

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 476**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

A61D 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2011 PCT/EP2011/063821**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12020077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2011 E 11741581 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2603581**

54 Título: **Cocultivos de células del cúmulo y embriones durante procedimientos de fertilización in vitro**

30 Prioridad:

11.08.2010 EP 10305882

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

23.01.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR y
ASSOU, SAID**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 738 476 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

Cocultivos de células del cúmulo y embriones durante procedimientos de fertilización *in vitro*

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere, en general, al campo de la medicina reproductiva. Más específicamente, la presente invención se refiere a un nuevo sistema de cocultivo de embriones humanos para mejorar el crecimiento de embriones humanos *in vitro* y, por consiguiente, aumentar las tasas de embarazo en mujeres infértiles que se someten a un tratamiento de fertilización *in vitro* (FIV).

Estado de la técnica

La fertilización *in vitro* es una técnica potente y ampliamente usada para el tratamiento de la infertilidad. En este procedimiento, se extraen óvulos humanos y se mezclan con esperma en una placa de cultivo para permitir la fertilización. Posteriormente, se transfieren los embriones al útero en el día 2/3, cuando tienen entre 4 y 8 células, respectivamente o en el día 5 o 6 en el estadio de blastocisto. Esta técnica se emplea para mujeres con, por ejemplo, trompas de Falopio dañadas o ausentes, endometriosis, infertilidad de factor masculino e infertilidad por causas desconocidas. Sin embargo, la tasa de implantación varía entre un 5 % y un 30 %.

En condiciones *in vivo*, el embrión alcanza el útero en un estadio de desarrollo de blastocisto. Por consiguiente, las técnicas de cocultivo de embriones, empleadas con éxito en animales, representan un esfuerzo para mejorar los medios de cultivo para embriones, de tal forma que una mayor proporción de embriones alcance el estadio de blastocisto para mejorar las tasas de implantación y embarazo. Además, en caso de que el cocultivo de como resultado una mayor tasa de implantación, podrían transferirse menos embriones en cada ciclo, dando como resultado una incidencia reducida de embarazos múltiples. Por lo tanto, se ha empleado una variedad de técnicas de cocultivo que implican el uso de capas de células alimentadoras procedentes de una serie de tejidos, incluyendo el uso de tejidos reproductivos humanos (es decir, endometrio). Sin embargo, no ha surgido un método de cocultivo estandarizado y aún queda por determinar el sistema óptimo para el cultivo de embriones humanos antes de la implantación.

Objeto de la invención:

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a una población de células del cúmulo para su uso en un método de FIV, comprendiendo dicho método una etapa de cultivo de un embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto mediante el cocultivo de dicho embrión en presencia de dicha población de células del cúmulo.

Descripción detallada de la invención:

El concepto y la tecnología de la presente invención implican cultivar embriones en células del cúmulo humanas (hCC). La idea es que estas células, que en ocasiones se denominan células "colaboradoras", estimularán el desarrollo embrionario temprano añadiendo factores de crecimiento o algún otro efecto beneficioso. Otra aplicación potencial del cocultivo con hCC para programas de FIV es el cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto y posteriormente llevar a cabo la transferencia del blastocisto en el día 5 o el día 6. Esto permite seleccionar el mejor embrión que ha sido capaz de sobrevivir a lo largo de las etapas tempranas de escisión de la primera semana de desarrollo. Generalmente es muy difícil conseguir buenos números de blastocistos de alta calidad cuando se cultivan en medios de cultivo sencillos. Las hCC son células somáticas que se encuentran estrechamente asociadas con el ovocito en desarrollo en el folículo ovárico. Las hCC se estimulan para que crezcan, se diferencien y luteinicen por factores endocrinos, paracrinos y autocrinos. Las principales funciones de las hCC incluyen la producción de esteroides así como de cientos de factores de crecimiento para que interactúen con el ovocito durante su desarrollo dentro del folículo ovárico. Sin embargo, tras la ovulación, las hCC producen progesterona, que puede mantener un potencial embarazo. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para el cocultivo *in vitro* de embriones humanos en células del cúmulo humanas (hCC).

Métodos para cultivar un embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto:

La presente invención se refiere a una población de células del cúmulo para su uso en un método de FIV, comprendiendo dicho método una etapa de cultivar un embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto mediante el cocultivo de dicho embrión en presencia de dicha población de células del cúmulo.

