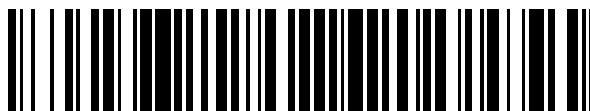


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 482**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011** **PCT/IL2011/000722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012** **WO12032521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011** **E 11770876 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 2614141**

54 Título: **Nuevos métodos y medios de cultivo para cultivar células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

07.09.2010 US 380388 P

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

06.03.2020

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION LIMITED (100.0%)
Senate House, Technion City
3200004 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 746 482 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

Nuevos métodos y medios de cultivo para cultivar células madre pluripotentes

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un método para cultivar células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados y a poblaciones aisladas de células madre pluripotentes generadas por este.

10 El potencial de diferenciación excepcional de las células madre embrionarias humanas (hESC) las destaca como uno de los mejores modelos para estudiar el desarrollo humano temprano, el compromiso de linaje, los procesos de diferenciación y para usar con fines industriales y para terapia basada en células.

15 Las células pluripotentes inducidas (iPS) son células somáticas que se reprograman a células de tipo ESC capaces de diferenciarse en tejidos representativos de las tres capas germinales embrionarias tanto *in vitro* como *in vivo*. Se generaron células iPS de ratón o humanas mediante la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción, c-Myc, Oct4, KLF4 y Sox2 en células somáticas. Se demostró que las células iPS forman la misma morfología de colonias que las ESC y expresan algunos marcadores de ESC normales tales como *Myb*, *Kit*, *Gdf3* y *Zic3*, pero marcadores menos prominentes tales como *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Utf1*, *Tcl1* y el gen del receptor *LIF*, lo que confirma que las células iPS son similares pero no idénticas a las células ES [Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al*, 2007; Meissner *et al*, 2007; Okita *et al*, 2007]. Yu Junying *et al*. (Science 318: 1917-1920, 2007) encontraron un patrón de expresión génica común para las células iPS procedentes de fibroblastos y hESC.

25 Estudios adicionales revelaron que podrían obtenerse células iPS transformando células somáticas con Oct4, Sox2, Nanog y Lin28, omitiendo al mismo tiempo el uso del oncogén C-Myc [Yu J., *et al*, 2007, Science, 318: 1917-1920; Nakagawa *et al*, 2008]. Las mejoras de los métodos de obtención de células iPS incluyen el uso de plásmidos en lugar de vectores víricos u obtención sin ninguna integración al genoma, lo que podría simplificar el uso futuro de las células iPS para aplicaciones clínicas [Yu J, *et al*., Science. 2009, 324: 797-801].

30 Las células iPS disponibles actualmente son las procedentes de fibroblastos embrionarios [Takahashi y Yamanaka, 2006; Meissner *et al*, 2007], fibroblastos formados a partir de hESC [Park *et al*, 2008], fibroblastos fetales [Yu *et al*, 2007; Park *et al*, 2008], fibroblastos del prepucio [Yu *et al*, 2007; Park *et al*, 2008], tejidos dérmicos y cutáneos de adultos [Hanna *et al*, 2007; Lowry *et al*, 2008], linfocitos b [Hanna *et al* 2007] y células de hígado y estómago de adultos [Aoi *et al*, 2008].

35 De manera similar a las hESC, las células iPS se cultivan tradicionalmente con una capa de soporte en cultivo bidimensional, lo que permite su crecimiento continuo en el estado indiferenciado. Por ejemplo, se cultivaron células iPS en capas de alimentación que consistían en fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (MEF) o fibroblastos de prepucio [Takahashi y Yamanaka 2006, Meissner *et al* 2007] en presencia de un medio complementado con suero bovino fetal (FBS). Las mejoras adicionales de los métodos de cultivo incluyen el cultivo de células iPS en capas de alimentación de MEF en presencia de un medio de cultivo más definido que contiene reemplazo de suero y 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Park *et al*., 2008). Sin embargo, para aplicaciones clínicas (por ejemplo, terapia basada en células) o fines industriales, las células iPS deberían cultivarse en un sistema de cultivo definido, sin xeno (por ejemplo, sin animales) y un sistema de cultivo escalable con procesos controlados.

40 La publicación PCT n.º WO2007/026353 desvela un medio de cultivo sin xeno, bien definido, que comprende una isoforma de TGF-beta o la quimera formada entre IL6 y el receptor de IL6 soluble (IL6RIL6 en lo sucesivo en el presente documento) para mantener células madre embrionarias humanas, en un estado indiferenciado en un sistema de cultivo bidimensional.

45 La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20050233446 desvela un medio definido que comprende bFGF, insulina y ácido ascórbico para mantener las hESC cuando se cultivan en Matrigel™ en un estado indiferenciado.

50 Ludwig TE., *et al*., 2006 (Nature Biotechnology, 24: 185-7) desvela el medio definido TeSR1 para el cultivo de hESC en una matriz compuesta de colágeno IV, fibronectina, laminina y vitronectina.

55 La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20090029462 desvela métodos para expandir células madre pluripotentes en suspensión usando microvehículos o encapsulación celular.

60 La publicación PCT n.º WO/2008/015682 desvela un método para expandir y mantener células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia al sustrato.

65 La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20070155013 desvela un método para cultivar células madre pluripotentes en suspensión usando un vehículo que se adhiere a las células madre pluripotentes.

La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20080241919 (Parsons *et al.*) desvela un método para cultivar células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión en un medio que comprende bFGF, insulina y ácido ascórbico en un recipiente de cultivo celular que incluye una matriz sin células.

- 5 La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20080159994 (Mantalaris *et al.*) desvela un método de cultivo de células ES pluripotentes encapsuladas dentro de perlas de alginato en un cultivo tridimensional en un medio que comprende reemplazo de suero y bFGF.

10 La solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20070264713 desvela un método para cultivar células madre indiferenciadas en suspensión en microvehículos en recipientes usando un medio acondicionado.

La publicación PCT n.º WO2006/040763 desvela células embrionarias de primates aisladas que proceden de blastocistos extendidos (por ejemplo, de al menos nueve días después de la fertilización) y métodos generados y que usan los mismos.

15 La publicación PCT n.º WO2003/046141 desvela la obtención de líneas celulares de hES a partir de ovocitos activados partenogenéticamente sin usar un embrión.

20 Buecker *et al* (2010), CELL STEM CELL, vol. 6, n.º 6, págs. 535-546, desvela que un estado de tipo ESC murino facilita la transgénesis y la recombinación homóloga en células madre pluripotentes humanas. Los autores demuestran que la reprogramación de iPSC humana en presencia de LIF produce células madre humanas que presentan propiedades morfológicas, moleculares y funcionales de ESC murinas. Estas se denominaron iPSC hLR5 porque requieren la expresión de cinco factores de reprogramación ectópicos, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc* y *Nanog*, para mantener este estado más intacto. Las células son "metaestables" y tras la retirada del factor ectópico vuelven a iPSC humanos convencionales. También se demuestra que el estado hLR5 facilita la dirección génica.

25 Amit *et al* (2010), STEM CELL REVIEWS, vol. 6, n.º 2, págs. 248-259 se refieren al cultivo en suspensión de células madre pluripotentes inducidas y embrionarias humanas indiferenciadas. Los autores presentan un sistema de cultivo en suspensión para hESC indiferenciadas y células madre pluripotentes inducidas (iPSC), basado en medio complementado con la quimera IL6RIL6 (receptor de interleucina-6 fusionado con interleucina-6) y factor de crecimiento de fibroblastos básico. Cuatro líneas hESC cultivadas en este sistema mantuvieron todas las características de ESC después de 20 pases, incluyendo cariotipo estable y pluripotencia. Se obtuvieron resultados similares cuando hESC se reemplazó con iPSC de dos líneas celulares diferentes.

30 Los antecedentes adicionales de la técnica incluyen la solicitud de patente de los Estados Unidos 20090130759; Stankoff B., *et al.*, J. Neuroscience 22: 9221-9227, 2002; Ernst M., *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 271: 30136-30143, 1996; Roeb E., *et al.*, Hepatology, 1993, 18: 1437-42; solicitud de patente de los Estados Unidos 20040235160; Pera M.F., *et al.* 2000. Journal of Cell Science 113, 5-10. Células madre embrionarias humanas. Comentario.

40 Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una población aislada de células madre pluripotentes humanas que comprenden al menos 50 % de células madre pluripotentes humanas caracterizadas por una identificación de expresión de OCT4⁺/TRA1-60⁺/TRA1-81⁺/SSEA1⁺/SSEA4⁻, en donde las células madre individuales pluripotentes humanas son capaces de diferenciarse en las capas germinales embrionarias endodermo, ectodermo y mesodermo.

45 También se proporciona un método para expandir y mantener células madre pluripotentes (PSC) en un estado indiferenciado, comprendiendo el método: (a) pasar las PSC en un cultivo en suspensión por disociación mecánica de agregados de PSC a células individuales o grupos en condiciones desprovistas de una disociación enzimática, comprendiendo cada uno de dichos grupos no más de 200 PSC, durante al menos 2 y no más de 10 pases, para obtener de este modo un cultivo en suspensión de PSC desprovisto de agregados, y; (b) pasar sin disociación dicho cultivo en suspensión de PSC desprovisto de dichos agregados y que comprende células individuales o grupos pequeños, comprendiendo cada uno de los grupos no más de 200 PSC, expandiendo y manteniendo de este modo las PSC en el estado indiferenciado.

El método puede comprender además cultivar las PSC en condiciones que permitan la expansión de las células madre individuales pluripotentes en el estado indiferenciado.

60 También se proporciona un método para generar células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método: (a) cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, para obtener de este modo células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados; y (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje, generando de este modo células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes.

También se proporciona un método para generar cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método: (a) cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión según el método anterior, para obtener de este modo células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados; y (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre pluripotentes en cuerpos embrioides; generando de este modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes.

También se proporciona una población aislada de células madre pluripotentes (PSC) humanas desprovistas de agregados celulares generada según uno de los métodos anteriores, en donde el cultivo en suspensión desprovisto de agregados comprende células individuales o grupos pequeños, comprendiendo cada uno de los grupos no más de 200 PSC, en donde dicha población aislada de PSC humanas comprende al menos 50 % de PSC humanas caracterizadas por una identificación de expresión OCT4⁺/TRA1-60⁺/TRA1-81⁺/SSEA1⁺/SSEA4⁻ y capaz de diferenciarse en las capas germinales embrionarias endodermo, ectodermo y mesodermo.

El cultivo puede efectuarse en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia al sustrato.

Las condiciones de cultivo pueden estar desprovistas de un inhibidor de quinasa asociada a Rho (ROCK).

Las células madre pluripotentes pueden ser células madre pluripotentes humanas.

Las células madre pluripotentes humanas pueden ser células madre embrionarias.

Las células madre pluripotentes humanas pueden ser células madre pluripotentes inducidas.

Dicho cultivo en suspensión puede comprender un medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y factor neurotrófico ciliar (CNTF).

Dicho cultivo en suspensión puede comprender un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a una concentración de al menos 50 ng/ml y una quimera IL6RIL6.

Dicho cultivo en suspensión puede comprender un medio de cultivo que comprende un reemplazo de suero sin contaminantes animales y una quimera IL6RIL6.

Dicho cultivo en suspensión puede comprender un medio de cultivo sin suero que comprende un receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) e interleucina 6 (IL6), en donde una concentración del sIL6R es al menos 5 ng/ml y en donde una concentración de la IL6 es al menos 3 ng/ml.

Dicho cultivo en suspensión puede comprender un medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y oncostatina.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de realizaciones de la invención, se describen a continuación métodos y/o materiales ilustrativos. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

Las FIG. 1A-C son fotografías de ESC I3, que se cultivaron en un cultivo en suspensión, después del envío de células vivas sobre el Océano Atlántico (de Israel a Baltimore, EE.UU.) que duró cuatro días. Las células I3 se cultivaron en suspensión durante al menos 20 pases antes de enviarse. Figuras 1A y 1B - Morfología de I3, 3 días (Figura 1A) y 1 día (Figura 1B) después de la llegada y nueva siembra en suspensión usando medio de cultivo CM100Fp. Las células demuestran la morfología esférica normal que consiste en células indiferenciadas. Figura 1C - Morfología de I3, 3 días después de la llegada y nueva siembra con MEF. Las células demuestran la morfología de colonia normal de ESC

Las FIG. 2A-D son imágenes fluorescentes de hESC I3.2 teñidas con anticuerpos contra diversos marcadores de pluripotencia (tinción de inmunofluorescencia). Las células cultivadas en el nuevo medio descrito en el presente documento (por ejemplo, el medio CMTesR2 en este caso) se ensayaron para determinar su pluripotencia usando los marcadores normales Oct4 (Figura 2A), SSEA4 (Figura 2B), Tra-160 (Figura 2C) y TRA-1-81 (Figura 2D). En este ejemplo, se cultivaron I3.2 en el pase p19+83 (es decir, la línea celular clonal 13.2 se obtuvo de la línea celular 13 en el pase 19 y las células para análisis estaban en el pase 83 después del aislamiento del clon) con medio CMTesR2 para 5 pases en suspensión y después se volvieron a cultivar en MEF. Se descubrió que las células eran positivas para todos los marcadores ensayados.

Las FIG. 3A-C son fotografías de la línea de ESC I3.2 que representan la morfología de células cultivadas en suspensión usando el nuevo medio de cultivo descrito en el presente documento. Figura 3A - I3.2 en el pase p19+87 (es decir, 87 pases después del aislamiento del clon) se cultivaron en suspensión usando cmTeSR2 durante 26 pases y después se volvieron a sembrar en placas con MEF que demuestran morfología normal de colonias de ESC. Figura 3B - Células J3 [línea celular de blastocisto retardado (extendido)] en el pase 80 (p80), cultivadas durante 2 pases usando medio NCM100 en suspensión que demuestran morfología esférica típica de células indiferenciadas. Figura 3C - Células H9.2 en p29+48 (es decir, la línea celular H9 en el pase 29 se sometió a clonación de una sola célula y se usó la línea de hESC clonal resultante en el pase 48 después del aislamiento) cultivadas durante 5 pases usando medio ILCNTF en suspensión que demuestra morfología esférica normal de células indiferenciadas.

Las FIG. 4A-B son fotografías de la línea H9 hESC (Figura 4A) y la línea celular C2 iPS humana (Figura 4B) que representan las células individuales en el cultivo en suspensión. Figura 4A - H9 en p53 (pase 53) cultivada usando medio CMrb100Fp para 9 pases en suspensión como células individuales en un cultivo estático. Figura 4B - células C2 iPS cultivadas durante 1,5 meses en un matraz giratorio (un cultivo dinámico) como células individuales usando medio CM100Fp. Las células se tiñeron con azul de tripano. Las células muertas se tiñen de azul. Estos resultados demuestran que las células madre pluripotentes cultivadas en un cultivo en suspensión como se describe en el presente documento adoptan el patrón de crecimiento de células individuales.

Las FIG. 5A-C son fotografías microscópicas que representan células madre pluripotentes cultivadas en suspensión en condiciones dinámicas usando un biorreactor Wave controlado (Biostat® Cultibag RM, Sartorius North America, Edgewood, Nueva York, EE.UU.). La línea de células madre pluripotentes inducidas C2 se cultivó en un biorreactor Wave controlado durante cinco días como células individuales (Figura 5A) o como esferas pequeñas de hasta 200 µM (Figura 5B). Figura 5C - Las células cultivadas en suspensión como células individuales se volvieron a cultivar en MEF (tinción de Oct-4). El número de células vivas aumentó en 64 veces mientras se mantenían las características de las células iPS, tales como la expresión de Oct4 (Figura 5C).

Las FIG. 6A-C son fotografías microscópicas que representan células madre pluripotentes después de congelar/descongelar y cortes de células individuales cultivadas en suspensión. La línea celular C2 (iPS de fibroblastos de prepucio, en el pase 89 de derivación, de las que las células se cultivaron durante 48 pases en un cultivo en suspensión en presencia del medio de cultivo cmrb100p) se congeló usando las siguientes soluciones de congelación: reemplazo de suero (SR) al 90 % y DMSO al 10 % (Figura 6A); SR al 20 %, suero bovino fetal (FBS) al 20 % y DMSO al 10 % (Figura 6B); y solución de congelación sin suero de Biological Industries (Beit HaEmek, Israel) (Figura 6C). Después de congelarse durante 5 días en nitrógeno líquido, las células se descongelaron y se volvieron a cultivar en un cultivo en suspensión. Se muestran las células después de congelar/descongelar y volver a cultivar en un cultivo en suspensión. Obsérvese que más del 70 % de las células sobrevivieron al procedimiento y se recuperaron directamente al cultivo en suspensión.

Las FIG. 7A-C son imágenes de tinción de inmunofluorescencia que demuestran la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes en células del linaje nervioso. Se indujo la diferenciación de I6 cultivadas en suspensión durante más de 40 pases mediante la adición de ácido retinoico y se tiñeron para marcadores nerviosos típicos: Nestina (Figura 7A), β-tubulina (Figura 7B) y Molécula de Adhesión de Células Neurales (NCAM) Polisialilada (PSA) (Figura 7C). Los marcadores específicos se tiñen de rojo y la tinción azul representa la tinción DAPI.

Las FIG. 8A-B son análisis de FACS que demuestran la diferenciación de las células madre pluripotentes en el linaje nervioso. Figura 8A - Análisis de FACS usando el anticuerpo de NCM FITC, que muestra que el 68 % de las células son positivas para NCAM; Figura 8B - Análisis de FACS, control de isotipo, usando IgG de NCAM.

Las FIG. 9A-G son un histograma (Figura 9A) e imágenes de gel (Figuras 9B-G) que representan los resultados de un análisis de RT-PCR semicuantificado con marcadores específicos de nervios. Se realizó análisis de RT-PCR en células cultivadas en suspensión e inducidas al linaje de células nerviosas por ácido retinoico y en células cultivadas en suspensión como indiferenciadas. Se describen cebadores de RT-PCR de los genes de OCT-4 (Figura 9B), PAX6 (Figura 9C), Filamento neural de cadena pesada (HNF) (Figura 9D), Nestina (Figura 9E) y caja homeótica LIM 2 (LHX2) (Figura 9F) y GAPDH (gen de control, Figura 9G) en la Tabla 1 en la sección de Ejemplos a continuación. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. Los carriles 1-3 son de tres repeticiones biológicas diferentes y el carril 4 son células indiferenciadas de 16 cultivadas en suspensión durante 40 pases.

Las FIG. 10A-B son imágenes de inmunofluorescencia que representan la inducción de células madre pluripotentes a células del linaje endodérmico. Células de la línea celular C2 inducidas a diferenciarse al linaje endodérmico. 10 días después de la diferenciación, las células de inducción se tiñeron para el marcador PDX1 (factor de transcripción relacionado con células β) (Figura 10A, verde) y para DAPI (tinción del núcleo) (Figura 10B, azul).

Las FIG. 11A-B son dos imágenes representativas que representan la morfología de colonias de hESC después de volver a sembrar en MEF. Las células CL1 (13E1) que se cultivaron durante 17 pases en suspensión como células individuales se volvieron a sembrar en MEF y se fotografiaron usando un contraste de fase. Obsérvese que cuando se vuelven a sembrar en células alimentadoras (MEF), las células forman colonias caracterizadas por la morfología normal de las células pluripotentes con espacios entre las células, bordes claros y alta relación de núcleo con respecto a citoplasma.

Las figuras 12A-J son histogramas que representan análisis de FACS de marcadores pluripotentes. Se cultivaron ESC humanos en MEF bidimensionales (2-D) (Figuras 12A-B), en un cultivo en suspensión como agregados celulares (Figuras 12C-D, 12G-H) o en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares (Figuras 12E-F, 12I-J) y la expresión de los marcadores TRA1-60, TRA1-81, SSEA1 y SSEA4 se ensayaron mediante FACS. Figura 12A - Células H14 cultivadas en 2D, clasificadas por un anticuerpo TRA1-

60 (curva azul). Obsérvese que el 74,9 % de las células son TRA1-60 positivas; Figura 12B - Células H14 cultivadas en 2D, clasificadas por un anticuerpo TRA1-81 (curva azul). Obsérvese que el 71,2 % de las células son TRA1-81 positivas; Figura 12C - 13 células cultivadas en suspensión como agregados celulares durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo TRA1-60 (curva azul). Obsérvese que el 94,6 % de las células son TRA1-60 positivas; Figura 12D - 13 células cultivadas en suspensión como aglomeraciones celulares durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo TRA1-81 (curva azul). Obsérvese que el 93 % de las células son TRA1-81 positivas; Figura 12E - Células H14 en suspensión como células individuales durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo TRA1-60 (curva azul). Obsérvese que solo el 0,65 % de las células son TRA1-60 positivas; Figura 12F - Células H14 en suspensión como células individuales durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo TRA1-81 (curva azul). Obsérvese que solo el 0,7 % de las células son TRA1-81 positivas; Figura 12G - Células I3 cultivadas en suspensión como agregados celulares durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo SSEA1 (curva azul). Obsérvese que el 11,1 % de las células son SSEA1 positivas; Figura 12H - Células I3 cultivadas en suspensión como agregados celulares durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo SSEA4 (curva gris). Obsérvese que el 98,4 % de las células son SSEA4 positivas; Figura 12I - Células H7 en suspensión como células individuales durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo SSEA1 (curva azul). Obsérvese que el 78,5 % de las células son SSEA1 positivas; Figura 12J - Células H7 cultivadas en suspensión como células individuales durante más de 10 pases, clasificadas por un anticuerpo SSEA4 (curva azul). Obsérvese que solo el 5,43 % de las células son SSEA4 positivas. La curva roja en cada una de las Figuras 12A-G y 12I-J representa un control negativo.

