 <400> 4
aaggcaagtc agcagccatc tcat 24

65 <210> 5
<211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 5
 gctggattgt ctgcaggatg gggaa 25

 10 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 6
 20 tcccctgaag aaaattggtt aaaat 25

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 7
 30 gagtgaaatg gcacgatacc ta 22

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 8
 40 tttcctctcc ttcttcacct tc 22

 <210> 9
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 50
 <400> 9
 ggagttatgg tgggtatggg tc 22

 <210> 10
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 10
 agtggtgaca aaggagtagc ca 22

 65 <210> 11
 <211> 18

ES 2 705 683 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 11
caaaagagtg tctgtgag 18

10 <210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 12
ccatgtatt acattggc 18

20 <210> 13
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 13
atctggcacc acaccttcta caatgagctg cg 32

30 <210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

40 <400> 14
cgtcatactc ctgcttgctg atccacatct gc 32

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo seleccionado del grupo que consiste en:
 - 5 (i) un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento transformante β_1 (TGF β_1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y suero humano o sustitutivo del suero, medio de cultivo que está esencialmente libre de contaminantes animales, medio de cultivo que es capaz de mantener células madre pluripotentes humanas en un estado no diferenciado; y
 - 10 (ii) un medio de cultivo que comprende el factor de crecimiento transformante β_1 , (TGF β_1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y albúmina no animal, y que carece de suero, medio de cultivo que está esencialmente libre de contaminantes animales y dicho medio de cultivo que puede mantener células madre pluripotentes humanas en un estado no diferenciado.
2. El medio de cultivo de la reivindicación 1(i), medio de cultivo que está además esencialmente libre de contaminantes de células alimentadoras, y en el que dicho bFGF se proporciona a una concentración de al menos 2 ng/ml.
3. El medio de cultivo de la reivindicación 1, que comprende además el factor inhibidor de la leucemia (LIF).
4. El medio de cultivo de la reivindicación 1 o 3, medio de cultivo que está esencialmente libre de contaminantes de células alimentadoras.
5. El medio de cultivo de la reivindicación 1, 3 o 4, en el que dicho bFGF se proporciona a una concentración de al menos 2 ng/ml.
6. El medio de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho TGF β_1 se proporciona a una concentración de al menos 0,06 ng/ml.
7. El medio de cultivo de la reivindicación 1(ii), que comprende además sustitutivo del suero.
8. El medio de cultivo de la reivindicación 1(i) o 7, en el que dicho sustitutivo del suero comprende albúmina o sustitutos de albúmina, aminoácidos, vitaminas, transferrinas o sustitutos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno y elementos traza.
9. El medio de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho TGF β_1 , se proporciona en un intervalo de concentración de 0,06-0,24 ng/ml.
10. El medio de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho bFGF se proporciona en un intervalo de concentración de 2-8 ng/ml.
11. El medio de cultivo de la reivindicación 3, en el que dicho LIF se proporciona a una concentración de al menos 500 u/ml.
12. El medio de cultivo de la reivindicación 3, en el que dicho LIF se proporciona en un intervalo de concentración de 500-2.000 u/ml.
13. El medio de cultivo de la reivindicación 1(i) o 7, en el que dicho sustitutivo del suero se proporciona en un intervalo de concentración del 1 % al 40 %.
14. El medio de cultivo de la reivindicación 1(i) o 7, en el que dicho sustitutivo del suero se proporciona a una concentración de al menos el 10 %.
15. El medio de cultivo de la reivindicación 1(i), en el que dicho suero humano se proporciona en un intervalo de concentración del 1 % al 40 %.
16. El medio de cultivo de la reivindicación 1(i), en el que dicho suero humano se proporciona a una concentración del al menos 10 %.
17. El medio de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que dicho medio de cultivo es capaz de mantener células madre pluripotentes en un estado no diferenciado durante al menos 5 pasadas.