Como se usa en el presente documento, el término "embrión" se refiere a un cigoto o derivados post-zigóticos de un óvulo fertilizado. Por lo tanto, el término "embrión" se refiere a cualquier entidad en el estadio preembrionario después de la fertilización del óvulo. Por lo tanto, el término incluye un óvulo fertilizado y un cigoto. De acuerdo con la invención, el embrión es un embrión humano.

Pueden generarse embriones *in vitro* mediante cualquiera de las técnicas bien conocidas en la especialidad, tales como fertilización *in vitro* (FIV), incluyendo FIV llevada a cabo mediante el mezclado simple del ovocito y el esperma o mediante la inyección intracitoplasmática de esperma dentro de un ovocito.

- 5 Para la fertilización *in vitro* (FIV), se fertilizan ovocitos recogidos de un sujeto femenino usando esperma recogido de un sujeto masculino (por ejemplo, sencillamente mezclando el ovocito y el esperma o mediante la inyección intracitoplasmática del esperma dentro del ovocito) y se inicia el desarrollo embrionario *in vitro*. Los protocolos y métodos para la FIV están bien establecidos en la técnica para diversos mamíferos, incluyendo seres humanos (véase, por ejemplo, Boiso et al. *Reprod Biomed Online*. 2002; 5:328-350; Frydman et al. *Hum Reprod*. 1988; 3:559-561; Tarin y Pellicer. *Ann Acad Med Singapor* 1992; 21:492-497; Kenny. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995; 102:317-325; Mansour. *Hum Reprod Update*. 1998; 4:43-56; y Evans et al. *Obstet Gynecol Surv*. 1980; 35:7181), ratones (véase, por ejemplo, Yanagimachi. *Hum Reprod*. 1998; 13:87-98 y Sato et al. *Horm Res*. 1995; 44 Suppl 2:4-8), ovejas (véase, por ejemplo, Armstrong et al. *Reprod Fertil Dev*. 1997; 9:333-339), vacas (véase, por ejemplo, Hoshi. *Theriogenology*. 2003; 59:675-685 y Marquant-Leguienne y Humblot. *Theriogenology*. 1998; 49:3-11), hámsteres (véase, por ejemplo, Bavister. *Gamete Res*. 1989; 23: 139-158); caballos (véase, por ejemplo, Squires. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1996; 12:31-45 y Hinrichs. *Theriogenology* 1998; 49:13-21) y cerdos (véase, por ejemplo, Niemann y Rath. *Theriogenology*. 2001; 56:1291-1304 y Robl y First. *J ReprodFertil Suppl*. 1985; 33:101-114).

- 20 Los protocolos de FIV pueden resumirse generalmente en cuatro etapas 5, como se expone a continuación. Etapa uno: estimulación ovárica y monitorización. Para maximizar las probabilidades de una fertilización exitosa de un paciente, un paciente que se someta a FIV toma hormonas en forma de inyecciones para aumentar el número de óvulos producidos en un mes concreto. Se lleva a cabo una monitorización para seguir de manera continua la respuesta ovárica de una mujer, permitiendo al médico ajustar y temporizar la dosis de medicación de manera adecuada. Etapa dos: recogida del óvulo. Habiéndose sedado al paciente y encontrándose este cómodo, se extraen los ovocitos u óvulos a través de la vagina 15 con guiado por ultrasonidos. Etapa tres: cultivo y fertilización. Se fertilizan los ovocitos con esperma del compañero varón. En ocasiones, se coloca el esperma sobre el ovocito. En otros casos, especialmente cuando hay menos de un millón de espermatozoides vivos, se usa ICSI o inyección intracitoplasmática del esperma capturando un solo espermatozoide e inyectándolo directamente en el ovocito. Etapa cuatro: transferencia del embrión. Se transfieren directamente tres o cuatro de los mejores embriones al útero y se deja que se implanten. Los demás embriones sanos pueden criopreservarse (congelarse) 25. Se lleva a cabo una prueba de embarazo 11 días después de la transferencia de los embriones. En un buen programa con un laboratorio de alta calidad, una mujer de menos de 40 años debería quedar embarazada aproximadamente un 50 % de las veces.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "blastocisto" se refiere a la estructura formada en la embriogénesis temprana de los mamíferos, tras la formación de la mórula. Posee una masa interna de células (ICM) o embrioblasto, que posteriormente forma el embrión y una capa externa de células o trofoblasto, que posteriormente forma la placenta. El trofoblasto rodea a la masa interna de células y una cavidad del blastocisto rellena de líquido conocida como el blastocele. El blastocisto humano comprende 70-100 células. La formación del blastocisto comienza en el día 5 tras la fertilización en seres humanos, cuando se abre el blastocele en la mórula.