Las FIG. 13A-B son histogramas que representan análisis de RT-PCR. Se muestra el factor de cambio promedio (tres repeticiones de cada uno) en la expresión génica por PCR en tiempo real para las células madre pluripotentes H7 y CL1. El factor de cambio promedio se calculó en comparación con el nivel de expresión de los genes indicados en las células madre pluripotentes H7 y CL1 cuando se cultivaron en MEF (designado como "1"). Figura 13A - Se muestran los resultados para genes de pluripotencia Sox2, Rex1, Nanog y Oct4; Figura 13B - Se muestran los resultados para genes de moléculas de adhesión FBLN5, CTNNB1, PLXNA2, EGFR, ITGA7, IGTA6, ITGA2, CLDN18, CLDN6, CDH2, CDH1 y FN1. Barras azules = células individuales (SC) cultivadas en suspensión durante más de 10 pases; Barras rojas = agregados celulares (CI) cultivados en suspensión durante más de 10 pases; Barras verdes = células madre pluripotentes cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en un cultivo bidimensional convencional. Obsérvese la ligera reducción de la expresión de Nanog en las células madre pluripotentes individuales en comparación con las células madre pluripotentes cultivadas en MEF, mientras que la expresión de Oct4 aumentó en células cultivadas como células individuales en comparación con las mismas células cuando se cultivaron en MEF o como agregados celulares en un cultivo en suspensión.

La FIG. 14 es una imagen que representa la eficacia de clonación de hESC que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales. Se formaron clones de células individuales sembrando células individuales de la línea de hESC H7 que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares. Cada célula se sembró en un solo pocillo de una placa de 96 pocillos de baja adhesión y se cultivó en suspensión. Obsérvese que la eficacia de clonación de las hESC cultivadas en un cultivo en suspensión como células individuales es del 95 %.

La FIG. 15 es una imagen que representa la eficacia de descongelación de hESC cultivadas en un cultivo en suspensión como células individuales. Las ESC humanas cultivadas como células individuales en un cultivo en suspensión se congelaron usando soluciones de congelación convencionales y después se descongelaron en un cultivo en suspensión. Las células se recuperaron bien, sobreviviendo al menos el 80 % de las células.

Las FIG. 16A-B son imágenes que representan la manipulación genética de hESC cultivadas en un cultivo en suspensión como células individuales. Las ESC humanas cultivadas en un cultivo en suspensión como células individuales se sometieron a electroporación con una construcción de ácido nucleico que incluía el gen de GFP bajo el promotor de CMV. Figura 16A - Una imagen de contraste de fase de las células después de la manipulación genética. Obsérvese que la mayoría de las células (al menos el 90 %) sobrevivieron al procedimiento de electroporación; Figura 16B - una imagen microscópica fluorescente de las células después de la manipulación genética. Las señales verdes corresponden a células que expresan la construcción recombinante (GFP bajo la regulación transcripcional del promotor de CMV).

Las FIG. 17A-C son imágenes microscópicas que representan la diferenciación de las ESC humanas cultivadas en un cultivo en suspensión como células individuales en progenitores neurales (NP). Se indujo la diferenciación de ESC humanas cultivadas en suspensión como células individuales en el linaje de células neuronales. Figura 17A - Astroцитos, GFAP (rojo); Figura 17B - Oligodendrocitos, O4 (verde); Figura 17C - Neuronas, β -Tubulina (verde) y Nestina (rojo).

Las FIG. 18A-C son histogramas que representan análisis de FACS de MSC que se aislaron por diferenciación de hESC cultivadas en cultivo en suspensión como células individuales. Figura 18A - MSC procedentes de la línea de hESC J3 cultivadas en medio sin componentes de origen animal, clasificadas por un anticuerpo CD73 (curva azul). Obsérvese que el 82,5 % son CD73 positivas; Figura 18B - MSC procedentes de la línea de hESC J3 cultivadas en medio sin componentes de origen animal, clasificadas por un anticuerpo CD31 (curva azul). Obsérvese que solo el 4,83 % son CD31 positivas; Figura 18C - MSC procedentes de la línea de hESC J3 cultivadas en medio que contiene suero, clasificadas por un anticuerpo CD105 (curva azul). Obsérvese que el 99,3 % son CD105 positivas.

Las FIG. 19A-D son imágenes que representan la diferenciación de hESC que se cultivan en suspensión como células individuales en MSC. Las células individuales cultivadas en suspensión como células individuales pueden diferenciarse tanto en suspensión como en 2D a MSC potentes. Figuras 19A-B - Imágenes de contraste de fase

de MSC diferenciadas de ESC humanas que se cultivaron en suspensión como células individuales. Las hESC se volvieron a sembrar en un cultivo en suspensión y se diferenciaron en MSC que tenían la morfología normal de MSC. Figura 19A - Se diferenciaron células CL1 en medio Fy enriquecido; Figura 19B - Se diferenciaron células CL1 en medio MeSUSII; Figura 19C - Tinción con rojo de alizarina de MSC diferenciadas (que se formaron por diferenciación de las hESC cultivadas en suspensión como células individuales) en el linaje óseo. Figura 19D - Tinción con Oil red de MSC diferenciadas (que se formaron por diferenciación de las hESC cultivadas en suspensión como células individuales) en adipocitos.

Las FIG. 20A-B son imágenes que representan la diferenciación de hESC que se cultivan en suspensión como células individuales en la capa germinal del endodermo. Se cultivaron células C2 durante más de 10 pases como células individuales en suspensión. Para la diferenciación del endodermo, el bFGF y la quimera IL6RIL6 se retiraron del medio de cultivo y se añadió activina A en concentración de 10 ng/ml durante 48 horas en un cultivo en suspensión. 10 días después de la exposición a activina A, las células se sembraron en una matriz Matrigel o HFF y se tiñeron para la expresión de PDX1 usando el anticuerpo anti-PDX1 (R&D Biosystems). Figura 20A - Tinción DAPI (tinción nuclear) (azul); Figura 20B - PDX1 (rojo). Obsérvese que todas las células que se tiñen con DAPI (tinción nuclear) también se tiñen con PDX1.

Descripción detallada

Los presentes inventores han descubierto después de laboriosas experimentaciones medios de cultivo definidos, que están exentos de suero y desprovistos de contaminantes animales y que pueden mantener células madre pluripotentes tales como iPS y ESC humanas en un estado indiferenciado en ausencia de soporte de células alimentadoras conservando al mismo tiempo su potencial pluripotente para diferenciarse en las tres capas germinales embrionarias.

Por tanto, como se muestra en la sección de ejemplos a continuación, se cultivaron células hESCs e iPS (por ejemplo, procedentes de fibroblastos de prepucio o adultos) en un estado indiferenciado en sistemas de cultivo bidimensionales o tridimensionales en presencia de medios de cultivo definidos y sin suero (por ejemplo, yFIL25, CMrb100F, CMrb100Fp, ILCNTF), así como en presencia de medios de cultivo bien definidos que comprenden un reemplazo de suero sin contaminantes animales (por ejemplo, NCM100F, NCM100Fp, NCMrb100F, NCMrb100Fp, NILCNTF, CmHA13, CmHA13p) que son adecuados para su uso en aplicaciones clínicas/terapéuticas ya que las células madre pluripotentes humanas cultivadas en los mismos están completamente desprovistas de contaminantes animales. Asimismo, como se muestra en el Ejemplo 4 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes cultivadas en suspensión pueden permanecer viables, proliferativas y pluripotentes mientras se transfieren entre países como células vivas. En cultivo, las células madre pluripotentes presentan una morfología indiferenciada y características moleculares que son típicas de iPS o hESC, incluyendo el cariotipo normal, expresión de marcadores de pluripotencia (por ejemplo, Oct4, SSEA4, TRA-1-81, TRA-1-60) y la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales embrionarias tanto *in vitro* (por formación de cuerpos embrioides después de al menos 10) como *in vivo* (por formación de teratomas después de al menos 20 pases). Además, como se muestra en las Figuras 7-10 y se describe en el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes se usaron para generar células específicas de linajes de los linajes celulares neuronales, endodérmicos y mesodérmicos.

Además, los presentes inventores han descubierto condiciones de cultivo adecuadas para mantener células madre pluripotentes, indiferenciadas en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares y aislaron una nueva población de células madre pluripotentes humanas que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales.

Por tanto, como se describe en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos a continuación, los presentes inventores cultivaron células madre pluripotentes (por ejemplo, células hESC e iPS humanas) en un cultivo en suspensión haciendo pasar mecánicamente las células (por ejemplo, usando una pipeta) sin el uso de tripsina o inhibidor de ROCK. Después de aproximadamente 3-7 pases de separación mecánica de agregados celulares en células individuales, las células madre pluripotentes adoptaron un modo de expansión de células individuales, que no requirió más separación mecánica para el pase de cultivo, permitiendo de este modo la producción en masa de estas células. Cuando el cultivo en suspensión que se cultivó como células individuales se volvió a sembrar en MEF, las células formaron colonias con la morfología normal de células madre pluripotentes (Figuras 11A-B). Como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes humanas que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales presentan un patrón más intacto de expresión génica en comparación con las ESC humanas cultivadas en MEF o en comparación con hESC que se cultivan en un cultivo en suspensión como agregados celulares. Por tanto, la población aislada de células madre pluripotentes que se cultivan en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares presentan una identificación de expresión SSEA4⁺/TRA1-60⁺/TRA1-81⁺/SSEA1⁺ (Figuras 12E, 12F, 12I y 12J; Tabla 3), que es diferente de la identificación de expresión SSEA4⁺/TRA1-60⁺/TRA1-81⁺/SSEA1⁻ de ESC humanas cultivadas en MEF o en un cultivo en suspensión como agregados celulares (Figuras 12A, 12B, 12C, 12D, 12G, 12H; Tabla 3). En cambio, las células madre pluripotentes, que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales, presentan mayores niveles de OCT-4, un marcador de pluripotencia, en comparación con hESC cultivadas en MEF (2-D) o con hESC cultivadas en un cultivo en suspensión como agregados celulares (Ejemplo 8, Figura 13A). Además, se descubrió que las células madre pluripotentes que se cultivaron en suspensión como células individuales presentaban una mayor eficacia de clonación (por ejemplo, aproximadamente 95 % de eficacia para hESC) en comparación con células madre

pluripotentes cultivadas en 2-D (por ejemplo, entre 4-18 %, dependiendo del uso de inhibidor de ROCK) (Ejemplo 9, Tabla 4), aumento de la supervivencia a ciclos de congelación y descongelación (Ejemplo 9, Figura 15) y mayor supervivencia a y eficacia de la manipulación genética (Ejemplo 9, Figuras 16A-B). Se mostró que las células madre pluripotentes que se cultivaron en suspensión como células individuales eran capaces de diferenciarse a las tres capas germinales embrionarias, es decir, la capa germinal del ectodermo, formando células progenitoras neuronales que expresan GFAP (proteína ácida fibrilar glial), un marcador de astrocitos, O4, un marcador de oligodendrocitos y β -tubulina y nestina, marcadores de neuronas (Ejemplo 10, Figuras 17A-C); la capa germinal del mesodermo, formando células madre mesenquimatosas que expresan CD73 y CD105 (Ejemplo 11, Figuras 18A y 18C) y que no expresan CD31 (Ejemplo 11, Figura 18B); y la capa germinal del endodermo, formando células endodérmicas que expresan PDX1 (Ejemplo 12, Figuras 20A-B). Además, los presentes inventores han demostrado, por primera vez, la diferenciación *in vitro* en un cultivo en suspensión de células madre pluripotentes en células madre mesenquimatosas (Ejemplo 11). Estas MSC fueron capaces de diferenciarse en un linaje celular adipogénico (Ejemplo 11, Figura 19D), un linaje celular osteogénico (Ejemplo 11, Figura 19C) y un linaje celular condrogénico (Ejemplo 11 y datos no mostrados). En conjunto, las nuevas células madre pluripotentes identificadas en el presente documento pueden usarse como una fuente ilimitada de células madre indiferenciadas pluripotentes para diversas terapias basadas en células, exploración de fármacos, producción de una vacuna y/o producción de proteínas.

Por tanto, según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método para expandir y mantener células madre pluripotentes (PSC) en un estado indiferenciado, comprendiendo el método: (a) pasar las PSC en un cultivo en suspensión por disociación mecánica de agregados de PSC a células individuales o grupos en condiciones desprovistas de una disociación enzimática, comprendiendo cada uno de dichos grupos no más de 200 PSC, durante al menos 2 y no más de 10 pases, para obtener de este modo un cultivo en suspensión de PSC desprovisto de agregados, y; (b) pasar sin disociación dicho cultivo en suspensión de PSC desprovisto de dichos agregados y que comprende células individuales o grupos pequeños, comprendiendo cada uno de los grupos no más de 200 PSC, expandiendo y manteniendo de este modo las PSC en el estado indiferenciado.

El pase de las PSC en un cultivo en suspensión por disociación mecánica de agregados de PSC en células individuales puede efectuarse durante al menos 2 y no más de 9 pases, durante al menos 2 y no más de 8 pases, durante al menos 2 y no más de 7 pases, durante al menos 2 y no más de 6 pases, durante al menos 2 y no más de 5 pases, durante al menos 2 y no más de 4 pases, durante al menos 3 y no más de 9 pases, durante al menos 3 y no más de 8 pases, durante al menos 3 y no más de 7 pases, durante al menos 3 y no más de 6 pases, durante al menos 3 y no más de 5 pases.

El método puede comprender además cultivar las PSC en condiciones que permitan la expansión de las células madre individuales pluripotentes en el estado indiferenciado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre pluripotentes" se refiere a células que son capaces de diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias (es decir, endodermo, ectodermo y mesodermo). La expresión "células madre pluripotentes" puede leerse en células madre embrionarias (ESC) y/o células madre pluripotentes inducidas (células iPS).

La expresión "células madre embrionarias", como se usa en el presente documento, se refiere a células que se obtienen del tejido embrionario formado después de la gestación (por ejemplo, blastocisto) antes de la implantación (es decir, un blastocisto previo a la implantación); células de blastocisto extendidas (EBC) que se obtienen a partir de un blastocisto de estadio posterior a la implantación/previo a la gastrulación (véase documento WO2006/040763); y/o células germinales embrionarias (EG) que se obtienen del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferentemente antes de las 10 semanas de gestación. Se excluyen de la invención EBC humanas y células EG humanas y su uso.

Las células madre pluripotentes pueden ser células madre embrionarias, tales como de origen humano o de primates (por ejemplo, mono). Se excluyen de la invención células madre embrionarias humanas obtenidas mediante el uso y la destrucción de embriones humanos.

Se pueden obtener células madre embrionarias usando métodos de cultivo celular bien conocidos. Por ejemplo, pueden aislarse células madre embrionarias humanas de blastocistos humanos. Los blastocistos humanos se obtienen normalmente de embriones previos a la implantación *in vivo* humanos o de embriones fecundados *in vitro* (FIV). Como alternativa, un embrión humano de una sola célula puede expandirse a la etapa de blastocisto. Para el aislamiento de células ES humanas, la zona pelúcida se retira del blastocisto y la masa celular interna (ICM) se aísla mediante inmunocirugía, en la que las células del trofoectodermo se lisan y se retiran de la ICM intacta mediante pipeteo suave. La ICM se siembra después en un matraz de cultivo tisular que contiene el medio apropiado que permite su crecimiento. Después de 9 a 15 días, el crecimiento procedente de ICM se disocia en agregados por disociación mecánica o por degradación enzimática y las células se vuelven a sembrar en un medio de cultivo tisular nuevo. Las colonias que demuestran morfología indiferenciada se seleccionan individualmente por micropipeta, se disocian mecánicamente en agregados y se vuelven a sembrar. Las células ES resultantes se dividen después rutinariamente cada 4-7 días. Para más detalles sobre los métodos de preparación de células ES humanas, véase Thomson *et al.*, [Patente de los Estados Unidos n.º 5.843.780; Science 282: 1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38: 133, 1998; Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844, 1995]; Bongso *et al.*, [Hum Reprod 4: 706, 1989]; y Gardner *et al.*, [Fertil. Steril. 69: 84, 1998].

Se apreciará que también se pueden usar células madre disponibles en el mercado. Se pueden obtener células ES humanas del registro de células madre embrionarias humanas NIH (<http://escr.nih.gov>). Son ejemplos no limitantes de líneas de células madre embrionarias disponibles en el mercado, que no están incluidos en la invención, BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03, TE04 y TE06.

Las células de blastocisto extendido no humano (EBC) se pueden obtener de un blastocisto de al menos nueve días después de la fertilización en una etapa previa a la gastrulación. Antes de cultivar el blastocisto, se digiere la zona pelúcida [por ejemplo, mediante la solución ácida de Tyrode (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.)] para exponer la masa celular interna. Los blastocistos se cultivan después como embriones completos durante al menos nueve y no más de catorce días después de la fertilización (es decir, antes del acontecimiento de gastrulación) *in vitro* usando métodos convencionales de cultivo de células madre embrionarias.

Se preparan células germinales embrionarias (EG) no humanas a partir de las células germinales primordiales obtenidas de fetos del equivalente a aproximadamente 8-11 semanas de gestación de un feto humano usando técnicas de laboratorio conocidas por cualquier experto en la materia. Las crestas genitales se disocian y se cortan en pequeños trozos que posteriormente se disgregan en células mediante disociación mecánica. Las células EG se cultivan después en matraces de cultivo tisular con el medio apropiado. Las células se cultivan con reemplazo diario de medio hasta que se observa una morfología celular coherente con las células EG, normalmente después de 7-30 días o 1-4 pases. Para detalles adicionales sobre los métodos de preparación de células EG humanas, véase Shambloott *et al.*, [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726, 1998] y patente de los Estados Unidos n.º 6.090.622.

La expresión "célula madre pluripotente inducida (iPS)" (o célula madre de tipo embrionario) como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre proliferativa y pluripotente que se obtiene por desdiferenciación de una célula somática (por ejemplo, una célula somática adulta).

La célula iPS puede caracterizarse por una capacidad proliferativa que es similar a la de las ESC y, por tanto, puede mantenerse y expandirse en cultivo durante un tiempo casi ilimitado.

Las células iPS pueden ser dotadas de pluripotencia mediante manipulación genética que reprograma la célula para adquirir las características de las células madre embrionarias. Por ejemplo, pueden generarse células iPS a partir de células somáticas mediante la inducción de la expresión de Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc en una célula somática esencialmente como se describe en Takahashi y Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007, Meissner *et al.*, 2007 y Okita K., *et al.*, 2007, Nature 448: 313-318). Además, o como alternativa, pueden generarse células iPS a partir de células somáticas mediante la inducción de la expresión de Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 esencialmente como se describe en Yu *et al.*, 2007 y Nakagawa *et al.*, 2008. Cabe señalar que la manipulación genética (reprogramación) de las células somáticas se puede realizar usando cualquier método conocido, tal como el uso de plásmidos o vectores víricos, o por derivación sin ninguna integración al genoma [Yu J., *et al.*, Science. 2009, 324: 797-801].

Las células iPS pueden obtenerse induciendo la desdiferenciación de fibroblastos embrionarios [Takahashi y Yamanaka, 2006; Meissner *et al.*, 2007], fibroblastos formados a partir de hESC [Park *et al.*, 2008], fibroblastos fetales [Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008], fibroblastos del prepucio [Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008], tejidos dérmicos y cutáneos de adultos [Hanna *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008], linfocitos b [Hanna *et al.*, 2007] y células de hígado y estómago de adultos [Aoi *et al.*, 2008].

Las líneas celulares iPS también están disponibles a través de bancos celulares tales como el banco WiCell. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares iPS disponibles en el mercado incluyen el clon 1 de prepucio iPS [n.º de Catálogo WiCell iPS (prepucio)-1-DL-1], el clon 1 iPSIMR90 [n.º de catálogo WiCell iPS (IMR90)-1-DL-1] y el clon 4 iPSIMR90 [n.º de catálogo WiCell iPS (IMR90)-4-DL-1].

Las células madre pluripotentes inducidas pueden ser células madre pluripotentes inducidas.

Como se usa en el presente documento, el término "expandir" se refiere a aumentar el número de células madre pluripotentes durante el periodo de cultivo (en al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 %, 1000 % y más). Se apreciará que el número de células madre pluripotentes, que se puede obtener de una sola célula madre pluripotente, depende de la capacidad de proliferación de las células madre pluripotentes. La capacidad de proliferación de una célula madre pluripotente se puede calcular por el tiempo de duplicación de la célula (es decir, el tiempo necesario para que una célula experimente una división mitótica en el cultivo) y el periodo en que el cultivo de células madre pluripotentes se puede mantener en el estado indiferenciado (que es equivalente al número de pases multiplicado por los días entre cada pase).

El método descrito en el presente documento permite la expansión de una sola célula madre pluripotente (por ejemplo, hESC o célula iPS humana) en al menos 8 veces en 5 días, por ejemplo, al menos 16 veces en 5 días, por ejemplo, al menos 32 veces en 5 días, por ejemplo, al menos 64 veces en 5 días.

El método descrito en el presente documento permite la expansión de una sola célula madre pluripotente (por ejemplo, hESC o célula iPS humana) o un pequeño grupo de 2-100 células en al menos 2^8 , por ejemplo, 2^{10} , por ejemplo, 2^{14} , por ejemplo, 2^{16} , por ejemplo, 2^{18} , por ejemplo, 2^{20} veces en aproximadamente un mes.

Como se usa en el presente documento, el término "agregado" se refiere a un grupo de células que se adhieren entre sí en suspensión.

El agregado celular puede permanecer intacto cuando se cambia el medio del cultivo en suspensión (por ejemplo, aumenta, se reduce o se reemplaza) sin emplear ninguna disociación mecánica o enzimática de los agregados.

Los agregados de células madre pluripotentes pueden comprender al menos aproximadamente 200 células (por ejemplo, aproximadamente 200), por ejemplo, al menos aproximadamente 500 células (por ejemplo, aproximadamente 500), al menos aproximadamente 600 células (por ejemplo, aproximadamente 600), al menos aproximadamente 700 células (por ejemplo, aproximadamente 700), al menos aproximadamente 800 células (por ejemplo, aproximadamente 800), al menos aproximadamente 900 células (por ejemplo, aproximadamente 900), al menos aproximadamente 1000 células (por ejemplo, aproximadamente 1000), al menos aproximadamente 1100 células (por ejemplo, aproximadamente 1100), al menos aproximadamente 1200 células (por ejemplo, aproximadamente 1200), al menos aproximadamente 1300 células (por ejemplo, aproximadamente 1300), al menos aproximadamente 1400 células (por ejemplo, aproximadamente 1400), al menos aproximadamente 1500 células (por ejemplo, aproximadamente 1500), al menos aproximadamente 5×10^3 células (por ejemplo, aproximadamente 5×10^3), al menos aproximadamente 1×10^4 células (por ejemplo, aproximadamente 1×10^4), al menos aproximadamente 5×10^4 células (por ejemplo, aproximadamente 5×10^4), al menos aproximadamente 1×10^5 células (por ejemplo, aproximadamente 1×10^5) o más. Como se usa en el presente documento, el término "pase" como se usa en el presente documento se refiere a la división de las células en el recipiente de cultivo en 2 o más recipientes de cultivo, incluyendo normalmente la adición de medio nuevo. El pase generalmente se realiza cuando las células alcanzan una densidad determinada en cultivo.