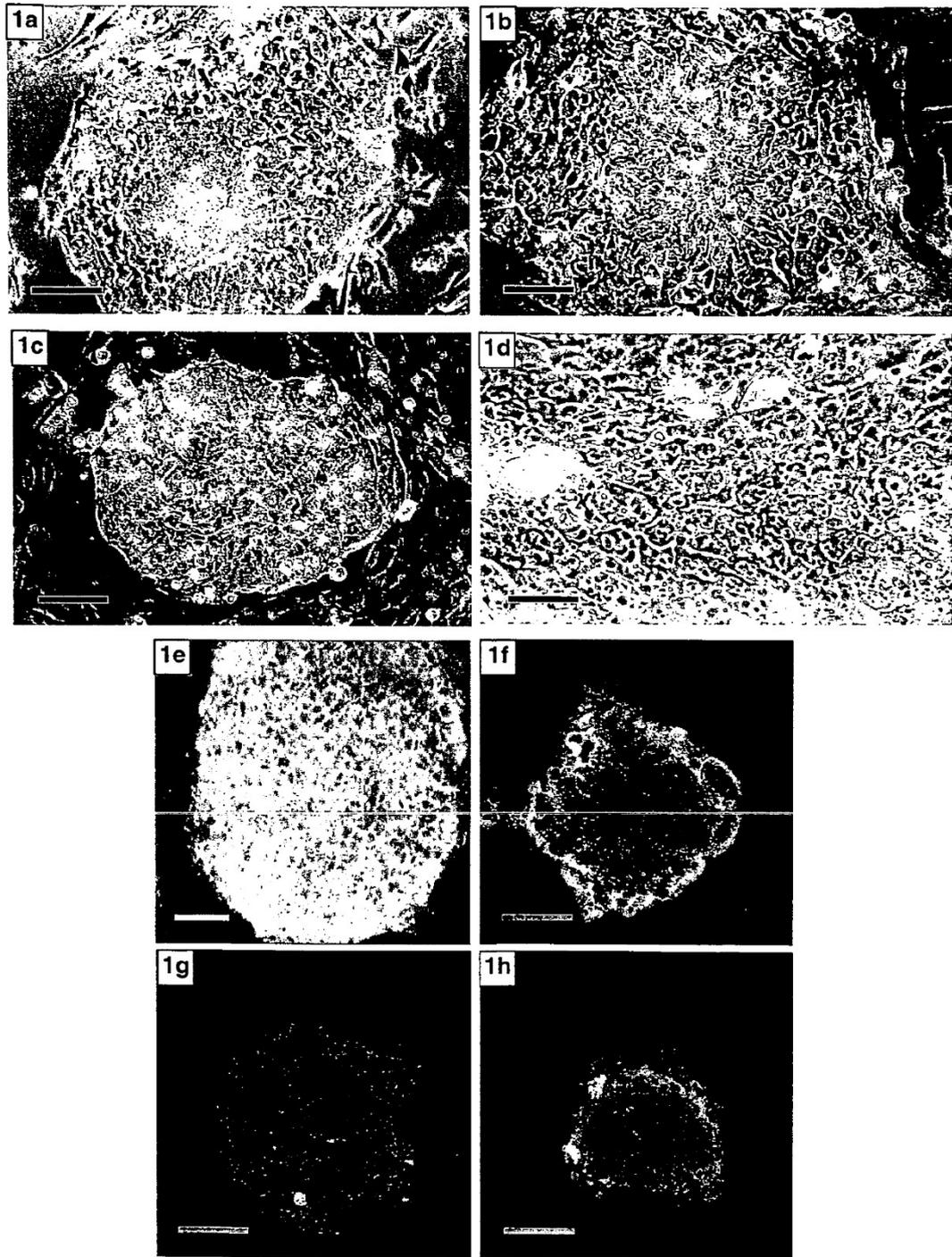


Fig. 1a-h

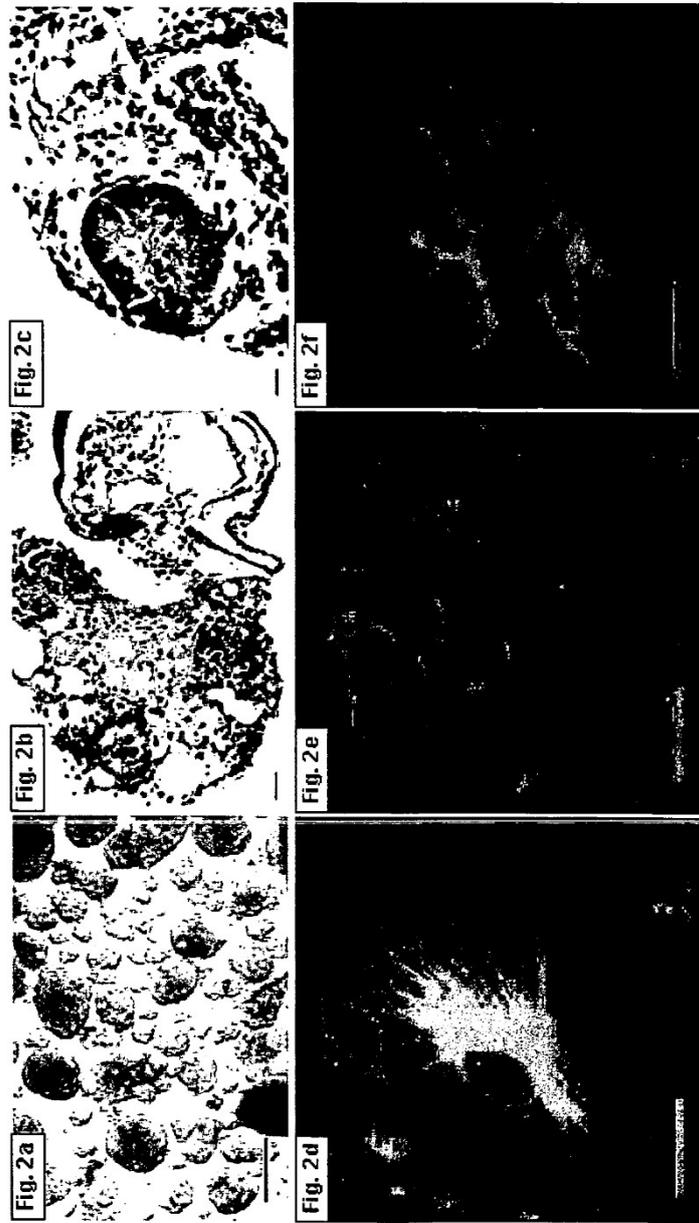


Fig. 2a-f