- 40 La expresión "células del cúmulo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula aislada cultivada o no cultivada procedente de células y/o tejido que rodea a un ovocito. Los expertos en la materia pueden identificar fácilmente las células del cúmulo. Se analizan ejemplos de métodos para aislar y/o cultivar células del cúmulo en Damiani et al., 1996, *Mol. Reprod. Dev*. 45: 521-534; Long et al., 1994, *J Reprod. Pert*. 102: 361-369; y Wakayama et al., 1998, *Nature* 394: 369-373, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Las células del cúmulo pueden aislarse de folículos ováricos en cualquier estadio de desarrollo, incluyendo folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios, folículos en crecimiento, folículos vesiculares, folículos en maduración y folículos de Graaf. Las células del cúmulo pueden aislarse de los ovocitos de diversas maneras bien conocidas por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, pueden separarse las células del cúmulo de los ovocitos pipeteando el complejo de célula del cúmulo/ovocito a través de una pipeta de calibre pequeño, mediante exposición a hialuronidasa o mediante la ruptura mecánica (por ejemplo, agitación vorticial) del complejo de célula del cúmulo/ovocito. Además, la exposición a medio sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ puede retirar el cúmulo de los ovocitos inmaduros. Además, pueden establecerse cultivos de células del cúmulo colocando los ovocitos inmaduros en medio de cultivo. Una vez que se retiran las células del cúmulo de medios que contienen concentraciones aumentadas de LH/FSH, pueden unirse a la placa de cultivo.

Las células del cúmulo de acuerdo con la invención son células del cúmulo humanas. En una realización particular, las células del cúmulo proceden de una línea celular del cúmulo.

- 60 De acuerdo con una realización de la invención, el embrión se cultiva en una superficie de cultivo celular recubierta con una capa de células del cúmulo.

- 65 La expresión "superficie de cultivo celular" o "matriz de cultivo celular" se refiere a cualquier tipo de superficie o matriz adecuada para el cultivo celular. La expresión "superficie de cultivo celular" incluye, pero sin limitación, placas, discos, pocillos o matraces de cultivo celular. En una realización particular, la superficie de cultivo es una superficie plástica de la placa, disco, pocillo o matraz de cultivo, La superficie de cultivo celular ha de ser compatible con el recubrimiento

de células del cúmulo. De acuerdo con una realización de la invención, la superficie de cultivo celular se selecciona de tal modo que las células del cúmulo pueden adherirse a esta de manera natural. Pueden seleccionarse diversos materiales de superficie de cultivo celular. Los ejemplos de dichos materiales incluyen, pero sin limitación, discos de cultivo celular o discos recubiertos de colágeno.

5 Normalmente, como se describe en el EJEMPLO, para obtener una capa de células del cúmulo en una superficie de cultivo celular, las células del cúmulo se recubren en primer lugar sobre la superficie de cultivo celular con un medio de cultivo que contiene colágeno. Tras dejar pasar un tiempo suficiente para permitir la adhesión de las células del cúmulo sobre la superficie de cultivo, se retira el medio de cultivo que contiene colágeno y se reemplaza por un medio que permite la expansión de dichas células del cúmulo.

En una realización particular, se trata previamente a las células del cúmulo para detener su proliferación antes de entrar en contacto con el embrión. Por tanto, las células del cúmulo se inactivan mediante irradiación gamma o con un agente bloqueador del ciclo celular.

15 De acuerdo con la presente invención, las condiciones de cultivo también son importantes para cultivar el embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto. Durante el cultivo, pueden controlarse variables, tales como la temperatura y los niveles de CO₂ para maximizar el crecimiento del embrión. Por ejemplo, la temperatura óptima para el desarrollo de un embrión es de entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 40 °C, preferentemente, de entre aproximadamente 35 °C y 39 °C, siendo aún más preferida una temperatura de 37 °C. Los niveles óptimos de CO₂ en el ambiente de cultivo para el desarrollo de un embrión son de aproximadamente un 1 % de CO₂ a aproximadamente un 10 % de CO₂, más preferentemente, de aproximadamente un 3 % de CO₂ a aproximadamente un 8 % de CO₂ y aún más preferentemente, aproximadamente un 5 % de CO₂.