El pase de un cultivo celular sembrado a una concentración de aproximadamente 1×10^6 células por mililitro en un sistema de cultivo tridimensional estático se puede realizar cuando la concentración de las células aumenta a aproximadamente 2 o 3 veces (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2×10^6 - 3×10^6 células/ml), pero no más de hasta aproximadamente 4 veces (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 4×10^6 células/ml).

El pase de un cultivo celular sembrado a una concentración de aproximadamente 1×10^6 células por mililitro en un sistema de cultivo tridimensional dinámico se puede realizar cuando la concentración de las células aumenta aproximadamente 20-40 veces (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 20×10^6 - 40×10^6 células/ml), pero no más de hasta aproximadamente 50 veces (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 50×10^6 células/ml).

Como se usa en el presente documento, la expresión "disociación mecánica" se refiere a la separación de los agregados de células madre pluripotentes en células individuales empleando una fuerza física en lugar de una actividad enzimática.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células individuales" se refiere al estado en el que las células madre pluripotentes no forman grupos de células, comprendiendo cada grupo más de aproximadamente 200 células madre pluripotentes, en el cultivo en suspensión.

Las células madre pluripotentes pueden no formar grupos de células, comprendiendo cada grupo más de aproximadamente 150, aproximadamente 100, aproximadamente 90, aproximadamente 80, aproximadamente 70, aproximadamente 60, aproximadamente 50, aproximadamente 40, aproximadamente 30, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 3, aproximadamente 2 o aproximadamente 1 célula madre pluripotente, en el cultivo en suspensión.

Cada una de la pluralidad de las células madre pluripotentes puede no adherirse a otra célula madre pluripotente mientras esté en el cultivo en suspensión.

Para disociación mecánica, un sedimento de células madre pluripotentes (que se puede obtener mediante centrifugación de las células) o un agregado aislado de células madre pluripotentes se puede disociar pipeteando las células arriba y abajo en una cantidad pequeña de medio (por ejemplo, 0,2-1 ml). Por ejemplo, el pipeteo se puede realizar varias veces (por ejemplo, entre 3 y 20 veces) usando una punta de pipeta de 200 μ l o 1000 μ l.

Además, o como alternativa, se puede realizar disociación mecánica de grandes agregados de células madre pluripotentes usando un dispositivo diseñado para romper los agregados a un tamaño predeterminado. Dicho dispositivo se puede obtener de CellArtis Goteborg, Suecia. Además, o como alternativa, se puede realizar disociación mecánica manualmente usando una aguja tal como una aguja de 27 g (BD Microlance, Drogheda, Irlanda) mientras

se observan los agregados bajo un microscopio invertido.

Según la invención, el pase se efectúa en condiciones desprovistas de disociación enzimática.

- 5 También puede efectuarse cultivo en suspensión en condiciones desprovistas de disociación enzimática de grupos/agregados celulares.

Las condiciones de cultivo pueden estar desprovistas de un agente antiapoptótico.

- 10 Las condiciones de cultivo pueden estar desprovistas de un inhibidor de quinasa asociada a Rho (ROCK).

Según la invención, se efectúa cultivo de 2 a 10 pases en un estado pluripotente indiferenciado.

- 15 Los presentes inventores han descubierto que cuando las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se pasan mecánicamente sin disociación enzimática de grupos de células durante al menos 2 y no más de 10 pases, las células madre pluripotentes adoptan el modo de crecimiento celular de células individuales (es decir, se expanden como células individuales y no como agregados celulares). Por tanto, como se describe en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos a continuación, las células cultivadas en suspensión mientras se pasaban solo por disociación mecánica de grupos de células durante los primeros 2-10 pases adoptaron el modo de expansión de células individuales y crecieron sin la necesidad de disociación adicional de grupos de células durante al menos aproximadamente 15, 20 o 25 pases adicionales.

- 25 Cabe señalar que aunque las células se cultivan como células individuales, aún es necesario que se diluyan cuando la concentración de células supera aproximadamente 1×10^6 células por mililitro (por ejemplo, 5×10^6 células por cada 5 ml de placa de Petri).

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

- 30 Cabe señalar que algunos protocolos de cultivo de células madre pluripotentes tales como hESC y células iPS incluyen la microencapsulación de las células dentro de una membrana de hidrogel semipermeable, que permite el intercambio de nutrientes, gases y productos metabólicos con el medio a granel que rodea la cápsula (para más detalles véase, por ejemplo, solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20090029462 a Beardsley *et al.*).

- 35 Las células madre pluripotentes pueden cultivarse en el cultivo en suspensión están desprovistas de encapsulación celular.

- 40 Las condiciones para cultivar las células madre pluripotentes en suspensión pueden estar desprovistas de adherencia al sustrato, por ejemplo, sin adherencia a un sustrato externo tal como componentes de matriz extracelular, un microportador o perlas de vidrio.

El medio de cultivo y/o las condiciones para cultivar las células madre pluripotentes en suspensión están desprovistos de un vehículo proteico.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo proteico" se refiere a una proteína que actúa en la transferencia de proteínas o nutrientes (por ejemplo, minerales tales como cinc) a las células en el cultivo. Dichos vehículos proteicos pueden ser, por ejemplo, albúmina (por ejemplo, albúmina sérica bovina), Albumax (albúmina enriquecida con lípidos) o plasmanato (proteínas aisladas de plasma humano). Dado que estos portadores se obtienen de fuentes humanas o animales, su uso en hESC de cultivos de células iPS humanas está limitado por variaciones específicas de lote y/o exposición a patógenos. Por tanto, un medio de cultivo que está desprovisto de un vehículo proteico (por ejemplo, albúmina) es muy ventajoso ya que permite un medio verdaderamente definido que puede fabricarse a partir de materiales recombinantes o sintéticos.

- 55 El cultivo en un cultivo en suspensión puede efectuarse sembrando las células madre pluripotentes en un recipiente de cultivo a una densidad celular que promueve la supervivencia y proliferación celular, pero limita la diferenciación. Normalmente, se usa una densidad de placa (o una densidad de siembra) de entre aproximadamente 1×10^3 por ml y aproximadamente 2×10^6 células por ml. Cuando se usa un biorreactor, la concentración de células sembradas en el biorreactor puede ser de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 10^6 células por ml. Se apreciará que, aunque habitualmente se siembran suspensiones de células individuales de células madre, también se pueden usar grupos pequeños tales como 10-200 células.

- 65 Con el fin de proporcionar a las células madre pluripotentes un suministro suficiente y constante de nutrientes y factores de crecimiento durante el cultivo en suspensión, el medio de cultivo puede reemplazarse diariamente o en un programa predeterminado, tal como cada 2-3 días. Por ejemplo, se puede realizar reemplazo del medio de cultivo sometiendo el cultivo en suspensión de células madre pluripotentes a centrifugación durante aproximadamente 3 minutos a 80 g y resuspensión del sedimento de células madre pluripotentes formado en un medio nuevo. Además, o como alternativa,

se puede emplear un sistema de cultivo en el que el medio de cultivo esté sujeto a filtración o diálisis constante para proporcionar un suministro constante de nutrientes o factores de crecimiento a las células madre pluripotentes.

El recipiente de cultivo usado para cultivar las células madre pluripotentes en suspensión puede ser cualquier recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, con un grado de pureza adecuado para el cultivo de células madre pluripotentes) que tenga una superficie interna diseñada de tal manera que las células madre pluripotentes cultivadas en el mismo no puedan adherirse o unirse a dicha superficie (por ejemplo, células tratadas sin cultivo tisular, para evitar la unión o adherencia a la superficie). Preferentemente, para obtener un cultivo escalable, el cultivo se efectúa usando un sistema de cultivo controlado (preferentemente un sistema de cultivo controlado por ordenador) en el que los parámetros de cultivo tales como la temperatura, agitación, pH y pO₂ se realiza automáticamente usando un dispositivo adecuado. Una vez que se han registrado los parámetros de cultivo, el sistema se configura para el ajuste automático de los parámetros de cultivo según sea necesario para la expansión de células madre pluripotentes.

Se efectúa cultivo en condiciones que comprenden un cultivo en suspensión estático (es decir, no dinámico).

Para el cultivo no dinámico de células madre pluripotentes, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en placas de Petri de 58 mm sin recubrimiento (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Por ejemplo, para iniciar un cultivo en suspensión en placas de Petri de 58 mm, las células madre pluripotentes se siembran a una densidad celular de 1×10^6 - 5×10^6 células/placa.

Mientras que en el cultivo en suspensión no dinámico, las células madre pluripotentes pueden pasarse cada 5-7 días disociando los agregados celulares como se ha descrito anteriormente y dividiendo el cultivo en vasos de cultivo adicionales en una relación de aproximadamente 1:2-1:4.

El cultivo puede realizarse en condiciones que comprenden un cultivo en suspensión dinámica (por ejemplo, usando un reactor Wave o un reactor agitado).

Para el cultivo dinámico de células madre pluripotentes, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en matraces giratorios [por ejemplo, de 200 ml a 1000 ml, por ejemplo 250 ml que se pueden obtener de CellSpin de Integra Biosciences, Fernwald, Alemania; de 100 ml que se pueden obtener de Bellco, Vineland, NJ; o en un Erlenmeyer de 125 ml (Corning Incorporated, Corning NY, EE.UU.)] que se pueden conectar a una unidad de control y, por tanto, presentar un sistema de cultivo controlado. El recipiente de cultivo (por ejemplo, un matraz giratorio, un Erlenmeyer) se agita continuamente. Los recipientes de cultivo pueden agitarse a 40-110 revoluciones por minuto (rpm) usando una placa magnética y colocarse en la incubadora. Además, o como alternativa, el recipiente de cultivo se puede agitar usando un agitador (S3.02.10L, ELMI Ltd, Riga, Letonia). El medio de cultivo puede cambiarse cada 1-3 días, por ejemplo, cada día. Otros biorreactores controlados adecuados que agitan el medio mediante un impulsor y pueden usarse para el cultivo dinámico de las células madre pluripotentes en el medio de cultivo incluyen el cultivo celular Biostat®Aplus (Sartorius North America, Edgewood, Nueva York, EE.UU.), biorreactor controlado por optimizador celular (Wheaton Science Products, Millville, NJ, EE.UU.) equipado con impulsor elevador celular (Infors HT, Rittergasse, Suiza), reactor agitado Multifors Infors HT (Infors GA, CH-4103 Bottmingen Suiza).

Además, o como alternativa, se puede lograr cultivo dinámico de células madre pluripotentes usando un biorreactor controlado en el que la dinámica de las células se logra mediante un movimiento ondulatorio, tal como el Biostat® Cultibag RM (Sartorius North America, Edgewood, Nueva York, EE.UU.) (Bolsa de 2 litros con 1 litro). Los parámetros del reactor pueden incluir una velocidad de inclinación: 10-16 revoluciones por minuto (rpm); ángulo de 7°; Temperatura: 37 °C, pH: 7-7,4, concentración de O₂: 50 %. Otro biorreactor adecuado es el Biorreactor 20/50 EH5 Wave sistema WavePod (GE Healthcare, EE.UU.), que al usar los mismos parámetros permite un aumento de 70 veces durante 12 días. El biorreactor adecuado adicional es el biorreactor RWV/STLV de 55 ml que permite fuerzas de corte mínimas dentro del reactor (Synthecon Incorporated, Houston, TX, EE.UU.).

Por ejemplo, para iniciar un cultivo en suspensión en condiciones dinámicas, las células madre pluripotentes se siembran a una concentración de aproximadamente 10^4 - 10^6 células/ml.

Mientras que en el cultivo en suspensión dinámico, las células madre pluripotentes pueden pasarse cada 5-7 días disociando los agregados celulares como se ha descrito anteriormente. Ya que los biorreactores tienen una gran capacidad, no es necesario dividir el cultivo celular adicionalmente en recipientes de cultivo adicionales y solo se puede realizar adición y/o reemplazo del medio con un medio nuevo cada 3-10 días.

Las enseñanzas del presente documento se pueden usar para obtener una línea de células madre pluripotentes.

El término "obtener", como se usa en el presente documento, se refiere a generar una línea de células madre embrionarias o una línea de células madre pluripotentes inducidas a partir de al menos una célula madre embrionaria o pluripotente inducida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "línea de células madre embrionarias" se refiere a células madre embrionarias que se obtienen de una célula individual o un grupo de células madre embrionarias de un solo organismo

(por ejemplo, un solo blastocisto humano) y que se caracterizan por la capacidad de proliferar en cultivo manteniendo al mismo tiempo el estado indiferenciado y la capacidad pluripotente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "línea de células madre pluripotentes inducidas" se refiere a células madre pluripotentes inducidas que se obtienen de una célula individual o un grupo de células madre pluripotentes inducidas de un solo organismo) y que se caracterizan por la capacidad de proliferar en cultivo manteniendo al mismo tiempo el estado indiferenciado y la capacidad pluripotente.

Se desvela en el presente documento un método para obtener una línea de células madre embrionarias, comprendiendo el método: (a) obtener células madre embrionarias (ESC) de un blastocisto en etapa previa a la implantación, blastocisto en etapa posterior a la implantación y/o un tejido genital de un feto; y (b) pasar las ESC en un cultivo en suspensión por disociación mecánica de agregados de ESC en células individuales durante al menos 2 y no más de 10 pases, para obtener de este modo un cultivo en suspensión de ESC desprovisto de agregados, y; (c) pasar el cultivo en suspensión de ESC desprovisto de los agregados sin disociación de los agregados, obteniendo de este modo la línea de células madre embrionarias.

Se puede realizar obtención de una célula madre embrionaria de un blastocisto en etapa previa a la implantación, blastocisto en etapa posterior a la implantación y/o un tejido genital de un feto usando métodos conocidos en la técnica y como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Dicho método de obtener la línea de células madre embrionarias puede comprender además cultivar los ESC en condiciones que permitan la expansión de las células madre individuales embrionarias en el estado indiferenciado.

También se desvela un método para obtener una línea de células madre pluripotentes inducidas (células iPS), comprendiendo el método: inducir una célula somática a una célula madre pluripotente; y expandir y mantener las células madre pluripotentes inducidas en un estado indiferenciado (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente y en la sección de Ejemplos a continuación), obteniendo de este modo la línea de células madre pluripotentes inducidas (células iPS).

Como se ha mencionado anteriormente y se describe en la Tabla 4 y el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos a continuación, la eficacia de clonación de las células madre pluripotentes que se cultivan en suspensión como células individuales es significativamente mayor que la de las mismas células cuando se cultivan en un sistema de cultivo bidimensional (por ejemplo, en MEF), sin el uso de un agente antiapoptótico tal como el inhibidor de ROCK.

También se desvela un método para clonar células madre pluripotentes. El método se efectúa cultivando una única célula madre pluripotente (es decir, una célula) obtenida según el método del presente documento o una única célula madre embrionaria (es decir, una célula) obtenida según el método del presente documento, en un cultivo en suspensión en condiciones que permiten la expansión de la célula madre pluripotente individual o de la célula madre embrionaria individual en el estado indiferenciado, expandiendo de este modo la célula madre pluripotente individual o la célula madre embrionaria en un cultivo clonal, clonando de este modo las células madre pluripotentes.

Como se describe en el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se cultivan como células individuales en un cultivo en suspensión tienen una mayor tolerancia a un ciclo de congelación-descongelación (por ejemplo, aproximadamente 80 % de supervivencia) en comparación con cuando las mismas células se cultivan en 2-D (por ejemplo, en MEF, hasta 50 %) en condiciones de ensayo idénticas.

Las células madre pluripotentes, que se cultivan como células individuales en un cultivo en suspensión, pueden estar sujetas, por lo tanto, a al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez ciclos (por ejemplo, hasta 10 ciclos) de congelación/descongelación sin obstaculizar la capacidad proliferativa de las células en el estado indiferenciado conservando al mismo tiempo su capacidad pluripotente.

Como se describe en el Ejemplo 8 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se cultivan según el método del presente documento como células individuales en un cultivo en suspensión presentan un patrón de expresión único, que es ligeramente diferente al de hESC, pero que es similar al patrón de expresión de las ESC de ratón (TRA1-60/TRA1-81/SSEA1*/SSEA4*; véase Pera M.F., *et al.* 2000. *Journal of Cell Science* 113, 5-10. Células madre embrionarias humanas. Comentario). Por tanto, como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 13A, las células madre pluripotentes que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales (desprovistas de agregados celulares) expresan OCT4, un marcador de pluripotencia, a un nivel significativamente mayor (por ejemplo, niveles de ARN aproximadamente 8 veces mayores) en comparación con el nivel de ARN de OCT4 en células madre pluripotentes cultivadas en MEF o en comparación con el nivel de ARN de OCT4 en células madre pluripotentes que se cultivan en un cultivo en suspensión como agregados celulares (por ejemplo, con agregados que tienen más de aproximadamente 200-1x10⁵ células por agregado).

Las células cultivadas como en el presente documento pueden aislarse adicionalmente.

Por tanto, según la invención, se proporciona una población aislada de células madre pluripotentes humanas que comprenden al menos 50 % de células madre pluripotentes humanas caracterizadas por una identificación de expresión OCT4⁺/TRA1-60⁺/TRA1-81⁺/SSEA1⁺/SSEA4⁻, en donde dichas células madre pluripotentes humanas son capaces de diferenciarse en las capas germinales embrionarias endodermo, ectodermo y mesodermo.

Como se muestra en las Figuras 12A-J y se describe en el Ejemplo 8 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se cultivaron en suspensión como células individuales no expresan TRA1-60, TRA1-81 o SSEA-4, pero expresan SSEA1.

Por tanto, se proporciona una población aislada de células madre individuales pluripotentes humanas que comprenden al menos 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 % (por ejemplo, 70 %), al menos aproximadamente 75 % (por ejemplo, 75 %), al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, 80 %), al menos aproximadamente 81 % (por ejemplo, 81 %), al menos aproximadamente 82 % (por ejemplo, 82 %), al menos aproximadamente 83 % (por ejemplo, 83 %), al menos aproximadamente 84 % (por ejemplo, 84 %), al menos aproximadamente 85 % (por ejemplo, 85 %), al menos aproximadamente 86 % (por ejemplo, 86 %), al menos aproximadamente 87 % (por ejemplo, 87 %), al menos aproximadamente 88 % (por ejemplo, 88 %), al menos aproximadamente 89 % (por ejemplo, 89 %), al menos aproximadamente 90 % (por ejemplo, 90 %), al menos aproximadamente 91 % (por ejemplo, 91 %), al menos aproximadamente 92 % (por ejemplo, 92 %), al menos aproximadamente 93 % (por ejemplo, 93 %), al menos aproximadamente 94 % (por ejemplo, 94 %), al menos aproximadamente 95 % (por ejemplo, 95 %), al menos aproximadamente 96 % (por ejemplo, 96 %), al menos aproximadamente 97 % (por ejemplo, 97 %), al menos aproximadamente 98 % (por ejemplo, 98 %), al menos aproximadamente 99 % (por ejemplo, 99 %), por ejemplo, 100 % de células madre pluripotentes humanas caracterizadas por una identificación de expresión OCT4⁺/TRA1-60⁺/TRA1-81⁺/SSEA1⁺/SSEA4⁻, en donde las células madre individuales pluripotentes humanas son capaces de diferenciarse en las capas germinales embrionarias endodermo, ectodermo y mesodermo.

La población celular aislada puede comprender células que expresan Rex1, Sox2, EGFR, TGA7, TGA6, ITGA2, CTNNB1, CDH1 a un nivel comparable (dentro del mismo orden de magnitud) que las hESC cultivadas en MEF; y células que expresan niveles significativamente mayores de FBLN5 y PLXNA2 en comparación con hESC cultivadas en MEF en condiciones de ensayo idénticas.

Como se describe en los Ejemplos 1 y 2 de la sección de Ejemplos a continuación, los presentes inventores han descubierto nuevos medios de cultivo que pueden usarse para mantener y expandir células madre pluripotentes en un estado proliferativo e indiferenciado.

Por lo tanto, se desvela un medio de cultivo definido adecuado para mantener y expandir células madre pluripotentes en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado en ausencia de soporte de células alimentadoras, en sistemas de cultivo bidimensionales o tridimensionales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo" se refiere a una sustancia líquida usada para mantener el crecimiento de células madre pluripotentes y mantenerlas en un estado indiferenciado. El medio de cultivo usado puede ser un medio a base de agua que incluye una combinación de sustancias tales como sales, nutrientes, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas tales como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, todos los cuales son necesarios para la proliferación celular y son capaces de mantener las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado. Por ejemplo, un medio de cultivo puede ser un medio de cultivo tisular sintético tal como los Ko-DMEM (Gibco-Invitrogen Corporation products, Grand Island, NY, EE.UU.), DMEM/F12 (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), medio Mab ADCB (HyClone, Utah, EE.UU.), Nutristem™ (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel; también conocido como medio de cultivo Stemedia™ NutriStem™ XF/FF, STEMGENT, EE.UU.), TeSR™ (StemCell Technologies) y TeSR2™ (StemCell Technologies) complementadas con los aditivos necesarios como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento.

El medio de cultivo desvelado puede comprender DMEM/F12 en un intervalo de concentración de 80-90 %, por ejemplo, aproximadamente 85 %.

El medio de cultivo puede estar sin suero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sin suero" se refiere a estar desprovisto de un suero humano o animal.