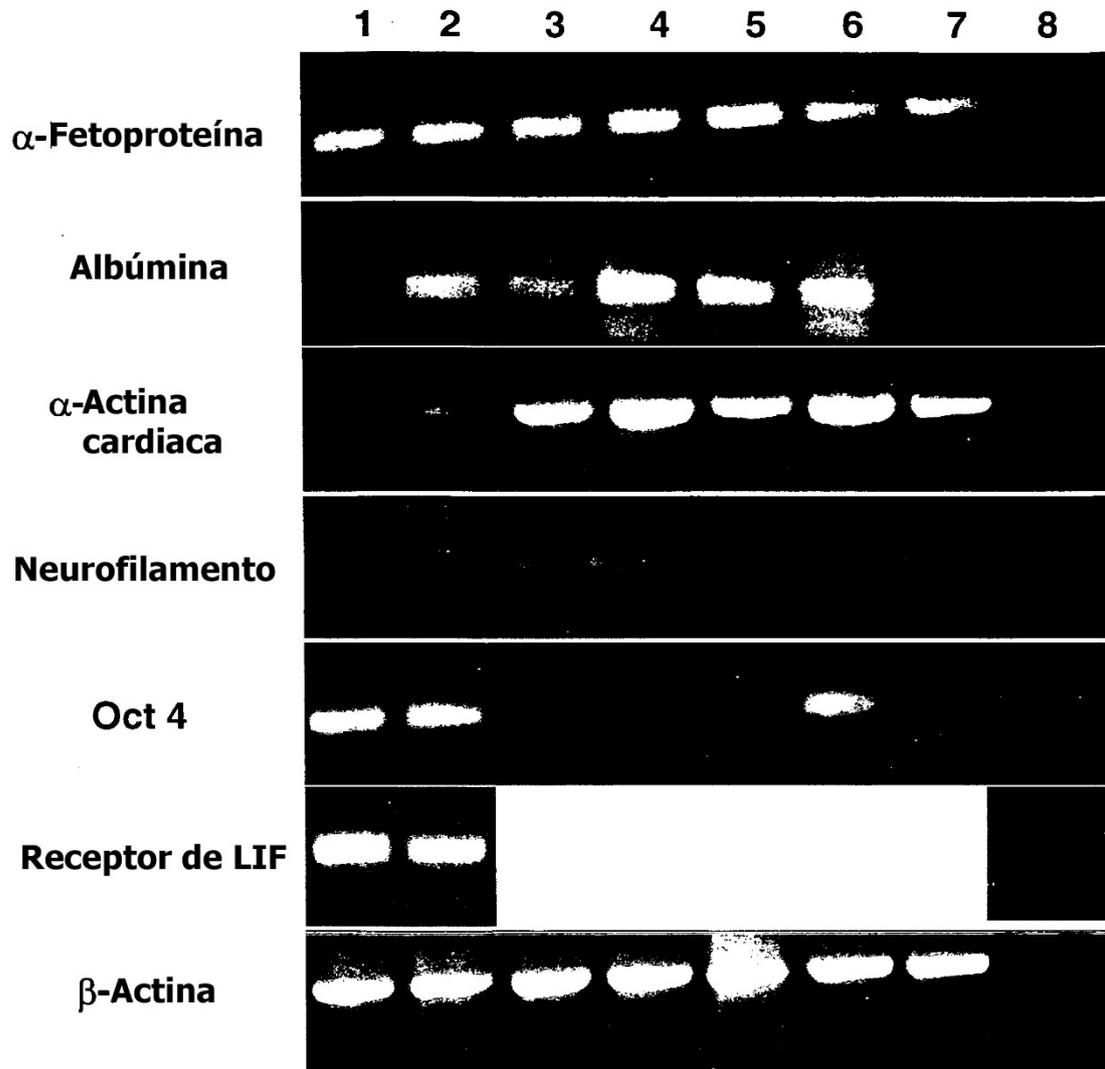


Fig. 3

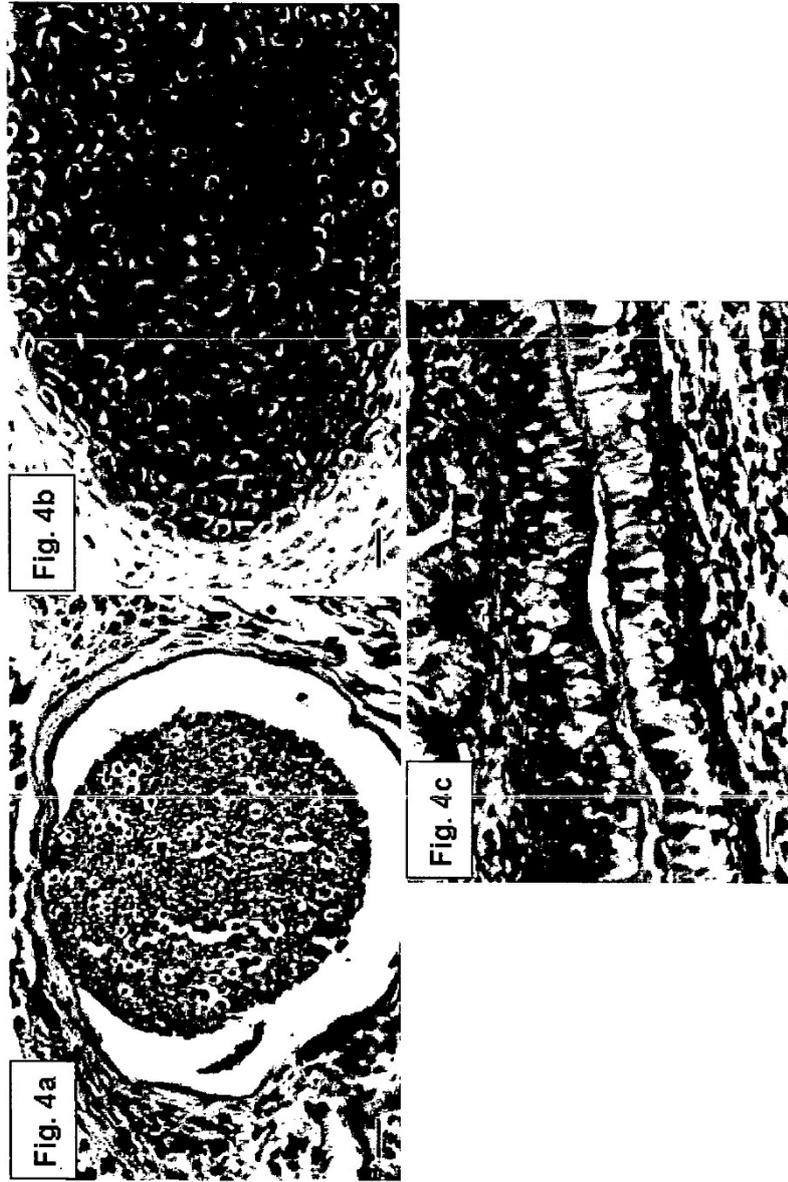


Fig. 4a-c