25 Se conocen bien en la técnica medios adecuados para cultivar embriones. Por ejemplo, en la actualidad hay disponibles medios que permiten a los embriones avanzar hasta blastocistos a velocidades comparables a las que se producen dentro del útero (Summers M, Biggers JD 2003 Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Human Reprod Update 9:557-582) lo que aumenta las posibilidades de que dichos embriones se encuentren libres de las marcas epigenéticas introducidas como resultado del estrés del cultivo *in vitro*. Muchos de estos medios están más bien basados en las concentraciones de iones, aminoácidos y azúcares encontrados en el tracto reproductivo de la mujer en el momento de la liberación, fertilización y desarrollo del óvulo (Gardner D, Lane M 1998 Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum free media. Hum Reprod 13:148-160). Normalmente, se usan medios de cultivo que contienen un tampón fosfato o tampón orgánico Hepes para procedimientos que implican la manipulación de gametos fuera de la incubadora, el enjuagado de los folículos y la micromanipulación. La mayoría de los medios de cultivo utilizan un sistema de tampón de bicarbonato/CO₂ para mantener el pH en el intervalo de 7,2-7,4. La osmolaridad del medio de cultivo ha de encontrarse en el intervalo de 275-290 mosmol/kg. También pueden cultivarse los embriones en aceite de parafina, lo que impide la evaporación del medio, manteniendo una osmolaridad constante. El aceite también minimiza las fluctuaciones de pH y temperatura cuando se extraen los embriones de la incubadora para su evaluación bajo el microscopio. El aceite de parafina puede resultar tóxica para los gametos y embriones, por lo que los lotes de aceite deben evaluarse y probarse en embriones de ratón antes de su uso en el cultivo de embriones humanos.

El medio está compuesto de un 99 % de agua. La pureza del agua es crucial y se logra mediante ultrafiltración.

45 El medio de cultivo también contiene una fuente de proteínas, tal como albúmina o suero sintético que se añaden en concentraciones del 5 al 20 % (p/v o v/v, respectivamente). También se añade una fuente de sal al medio, tal como NaCl, KCl, KH₂PO₄, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O o NaHCO₃. El medio de cultivo también contiene una fuente de carbohidratos, ya que hay presencia de carbohidratos en el tracto reproductivo femenino. Junto con los aminoácidos, representan la principal fuente de energía para el embrión. Los medios de cultivo que soportan el desarrollo de los cigotos hasta 8 células contienen piruvato y lactato. Algunos medios comerciales están libres de glucosa, mientras que otros añaden una concentración muy baja de glucosa para satisfacer las necesidades del esperma durante la inseminación convencional. Los medios que soportan el desarrollo de embriones de 8 células hasta el estadio de blastocisto contienen piruvato y lactato en bajas concentraciones y una mayor concentración de glucosa. También es necesario complementar el medio de cultivo con aminoácidos para el desarrollo del embrión. Los medios que soportan el desarrollo de los cigotos hasta 8 células se complementan con aminoácidos no esenciales, tales como prolina, serina, alanina, asparagina, aspartato, glicina y glutamato. Los medios que soportan el desarrollo de los embriones de 8 células hasta el estadio de blastocisto se complementan con aminoácidos esenciales, tales como cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, valina, arginina, glutamina, fenilalanina, treonina y triptófano. El medio de cultivo también puede contener vitaminas.

60 El medio de cultivo también puede contener antibióticos. La mayoría de los laboratorios de la especialidad de hecho usan medios de cultivo que contienen antibióticos para minimizar el riesgo de crecimiento microbiano. Los antibióticos más comúnmente usados son penicilina (β-lactama, bacterias grampositivas, altera la integridad de la pared bacteriana) y estreptomycin (aminoglicósido, bacterias gramnegativas, altera la síntesis de proteínas).

65 Tres ejemplos de medios secuenciales para el desarrollo de embriones son: G1/G2 (Gardner et al, 1998 Hum. Reprod.

13, 3434); medio para FIV universal/MS (Bertheussen et al., 1997); y medio para PI/Blastocisto (Behr et al., 1998 Am. Soc. Rep. Med. 0-262). De manera interesante, el medio M3 es una modificación de F-10 y F-12 de Ham, mientras que el medio para blastocistos es una modificación del F-10 de Ham). Los medios para cultivar embriones se encuentran disponibles comercialmente de Origio (Dinamarca), Vitrolife (Suecia), Sage Biopharma (EE. UU.), Irvine Scientific (EE. UU.).