Cabe señalar que la función del suero en los protocolos de cultivo es proporcionar a las células cultivadas un entorno similar al presente *in vivo* (es decir, dentro del organismo del que proceden las células, por ejemplo, un blastocisto de un embrión). Sin embargo, el uso de suero, que se obtiene de una fuente animal (por ejemplo, suero bovino) o de una fuente humana (suero humano), está limitado por las variaciones significativas en los componentes del suero entre los individuos donantes (de los que se obtiene el suero) y el riesgo de tener xenocontaminantes (en caso de que se use suero animal).

El medio de cultivo sin suero desvelado puede estar desprovisto de albúmina sérica (por ejemplo, albúmina que se purifica a partir de suero humano o suero animal).

El medio de cultivo desvelado puede comprender reemplazo de suero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "reemplazo de suero" se refiere a una formulación definida, que sustituye la función del suero al proporcionar a células madre pluripotentes los componentes necesarios para el crecimiento y la viabilidad.

Se conocen en la técnica diversas formulaciones de reemplazo de suero y están disponibles en el mercado.

Por ejemplo, el reemplazo de suero GIBCO™ Knockout™ (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE.UU., n.º de catálogo 10828028) es una formulación definida sin suero optimizada para cultivar y mantener células ES indiferenciadas en cultivo. Cabe señalar que la formulación del reemplazo de suero GIBCO™ Knockout™ incluye Albumax (albúmina sérica bovina enriquecida con lípidos) que proviene de una fuente animal (Publicación de Patente Internacional n.º WO 98/30679 de Price, P.J. *et al.*). Sin embargo, una publicación reciente de Crook *et al.*, 2007 (Crook JM., *et al.*, 2007, Cell Stem Cell, 1: 490-494) describe seis líneas de hESC de uso clínico generadas usando fibroblastos de prepucio de uso clínico aprobados por la FDA en Reemplazo de Suero Knockout™ fabricado por cGMP (Invitrogen Corporation, EE.UU., n.º de catálogo 04-0095).

Otro reemplazo de suero disponible en el mercado es el complemento B27 sin vitamina A que está disponible de Gibco-Invitrogen, Corporation, Grand Island, NY, EE.UU., n.º de catálogo 12587-010. El complemento B27 es una formulación sin suero que incluye d-biotina, fracción sin ácidos grasos V de albúmina sérica bovina (BSA), catalasa, L-carnitina HCl, corticosterona, etanolamina HCl, D-galactosa (Anhid.), glutatión (reducido), insulina humana recombinante, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina-2-HCl, selenito de sodio, superóxido dismutasa, complejo de T-3/albumina, DL alfa tocoferol y acetato de DL alfa tocoferol. Sin embargo, el uso del complemento B27 es limitado ya que incluye albúmina de origen animal.

El reemplazo de suero puede estar desprovisto de (completamente libre de) contaminantes animales. Dichos contaminantes pueden ser patógenos que pueden infectar células humanas, componentes celulares o componentes acelulares (por ejemplo, líquido) de animales.

Cabe señalar que cuando se usa un reemplazo de suero sin contaminantes animales para cultivar células humanas, entonces el reemplazo de suero se denomina "sin xeno".

El término "xeno" es un prefijo basado en la palabra griega "Xenos", es decir, un extraño. Como se usa en el presente documento, la expresión "sin xeno" se refiere a estar desprovisto de cualquier componente/contaminante que proceda de una especie xeno (es decir, una distinta, ajena).

Por ejemplo, un reemplazo de suero sin xeno para su uso con células humanas (es decir, un reemplazo de suero sin contaminantes animales) puede incluir una combinación de insulina, transferrina y selenio. Además, o como alternativa, un reemplazo de suero sin xeno puede incluir albúmina, transferrina e insulina humanas o producidas de forma recombinante.

Los ejemplos no limitantes de composiciones de reemplazo de suero sin xeno disponibles en el mercado incluyen la premezcla de ITS (insulina, transferrina y selenio) disponible de Invitrogen Corporation (ITS, Invitrogen, n.º de catálogo 51500-056); Reemplazo de suero 3 (SR3; Sigma, n.º de catálogo S2640) que incluye albúmina sérica humana, transferrina humana e insulina recombinante humana y no contiene factores de crecimiento, hormonas esteroideas, glucocorticoides, factores de adhesión celular, Ig y mitógenos detectables; SR KnockOut™ sin Xeno [números de catálogo A10992-01, A10992-02, partes n.º 12618-012 o 12618-013, Invitrogen GIBCO] que contiene solo proteínas procedentes de seres humanos o recombinantes humanas.

Las formulaciones de reemplazo de suero sin xeno ITS (Invitrogen Corporation) o SR3 (Sigma) se pueden diluir en una relación de 1 a 100 para alcanzar una concentración de trabajo x1.

La concentración del reemplazo de suero [por ejemplo, SR KnockOut™ sin Xeno (Invitrogen)] en el medio de cultivo puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 % [volumen/volumen (v/v)] a aproximadamente 50 % (v/v), por ejemplo, de aproximadamente 5 % (v/v) a aproximadamente 40 % (v/v), por ejemplo, de aproximadamente 5 % (v/v) a aproximadamente 30 % (v/v), por ejemplo, de aproximadamente 10 % (v/v) a aproximadamente 30 % (v/v), por ejemplo, de aproximadamente 10 % (v/v) a aproximadamente 25 % (v/v), por ejemplo, de aproximadamente 10 % (v/v) a aproximadamente 20 % (v/v), por ejemplo, aproximadamente 10 % (v/v), por ejemplo, aproximadamente 15 % (v/v), por ejemplo, aproximadamente 20 % (v/v), por ejemplo, aproximadamente 30 % (v/v).

El medio de cultivo desvelado puede ser capaz de mantener la célula madre pluripotente en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 5 pases, al menos 10 pases, al menos 15 pases, al menos 20 pases, al menos 25 pases, al menos 30 pases, al menos 35 pases, al menos 40 pases, al menos 45 pases, al menos 50

pases (por ejemplo, al menos 25, 50, 75, 100 o 250 días en cultivo).

El medio de cultivo desvelado puede ser capaz de expandir las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos a continuación, las hESC o células iPS humanas podrían mantenerse en el estado indiferenciado durante al menos 20 pases en un sistema de cultivo bidimensional o durante al menos 50 pases en un sistema de cultivo tridimensional cuando se cultivan en suspensión. Ya que cada pase se realiza cada 5-7 días (por ejemplo, 144 horas) y un tiempo de duplicación observado de aproximadamente 25-36 horas, una sola hESC o célula iPS humana cultivada en estas condiciones podría expandirse para dar lugar a 2^4 - 2^5 células (en 6 días). Cabe señalar que cuando se cultiva en un biorreactor controlado, la capacidad de expansión de las células madre pluripotentes aumenta a aproximadamente 64 veces en 5 días. Por tanto, en un mes de cultivo (es decir, 720 horas), una célula madre pluripotente individual puede expandirse hasta 2^{20} (1×10^6) hESC o células iPS humanas.

Los presentes inventores han descubierto que la combinación de factores de crecimiento interleucina 11 (IL11) y factor neurotrófico ciliar (CNTF); o interleucina 11 (IL11) y la oncostatina se pueden usar para mantener el crecimiento y la expansión de células madre pluripotentes en un estado proliferativo, indiferenciado, pluripotente.

Por lo tanto, se desvela un medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y factor neurotrófico ciliar (CNTF); o interleucina 11 y oncostatina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "interleucina 11" se refiere a un miembro proteico de la familia de citocinas gp130, también conocida como AGIF e IL-11. Se puede obtener interleucina 11 [por ejemplo, el polipéptido IL-11 humano n.º de referencia de GenBank NP_000632.1 (SEQ ID NO: 32); polinucleótido IL-11 humano n.º de referencia de GenBank NM_000641.2 (SEQ ID NO: 33)] de diversas fuentes comerciales tales como R&D Systems o PeproTech.

Como se usa en el presente documento, la expresión "factor neurotrófico ciliar" (también conocido como HCNTF; CNTF) se refiere a una hormona polipeptídica cuyas acciones parecen estar restringidas al sistema nervioso donde promueve la síntesis de neurotransmisores y el crecimiento de neuritas en determinadas poblaciones neuronales. La proteína es un potente factor de supervivencia para neuronas y oligodendrocitos y puede ser relevante para reducir la destrucción del tejido durante ataques inflamatorios. Se puede obtener CNTF [por ejemplo, el polipéptido CNTF humano n.º de referencia de GenBank NP_000605.1 (SEQ ID NO: 34); polinucleótido CNTF humano n.º de referencia de GenBank NM_000614 (SEQ ID NO: 35)] de diversas fuentes comerciales tales como R&D Systems o PeproTech.

Como se usa en el presente documento, el término "oncostatina" (también conocido como OSM oncostatina M, OSM) se refiere a un miembro polipeptídico de una familia de citocinas que incluye el factor inhibidor de la leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos e interleucina 6. Se puede obtener oncostatina [por ejemplo, el polipéptido de oncostatina humana n.º de referencia de GenBank NP_065391.1 (SEQ ID NO: 36 o P13725 (SEQ ID NO: 37); polinucleótido humano n.º de referencia de GenBank NM_020530.3 (SEQ ID NO: 38)] de diversas fuentes comerciales tales como R&D Systems (por ejemplo, R&D Systems, número de catálogo 295-OM-010).

El medio de cultivo desvelado está desprovisto de un inhibidor de glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de GSK3 incluyen inhibidores de GSK-alfa o GSK-beta tales como CHIR 98014, CHIR 99021, AR-AO144-18, SB216763 y SB415286. Se describen ejemplos de inhibidores de GSK3 en Bennett C, *et al.*, J. Biological Chemistry, vol. 277, n.º 34, 23 Ago. 2002, págs. 30998-31004; y en Ring D B, *et al.*, Diabetes, vol. 52, Marzo de 2003, págs. 588-595, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La IL11 puede proporcionarse a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 ng/ml y no más de aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,2 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,3 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,4 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,7 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 ng/ml.

La IL11 se puede proporcionar a una concentración de entre aproximadamente 0,5 ng/ml y aproximadamente 5 ng/ml.

El CNTF se puede proporcionar a una concentración de al menos 0,1 ng/ml y no más de aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,2 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,3 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,4 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,7 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,9 ng/ml, por ejemplo, al menos

aproximadamente 1 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 ng/ml.

El CNTF se puede proporcionar a una concentración de entre aproximadamente 0,5 ng/ml y aproximadamente 5 ng/ml.

5 La oncostatina se puede proporcionar a una concentración de al menos 0,1 ng/ml y no más de aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,2 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,3 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,4 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,7 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 ng/ml.

La oncostatina se puede proporcionar a una concentración de entre aproximadamente 0,5 ng/ml y aproximadamente 5 ng/ml.

15 El medio desvelado que comprende IL11 y CNTF; o IL11 y oncostatina comprende además el reemplazo de suero (por ejemplo, un reemplazo de suero sin contaminantes animales) a una concentración entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 15 %.

20 El medio de cultivo desvelado que comprende IL11 y CNTF; o IL11 y oncostatina puede comprender además el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

25 El factor de crecimiento de fibroblastos básico (también conocido como bFGF, FGF2 o FGF-β) es un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. bFGF [(por ejemplo, polipéptido de bFGF humano n.º de referencia de GenBank NP_001997.5 (SEQ ID NO: 39); polinucleótido de bFGF humano n.º de referencia de GenBank NM_002006.4 (SEQ ID NO: 40) se puede obtener de diversas fuentes comerciales tales como Cell Sciences®, Canton, MA, EE.UU. (por ejemplo, números de catálogo CRF001A y CRF001B), Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU. (por ejemplo, números de catálogo: PHG0261, PHG0263, PHG0266 y PHG0264), ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. Rehovot, Israel (por ejemplo, número de catálogo: CYT-218) y Sigma, St Louis, MO, EE.UU. (por ejemplo, número de catálogo: F0291).

35 La concentración de bFGF en el medio de cultivo que comprende IL11 y CNTF; o IL11 y oncostatina pueden ser al menos aproximadamente 4 ng/ml y no más de 100 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 7 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 ng/ml.

40 Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo que comprenden la IL11 y el CNTF incluyen los medios ILCNTF, NILCNTF descritos en la sección de Ejemplos a continuación, que se mostraron capaces de mantener el crecimiento de hESC y células iPS en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 12 pases en un sistema de cultivo bidimensional y durante al menos 10 en un cultivo en suspensión.

45 Los presentes inventores han descubierto que la quimera IL6RIL6 se puede usar en medios de cultivo que están completamente desprovistos de contaminantes animales para mantener el crecimiento de células madre pluripotentes humanas en un estado indiferenciado.

Por tanto, se desvela un medio de cultivo que comprende un reemplazo de suero sin contaminantes animales y una quimera IL6RIL6.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "quimera IL6RIL6" se refiere a un polipéptido quimérico que comprende la porción soluble del receptor de interleucina-6 [IL-6-R, por ejemplo, el IL-6-R humano como se expone en el n.º de referencia de GenBank AAH89410; SEQ ID NO: 41; por ejemplo, una porción de los receptores solubles de IL6 como se expone en los aminoácidos 112-355 (SEQ ID NO: 42) del n.º de referencia de GenBank AAH89410] y la interleucina-6 (IL6; por ejemplo, IL-6 humana como se expone en el n.º de referencia de GenBank CAG29292; SEQ ID NO: 43) o una fracción biológicamente activa del mismo (por ejemplo, un dominio de unión al receptor).

60 Cabe señalar que cuando se construye la quimera IL6RIL6, las dos porciones funcionales (es decir, la IL6 y su receptor) pueden fusionarse directamente (por ejemplo, unirse o fusionarse traduccionalmente, es decir, estar codificadas por un único marco abierto de lectura) entre sí o conjugarse (unirse o fusionarse traduccionalmente) a través de un conector adecuado (por ejemplo, un conector polipeptídico). El polipéptido quimérico IL6RIL6 puede presentar una cantidad y un patrón de glucosilación similares a los de los receptores de IL6 e IL6 de origen natural. Por ejemplo, una quimera IL6RIL6 adecuada es como se expone en la SEQ ID NO: 19 y en la Figura 11 del documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*

65 Cabe señalar que una vez que el reemplazo de suero está completamente desprovisto de contaminantes animales, los ingredientes adicionales del medio de cultivo también se pueden seleccionar sin contaminantes animales (por

ejemplo, sintéticos, recombinantes o purificados de fuentes humanas) de modo que todo el medio de cultivo esté desprovisto de contaminantes animales y se puede usar como medio sin xeno para cultivar células madre pluripotentes humanas, adecuado para fines clínicos/terapéuticos.

- 5 Los presentes inventores han descubierto que la quimera IL6RIL6 se puede proporcionar a una concentración alta, es decir, entre 50 y 150 ng/ml o a una concentración baja, es decir, entre 50 y 150 pg/ml mientras se mantiene aún la capacidad del medio para mantener el crecimiento de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

10 La concentración de la quimera IL6RIL6 puede ser de al menos aproximadamente 50 ng/ml y no más de aproximadamente 350 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 50 y 200 ng/ml, por ejemplo, está en el intervalo de aproximadamente 55 ng/ml a aproximadamente 195 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 60 ng/ml a aproximadamente 190 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 65 ng/ml a aproximadamente 185 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 70 ng/ml a aproximadamente 180 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 75 ng/ml a aproximadamente 175 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 80 ng/ml a aproximadamente 170 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 85 ng/ml a aproximadamente 165 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 ng/ml a aproximadamente 140 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 ng/ml a aproximadamente 130 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 ng/ml a aproximadamente 120 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 ng/ml a aproximadamente 110 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 95 ng/ml a aproximadamente 105 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 98 ng/ml a aproximadamente 102 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ml de la quimera IL6RIL6.

Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo sin contaminantes animales que comprenden entre aproximadamente 50 y 200 ng/ml de la quimera IL6RIL6 incluyen los cmTeSR2, NCMrb100F, NCM100F, cmV5b y cmHA13.

25 La concentración de la quimera IL6RIL6 puede ser de al menos 50 pg/ml y no más de aproximadamente 150 pg/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 50 y 200 pg/ml, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 55 pg/ml a aproximadamente 195 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 60 pg/ml a aproximadamente 190 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 65 pg/ml a aproximadamente 185 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 70 pg/ml a aproximadamente 180 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 175 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 80 pg/ml a aproximadamente 170 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 85 pg/ml a aproximadamente 165 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 150 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 140 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 130 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 120 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 pg/ml a aproximadamente 110 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 95 pg/ml a aproximadamente 105 pg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 98 pg/ml a aproximadamente 102 pg/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 pg/ml de la quimera IL6RIL6.

Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo sin xeno que comprenden entre aproximadamente 50 y 200 pg/ml de la quimera IL6RIL6 incluyen los cmTeSR2p, NCMrb100Fp, NCM100Fp, cmV5bp y cmHA13p.

40 Por ejemplo, la quimera IL6RIL6 se puede añadir al medio de cultivo medio sin proteínas animales TeSR™ 2 (StemCell Technologies, n.º de catálogo 05860/05880). El medio TeSR™ 2 es una formulación definida completa, sin proteínas animales, sin suero, que contiene factor de crecimiento de fibroblastos humano básico recombinante (rhbFGF) y factor de crecimiento transformante humano recombinante β (rhTGF β).

45 El medio de cultivo sin contaminantes animales desvelado que comprende la quimera IL6RIL6 puede comprender además bFGF.

50 bFGF se puede proporcionar a una concentración baja (por ejemplo, entre aproximadamente 4 y 20 ng/ml) o a una concentración alta (por ejemplo, entre 50 y 150 ng/ml).

El medio de cultivo desvelado que comprende un reemplazo de suero sin contaminantes animales y la quimera IL6RIL6, puede comprender además bFGF a una concentración de al menos aproximadamente 4 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 7 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 15 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 ng/ml. Los ejemplos no limitantes de dichos medios de cultivo incluyen los cmV5b, NCM100Fp, NCM100F y cmV5bp.

60 El medio de cultivo desvelado que comprende un reemplazo de suero sin contaminantes animales y la quimera IL6RIL6, puede comprender además bFGF a una concentración de al menos aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 1 μ g, por ejemplo, de aproximadamente 60 ng/ml a aproximadamente 1 μ g/ml, por ejemplo, de aproximadamente 70 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 80 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 90 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 60 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 70 ng/ml, por

ejemplo, aproximadamente 80 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 90 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 50 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 60 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 70 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 80 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 110 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 120 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 130 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 140 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 150 ng/ml. Los ejemplos no limitantes de dichos medios de cultivo incluyen los NCMrb100F y NCMrb100Fp, cmTeSR2 y cmTeSR2p.

El medio de cultivo sin contaminantes animales desvelado que comprende la quimera IL6RIL6 puede comprender además ácido ascórbico.

El ácido ascórbico (también conocido como vitamina C) es un ácido de azúcar ($C_6H_8O_6$; peso molecular 176,12 gramos/mol) con propiedades antioxidantes. El ácido ascórbico usado por el medio de cultivo puede ser un ácido ascórbico natural, un ácido ascórbico sintético, una sal de ácido ascórbico (por ejemplo, ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, ascorbato de potasio), una forma de éster de ácido ascórbico (por ejemplo, palmitato de ascorbilo, estearato de ascorbilo), un derivado funcional del mismo (una molécula derivada del ácido ascórbico que presenta la misma actividad/función cuando se usa en el medio de cultivo) o un análogo del mismo (por ejemplo, un equivalente funcional del ácido ascórbico que presenta una actividad análoga a la observada para el ácido ascórbico cuando se usa en el medio de cultivo). Los ejemplos no limitantes de formulaciones de ácido ascórbico que se pueden usar en el medio de cultivo incluyen ácido L-ascórbico y ácido ascórbico 3-fosfato.

El ácido ascórbico se puede obtener de diversos fabricantes tales como Sigma, St Louis, MO, EE.UU. (por ejemplo, números de catálogo: A2218, A5960, A7506, A0278, A4403, A4544, A2174, A2343, 95209, 33034, 05878, 95210, 95212, 47863, 01-6730, 01-6739, 255564, A92902, W210901).

La concentración de ácido ascórbico en el medio de cultivo sin contaminantes animales que comprende la quimera IL6RIL6 puede estar entre aproximadamente 25 y 200 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre 25 y 150 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre 30 y 150 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre aproximadamente 40 y 120 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre aproximadamente 40 y 100 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre aproximadamente 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre aproximadamente 40 y 60 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$. Los ejemplos no limitantes de dichos medios de cultivo incluyen medios cmHA13p y cmHA13 descritos en la sección de Ejemplos a continuación.

El medio de cultivo sin contaminantes animales que comprende la quimera IL6RIL6 puede comprender además una isoforma del factor de crecimiento transformante beta (TGF β).

Como se usa en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento transformante beta (TGF β)" se refiere a cualquier isoforma del factor de crecimiento transformante beta (β), que actúa a través del mismo sistema de señalización del receptor en el control de la proliferación, diferenciación y otras funciones en muchos tipos celulares. El TGF β actúa induciendo la transformación y también actúa como un factor de crecimiento autocrino negativo.

El término TGF β puede referirse a TGF β_1 [secuencia de ARNm de TGF β_1 humano n.º de referencia de GenBank NM_000660.4 (SEQ ID NO: 44), secuencia polipeptídica n.º de referencia de GenBank NP_000651.3 (SEQ ID NO: 45)], TGF β_2 [secuencia de ARNm de TGF β_2 humano n.º de referencia de GenBank NM_001135599.1 isoforma 1 (SEQ ID NO: 46) o n.º de referencia de GenBank NM_003238.2 isoforma 2 (SEQ ID NO: 47); secuencia polipeptídica n.º de referencia de GenBank NP_001129071.1 isoforma 2 (SEQ ID NO: 48) o n.º de referencia de GenBank NP_003229.1 isoforma 2 (SEQ ID NO: 49)] o TGF β_3 [secuencia de ARNm de TGF β_3 humano n.º de referencia de GenBank NM_003239.2 (SEQ ID NO: 50), secuencia polipeptídica n.º de referencia de GenBank NP_003230.1 (SEQ ID NO: 51)]. Las isoformas de TGF β pueden obtenerse de diversas fuentes comerciales, tales como R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU. y Sigma, St Louis, MO, EE.UU.

El TGF β que se incluye en el medio de cultivo desvelado puede ser TGF β_1 .