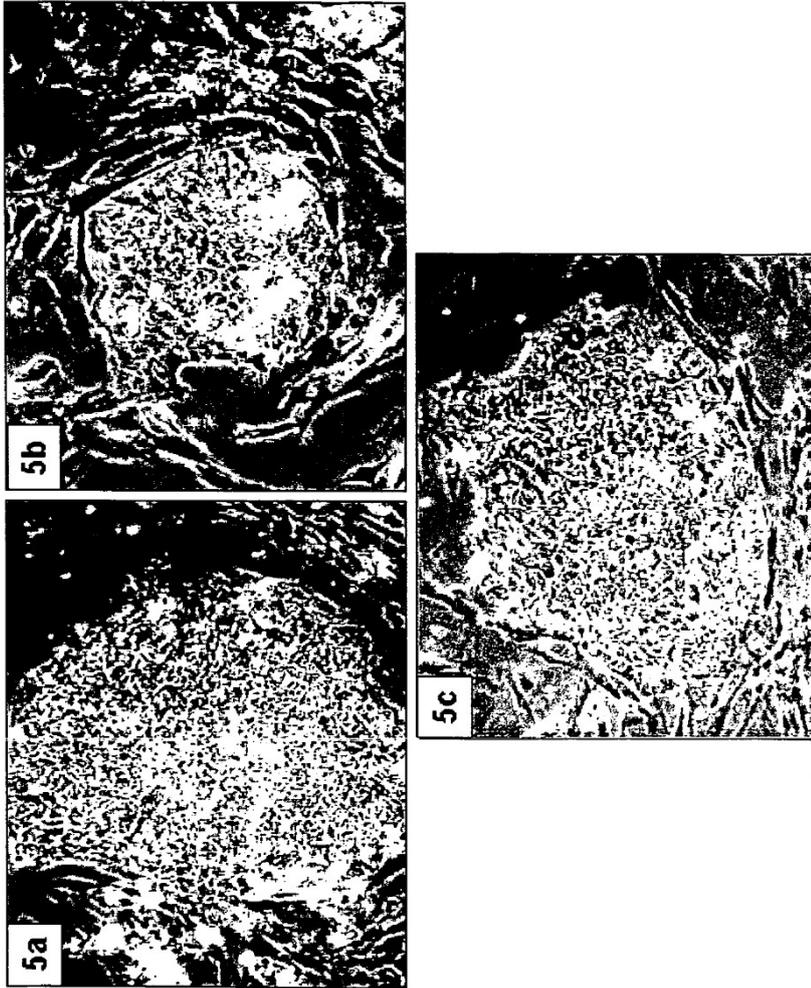


Fig. 5a-c

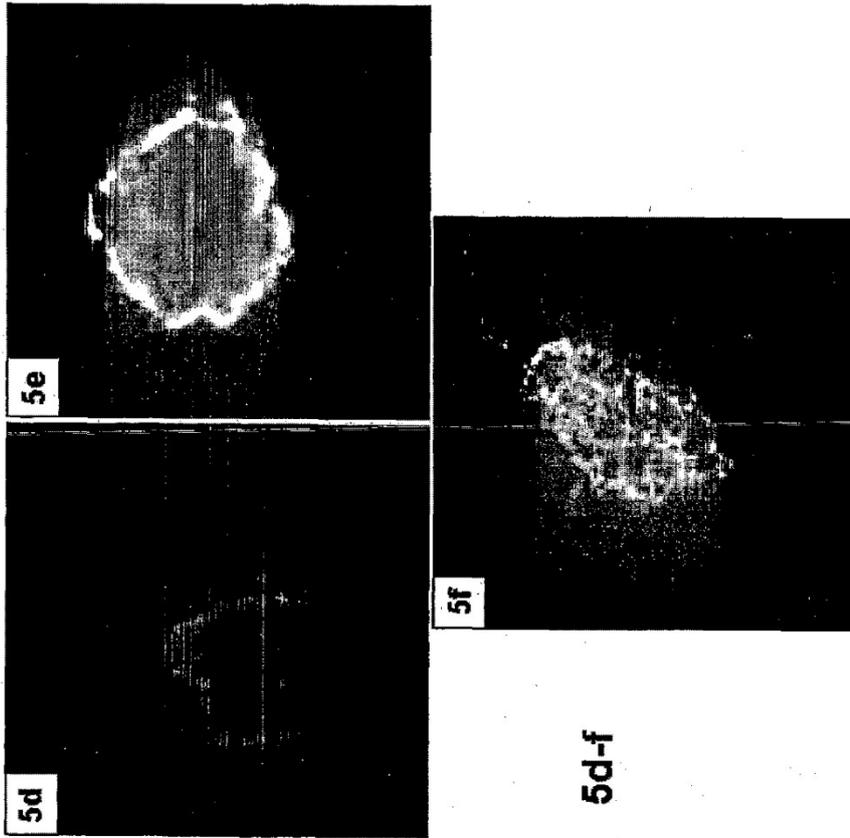


Fig. 5d-f