La presente invención permite aumentar el potencial de implantación *in vivo* de un embrión fertilizado *in vitro*. El "potencial de implantación" es la capacidad de los embriones para implantarse en el útero. La presente invención incluye llevar a cabo una de las realizaciones descritas anteriormente para cultivar un embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto, de tal forma que se logra una eclosión completa del embrión en cultivo o se mejora la eclosión, en comparación con otros métodos de FIV. Posteriormente, se introduce el blastocisto en el útero de un hospedador mamífero, de tal forma que se logra una implantación potenciada del embrión. La eclosión completa del embrión *in vitro* se correlaciona con el establecimiento de un embarazo viable.

La presente invención permite aumentar el potencial de alumbramiento con vida de un embrión de mamífero fertilizado *in vitro*. El "potencial de alumbramiento con vida" se refiere a la capacidad de un embrión para desembocar en un nacimiento con vida. El método comprende cultivar un embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto, como se ha descrito anteriormente, de tal forma que se logra un potencial de eclosión mejorado o la eclosión completa de los embriones en cultivo. Después, se transfiere el blastocisto al útero de un hospedador mamífero; y se deja que el embrión se implante y crezca *in vivo*, de tal forma que se mejora la capacidad del embrión para desembocar en un nacimiento con vida en relación con la de un embrión no cultivado de acuerdo con la invención.

El método de la invención también es particularmente adecuado para limitar los embarazos múltiples, debido a que puede proporcionar una mayor tasa de implantación, como se ha descrito anteriormente y de este modo se pueden transferir menos embriones en cada ciclo, dando como resultado una incidencia reducida de embarazos múltiples.

Métodos para mantener el estado no diferenciado en cultivo de una población de células madre pluripotentes:

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para mantener el estado no diferenciado en cultivo de una población de células madre pluripotentes que comprende la etapa de cocultivar dicha población de células madre pluripotentes en presencia de una población de células del cúmulo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre pluripotente humana" se refiere a cualquier célula precursora humana que tenga la capacidad de formar cualquier célula adulta. En una realización particular, las células madre pluripotentes humanas incluyen, pero sin limitación, células madre embrionarias (células hES) o células madre pluripotentes inducidas humanas (células iPS humanas).

Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre embrionarias humanas" o "células hES" o "hESC" se refiere a células precursoras humanas que tienen la capacidad de formar cualquier célula adulta. Las células hES pueden obtenerse de embriones fertilizados que tienen menos de una semana de edad. De acuerdo con la divulgación, las células hES no se cultivan previamente en presencia de LIF, como se describe en la solicitud internacional de patente WO2002/097068. Además, de acuerdo con la divulgación, ha de entenderse que las células hES no se han diferenciado previamente en cuerpos embrionarios, como se describe en Metallo CM. et al. (2007) o en Ji L; et al. (2006).

Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre pluripotentes inducidas humanas" o "células iPS humanas" o "iPSC humanas" se refiere a un tipo de célula madre pluripotente humana obtenida artificialmente de una célula no pluripotente humana (por ejemplo, una célula somática adulta). Las células madre pluripotentes inducidas humanas son idénticas a las células madre embrionarias humanas en la capacidad para formar cualquier célula adulta, pero no proceden de un embrión. Normalmente, puede obtenerse una célula madre pluripotente inducida humana mediante la expresión inducida de los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en cualquier célula somática adulta (por ejemplo, fibroblasto). Por ejemplo, pueden obtenerse células madre pluripotentes inducidas humanas de acuerdo con el protocolo descrito por Takahashi K. et al. (2007), por Yu et al. (2007) o mediante cualquier otro protocolo en el que se reemplacen uno o los otros agentes usados para reprogramar células en estos protocolos originales por cualquier gen o proteína que actúe sobre o se transfiera a las células somáticas al inicio de las líneas iPS. Básicamente, se transfectan células somáticas adultas con vectores víricos, tales como retrovirus, que comprenden los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc genes. De acuerdo con una realización de la divulgación, pueden seleccionarse células iPS humanas de cualquier línea celular de iPS humanas. Los ejemplos de líneas celulares iPS humanas incluyen, pero sin limitación, los clones 201BG (Takahashi et al., 2007) e iPS (prepuccio o IMR90)-1-MCB-1 (Yu et al., 2007).