La concentración de TGF β_1 en el medio de cultivo desvelado está en el intervalo de aproximadamente 0,05 ng/ml a aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, de 0,1 ng/ml a aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.

La concentración de TGF β_1 en el medio de cultivo desvelado es de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,4 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,8 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 2 ng/ml.

Son ejemplos no limitantes de un medio de cultivo sin contaminantes animales que comprende la quimera IL6RIL6, bFGF y TGF β_1 los cmV5b, cmV5bp, cmTeSR2 y cmTeSR2p que se describen en la sección de ejemplos a continuación.

El TGFβ que se incluye en el medio de cultivo desvelado puede ser TGFβ3.

La concentración de TGFβ₃ en el medio de cultivo desvelado puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml, por ejemplo, de 0,1 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.

La concentración de TGFβ₃ en el medio de cultivo desvelado puede ser al menos aproximadamente 0,5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,4 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,8 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 2 ng/ml.

También se desvela un medio de cultivo que comprende bFGF a una concentración de al menos aproximadamente 50 ng/ml (por ejemplo, entre 50 y 200 ng/ml) y una quimera IL6RIL6 a una concentración alta (por ejemplo, entre 50 y 200 ng/ml) o concentración baja (por ejemplo, entre 50 y 200 pg/ml). Los ejemplos no limitantes de dichos medios de cultivo incluyen los medios de cultivo CMrb100F, CMrb100Fp, NCMrb100F y NCMrb100Fp, que se mostró que son capaces de mantener hESC y células iPS en un estado proliferativo, pluripotente e indiferenciado durante al menos 5 pases en un sistema de cultivo bidimensional y durante al menos 15 pases en un sistema de cultivo tridimensional.

Los presentes inventores han descubierto que puede usarse un medio de cultivo que comprende altas concentraciones de un receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) e interleucina 6 (IL6) para mantener el crecimiento de células madre pluripotentes en un estado proliferativo, indiferenciado y pluripotente.

Por tanto, se desvela un medio de cultivo que comprende sIL6R e IL6, en donde una concentración de sIL6R es al menos aproximadamente 5 ng/ml y en donde una concentración de IL6 es al menos aproximadamente 3 ng/ml.

La concentración de sIL6 puede ser al menos aproximadamente 5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 6 ng/ml, al menos aproximadamente 7 ng/ml, al menos aproximadamente 8 ng/ml, al menos aproximadamente 9 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 15 ng/ml, al menos aproximadamente 20 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, por ejemplo, en el intervalo de entre 10 ng/ml y entre 50 ng/ml, por ejemplo, entre 20 y 40 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 25 ng/ml.

La concentración de IL6 puede ser al menos aproximadamente 3 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 4 ng/ml, al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 6 ng/ml, al menos aproximadamente 7 ng/ml, al menos aproximadamente 8 ng/ml, al menos aproximadamente 9 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 15 ng/ml, al menos aproximadamente 20 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, por ejemplo, en el intervalo de entre 10 ng/ml y entre 50 ng/ml, por ejemplo, entre 20 y 40 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 25 ng/ml.

El medio desvelado que comprende sIL6 e IL6 puede incluir además bFGF a una concentración de al menos aproximadamente 4 ng/ml y no más de 100 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 7 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 8 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 9 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 ng/ml.

El medio desvelado que comprende sIL6 e IL6 puede incluir además reemplazo de suero a una concentración de entre 10 y 30 %, por ejemplo, aproximadamente 15 %. Cabe señalar que la concentración de reemplazo de suero puede variar dependiendo del tipo de reemplazo de suero utilizado.

Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo que comprenden sIL6 e IL6 incluyen el medio yFIL25 descrito en la sección de Ejemplos a continuación.

El medio de cultivo desvelado puede comprender además insulina. La insulina se puede obtener de Invitrogen Carlsbad CA, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.

La concentración de insulina en el medio de cultivo puede ser entre 0,0001 y 1 gramos/litro (por ejemplo, entre aproximadamente 0,001 µg/µl y aproximadamente 0,1 µg/µl, por ejemplo, entre aproximadamente 0,005 µg/µl y aproximadamente 0,05 µg/µl, por ejemplo, aproximadamente 0,01 µg/µl).

El medio de cultivo desvelado puede comprender además albúmina. La albúmina se puede obtener de Sigma, St Louis, MO, EE.UU.

La concentración de albúmina en el medio de cultivo puede ser entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 5 %.

El medio de cultivo desvelado puede comprender además transferrina. La transferrina se puede obtener de Invitrogen Carlsbad CA, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.

El medio de cultivo desvelado puede comprender además una mezcla de lípidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla de lípidos" se refiere a una composición lipídica definida (por ejemplo, químicamente definida) necesaria para cultivar las células madre pluripotentes. Cabe señalar que la mezcla de lípidos se añade habitualmente a un medio de cultivo que está desprovisto de suero o reemplazo de suero y, por tanto, sustituye los lípidos que se añaden habitualmente a formulaciones de suero o reemplazo de suero.

Un ejemplo no limitante de una mezcla de lípidos disponible en el mercado, que puede usarse en el medio de cultivo del presente documento, es el concentrado lipídico químicamente definido disponible de Invitrogen (n.º de catálogo 11905-031).

La concentración de la mezcla de lípidos en el medio de cultivo puede ser de aproximadamente 0,5 % [volumen/volumen (v/v)] a aproximadamente 3 % v/v, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % v/v a aproximadamente 2 % v/v, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % v/v a aproximadamente 1 % v/v, por ejemplo, aproximadamente 1 % v/v.

El medio de cultivo puede comprender además bicarbonato de sodio. El bicarbonato de sodio se puede obtener de Biological Industries, Beit HaEmek, Israel.

La concentración de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo puede ser de aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 %, por ejemplo, de aproximadamente 6 % a aproximadamente 9 %, por ejemplo, de aproximadamente 7 % a aproximadamente 8 %, por ejemplo, aproximadamente 7,5 %.

El medio de cultivo desvelado puede comprender además L-glutamina. La concentración de L-glutamina en el medio de cultivo puede ser de aproximadamente 0,5 milimolar (mM) a aproximadamente 10 mM, por ejemplo, aproximadamente 1-5 mM, por ejemplo, 2 mM.

El medio de cultivo desvelado puede comprender además un aminoácido no esencial. Se pueden obtener aminoácidos no esenciales como una reserva de 10 mM de diversos proveedores tales como Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU. La concentración del aminoácido no esencial en el medio de cultivo puede ser de aproximadamente 0,1-10 %, por ejemplo, aproximadamente 0,2-5 %, por ejemplo, aproximadamente 0,5-2 %, por ejemplo, aproximadamente 1 %.

El medio de cultivo desvelado puede comprender además un agente reductor tal como beta-mercaptoetanol (β -mercaptoetanol), en un intervalo de concentración entre aproximadamente 0,01 y 1 mM, por ejemplo, 0,1 mM.

Como se ha mencionado, cualquiera de los factores proteicos usados en el medio de cultivo (por ejemplo, la interleucina 11, CNTF, oncostatina, bFGF, quimera IL6RIL6, TGF β 1, TGF β 3, insulina, albúmina, transferrina) puede expresarse de manera recombinante o sintetizarse bioquímicamente. Además, los factores proteicos de origen natural tales como bFGF y TGF β pueden purificarse a partir de muestras biológicas (por ejemplo, de suero humano, cultivos celulares) usando métodos bien conocidos en la técnica. Cabe señalar que para la preparación de un medio de cultivo sin contaminantes animales, el factor proteico se purifica preferentemente de una fuente humana o se expresa de manera recombinante.

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

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

El cultivo celular puede estar exento de células alimentadoras (desprovisto de soporte de células alimentadoras).

La expresión "soporte de células alimentadoras", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una célula alimentadora (por ejemplo, fibroblastos) para mantener células madre pluripotentes en un estado proliferativo e indiferenciado cuando las células madre pluripotentes se cultivan conjuntamente en las células alimentadoras o cuando las células madre pluripotentes se cultivan en una matriz (por ejemplo, una matriz extracelular,

una matriz sintética) en presencia de un medio acondicionado generado por las células alimentadoras. El soporte de las células alimentadoras depende de la estructura de las células alimentadoras durante el cultivo (por ejemplo, la matriz tridimensional formada al cultivar las células alimentadoras en una placa de cultivo tisular), la función de las células alimentadoras (por ejemplo, la secreción de factores de crecimiento, nutrientes y hormonas por las células alimentadoras, la tasa de crecimiento de las células alimentadoras, la capacidad de expansión de las células alimentadoras antes de la senescencia) y/o la unión de las células madre pluripotentes a la capa o las capas de células alimentadoras.

La expresión "ausencia de soporte de células alimentadoras" como se usa en el presente documento se refiere a un medio de cultivo y/o un cultivo celular que está desprovisto de células alimentadoras y/o un medio acondicionado generado por el mismo.

Las células madre pluripotentes que se incluyen en el cultivo celular pueden presentar un cariotipo estable (estabilidad cromosómica) durante el periodo de cultivo, por ejemplo, durante al menos 2 pases, por ejemplo, al menos 4 pases, por ejemplo, al menos 8 pases, por ejemplo, al menos 15 pases, por ejemplo, al menos 20 pases, por ejemplo, al menos 25 pases, por ejemplo, al menos 30 pases, por ejemplo, al menos 35 pases, por ejemplo, al menos 40 pases, por ejemplo, al menos 45 pases, por ejemplo, al menos 50 pases.

El cultivo celular puede presentar un tiempo de duplicación de al menos 20 horas, por ejemplo, un tiempo de duplicación que está entre 20 y 40 horas (por ejemplo, aproximadamente 36 horas), representando de este modo células madre pluripotentes, no tumorigénicas, genéticamente estables (por ejemplo, hESC y células iPS).

El cultivo celular puede caracterizarse por al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, por ejemplo, al menos 70 %, por ejemplo, al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, por ejemplo, al menos 90 %, por ejemplo, al menos 95 % de células madre pluripotentes indiferenciadas.

El cultivo celular puede comprender al menos 1000 células madre pluripotentes e indiferenciadas por mililitro (ml) de medio de cultivo. Cabe señalar que para varias aplicaciones, tal como para la clonación de células individuales de las células madre pluripotentes, la concentración de células puede ser de aproximadamente 1 célula por cada 100-200 µl de medio, cada célula se coloca (siembra) en una placa separada, preferentemente una placa que no está recubierto (por ejemplo, una placa no tratada con cultivo), para evitar la adhesión de la célula a la placa.

El estado de diferenciación o indiferenciación de las células madre pluripotentes cultivadas en 2-D o en suspensión como agregados celulares se puede determinar usando métodos conocidos (por ejemplo, como se describe en Thomson *et al*, 1998). Por ejemplo, el estado de diferenciación puede determinarse usando diversos enfoques, incluyendo, por ejemplo, evaluación morfológica (por ejemplo, como se muestra en las Figuras 1A-C y 3A-C) y/o detección del patrón de expresión de marcadores normales del estado indiferenciado usando técnicas inmunológicas tales como citometría de flujo para marcadores unidos a membrana, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para marcadores extracelulares e intracelulares e inmunoensayo enzimático, para marcadores moleculares secretados. Por ejemplo, la inmunofluorescencia empleada en hESC o células iPS humanas cultivadas en el medio de cultivo descrito en el presente documento reveló la expresión de Oct4, antígeno embrionario específico de etapa (SSEA) 4, el antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81 (por ejemplo, Figuras 2A-D). Adicionalmente, el nivel de transcritos de marcadores de indiferenciación específicos (por ejemplo, Oct 4, Nanog, Sox2, Rex1, Cx43, FGF4) o marcadores de diferenciación (por ejemplo, albúmina, glucagones, α -actina cardíaca, β -globulina, Flk1, AC133 y neurofilamento) puede detectarse usando técnicas basadas en ARN tales como análisis de RT-PCR y/o análisis de micromatrices de ADNc.

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

El cultivo celular puede comprender células madre pluripotentes y un medio sin xeno, por tanto, el medio no contiene ningún contaminante de una especie distinta de la de las células madre pluripotentes. Por ejemplo, cuando el cultivo celular comprende células madre pluripotentes humanas, entonces el medio está desprovisto de contaminantes animales. De manera similar, cuando el cultivo celular comprende células madre pluripotentes de primates (por ejemplo, mono), el medio de cultivo está desprovisto de otros contaminantes animales o humanos.

Se desvela en el presente documento un método para expandir y mantener células madre pluripotentes en un estado pluripotente e indiferenciado.

El método de expansión y mantenimiento de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado puede efectuarse cultivando las células madre pluripotentes en cualquiera de los nuevos medios de cultivo descritos en el presente documento.

La expansión y el mantenimiento de las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado pueden efectuarse en

un cultivo en suspensión.

El cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión puede efectuarse en un medio de cultivo sin suero y sin células alimentadoras.

Ya que grandes grupos de células madre pluripotentes pueden causar diferenciación celular, se toman medidas para evitar grandes agregados de células madre pluripotentes. Los agregados de células madre pluripotentes formados pueden, por tanto, disociarse cada 5-7 días y las células individuales o pequeños agregados de células pueden dividirse en recipientes de cultivo adicionales (es decir, pasarse) o permanecer en el mismo recipiente de cultivo pero con medio de cultivo adicional.

El cultivo puede efectuarse en condiciones que permitan la expansión de las células madre pluripotentes como células individuales.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el pase de las células madre pluripotentes se puede efectuar usando disociación mecánica de los agregados celulares.

Tras la disociación mecánica de los agregados celulares grandes, los agregados de células madre pluripotentes disociados pueden dividirse en agregados pequeños usando puntas de pipeta Gilson de 200 µl (por ejemplo, pipeteando arriba y abajo las células).

El método de expansión y mantenimiento de las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado puede efectuarse en un sistema de cultivo bidimensional.

El sistema de cultivo bidimensional puede comprender una matriz o capa de células alimentadoras.

Por ejemplo, el cultivo en un sistema de cultivo bidimensional puede realizarse sembrando las células madre pluripotentes en una matriz o una capa de células alimentadoras en una densidad celular que promueve la supervivencia y proliferación celular, pero limita la diferenciación. Normalmente, se usa una densidad de recubrimiento de entre aproximadamente 15.000 células/cm² y aproximadamente 3.000.000 células/cm².

Se apreciará que, aunque habitualmente se siembran suspensiones de células individuales de células madre pluripotentes, también se pueden usar grupos pequeños. Con este fin, se detiene la digestión enzimática (tal como con colagenasa de tipo IV) utilizada para rotura de los grupos (véase "Materiales generales y métodos experimentales" en la sección de Ejemplos a continuación) antes de que las células madre se dispersen por completo y las células se triturar con una pipeta de manera que se formen agregados (es decir, 10-200 células). Sin embargo, se toman medidas para evitar grandes grupos que pueden causar diferenciación celular.

El sistema de cultivo puede comprender una matriz y el medio de cultivo descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a cualquier sustancia a la que se puedan adherir las células madre pluripotentes y que, por lo tanto, pueda sustituir la función de unión celular de las células alimentadoras. Dicha matriz contiene normalmente componentes extracelulares a los que pueden unirse las células madre pluripotentes y, por tanto, proporciona un sustrato de cultivo adecuado.

La matriz puede comprender una matriz extracelular.

La matriz extracelular puede estar compuesta de componentes procedentes de la membrana basal o componentes de la matriz extracelular que forman parte de acoplamientos de receptor de molécula de adhesión-ligando. MATRIGEL® (Becton Dickinson, EE.UU.) es un ejemplo de una matriz adecuada disponible en el mercado. MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida; MATRIGEL® también está disponible como una preparación de factor de crecimiento reducido. Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes adecuados incluyen matriz de prepucio, matriz de laminina, matriz de fibronectina, matriz de proteoglicanos, matriz de entactina, matriz de sulfato de heparano, matriz de colágeno y similares, solas o en diversas combinaciones de las mismas.

La matriz puede estar desprovista de contaminantes animales (una matriz sin xeno para cultivar células madre pluripotentes humanas).

En los casos en los que se deseen condiciones de cultivo completas sin componentes de origen animal, la matriz procede preferentemente de una fuente humana o se sintetiza usando técnicas recombinantes tales como las descritas anteriormente. Dichas matrices incluyen, por ejemplo, fibronectina de origen humano, fibronectina recombinante, laminina de origen humano, matriz de fibroblastos de prepucio o una matriz de fibronectina sintética. La fibronectina de origen humano puede ser de fibronectina plasmática o fibronectina celular, ambos de los cuales se pueden obtener de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. La matriz de fibroblastos de prepucio y laminina de origen humano se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. Se puede obtener una matriz de fibronectina sintética de Sigma, St. Louis, MO,

EE.UU.

En caso de que se desee una capa de células alimentadoras, pueden cultivarse células madre pluripotentes humanas en una capa de células alimentadoras de fibroblastos de prepucio humano.

Los presentes inventores han descubierto que pueden enviarse células madre pluripotentes como células vivas, no congeladas, y aún permanecer viables, indiferenciadas y pluripotentes.

Las células pueden permanecer viables, indiferenciadas y pluripotentes después del envío (por vía aérea o marítima) que dura al menos 4 días.

Los presentes inventores han descubierto que los nuevos medios de cultivo desvelados en el presente documento pueden usarse para obtener nuevas líneas de células madre pluripotentes.

La línea de células madre pluripotentes puede ser una línea de células madre embrionarias y el método para obtener la línea de células madre embrionarias efectuada por: (a) obtener una célula madre embrionaria de un blastocisto en etapa previa a la implantación, blastocisto en etapa posterior a la implantación y/o un tejido genital de un feto; y (b) cultivar la célula madre embrionaria en un medio de cultivo desvelado en el presente documento, obteniendo de este modo la línea de células madre embrionarias.

La línea de células madre pluripotentes puede ser una línea de células madre pluripotentes inducidas (células iPS) y el método para obtener la línea celular iPS efectuarse mediante: (a) inducción de una célula somática a una célula madre pluripotente; y (b) cultivo de la célula madre pluripotente en un medio de cultivo desvelado en el presente documento, obteniendo de este modo la línea de células madre pluripotentes inducidas.

Una vez obtenidas, los ESC de células iPS se cultivan adicionalmente en cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento que permiten la expansión de las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, esencialmente como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Se apreciará que una línea de células madre pluripotentes establecida (por ejemplo, línea de células madre embrionarias o línea de células madre pluripotentes inducidas) puede someterse a ciclos de congelación/descongelación sin obstaculizar la capacidad proliferativa de las células en el estado indiferenciado conservando al mismo tiempo su capacidad pluripotente. Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 6A-C y se describe en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos a continuación, usando reemplazo de suero (de 10 % a 95 %) y dimetilsulfóxido (DMSO; de 5 % a 10 %) las hESC o células iPS humanas se congelaron y descongelaron con éxito y más del 70 % de las células sobrevivieron y se recuperaron directamente al cultivo en suspensión.

Cabe señalar que se puede utilizar cualquiera de los nuevos medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento para cultivar, mantener y expandir células madre pluripotentes, indiferenciadas, en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares.

Las condiciones de cultivo para expandir y mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden comprender el medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y factor neurotrófico ciliar (CNTF).

Las condiciones de cultivo para expandir y mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden comprender el medio de cultivo que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a una concentración de al menos 50 ng/ml y una quimera IL6RIL6.

Las condiciones de cultivo para expandir y mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden comprender el medio de cultivo que comprende un reemplazo de suero sin contaminantes animales y una quimera IL6RIL6.

Las condiciones de cultivo para expandir y mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden comprender el medio de cultivo sin suero que comprende un receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) e interleucina 6 (IL6), en donde una concentración de sIL6R es al menos 5 ng/ml y en donde una concentración de IL6 es al menos 3 ng/ml

Las condiciones de cultivo para expandir y mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden comprender el medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y oncostatina.

A continuación se presenta una descripción no limitante de los métodos desvelados en el presente documento para la producción de linajes celulares diferenciados a partir de las células madre pluripotentes.

Como se describe en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos a continuación, Las hESC y las células iPS humanas que se expandieron y mantuvieron en cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento son pluripotentes (es decir, capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares de las tres capas germinales embrionarias, el ectodermo, el endodermo y el mesodermo) como se demuestra *in vitro* (por la formación de EB) e *in vivo* (por la formación de teratomas) después de un periodo de cultivo prolongado (por ejemplo, de al menos 10 o 30 pases) en los sistemas de cultivo bidimensionales (por ejemplo, matrices sin alimentadoras) o tridimensionales (por ejemplo, cultivos en suspensión estáticos o dinámicos).

Por tanto, las hESC o células iPS humanas cultivadas según las enseñanzas del presente documento pueden usarse como fuente para generar células específicas de linaje, diferenciadas. Dichas células pueden obtenerse directamente de las células madre pluripotentes sometiendo las ESC a diversas señales de diferenciación (por ejemplo, citocinas, hormonas, factores de crecimiento) o indirectamente, a través de la formación de cuerpos embrioides y la posterior diferenciación de células de los EB en células específicas de linaje.

Por tanto, se desvela un método para generar cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes. El método se efectúa (a) cultivando células madre pluripotentes como se describe en el presente documento para obtener de este modo células madre pluripotentes indiferenciadas, expandidas; y (b) someter las células madre pluripotentes indiferenciadas, expandidas, a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar las células madre en cuerpos embrioides, generando de este modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes.

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

Por tanto, el método puede implicar el cultivo de las células madre pluripotentes descritas en el presente documento en cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento (por ejemplo, en suspensión como agregados celulares o como células individuales desprovistas de agregados celulares, o en un sistema de cultivo bidimensional) para obtener células madre pluripotentes indiferenciadas, expandidas y después someter las células madre pluripotentes indiferenciadas, expandidas (por ejemplo, ESC o células iPS) a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar las células madre pluripotentes en cuerpos embrioides. Dichas condiciones de cultivo que promueven la diferenciación están sustancialmente desprovistas de factores inhibidores de la diferenciación que se emplean cuando las células madre pluripotentes deben expandirse en un estado indiferenciado, tales como TGFβ1, TGFβ3, ácido ascórbico, IL-11, CNTF, oncostatina, bFGF y/o la quimera IL6RIL6.