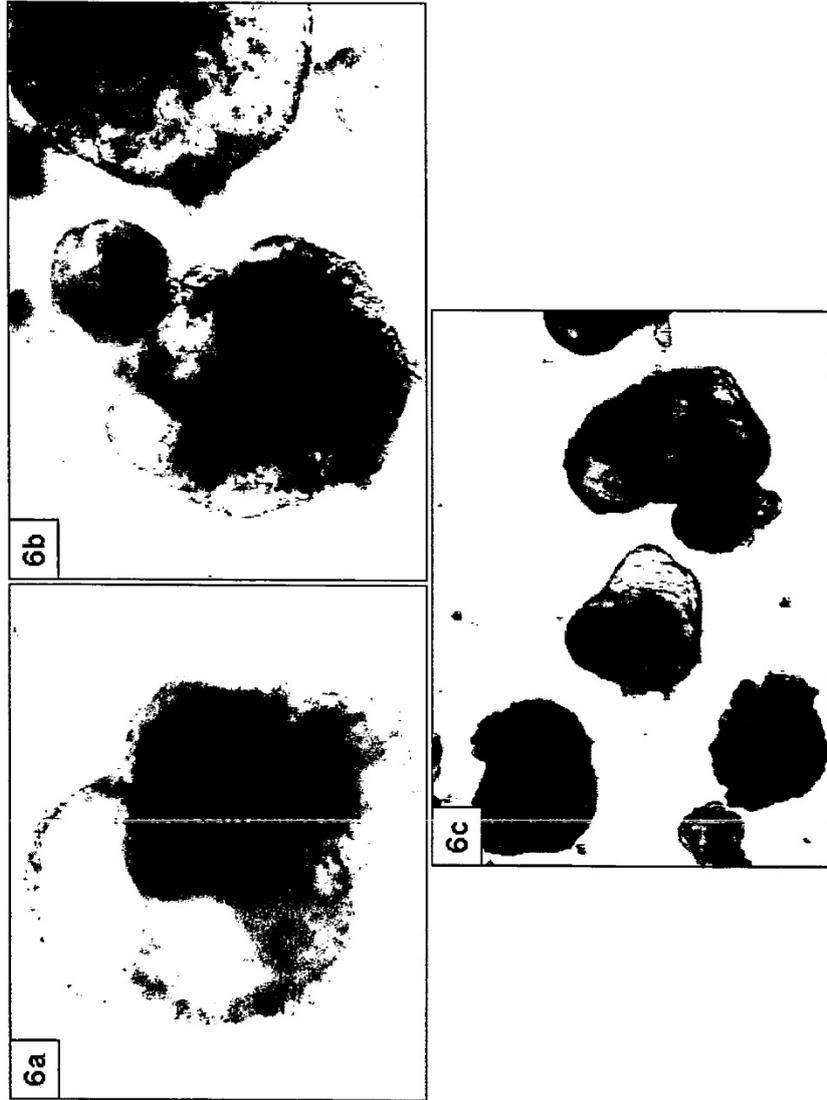


Fig. 6a-c

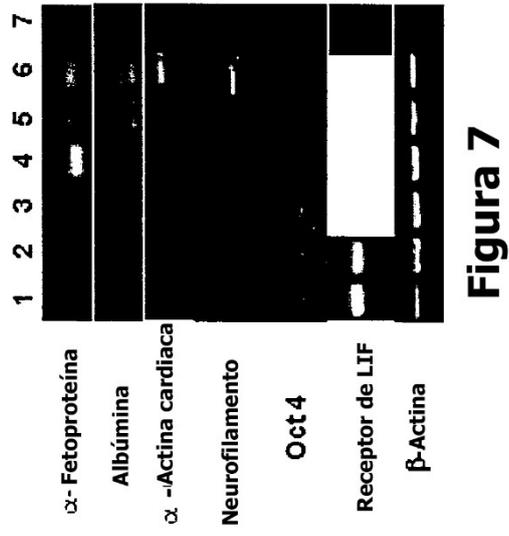


Figura 7