Las células del cúmulo son las mismas que las descritas para el método de cultivar el embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto (véase la cita anterior).

La divulgación se refiere además a un método para mantener el estado no diferenciado en cultivo de una población de células madre pluripotentes, comprendiendo dicho método una etapa de cultivar dicha población de células madre pluripotentes en una superficie de cultivo recubierta con una capa de células del cúmulo.

Dicha capa de células del cúmulo puede obtenerse como se ha descrito para el método de cultivar el embrión hasta un estadio de desarrollo de blastocisto (véase la cita anterior).

5 De acuerdo con la presente divulgación, también son importantes las condiciones de cultivo para mantener el estadio no diferenciado en cultivo de una población de células madre pluripotentes. Durante el cultivo, pueden controlarse variables tales como la densidad celular, la temperatura y los niveles de CO₂ para maximizar el desarrollo de poblaciones de células madre pluripotentes. Por ejemplo, la densidad de células en un cultivo de células madre pluripotentes puede afectar a la diferenciación espontánea de dicha población. Como tal, la densidad celular óptima para el crecimiento de una población de células madre pluripotentes es de aproximadamente 1 célula madre pluripotente a aproximadamente 10.000 células madre pluripotentes por cm², más preferentemente, de aproximadamente 1 célula madre pluripotente a aproximadamente 2.000 células madre pluripotentes por cm² y aún más preferentemente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 células madre pluripotentes por cm². En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan como una suspensión de células individuales. La temperatura óptima para el desarrollo de una población de células madre pluripotentes es de aproximadamente 32 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente, de aproximadamente 35 °C a 39 °C, siendo aún más preferida una temperatura de aproximadamente 37 °C. Los niveles de CO₂ óptimos en el ambiente de cultivo para el desarrollo de poblaciones de células madre pluripotentes es de aproximadamente un 1 % de CO₂ a aproximadamente un 10 % de CO₂, más preferentemente, de aproximadamente un 3 % CO₂ a aproximadamente un 8 % de CO₂ y aún más preferentemente, aproximadamente un 5 % de CO₂.

Los medios adecuados para cultivar células madre pluripotentes incluyen medio Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, Calif). El experto en la materia apreciará que se encuentra disponible una gran variedad de medios para cultivar células madre pluripotentes *in vitro*, por ejemplo, Specialty Media (Millipore Corporation, Billerica, Mass.); Resgro™ (Millipore Corporation, Billerica, Mass.); StemXvivo (R&D Systems, Minneapolis, Minn.). Los medios pueden complementarse con suero, por ejemplo, suero fetal bovino, suero cualificado ES (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), antibióticos, por ejemplo, Pen Strep (Invitrogen, Carlsbad, Calif), aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y glutamina, por ejemplo, Glutamax-1® (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Algunos cultivos de ESC pueden complementarse adicionalmente con factor inhibidor de leucemia, por ejemplo, Esgro® (Millipore Corporation, Billerica, Mass.).

A continuación se ilustrará adicionalmente la invención mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, no ha de interpretarse que estos ejemplos limiten en modo alguno el ámbito de la presente invención.

35 **Ejemplo 1: aislamiento de células del cúmulo humanas:**

Se obtuvieron células del cúmulo de pacientes consecutivos con su consentimiento informado de acuerdo con las guías del Centro de Reproducción Asistida, Hôpital Arnaud de Villeneuve; Montpellier. Tras examinar la apariencia de la masa del cúmulo, se separaron mecánicamente las células del cúmulo humanas (hCC) del ovocito usando dos agujas. Se colocó una aguja en la capa de las hCC para mantener al ovocito en su lugar y la otra aguja se usó para extraer rápidamente la mayor cantidad posible de la capa celular, sin tocar el ovocito. Las células se aspiraron con la menor cantidad posible de medio y se transfirieron estas células al medio preparado.

45 **Ejemplo 2: cultivo y amplificación de las hCC:**

En el experimento inicial, las hCC se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero fetal de ternero (FCS) al 10 % y 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y con placas recubiertas de gelatina (al 0,1 %). Usando este protocolo de cultivo, las hCC se adhirieron a la superficie a las 4 h después de la inoculación. El medio se reemplazó tres veces a la semana hasta que se alcanzó una confluencia del 80 %. Las células se pasaron cada 5-7 días enzimáticamente con tripsina al 0,25 %/EDTA. Se adaptó a la línea de CC para que creciese en estas condiciones (> 12 pases).