Para la formación de EB, las células madre pluripotentes (ESC o células iPS) se retiran de sus sistemas de cultivo sin alimentadoras o cultivos en suspensión y se transfieren a un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y que está desprovisto de factores inhibidores de la diferenciación. Por ejemplo, un medio de cultivo adecuado para la formación de EB puede incluir un medio de cultivo básico (por ejemplo, Ko-DMEM o DMEM/F12) complementado con FBSd al 20 % (HyClone, Utah, EE.UU.), L-glutamina 1 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM y reserva de aminoácidos no esenciales al 1 %.

La supervisión de la formación de EB está dentro de las capacidades de los expertos en la materia y puede efectuarse mediante evaluaciones morfológicas (por ejemplo, tinción histológica) y determinación de la expresión de marcadores específicos de diferenciación [por ejemplo, usando técnicas inmunológicas o análisis basado en ARN (por ejemplo, RT-PCR, micromatrices de ADNc)].

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

En algunos métodos para generar células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, el método incluye además la etapa (c) de someter las células de los cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje; generando de este modo las células específicas de linaje a partir de las células madre embrionarias.

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

Las células específicas de linaje pueden aislarse siguiendo la etapa (b).

Como se usa en el presente documento, la expresión "aislar células específicas de linaje" se refiere al enriquecimiento de una población mixta de células en un cultivo con células que presentan predominantemente al menos una característica asociada con un fenotipo de linaje específico. Se apreciará que todos los linajes celulares proceden de las tres capas germinales embrionarias. Por tanto, por ejemplo, los hepatocitos y las células pancreáticas proceden del endodermo embrionario, tejidos conjuntivos óseos, cartilaginosos, elástico, fibrosos, miocitos, células miocárdicas, células de la médula ósea, células vasculares (concretamente, células endoteliales y de músculo liso) y células hematopoyéticas se diferencian del mesodermo embrionario y neural, la retina y las células epidérmicas proceden del ectodermo embrionario.

Se puede efectuar aislamiento de células específicas de linaje clasificando las células de los EB mediante un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

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

Puede efectuarse aislamiento de células específicas de linaje mediante una separación mecánica de células, tejidos y/o estructuras de tipo tisular contenidos en los EB.

Por ejemplo, pueden aislarse cardiomiocitos latentes de los EB como se desvela en la solicitud de patentes de los Estados Unidos n.º 20030022367 de Xu *et al.* Se transfieren EB de cuatro días a placas recubiertas con gelatina o portaobjetos de cámara y se permite que se unan y diferencien. Las células que se contraen espontáneamente, que se observan desde el día 8 de diferenciación, se separan mecánicamente y se recogen en un tubo de 15 ml que contiene medio bajo en calcio o PBS. Las células se disocian usando digestión con collagenasa B durante 60-120 minutos a 37 °C, dependiendo de la actividad de collagenasa. Las células disociadas se resuspenden después en un medio KB de diferenciación (KCl 85 mM, K₂HPO₄ 30 mM, MgSO₄ 5 mM, EGTA 1 mM, creatina 5 mM, glucosa 20 mM, Na₂ATP 2 mM, piruvato 5 mM y taurina 20 mM, tamponado a pH 7,2, Maltsev *et al.*, Circ. Res. 75: 233, 1994) y se incuban a 37 °C durante 15-30 min. Después de la disociación, las células se siembran en portaobjetos de cámara y se cultivan en el medio de diferenciación para generar cardiomiocitos individuales capaces de latir.

También se puede efectuar aislamiento de células específicas de linaje sometiendo los EB a factores de diferenciación para inducir de este modo la diferenciación de los EB en células diferenciadas específicas de linaje.

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

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

Los EB pueden diferenciarse en oligodendrocitos y mielinizar células mediante el cultivo de las células en medio SATO modificado, es decir, DMEM con albúmina sérica bovina (BSA), piruvato, progesterona, putrescina, tiroxina, triyodotironina, insulina, transferrina, selenito de sodio, aminoácidos, neurotrofina 3, factor neurotrófico ciliar y Hepes (Bottenstein, J. E. y Sato, G. H., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76, 514-517; Raff, M. C., Miller, R. H., y Noble, M., 1983, Nature 303: 390-396]. En resumen, los EB se disocian usando tripsina/EDTA al 0,25 % (5 min a 37 °C) y se

trituran en suspensiones de células individuales. Las células suspendidas se siembran en matraces que contienen medio SATO complementado con suero equino al 5 % y de suero de ternera fetal (FCS) al 5 %. Después de 4 días en cultivo, los matraces se agitan suavemente para suspender células que se adhieren ligeramente (principalmente oligodendrocitos), mientras que los astrocitos permanecen adheridos a los matraces y además producen medio acondicionado. Los oligodendrocitos primarios se transfieren a nuevos matraces que contienen medio SATO durante dos días adicionales. Después de un total de 6 días en cultivo, las oligoesferas se disocian parcialmente y se resuspenden en medio SATO para trasplante de células o se disocian completamente y se siembran en un medio acondicionado para oligoesferas que se obtiene de la etapa de agitación anterior [Liu, S. *et al.*, (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 6126-6131].

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

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

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

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden obtener células específicas de linaje induciendo directamente las células madre pluripotentes indiferenciadas, expandidas tales como ESC o células iPS a condiciones de cultivo adecuadas para la diferenciación de linaje celular específico.

Por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 10, 11 y 12 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se expandieron y mantuvieron en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares son pluripotentes, como se demuestra *in vitro* mediante diferenciación directa de las células madre pluripotentes en progenitores neuronales del linaje celular del ectodermo (Figuras 17A-C, Ejemplo 10), células madre mesenquimatosas del linaje del mesodermo (Figuras 18A-C, Ejemplo 11) y células que expresan PDX1 del linaje celular del endodermo (Figuras 20A-B, Ejemplo 12).

Se desvela en el presente documento un método para generar células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes. El método se efectúa (a) cultivando las células madre pluripotentes para obtener de este modo células madre indiferenciadas, expandidas; y (b) sometiendo las células madre indiferenciadas, expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje, generando de este modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes.

A continuación se presentan ejemplos no limitantes de condiciones de cultivo que son adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes (por ejemplo, ESC y células iPS).

Pueden generarse células estromales mesenquimatosas que son CD73 positivas y SSEA-4 negativas a partir de hESC aumentando mecánicamente la fracción de células diferenciadas de tipo fibroblasto formadas en cultivos de hESC, esencialmente como se describe en Trivedi P y Hematti P. Exp Hematol. 2008, 36(3):350-9. En resumen, para inducir la diferenciación de hESC, los intervalos entre los cambios medios se aumentan a 3-5 días y las células en la periferia de las colonias de ESC se convierten en células fusiformes con aspecto de fibroblastos. Después de 9-10 días en estas condiciones, cuando aproximadamente el 40-50 % de las células en el cultivo adquieren la apariencia de fibroblastos, las porciones indiferenciadas de colonias de ESC se retiran físicamente y las células diferenciadas restantes se pasan a nuevas placas de cultivo en las mismas condiciones.

Para inducir la diferenciación de hESC en neuronas dopaminérgicas (DA), las células pueden cultivarse conjuntamente con las líneas celulares estromales de ratón PA6 o MS5 o pueden cultivarse con una combinación de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12), pleiotrofina (PTN), factor de crecimiento de tipo insulina 2 (IGF2) y efrina B1

(EFNB1) esencialmente como se describe en Vazin T, *et al.*, PLoS One. 12 de agosto de 2009; 4(8): e6606; y en Elkabetz Y., *et al.*, Genes Dev. 15 de enero de 2008; 22: 152-165.

Para generar neuronas de dopamina mesencefálica (mesDA), las hESC pueden modificarse genéticamente para expresar el factor de transcripción Lmx1a (por ejemplo, usando un vector lentivírico con el promotor PGK y Lmx1a) esencialmente como se describe en Friling S., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106: 7613-7618.

Para generar epitelio pulmonar (neumocitos de tipo II) a partir de hESC, las ESC se pueden cultivar en presencia de un medio de cultivo celular disponible en el mercado (medio de cultivo de las vías respiratorias pequeñas; Cambrex, College Park, MD) o, como alternativa, en presencia de un medio acondicionado recogido de una línea celular de neumocitos (por ejemplo, la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549) como se describe en Rippon HJ., *et al.*, Proc Am Thorac Soc. 2008; 5: 717-722.

Para inducir la diferenciación de hESC o células iPS humanas en células neurales, las células madre pluripotentes pueden cultivarse durante aproximadamente 5 días en presencia de un medio de reemplazo de suero complementado con inhibidor de TGF- β (SB431542, Tocris; por ejemplo, 10 nM) y nogina (R&D; por ejemplo, 500 ng/ml), después de lo cual las células se cultivan con cantidades crecientes (por ejemplo, 25 %, 50 %, 75 %, cambiado cada dos días) de medio N2 (Li XJ., *et al.*, Nat Biotechnol. 2005, 23: 215-21) en presencia de nogina 500 ng/ml, esencialmente como se describe en Chambers SM., *et al.*, Nat Biotechnol. 2009, 27: 275-280.

Para inducir la diferenciación de hESC o células iPS humanas en progenitores neurales, las células se cultivan en suspensión, después de lo cual los factores de inhibición de la diferenciación se retiran del medio de cultivo y se añade ácido retinoico 5×10^{-5} M durante 21 días. Después, las células se transfieren a placas recubiertas con fibronectina y se cultivan durante 5 días adicionales antes de recoger las células para su análisis. Q-PCR e inmunotinciones confirman la presencia de células progenitoras neuronales (véase el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos a continuación).

Para inducir la diferenciación de hESC o células iPS humanas en células del endodermo (incluyendo células productoras de insulina), los factores de inhibición de la diferenciación se retiran del medio de cultivo de las células madre pluripotentes y las células se exponen a Activina 10 ng/ml durante 48 horas, en medio que contiene aumentadores de AMPc como forskolina, 8-bromoAMPc, GABA, IBMX y DBC. Diez días después, las células se analizan para determinar los marcadores endodérmicos. Q-PCR para Sox17 demuestra aumento significativo en la expresión de Sox17 en células tratadas en comparación con los controles no tratados (véase el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos a continuación).

Para inducir la diferenciación de hESC o células iPS humanas en células madre mesenquimatosas (MSC), las células madre pluripotentes se transfieren a medio que contiene suero durante 14 días y después se siembran en gelatina o Matrigel. 7-14 días después, las células se diferencian en MSC, que pueden congelarse o pasarse usando al mismo tiempo tripsina.

Además de los cultivos primarios específicos de linaje, los EB como se describen en el presente documento pueden usarse para generar líneas celulares específicas de linaje que tienen capacidad de expansión ilimitada en cultivo.

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

Como se describe en el Ejemplo 11 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se cultivan en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden diferenciarse adicionalmente en células del linaje mesodérmico en un cultivo en suspensión (3-D) o en un sistema de cultivo bidimensional.

Como se describe en el Ejemplo 11 de la sección de Ejemplos a continuación, los presentes inventores han descubierto un nuevo método para diferenciar las células madre pluripotentes de las células madre mesenquimatosas en suspensión.

También se desvela en el presente documento un método para generar una célula madre mesenquimatosas en un cultivo en suspensión. El método se efectúa cultivando las células madre pluripotentes (por ejemplo, las PSC que se cultivan en suspensión como células individuales desprovistas de agregados) en un cultivo en suspensión en condiciones adecuadas para la diferenciación de células madre pluripotentes en células madre mesenquimatosas, generando de este modo la célula madre mesenquimatosas en el cultivo en suspensión.

Se puede usar cualquier medio de cultivo conocido adecuado para diferenciar células madre pluripotentes en MSC.

Los presentes inventores han descubierto que los siguientes medios de cultivo son adecuados para la diferenciación

de células madre pluripotentes en células madre mesenquimatosas:

(1) Medio Fy enriquecido; que consiste en DMEM/F12 al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero knockout al 10 %, suero fetal bovino al 10 % (FBS; HyClone o Biological Industries) L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa);

(2) Medio MeSus I: que consiste en DMEM al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene FBS al 20 % (HyClone o Biological Industries) L-glutamina 2 mM, (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa);

(3) Medio MeSus II: que consiste en α MEM al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene FBS al 20 % (HyClone o Biological Industries) L-glutamina 2 mM, (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa);

(4) Medio MeSus III: que consiste en DMEM/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), ITS al 1 % (Invitrogen) L-glutamina 2 mM, (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa).

Los presentes inventores han descubierto que las condiciones de cultivo deberían incluir una transferencia gradual de las células madre pluripotentes del cultivo en suspensión con medio indiferenciado a un cultivo en suspensión con el medio de diferenciación MSC. A continuación se presentan métodos no limitantes para transferir las células madre pluripotentes al medio de diferenciación:

I. (i) 25 % de medio de diferenciación 75 % de pCM100F para un pase; (ii) 50 % de medio de diferenciación 50 % de pCM100F para un pase; (iii) 75 % de medio de diferenciación 25 % de pCM100F para un pase; (iv) 100 % de medio de diferenciación.

II. (i) 50 % de medio de diferenciación 50 % de pCM100F para un pase; (ii) 75 % de medio de diferenciación 25 % de pCM100F para un pase; (iii) 100 % de medio de diferenciación

III. (i) 50 % de medio de diferenciación 50 % de pCM100F para un pase; (ii) 100 % de medio de diferenciación.

También se desvela en el presente documento una población aislada de células madre mesenquimatosas (MSC) en un cultivo en suspensión generado por el método descrito en el presente documento.

Al menos aproximadamente 30 % (por ejemplo, 30 %), al menos aproximadamente 35 % (por ejemplo, 35 %), al menos aproximadamente 40 % (por ejemplo, 40 %), al menos aproximadamente 45 % (por ejemplo, 45 %), al menos aproximadamente 50 % (por ejemplo, 50 %), al menos aproximadamente 55 % (por ejemplo, 55 %), al menos aproximadamente 60 % (por ejemplo, 60 %), al menos aproximadamente 65 % (por ejemplo, 65 %), al menos aproximadamente 70 % (por ejemplo, 70 %), al menos aproximadamente 75 % (por ejemplo, 75 %), al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, 80 %), al menos aproximadamente 81 % (por ejemplo, 81 %), al menos aproximadamente 82 % (por ejemplo, 82 %), al menos aproximadamente 83 % (por ejemplo, 83 %), al menos aproximadamente 84 % (por ejemplo, 84 %), al menos aproximadamente 85 % (por ejemplo, 85 %), al menos aproximadamente 86 % (por ejemplo, 86 %), al menos aproximadamente 87 % (por ejemplo, 87 %), al menos aproximadamente 88 % (por ejemplo, 88 %), al menos aproximadamente 89 % (por ejemplo, 89 %), al menos aproximadamente 90 % (por ejemplo, 90 %), al menos aproximadamente 91 % (por ejemplo, 91 %), al menos aproximadamente 92 % (por ejemplo, 92 %), al menos aproximadamente 93 % (por ejemplo, 93 %), al menos aproximadamente 94 % (por ejemplo, 94 %), al menos aproximadamente 95 % (por ejemplo, 95 %), al menos aproximadamente 96 % (por ejemplo, 96 %), al menos aproximadamente 97 % (por ejemplo, 97 %), al menos aproximadamente 98 % (por ejemplo, 98 %), al menos aproximadamente 99 % (por ejemplo, 99 %), por ejemplo, 100 % de las MSC generadas por el método pueden caracterizarse por una identificación de expresión CD73+/CD31-/CD105+.

Las MSC pueden tener capacidad de diferenciación en un cultivo en suspensión en un linaje celular seleccionado del grupo que consiste en un linaje adipogénico, un linaje osteoblástico y un linaje condrogénico.

Como se describe en el Ejemplo 10 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se cultivan en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden diferenciarse adicionalmente en células del linaje ectodérmico en un cultivo en suspensión (3-D) o en un sistema de cultivo bidimensional.

También se desvela un método para generar una célula progenitora neuronal en un cultivo en suspensión, que comprende cultivar las células madre pluripotentes descritas en el presente documento (por ejemplo, las células madre pluripotentes que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares) en un cultivo en suspensión en condiciones adecuadas para la diferenciación de células progenitoras neuronales, generando de este modo la célula progenitora neuronal en el cultivo en suspensión.

Se puede usar cualquier medio de cultivo conocido adecuado para diferenciar células madre pluripotentes en células progenitoras neuronales. Los ejemplos no limitantes incluyen un medio que contiene ácido retinoico (10^{-3} M) o nogina (10 ng/ml), esencialmente como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales".

También se desvela una población aislada de células progenitoras neuronales en un cultivo en suspensión generado por los métodos descritos en el presente documento.

5 Como se describe en el Ejemplo 12 de la sección de Ejemplos a continuación, las células madre pluripotentes que se cultivan en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares pueden diferenciarse adicionalmente en células del linaje endodérmico en un cultivo en suspensión (3-D) o en un sistema de cultivo bidimensional.

10 También se desvela en el presente documento un método para generar una célula endodérmica en un cultivo en suspensión, que comprende cultivar las células madre pluripotentes descritas en el presente documento (por ejemplo, las células madre pluripotentes que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares) en un cultivo en suspensión en condiciones adecuadas para la diferenciación de las células madre pluripotentes en células endodérmicas, generando de este modo la célula endodérmica en el cultivo en suspensión.

15 Se puede usar cualquier medio de cultivo conocido adecuado para diferenciar células madre pluripotentes en células endodérmicas. Los ejemplos no limitantes incluyen un medio que contiene activina A (por ejemplo, a una concentración de 10 ng/ml), durante 24-48 horas, esencialmente como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales".

20 También se desvela en el presente documento una población aislada de células endodérmicas en un cultivo en suspensión generado por el método descrito en el presente documento.

25 Se apreciará que, ya que las células específicas de linaje o las líneas celulares obtenidas según las enseñanzas del presente documento se desarrollan mediante procesos de diferenciación similares a los que se producen de manera natural en el embrión humano, se pueden usar adicionalmente para terapia basada en células humanas y regeneración de tejidos.

30 Por tanto, Se prevé el uso de las células o líneas celulares específicas de linaje expandidas y/o diferenciadas descritas en el presente documento para tratar un trastorno que requiere terapia de reemplazo celular (terapia basada en células).

35 Por ejemplo, se pueden usar precursores de oligodendrocitos para tratar trastornos de mielina (Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models. Molecular Medicine Today. 1997. págs. 554-561), se pueden usar condrocitos o células mesenquimatosas en el tratamiento de defectos óseos y cartilaginosos (patente de los Estados Unidos n.º 4.642.120) y se pueden usar células del linaje epitelial en la regeneración de la piel de una herida o quemadura (patentes de los Estados Unidos n.º 5.716.411).

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

45 La sobreexpresión o exclusión de genes puede efectuarse usando construcciones con inserción y/o inactivación [véase, por ejemplo, Fukushige, S. e Ikeda, J. E.: Trapping of mammalian promoters by Cre-lox site-specific recombination. DNA Res 3 (1996) 73-50; Bedell, M. A., Jerkins, N. A. y Copeland, N. G.: Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. Genes and Development 11 (1997) 1-11; Bermingham, J. J., Scherer, S. S., O'Connell, S., Arroyo, E., Kalla, K. A., Powell, F. L. y Rosenfeld, M. G.: Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. Genes Dev 10 (1996) 1751-62].

50 Las células específicas de linaje descritas en el presente documento pueden utilizarse para producir grandes cantidades (producción masiva) de proteínas tales como hormonas, citocinas, factores de crecimiento y fármacos. Por ejemplo, para producir las proteínas, se debería inducir que las células sobreexpresen la proteína mediante transfección, por ejemplo, y después de la expansión, la proteína podría aislarse del medio de cultivo.

60 Las células específicas de linaje descritas en el presente documento pueden utilizarse para preparar una biblioteca de ADNc. El ARNm se prepara mediante técnicas convencionales a partir de las células específicas de linaje y se transcribe posteriormente de forma inversa para formar ADNc. La preparación de ADNc puede sustraerse con nucleótidos de fibroblastos embrionarios y otras células de especificidad no deseada, para producir una biblioteca de ADNc sustraída mediante técnicas conocidas en este campo.

65 Las células específicas de linaje descritas en el presente documento pueden usarse para exploración de factores (tales

como fármacos de moléculas pequeñas, péptidos, polinucleótidos y similares) o condiciones (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a la diferenciación del precursor de linaje en células diferenciadas terminalmente (por ejemplo, para exploración de fármacos). Por ejemplo, sustancias que afectan el crecimiento, toxinas o factores de diferenciación potenciales pueden ensayarse mediante su adición al medio de cultivo.

Las células específicas de linaje descritas en el presente documento pueden usarse para preparar una vacuna. Por ejemplo, las células madre pluripotentes, o células diferenciadas a partir de las mismas, pueden inocularse con partículas víricas y cultivarse además en un medio adecuado hasta que se produzca lisis celular y se liberen en el medio partículas víricas recién producidas. Las células pueden usarse para la producción de virus atenuados que pertenecen a la familia de poxvirus, en particular virus de la viruela del canario, virus de la viruela aviar y virus vaccinia tal como el virus vaccinia nativo o recombinante [por ejemplo, virus vaccinia modificado Ankara tal como MVA disponible en el número de ATCC VR-1508] u otros ortopoxvirus]. Para una descripción adicional, véase solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20040058441.

El cultivo celular descrito en el presente documento o las células específicas de linaje generadas a partir del mismo pueden someterse a manipulación genética usando infección o transfección de un polinucleótido de interés. El polinucleótido puede incluirse en una construcción de ácido nucleico bajo la regulación de un promotor.

Se describen métodos para introducir el polinucleótido en células en Sambrook *et al.*, [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992)]; Ausubel *et al.*, [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)]; Chang *et al.*, [Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995)]; Vega *et al.*, [Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor MI (1995)]; Vectors [A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA (1988)] y Gilboa *et al.* [Biotechniques 4 (6): 504-512 (1986)] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores víricos recombinantes [por ejemplo, usando retrovirus, adenovirus (por ejemplo, vector derivado de adenovirus Ad-TK, Sandmair *et al.*, 2000. Hum Gene Ther. 11: 2197-2205), un vector de adenovirus/retrovirus quimérico que combina componentes retrovíricos y adenovíricos (Pan *et al.*, Cancer Letters 184: 179-188, 2002). Véase también la patente de los Estados Unidos 4.866.042 para vectores que implican el sistema nervioso central y también las patentes de los Estados Unidos 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positivo-negativo para inducir recombinación homóloga.