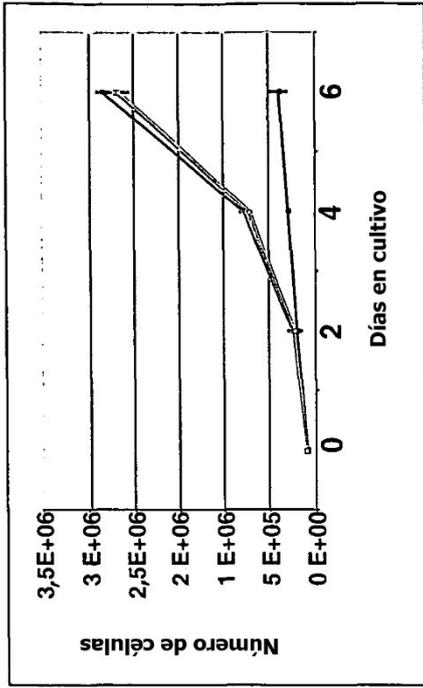


Fig. 8b

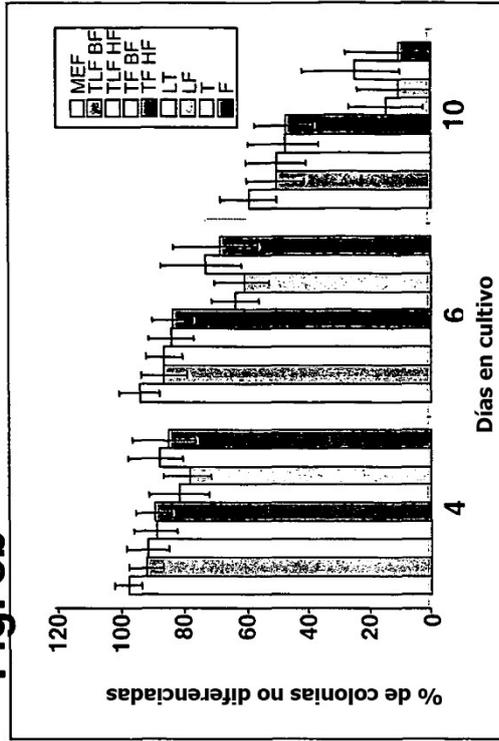


Fig. 8d