El suero (FCS) es una sustancia no definida con múltiples factores que podría tener influencia en la función celular y al estar basado en un producto de origen animal, limita su aplicación clínica. Por este motivo, se optimizaron los protocolos de cultivo para el cultivo a largo plazo de hCC en condiciones libres de animales. Se recubrieron placas de cultivo con medio HP01 que contenía colágeno I-III humano a 10 µg/cm² durante dos horas. Se retiró cuidadosamente la solución de adhesión y se reemplazó por medio de expansión definido SPE-IV (albúmina humana de grado clínico, portador de hierro sintético, insulina humana recombinante, nucleósidos, L-glutamina, monoglicérol, lípidos sintéticos, alfa-MEM). Este medio de cultivo contiene factores de crecimiento (rhIGF-I: 25 ng/ml y rh-b-FGF: 0,33 ng/ml). La concentración de células se fijó a 1.000 células/cm². Se cambió completamente el medio cuatro veces a la semana hasta que se alcanzó una confluencia del 70-80%.

En conclusión, los presentes inventores han desarrollado y analizado una nueva línea de hCC que contiene estabilidad cromosómica. Esta línea de hCC se adaptó para crecimiento en un sustrato de colágeno humano en medio definido libre de sustancias animales (> 10 pases). Este sistema de crecimiento reduce la exposición de las hCC a ingredientes de origen animal, limitando de este modo el riesgo de contaminación por patógenos.

Ejemplo 3: preparación de capa alimentadora de CC

5 Se cultivaron monocapas de hCC (pase 5) hasta la confluencia y se trataron con 10 µg/ml de mitomicina-C durante 2 h o mediante irradiación. Después de los tratamientos, se desprendieron las células con Tryple y se sembraron en placas de cultivo.

Ejemplo 4: las células madre embrionarias humanas (hESC) crecieron en la capa alimentadora de HCC

10 Se estudió la propagación y las características de pluripotencia de una línea de células madre embrionarias (hESC) en cultivo prolongado sobre hCC. Se observó que las hESC cultivadas sobre hCC son indistinguibles según múltiples criterios (morfología, marcadores de pluripotencia) de las hESC cultivadas sobre una capa alimentadora de fibroblastos. Se demostró que las hESC cultivadas sobre hCC mantienen los marcadores de pluripotencia, incluyendo la expresión de proteínas de la superficie celular (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81). La morfología y las características moleculares de estas células son similares, en comparación con las hESC cultivadas sobre células alimentadoras de fibroblastos.

15 En conclusión, las hCC soportan el crecimiento de hESC no diferenciadas. Las líneas de hESC se adaptan fácilmente a estas alimentadoras y mantienen la morfología típica de los cultivos de hESC no diferenciadas. Las hESC también continuaron expresando marcadores de pluripotencia, incluyendo TRA-1-60, SSEA3, SSEA4, Tra-1-81 y CD24.

20 **Ejemplo 4: el análisis de la expresión génica global valida a las hcc para la propagación de "embriones"**

25 Los perfiles de expresión de todo el genoma de las células alimentadoras hFF y de las hCC arrojan un 62 % de similitud de la expresión génica. Los coeficientes de correlación entre las dos muestras fueron elevados, mostrando tan solo un pequeño número de genes una expresión diferencial estadísticamente significativa.

Referencias:

30 A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una población de células del cúmulo humanas para su uso en un método de fertilización *in vitro* (FIV), en donde dicho método comprende la etapa de cultivar un embrión humano hasta un estadio de desarrollo de blastocisto mediante el cocultivo de dicho embrión en presencia de dicha población de células del cúmulo humanas, en donde dichas células del cúmulo humanas se tratan previamente con irradiación gamma o con un agente bloqueante del ciclo celular para detener su proliferación antes de entrar en contacto con el embrión.
- 10 2. La población de células del cúmulo humanas para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho embrión humano se cultiva sobre una superficie de cultivo recubierta con una capa de células del cúmulo humanas.
3. La población de células del cúmulo humanas para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichas células del cúmulo humanas proceden de una línea de células del cúmulo humanas.
- 15 4. La población de células del cúmulo humanas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho embrión humana se generó *in vitro* mediante el simple mezclado del ovocito y el esperma o mediante la inyección intracitoplasmática de esperma dentro de un ovocito.