El término "ng" se refiere a nanogramo. El término "pg" se refiere a picogramo. El término "ml" se refiere a mililitro. El término "mM" se refiere a milimolar. El término "µM" se refiere a micromolar.

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

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero sin limitación".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método y la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicada.

Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias plural salvo que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de la presente solicitud, se puede presentar diversa información en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente desvelados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se entiende que incluye cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen los primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos

para realizar una tarea dada, incluyendo, pero sin limitación, esas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Ejemplos

- 10 La referencia a las líneas hESC y hEBC y su uso en los Ejemplos es solo por referencia y no es parte de la invención.

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en el presente documento incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente 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", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes de los Estados Unidos 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); "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 and Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en las mismas son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida en las mismas se incorpora en el presente documento por referencia.

MATERIALES GENERALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

- 40 *Líneas de células pluripotentes inducidas (iPS)* - líneas celulares iPS J1.2-3 (de fibroblastos de prepucio; Park *et al.*, Nature 451:P141-147, 2008); C2 y C3 (de fibroblastos de prepucio, Germanguz *et al.*, JCMM, 2009); iF4 (de fibroblastos cutáneos adultos) [Park *et al.*, 2008, Germanguz *et al.*, 2009]; KTN7 y KTN3 (de Kartenocytes, Novac-Petraro Cellular Reprograming, (en prensa); y KTR13 y KTR13.4 (de Kartenocytes; Novac-Petraro Cellular Reprograming, en prensa) se cultivaron con MEF inactivado como se ha descrito previamente [Park *et al.*, 2008].

- 45 *Líneas de células madre embrionarias humanas (hESC)* - líneas ESC humanas H9.2, 13, 13.2 y 16.2 (descritas en Amit *et al.*, J. Anatomy 2002); y líneas de ESC humanas H14, H7, H9 (líneas celulares de Wisconsin) se cultivaron como se ha descrito previamente [Amit *et al.*, 2000].

- 50 *Líneas celulares de blastocisto extendido humano (hEBC)* - Líneas celulares de blastocisto extendido humano (descritas en el documento WO2006/040763) J3 y J6 se cultivaron como se describe en Amit *et al.*, Dev Biol, 2000.

- Medios de cultivo* - Se ensayaron las siguientes combinaciones de medios de cultivo para determinar su capacidad de mantener el crecimiento de líneas iPS, hESC y hEBC en cultivos unidos (2D) o en cultivos en suspensión (tridimensionales, 3D):

- 55 yF10 - Medio de cultivo básico que consiste en DMEM/F12 al 85 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) knockout al 15 %, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % y factor de crecimiento de fibroblastos básico 10 ng/ml (bFGF) (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa). Este medio de cultivo básico se usó como control y para el cultivo rutinario de células iPS y hESCs con MEF inactivado o fibroblastos de prepucio como capas alimentadoras en cultivos 2D.

- 60 yFIL25 - medio básico (yF10) con la adición de interleucina 6 (IL6) 25 ng/ml y receptor soluble de IL6 (R&D Biosystems, Mineápolis, MN, EE.UU.). Cabe mencionar que se puede usar cualquier agonista de gp130 tal como Oncostatina, IL11 en lugar de IL6.

- NCM100F - medio básico (yF10) en el que, en lugar de reemplazo de suero knockout, el reemplazo de suero es el reemplazo de suero sin componentes de origen animal (Invitrogen Corporation, Knockout SR sin xeno, número de catálogo 12618). Además, el medio NCM100F incluyó 100 ng/ml de IL6RIL6 [quimera de IL6-receptor de IL6 (SEQ ID NO: 19; que se describió en Chebath J, *et al.*, 1997 y documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*]. La IL6RIL6 de 85 Kda fue producida y purificada (Seron International SA, Ginebra, Suiza) y fue donada por el grupo Merck-Seron (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).
- NCM100Fp - medio básico (yF10) en el que, en lugar de reemplazo de suero knockout, el reemplazo de suero es el reemplazo de suero sin componentes de origen animal (Invitrogen Corporation, Knockout SR sin xeno número de catálogo 12618). Además, el medio NCM100Fp incluyó 100 pg/ml de IL6RIL6.
- ILCNTF - medio básico (yF10) complementado con interleucina 11 1 ng/ml (IL11; R&D Biosystems, número de catálogo 18-IL) y factor neurotrófico ciliar (CNTF; R&D Biosystems, número de catálogo 257-NT).
- NILCNTF - medio básico (yF10) en el que, en lugar de reemplazo de suero knockout, el reemplazo de suero es el reemplazo de suero sin componentes de origen animal (Invitrogen Corporation, Knockout SR sin xeno, número de catálogo 12618) y complementado con IL11 1 ng/ml y CNTF (R&D Biosystems).
- cmV5b - bFGF 10 ng/ml (Invitrogen corporation), quimera de IL6-receptor de IL6 100 ng/ml en medio Nutristem (Biological Industries).
- cmV5bp - bFGF 10 ng/ml (Invitrogen corporation), quimera de IL6-receptor de IL6 100 pg/ml en Nutristem (Biological Industries).
- cmTeSR - quimera IL6-receptor de IL6 100 ng/ml en medio mTeSR (StemCell Technologies).
- cmTeSRp - quimera de IL6-receptor de IL6 100 pg/ml en mTeSR (StemCell Technologies).
- cmTeSR2 - quimera de IL6-receptor de IL6 100 ng/ml en TeSR2 (Tecnologías StemCell).
- cmTeSR2p - quimera de IL6-receptor de IL6 100 pg/ml en TeSR2 (StemCell Technologies).
- cmHA13 DMEM/F12 al 85 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero SR3 al 1 % (Sigma), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 50 µg/ml, mezcla de lípidos al 1 % y bFGF 10 ng/ml y la quimera de IL6-receptor de IL6 a 100 ng/ml. La IL6RIL6 85 Kda se produjo y se purificó como se ha descrito y fue donada por el grupo Merck-Seron (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa).
- cmHA13p DMEM/F12 al 85 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero SR3 al 1 % (Sigma), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 50 µg/ml, mezcla de lípidos al 1 % y bFGF 10 ng/ml y la quimera de IL6-receptor de IL6 a 100 pg/ml. La IL6RIL6 85 Kda se produjo y se purificó como se ha descrito y fue donada por el grupo Merck-Seron (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa).
- CMrb100F - que incluye medio básico (yF10); la concentración de bFGF se aumentó a 100 ng/ml, 100 ng/ml de la IL6RIL6 (quimera de IL6-receptor de IL6; que se describió en Chebath J, *et al.*, 1997 y documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*). La IL6RIL6 de 85 Kda fue producida y purificada (Seron International SA, Ginebra, Suiza) y fue donada por el grupo Merck-Seron (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).
- CMrb100Fp - que incluye medio básico (yF10); la concentración de bFGF se aumentó a 100 ng/ml, 100 pg/ml de la IL6RIL6 (quimera de IL6-receptor de IL6; que se describió en Chebath J, *et al.*, 1997 y documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*). La IL6RIL6 de 85 Kda fue producida y purificada (Seron International SA, Ginebra, Suiza) y fue donada por el grupo Merck-Seron (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).
- NCMrb100F - medio básico (yF10) en el que, en lugar del reemplazo de suero knockout, el reemplazo de suero es el reemplazo de suero sin componentes de origen animal (Invitrogen Corporation, SR Knockout sin xeno número de catálogo 12618) y la concentración de bFGF se aumentó a 100 ng/ml. Además, 100 ng/ml de la IL6RIL6 (quimera de IL6-receptor de IL6; que se describió en Chebath J, *et al.*, 1997 y documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*). La IL6RIL6 de 85 Kda fue producida y purificada (Seron International SA, Ginebra, Suiza) y fue donada por el grupo Merck-Seron (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).
- NCMrb100Fp - medio básico (yF10) en el que, en lugar del reemplazo de suero knockout, el reemplazo de suero es el reemplazo de suero sin componentes de origen animal (Invitrogen Corporation, SR Knockout sin xeno número de catálogo 12618) y la concentración de bFGF se aumentó a 100 ng/ml. Además, el medio NCM100F incluía 100 pg/ml de la IL6RIL6 (quimera de IL6-receptor de IL6; que se describió en Chebath J, *et al.*, 1997 y documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*). La IL6RIL6 de 85 Kda fue producida y purificada (Seron International SA, Ginebra, Suiza) y fue donada por el grupo Merck-Seron (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).

Cultivo en sistemas de cultivo bidimensionales - Para el sistema de cultivo sin capa alimentadora, se usaron las matrices extracelulares Matrigel (BD Biosciences) o fibronectina humana (Millipore, Billerica, MA).

Inicio de cultivo en suspensión - Para iniciar cultivos en suspensión, las células iPS o ES se retiraron de su placa de cultivo usando colagenasa de tipo IV 1,5 mg/ml (Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.) o usando un rascador, se rompieron adicionalmente en pequeños agregados con puntas de pipeta Gilson de 200 - 1000 µl y se cultivaron en suspensión en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania) a una densidad celular de 1×10^6 - 5×10^6 células/placa. Las placas de Petri se mantuvieron estáticas en una incubadora a 37 °C en CO₂ al 5 %. El medio en el cultivo en suspensión se cambió diariamente y las células se pasaron cada 5-7 días, ya sea por corte manual de los agregados con agujas de 27 g (solo en los pases 1-3) o por pipeteo suave usando puntas de pipeta Gilson de 200-1000 µl. Como alternativa, las células se pasaron usando tripsina EDTA (0,25 %, Biological Industries, Beit Haemek, Israel) combinado con tratamiento de una hora con inhibidor de ROCK 10 M (EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA, EE.UU.) antes de la incubación con tripsina.

Cultivo en matraces de agitación - Se transfirieron agregados celulares cultivados en placa de Petri durante al menos un pase a un matraz de agitación de 250 ml en el medio ensayado, se agitaron continuamente a 40-110 revoluciones por minuto (rpm) usando una placa magnética y se colocaron en la incubadora. El medio se cambió cada 1-3 días. Cada 5-7 días, los agregados se dividieron en una relación de 1:2-1:4.

Cultivo en un biorreactor controlado - Las células se cultivaron en un biorreactor controlado Biostat® Cultibag RM (Sartorius North America, Edgewood, Nueva York, EE.UU.) (Bolsa de 2 litros con 1 litro). Los parámetros del reactor incluyeron la velocidad de inclinación: 16 revoluciones por minuto (rpm); ángulo de 7°; Temperatura: 37 °C, pH: 7-7,4, concentración de O₂: 50 %;

Inmunohistoquímica - Para inmunotinción fluorescente, las hESC indiferenciadas cultivadas en suspensión o recultivadas en MEF se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se expusieron a los anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C. Se usaron anticuerpos conjugados con Cys 3 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.) como anticuerpos secundarios (dilución 1:200). Los anticuerpos primarios (dilución 1:50) incluyen SSEA 1, 3 y 4 (Hybridoma Bank, Iowa, EE.UU.), TRA1-60 y TRA1-81 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.), Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), Marcador de oligodendrocitos (O4; de R&D Biosystems), Proteína ácida fibrilar glial (GFAP; de Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), β-tubulina (Covance, Princeton, Nueva Jersey, EE.UU.), nestina (Chemicon, Intl, Inc. Temecula, CA, EE.UU.), PDX1 (el anticuerpo primario es anti PDX1 humano de cabra; se usaron dos anticuerpos secundarios: anti-IgG de cabra de conejo conjugado con FLUOR (verde) o NL557 de burro anti cabra (rojo), todos de R&D Biosystems).

Análisis de citometría de flujo - Las esferas de hPSC cultivadas en suspensión se disociaron en células individuales usando tryPLE (Invitrogen Corporation products, Grand Island, NY, EE.UU.). Las células individuales se pipetearon arriba y abajo con una punta de pipeta de 200 µl. Las células se tiñeron con Ab anti-h/mSSEA4, anti-h/mSSEA1, h/mTRA-160, h/mTRA1-81 conjugado con ficoeritrina, se usó IgG2B de rata conjugado con ficoeritrina como control de isotipo (a menos que se indique otra cosa, todos los anticuerpos se adquirieron de sistemas de R&D systems, Mineápolis, MN, EE.UU.). Las células teñidas se analizaron después con citómetro de flujo FACS calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.) usando software CellQuest según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos anti-CD73 (BD Pharmingen), CD146 (BD Pharmingen), CD105 (BioScience), CD44 (BioScience), CD45 y CD31 (BD Pharmingen).

Análisis de cariotipo - Se realizó análisis de cariotipo (bandas G) en al menos 10 células de cada muestra, dos muestras por ensayo, como se ha descrito previamente [Amit *et al*, 2003]. Los cariotipos se analizaron y presentaron según el "Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética Humana" (ISCN).

Formación de cuerpos embrioides (EB) - Para la formación de EB, se pasaron hESC y células iPS como se ha descrito y se transfirieron a placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Los EB se cultivaron en un medio que constaba de DMEM/F12 al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (HyClone, Utah, EE.UU.), reemplazo de suero (SR) al 10 %, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM y reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % (Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Se recogieron EB de 10-14 días para aislamiento de ARN y examen histológico. Para el análisis histológico, los EB se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 %, se deshidrataron en alcohol graduado (70 %-100 %) y se incluyeron en parafina. Se desparafinaron secciones de 1-5 µm y se tiñeron con hematoxilina/eosina (HE).

Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT PCR) - Se aisló ARN total de hESC y células iPS cultivadas durante al menos 5 pases en suspensión (tridimensional, 3D) o en 2 dimensiones (2D) en el medio ensayado y a partir de EB de 10-21 días (formados a partir de células cultivadas en suspensión o células cultivadas en 2D) usando Tri-Reagent (Sigma, St. Louis MO, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total usando transcriptasa inversa MMLV RNasa H menos (Promega, Madison WI, EE.UU.). Las reacciones de PCR incluyeron desnaturalización durante 5 minutos a 94 °C seguido de ciclos repetidos (el número de ciclos se indica en la Tabla 1 a continuación) de: desnaturalización a 94 °C durante 30

segundos, hibridación a una temperatura de hibridación específica (como se indica en la Tabla 1 a continuación) y en presencia de una concentración específica de MgCl₂ (como se indica en la Tabla 1, a continuación) durante 30 segundos; y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Los cebadores de PCR y las condiciones de reacción utilizadas se describen en la Tabla 1. Los productos de PCR se fraccionaron por tamaño usando electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se usaron marcadores de ADN para confirmar el tamaño de los fragmentos resultantes.

5

Tabla 1

Cebadores y condiciones de RT-PCR			
Producto genético (número de referencia de GenBank); SEQ ID NO:	Cebadores directos (F) e inversos (R) (5'→3')	Condiciones de reacción	Tamaño del producto de PCR [[pares de bases (pb)]]
Oct-4 (S81255); SEQ ID NO: 1	F: GAGAACAATGAGAACCTTC AGGA (SEQ ID NO:2) R: TTCTGGCGCCGGTTACAGA ACCA (SEQ ID NO:3)	30 ciclos; temperatura de hibridación: 60 °C; concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	219
Nanog (NM 024865.2); SEQ ID NO: 4	F: ACTAACATGAGTGTGGATC C (SEQ ID NO:5) R: TCATCTTCACACGTCTTCA G (SEQ ID NO:6)	30 ciclos; temperatura de hibridación: 61 °C; concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	929
Rex1 (AF450454); SEQ ID NO: 7	F: GCGTACGCAAATTAAGTC CAGA (SEQ ID NO:8) R: CAGCATCCTAAACAGCTCG CAGAAT (SEQ ID NO:9)	30 ciclos; temperatura de hibridación: 56 °C; concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	306
FGF4 (NM_002007); SEQ ID NO: 10	F: CTACAACGCCTACGAGTCC TACA (SEQ ID NO:11) R: GTTGCACCAGAAAAGTCAG AGTTG (SEQ ID NO:12)	30 ciclos; temperatura de hibridación: 52 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	370
Sox2 (Z31560); SEQ ID NO: 13	F: CCCCCGGCGGCAATAGCA (SEQ ID NO:14) R: TCGGCGCCGGGAGATAC AT (SEQ ID NO:15)	30 ciclos; temperatura de hibridación: 60 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	448
GAPDH (NM_002046); SEQ ID NO: 16	F:AATCCCATCACCATCTTC CA (SEQ ID NO:17) R:GCCTGCTTCACCACCTTC T (SEQ ID NO:18)	23 ciclos; temperatura de hibridación: 60 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	581

(continuación)

<i>Cebadores y condiciones de RT-PCR</i>			
<i>Producto genético (número de referencia de GenBank); SEQ ID NO:</i>	<i>Cebadores directos (F) e inversos (R) (5'→3')</i>	<i>Condiciones de reacción</i>	<i>Tamaño del producto de PCR [(pares de bases (pb)]</i>
PAX6 (NM_001127612); SEQ ID NO: 20	F: AACAGACACAGCCCTCACA AACA (SEQ ID NO:21); R: CGGGAAGTTGAACTGGAAC TGAC (SEQ ID NO:22)	35 ciclos; temperatura de hibridación: 65 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	274
Nestina (NM_006617.1); SEQ ID NO: 23	F: CAGCTGGCGCACCTCAAGA TG (SEQ ID NO:24); R: AGGGAAGTTGGGCTCAGG ACTGC (SEQ ID NO:25)	35 ciclos; temperatura de hibridación: 65 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	210
HNF (NM_005382); SEQ ID NO: 26	F: GAGCGCAAAGACTACCTG AAGA (SEQ ID NO:28); R: CAGCGATTTCTATATCCAG AGCC (SEQ ID NO:27);	35 ciclos; temperatura de hibridación: 65 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	430
Lhx2 (NM_004789.3); SEQ ID NO: 29	F: CCAAGGACTTGAAGCAGCT C (SEQ ID NO:30); R: TGCCAGGCACAGAAGTT AAG (SEQ ID NO:31)	35 ciclos; temperatura de hibridación: 64 °C concentración de MgCl ₂ : 1,5 mM	285

Tabla 1. Se proporcionan los nombres de genes (identificados por los números de referencia de GenBank y los identificadores de secuencia) junto con los cebadores (secuencias e identificadores de secuencia) usados para detectar el nivel de expresión de los transcritos de los genes. También se proporcionan las condiciones de PCR y los productos de PCR resultantes.

RT-PCR en tiempo real - Se extrajo ARN usando TriReagent (Talron) de células que se cultivaron en 2-D, en un cultivo en suspensión como agregados celulares o en un cultivo en suspensión como células individuales. El ARN se sometió después a RT-PCR en tiempo real usando la mezcla de RT (Applied Biosystems) y los cebadores proporcionados en la Tabla 2, a continuación en el presente documento (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante.

Tabla 2

<i>Cebadores de RT-PCR en tiempo real</i>			
<i>Símbolos génicos</i>	<i>Número de ID del gen</i>	<i>Nombre completo del gen</i>	<i>Número de catálogo</i>
Oct4	ID: 5460	POU5F1	00999632
NANOG	ID: 79923	Nanog	02387400
Rex1	ID: 132625	ZFP42	00381890
Sox2	ID: 6657	Sox2	01053049
FN1	ID: 2335	Fibronectina 1	01549976
THBS4	ID: 7060	Trombospondina	00170261
CTNNB1	ID: 1499	Beta catenina	00355049
CDH2	ID: 1000	N-cadherina	00983062
CDH1	ID: 999	E-cadherina	00170423
CLDN18	ID: 51208	Claudina 18	00212584

(continuación)

Cebadores de RT-PCR en tiempo real			
CLDN6	ID: 9074	Claudina 6	00607528
ITGA2	ID: 3673	Integrina alfa 2	01041011
ITGB5	ID: 3693	Integrina beta 5	00174435
EGFR	ID: 1956	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	01076091
FBLN5	ID: 10516	Fibulina 5	00197064
PLXNA2	ID: 5362	Plexina A2	00300697
ITGA7	ID: 3679	Integrina alfa 7	01056475
ITGA6	ID: 3655	Integrina, alfa 6	01041011

Tabla 2. Se proporcionan los símbolos génicos, su número de ID del gen (protocolo de transferencia de hipertexto://World Wide Web (punto) ncbi (punto).nlm (punto) nih (punto) gov/gene/), el nombre completo del gen y el número de catálogo de Applied Biosystems de los cebadores utilizados para RT-PCR en tiempo real.

Formación de teratoma - Se recogieron células de cuatro a seis placas de 58 mm, 3-6 pocillos en placa de 6 pocillos o 20 ml de un cultivo en suspensión y se inyectaron en los músculos de las extremidades posteriores de machos de cuatro semanas de edad de ratones beige con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Diez semanas después de la inyección, se recogieron los teratomas resultantes y se prepararon para el análisis histológico usando el mismo método mencionado para los EB.

Prueba de la eficacia de clonación de las células madre pluripotentes (PSC) - Las PSC se cultivaron en 2-D, en un cultivo en suspensión como agregados celulares o en un cultivo en suspensión como células individuales y se ensayaron para determinar su capacidad de clonación de la siguiente manera, en donde para cada grupo de tratamiento, se realizaron 6 repeticiones de 96 células.

Clonación de cultivos 2D con MEF: Las células H7 se tripsinizaron con tripsina al 0,05 % EDTA 0,53 mM (Invitrogen) a células individuales. Cada célula individual se sembró en un pocillo separado en una placa de 96 pocillos (Nunc) cubierta con MEF inactivados mitóticamente. Se clonaron 96 células en cada repetición biológica añadiendo al mismo tiempo inhibidor de Rock 10 µM/ml. 10 días después de la siembra, se calculó el número de colonias resultantes. Se recogieron tres colonias por pase usando colagenasa de tipo IV 1 mg/ml y dispasa 10 mg/ml (ambas de GibcoBRL). Los cultivos clonados se cultivaron en medio pCM100F [que contiene DMEM/F12 al 85 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) knockout al 15 %, L-glutamina 2 mM, b-mercaptoetanol 0,1 mM, reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % y bFGF 4 ng/ml (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa) complementado con quimera IL6RIL6 100 pg/ml] y se pasaron rutinariamente cada 5-7 días con colagenasa de tipo IV 1 mg/ml. Después de la expansión en cultivo, los 3 clones resultantes se examinaron para determinar ESC características.