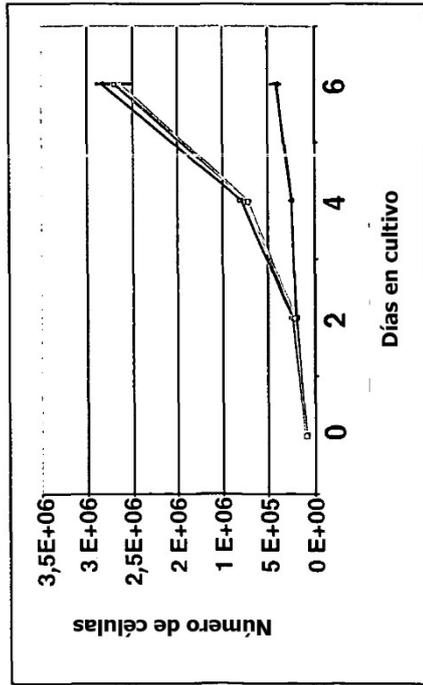


Fig. 8a

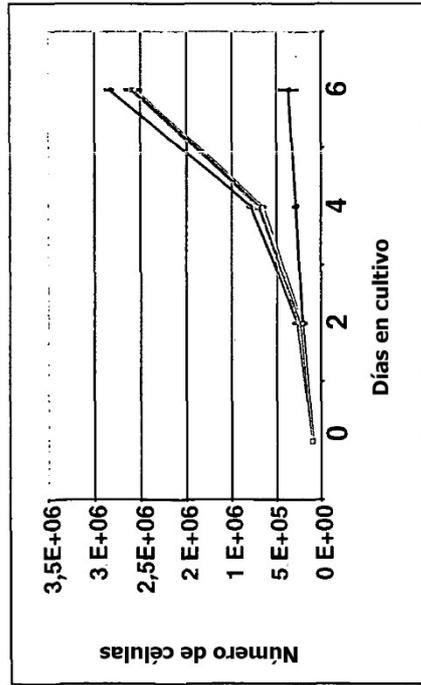


Fig. 8c

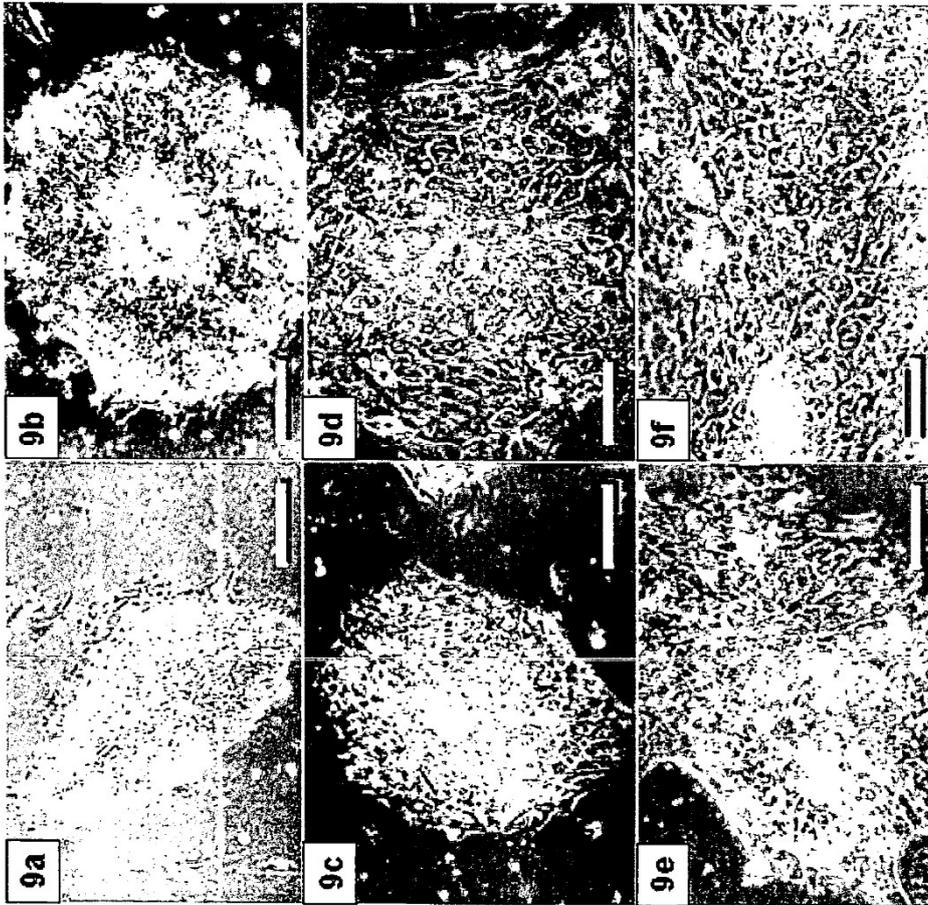


Fig. 9a-f

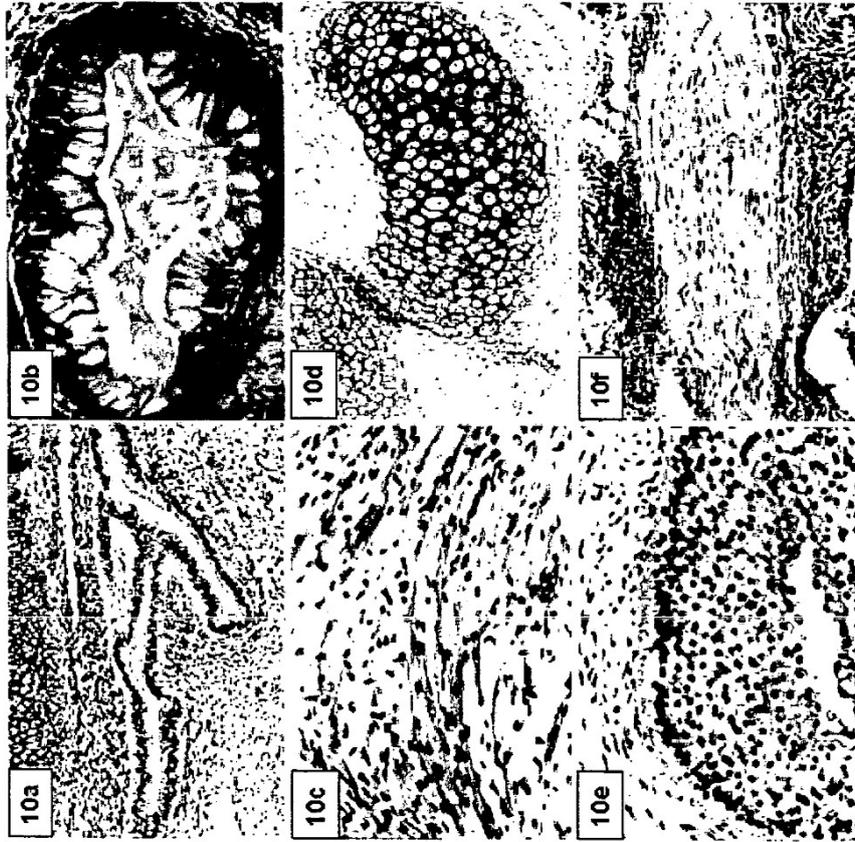


Fig. 10a-f