Clonación de cultivos 3D como células individuales: Se usaron células H7 cultivadas como células individuales en suspensión. Cada célula individual se sembró en un pocillo separado de baja unión en una placa de 96 pocillos (Nunc) o en placas cubiertas con MEF. Se clonaron 96 células en cada repetición biológica con o sin la adición de inhibidor de Rock 10 µM/ml como se describe en la Tabla 4 en el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos a continuación. 10 días después de la siembra, se calculó el número de colonias resultantes. Se recogieron tres colonias con una punta de 200 µl. Los cultivos clonados se cultivaron en medio pCM100F que contenía reemplazo de suero, quimera IL6-receptor de IL6 y bFGF 4 ng/ml y se pasaron habitualmente por pipeta cada 5-7 días. Después de la expansión en cultivo, se examinaron los 3 clones resultantes para determinar las ESC características.

Eficacia de congelación y descongelación - Las células se congelaron usando una de las siguientes soluciones de congelación:

1. Solución de congelación de suero y animales (Biological Industries).
2. DMEM complementado con DMSO al 10 % y FBS al 20 %.
3. DMEM complementado con DMSO al 10 % y SR al 30 %.

Después de 1-7 días en frigorífico a -80 °C (usando el congelador) los viales se transfirieron a nitrógeno líquido. Se descongelaron las células y se ensayó la viabilidad mediante tinción con azul de tripano. Se realizaron tres experimentos separados.

Manipulación genética - Las células se transfectaron usando el siguiente vector: CMV promotor-GFP (basado en el plásmido N1). Se usaron los siguientes métodos:

1. Electroporación usando electroporador BTX ECM 2001 con los siguientes parámetros: 40 µg de ADN, 10⁷ células, 3-6 mSc, 220V.

2. Reactivo de transfección Eugene 6 (Roche) o Lipofectamine (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante (40 µg de ADN para 10⁶ células).

Diferenciación neural - Para inducir la diferenciación neural, se transfirieron células individuales cultivadas en suspensión a un medio sin bFGF y la quimera IL6RIL6. Se añadieron ácido retinoico (10⁻³ M) o nogina (10 ng/ml) durante tres a siete días. Tres semanas después de la inducción de diferenciación, las células se sembraron en placas para teñirlas con fibronectina. Las células se tiñeron para O4 (marcador de oligodendrocitos), GFAP (proteína ácida fibrilar glial), nestina y β-tubulina.

Medios usados para la diferenciación de MSC en suspensión en linajes celulares adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos:

Medio adipogénico - DMEM F-12 complementado con FBS al 10 %, L-glutamina 1 mM, IBMX 0,5 mM, insulina 10 µg/ml, Dexametasona 10⁻⁶ M, Indometacina 0,1 mM.

Medio osteogénico - GMEM BHK-21 complementado con FBS al 10 %, piruvato sódico al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, ácido L-ascórbico 50 µg/ml, β-mercaptoetanol 0,1 mM, β-glicerol-fosfato 10 mM y dexametasona 0,1 µM.

Medio condrogénico - DMEM complementado con dexametasona 10⁻⁷ M, ITS al 1 %, ácido L-ascórbico 50 µg/ml, piruvato sódico 1 mM, L-prolina 4 mM y TGFβ3 10 ng/ml.

Protocolos de diferenciación de MSC en suspensión en linajes celulares adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos:

Procedimiento de diferenciación para diferenciación adipogénica y tinción con Oil Red O - Se sembraron MSC en una densidad de 20.000 células/cm² en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio adipogénico durante 4 semanas con cambios de medio dos veces a la semana.

La diferenciación adipogénica se evaluó mediante la observación de la acumulación de vacuolas ricas en lípidos dentro de las células después de la tinción con Oil Red O.

Tinción con Oil Red O - Las células se aclararon una vez con PBS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 minutos, se aclararon de nuevo y se tiñeron con solución de Oil Red O durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución de tinción y las células se lavaron 5 veces con agua.

Procedimiento de diferenciación para diferenciación osteogénica y tinción con rojo de alizarina - Se sembraron MSC en una densidad de 2000-3000 células/cm² en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio osteogénico durante 4 semanas con cambios de medio dos veces a la semana. Los cultivos de células se ensayaron para determinar el contenido mineral mediante tinción con rojo de alizarina.

Tinción con rojo de alizarina: Las células se aclararon una vez con PBS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 minutos, se aclararon de nuevo y se tiñeron con solución de rojo de alizarina al 2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución de tinción y las células se lavaron varias veces con agua.

Procedimiento de diferenciación para diferenciación condrogénica, tinción con hematoxilina y eosina y azul alcian - Para la diferenciación condrogénica, se centrifugaron 2x10⁵ MSC a 300 g durante 5 minutos en tubos de 15 ml de polipropileno Falcon para formar un sedimento celular. Las células se cultivaron en medio condrogénico durante 9 semanas con cambios de medio dos veces a la semana sin alterar la masa celular. Se realizaron secciones celulares después de fijar los sedimentos celulares con PFA al 4 % e incluirlos en agarosa de bajo punto de fusión (1,5 %).

Las tinciones con hematoxilina y eosina (HE) y azul alcian - fueron realizadas por el laboratorio de patología en el Centro Médico Rambam.

Protocolos de diferenciación de MSC en suspensión - Se usaron los mismos medios adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos (descritos anteriormente en el presente documento) para diferenciar las MSC en suspensión, sin sembrar las MSC en un sistema de cultivo 2D.

EJEMPLO 1 (Ejemplo de referencia)

CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

El cultivo de células pluripotentes en suspensión tiene ventajas significativas sobre los cultivos convencionales, particularmente cuando se intenta obtener grandes cantidades de células para trasplante de células y tejidos. Para iniciar cultivos en suspensión a partir de células pluripotentes cultivadas con MEF o en condiciones sin capa alimentadora [Amit *et al*, 2004], se emplearon varios factores de crecimiento y citocinas. Se usaron células pluripotentes de diferentes fuentes: células iPS de recién nacido (fibroblastos de prepucio), células iPS de adultos

(fibroblastos) y hESC.

Resultados experimentales

Cultivos en suspensión - A las 24 horas después de colocarse en un cultivo en suspensión en presencia de los siguientes medios de cultivo: yFIL25, NCM100F, NCM100Fp, ILCNTF, NILCNTF, cmV5b, cmV5bp, cmTeSR, cmTeSRp, cmTeSR2, cmTeSR2p, cmHA13, CMrb100F, CMrb100Fp, NCMrb100F o NCMrb100Fp, las células pluripotentes crearon agregados de esferoides o estructuras en forma de disco que, tras un examen histológico, revelaron una población homogénea de células pequeñas con núcleos grandes. Los esferoides crecieron y se dividieron mecánicamente cada 5-7 días manteniendo al mismo tiempo su morfología, lo que permite la expansión de los cultivos en suspensión. Se encontraron ventajas en todos estos tipos de medio para el cultivo de ESC y células IPS en suspensión como células individuales o agregados pequeños de menos de 100 células.

Como alternativa, mediante el uso de tratamiento con inhibidor de tripsina-EDTA y ROCK, las células suspendidas pudieron disociarse en células individuales y aún formaron esferoides de la misma morfología y características, permitiendo de este modo una expansión celular eficaz. Las células sometidas al cultivo en suspensión con los medios de cultivo ensayados mostraron un comportamiento y morfología e histología de esferoides similares. Cuando se devolvieron al cultivo 2D con MEF o fibronectina después de al menos 5 pases en suspensión, todos los agregados de esferoides se adhirieron a los MEF o la matriz de fibronectina, respectivamente, y después de 24-48 horas demostraron la morfología típica de las colonias de células pluripotentes, presentando una alta relación de núcleo con respecto a citoplasma con una notable presencia de uno a tres nucleolos y con separación normal entre las células.

Mantenimiento del fenotipo de células madre indiferenciadas - Se examinaron varios marcadores de superficie típicos de ESC y células IPS indiferenciadas de primates usando tinción inmunofluorescente esencialmente como se describe en Thomson *et al.*, 1998; Bhattacharya, *et al.* 2004; Kristensen *et al.*, 2005, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se descubrió que las células pluripotentes humanas cultivadas en suspensión con los medios ensayados durante al menos 5 pases siguen siendo muy positivas para SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 y Oct 4. Como en otras ESC de primates [Thomson *et al.*, 1995 y 1996] y con células cultivadas con MEF, la tinción para SSEA3 fue débil y la tinción para SSEA1 fue negativa. La tinción para marcadores de células madre se mantuvo alta cuando las células que se cultivaron en suspensión se devolvieron a cultivos 2D en capas de células alimentadoras MEF. Los análisis de RT-PCR mostraron que, de manera similar a las células cultivadas con MEF, las células pluripotentes cultivadas en suspensión durante al menos 5 pases expresaron marcadores genéticos de pluripotencia [King *et al.*, 2006] incluyendo Oct 4, Nanog, Sox2, Rex1, y FGF4. No se detectaron diferencias significativas en la expresión génica entre las células cultivadas en suspensión o con células re-cultivadas con MEF después de un cultivo continuo en suspensión.

Mantenimiento del cariotipo - Se llevó a cabo análisis del cariotipo mediante bandas de Giemsa en células después de al menos 7 pases en suspensión y se descubrió que las células presentaban cariotipo normal 46, XY o 46, XX. Por tanto, el cariotipo del cultivo celular en suspensión se mantuvo estable.

Pluripotencia - Después de expansión prolongada en cultivos en suspensión con el medio ensayado, las células pluripotentes conservaron su capacidad de diferenciación pluripotente. El potencial de desarrollo de las células se examinó en primer lugar *in vitro* mediante la formación de EB. Cuando las células pluripotentes cultivadas en suspensión durante más de 5 pases se transfirieron a medio que contenía suero sin la adición de los factores de crecimiento, se observó la formación de EB quísticos después de 7-10 días, de manera similar a las células cultivadas con MEF donde aparecieron EB cavitados después de 10 días en cultivo [Itskovitz *et al.*, 2000] y EB quísticos después de 14-20 días. Dentro de estos EB, hubo tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias típicas de la diferenciación de células pluripotentes.

La pluripotencia de las células pluripotentes en suspensión se demostró adicionalmente *in vivo* mediante la formación de teratomas. Se inyectaron células cultivadas en suspensión durante aproximadamente 10 pases en ratones SCID Beige y 10 semanas después se formaron tumores. Dentro de estos teratomas, se observaron tejidos representativos de las tres capas germinales.

Agitación de cultivos en suspensión - Se cultivaron células pluripotentes en suspensión en un matraz de agitación durante al menos un mes usando el medio ensayado. Un examen después de un mes mostró que morfológicamente los agregados de esferoides formados por las células permanecieron similares a los observados con células cultivadas de manera estática usando placas de Petri. Cuando se volvieron a cultivar en MEF, las células en los agregados se volvieron a unir, formando de nuevo colonias normales de células pluripotentes. Se descubrió que el cariotipo de las células cultivadas durante un mes en el matraz de agitación era normal.

EJEMPLO 2 (Ejemplo de referencia)

CULTIVO BIDIMENSIONAL DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Cultivo de células pluripotentes en cultivos 2D usando sistema sin suero, sin xeno y sin capas de soporte - Se

ensayaron varias combinaciones posibles de medios para determinar la capacidad de mantener el cultivo de células pluripotentes sin capas alimentadoras o sin componentes de origen animal (sin xeno, por ejemplo, usando fibroblastos de prepucio como alimentadores). Se descubrió que todos los medios ensayados (es decir, yFIL25, NCM100F, NCM100Fp, ILCNTF, NILCNTF, cmV5b, cmV5bp, cmTeSR, cmTeSRp, cmTeSR2, cmTeSR2p, cmHA13, CMrb100F, CMrb100Fp, NCMrb100F, o NCMrb100Fp), eran adecuados para mantener cultivos de células pluripotentes indiferenciadas. Se cultivaron células pluripotentes de forma continua durante al menos 5 pases, manteniendo al mismo tiempo sus características de células madre, incluyendo la proliferación indiferenciada, estabilidad del cariotipo y pluripotencia. No se pudieron observar diferencias morfológicas entre las colonias cultivadas en los sistemas de cultivo ensayados y las cultivadas en MEF con el medio básico, de manera correspondiente, las características morfológicas permanecieron sin cambios con respecto a células individuales, haciendo las células pequeñas y redondas, presentando alta relación de núcleo con respecto a citoplasma, con una notable presencia de uno a tres nucleolos y separación normal entre las células. Se manera similar a las células cultivadas en MEF, las células se pasaron rutinariamente cada cinco o siete días, en la misma relación de 1/2 o 1/3, los que indica un tiempo de duplicación de la población similar. Las células se pasaron con la misma eficacia de siembra de aproximadamente 1 millón de células por cada 10 cm², con la misma tasa de viabilidad de más del 90 %.

Las células madre pluripotentes que se cultivan en sistemas de cultivo 2-D en presencia de los nuevos medios de cultivo mantienen el patrón de expresión de células indiferenciadas - Se examinaron varios marcadores de superficie típicos de ESC y células iPS indiferenciadas de primates usando tinción inmunofluorescente esencialmente como se describe en Thomson *et al*, 1995, 1996, 1998, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se descubrió que las células cultivadas con el medio ensayado durante al menos 7 pases (por ejemplo, 10, 15 pases) eran muy positivas para los marcadores de superficie SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 y Oct 4. Como en otras ESC de primates, la tinción con SSEA3 fue débil y negativa para SSEA1.

Las células madre pluripotentes que se cultivan en sistemas de cultivo 2D en presencia de nuevos medios de cultivo son capaces de diferenciarse en linajes celulares procedentes de las tres capas germinales embrionarias in vitro e in vivo - El potencial de desarrollo de las células después de cultivo prolongado en las condiciones ensayadas se examinó *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrioides (EB). Las células pluripotentes cultivadas en las condiciones ensayadas formaron EB similares a los creados por ESC cultivadas en MEF. Dentro de estos EB, las células madre se diferenciaron en tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias (datos no mostrados).

Además, se mostró que las células madre pluripotentes eran capaces de diferenciarse *in vivo*. Por tanto, después de su inyección en ratones Beige SCID, las células cultivadas en las condiciones ensayadas forman teratomas que contienen tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias, es decir, ectodermo, endodermo y mesodermo (datos no mostrados).

EJEMPLO 3 (Ejemplo de referencia)

CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES COMO CÉLULAS INDIVIDUALES EN SUSPENSIÓN SIN PASE ENZIMÁTICO

Resultados experimentales

Cultivo de células individuales en cultivos en suspensión - Se cultivaron células pluripotentes en suspensión en un matraz de agitación o placas de Petri durante al menos un mes usando todo el medio ensayado (yFIL25, NCM100F, NCM100Fp, ILCNTF, NILCNTF, cmV5b, cmV5bp, cmTeSR, cmTeSRp, cmTeSR2, cmTeSR2p, cmHA13, CMrb100F, CMrb100Fp, NCMrb100F o NCMrb100Fp), como células individuales. Un examen después de un mes mostró que las células presentan características de células pluripotentes incluyendo cariotipo estable, expresión en marcadores específicos y potencial de diferenciación. Las células se pasaron sin el uso de inhibidor de ROCK y sin el uso de tripsina y se dividieron mecánicamente usando una pipeta. Esta es la primera vez que se ha mostrado que ESC o iPS humanas son capaces de cultivarse en un cultivo en suspensión como células individuales sin la necesidad de pases enzimáticos, ya que la célula adoptó un modo de cultivo de células individuales. El sistema se puede usar para procesos industriales sin pase.

Las ESC humanas que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales se pueden volver a sembrar en sistemas de cultivo bidimensionales, que demuestran la morfología típica de hESC - Se volvieron a sembrar CL1 (13E1) cultivadas durante 17 pases en suspensión como células individuales con MEF inactivados. Durante el primer pase, la morfología de la colonia no está clara. Pocas semanas después, las células formaron colonias con morfología de células pluripotentes de espacios entre células, bordes claros y alta relación de núcleo con respecto a citoplasma (Figuras 11A-B).

EJEMPLO 4 (Ejemplo de referencia)

LAS ESCS Y CÉLULAS IPS HUMANAS SE PUEDEN ENVIAR EN UN CULTIVO EN SUSPENSIÓN

Envío de células vivas - Las células cultivadas en suspensión como agregados celulares usando el método descrito

sobreviven al envío a temperatura ambiente o a 0-15 grados Celsius. Usando tubos de 50 ml con 20-40 ml de medio de cultivo, ventilados o no ventilados, se podrían enviar 2-10 millones de células por tubo. Al menos 50 % de las células sobrevivieron y continuaron creciendo, manteniendo al mismo tiempo todas las características pluripotentes. Se podría usar otro tamaño de tubo. El medio podría complementarse con antioxidantes y RoCK u otros agentes antiapoptóticos.

EJEMPLO 5 (Ejemplo de referencia)

EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES EN CONDICIONES DE CULTIVO DINÁMICAS

Los presentes inventores ensayaron la capacidad de los nuevos medios de cultivo descritos en el presente documento para mantener el crecimiento y la expansión de células madre pluripotentes tales como iPSC y ESC en condiciones de cultivo dinámicas cuando se cultivan como células individuales (desprovistas de agregados celulares) o en suspensión con agregados celulares.

Métodos experimentales

Líneas celulares y concentración de siembra: Se usó la línea celular de IPS C2 en el pase 77, de los que 37 pases estaban en suspensión antes de sembrar en las condiciones de cultivo dinámico. Se sembraron (inocularon) las iPSC a una concentración de $3,7 \times 10^4$ células/ml.

Medios de cultivo y condiciones: Se usaron los siguientes medios de cultivo para el cultivo en suspensión dinámica: CM100Fp. Las células se cultivaron en matraces de agitación o en un biorreactor controlado continuamente durante 5 días. Cuando se cultivaron en un biorreactor, el medio no se cambió durante el proceso de cultivo. Cuando se cultivaron en matraces de agitación, se cambió el medio todos los días.

Condiciones de cultivo para crecimiento dinámico en suspensión:

Cultivo en un biorreactor controlado - Las células se cultivaron en un biorreactor controlado Biostat® Cultibag RM (Sartorius North America, Edgewood, Nueva York, EE.UU.) (Bolsa de 2 litros con 1 litro). Los parámetros del reactor incluyeron la velocidad de inclinación: 16 revoluciones por minuto (rpm); ángulo de 7°; Temperatura: 37 °C, pH: 7-7,4, concentración de O₂: 50 %;

Cultivo en matraces de agitación - Se transfirieron agregados celulares cultivados en placa de Petri durante al menos un pase a un matraz de agitación de 250 ml en el medio ensayado, se agitaron continuamente a 40-110 revoluciones por minuto (rpm) usando una placa magnética y se colocaron en la incubadora. El medio se cambió cada 1-3 días. Cada 5-7 días, los agregados se dividieron en una relación de 1:2-1:4.

Resultados experimentales

Expansión de células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión usando los medios de cultivo descritos en el presente documento - Las células madre pluripotentes, que se sometieron a las condiciones de cultivo dinámicas, se expandieron hasta aproximadamente 26 veces en el número de células en los 11 días posteriores al cultivo en matraces de agitación cuando se cultivaron en un cultivo en suspensión con agregados celulares o hasta aproximadamente 50 veces en el número de células en los 11 días posteriores al cultivo en matraces de agitación cuando se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales desprovistas de agregados celulares. Además, las células madre pluripotentes se expandieron hasta aproximadamente 64 veces en el número de células en los 5 días posteriores al cultivo en el biorreactor controlado cuando se cultivaron como células individuales (Figuras 5A-C y datos no mostrados). Estos resultados demuestran que los nuevos medios de cultivo descritos en el presente documento son capaces de mantener la expansión de células pluripotentes cuando se cultivan en suspensión en condiciones dinámicas.

EJEMPLO 6 (Ejemplo de referencia)

LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES CULTIVADAS EN SUSPENSIÓN SE RECUPERAN BIEN DE LOS CICLOS DE CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN

Para ensayar la capacidad de las células madre pluripotentes cultivadas en suspensión en presencia de los nuevos medios de cultivo descritos en el presente documento para recuperarse de los ciclos de congelación/descongelación, las células se congelaron en nitrógeno líquido usando las siguientes soluciones de congelación:

- (1) 10 % de DMSO (Sigma), 10 % de FBS (HyClone), 10 % de SR (Invitrogen cooperation), 70 % de DMEM.
- (2) 5 % de DMSO, 10 % de FBS, 10 % de SR, 75 % de DMEM
- (3) 10 % de DMSO, 90 % de SR
- (4) 5 % de DMSO, 95 % de SR
- (5) Solución de congelación sin suero comercial (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel)

Las células congeladas se congelaron inicialmente a -80 °C en el frigorífico y, después de 12 horas a tres días, se transfirieron al tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Resultados experimentales

Las células madre pluripotentes se sometieron a condiciones de congelación usando la solución de congelación descrita anteriormente y después se descongelaron y se volvieron a cultivar en suspensión. Las Figuras 6A-C demuestran células C2 cultivadas durante 48 pases en suspensión con medio cmrb100p después de descongelar usando tres soluciones de congelación diferentes.

EJEMPLO 7 (Ejemplo de referencia)

GENERACIÓN DE CÉLULAS ESPECÍFICAS DE LINAJE DE LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Diferenciación en células neuronales - Se cultivaron células de las cuatro líneas celulares ensayadas (13, 14, 16 y H9.2) en suspensión con agregado celular durante al menos 25 pases. Después, los factores se retiraron del medio de cultivo y se añadió ácido retinoico 5×10^{-5} M durante 21 días. Después, las células se transfirieron a placas recubiertas con fibronectina y se cultivaron durante 5 días adicionales antes de cosechar las células para su análisis. Se realizaron RT-PCR cuantitativa, inmunotinciones (inmunofluorescencia y FACS) y los resultados muestran la expresión de genes del linaje de células neuronales tales como PAX6, HNF, nestina, β -tubulina y PSA-NCAM (Figuras 7A-C, 8A-B, 9A-G).

Diferenciación en células endodérmicas - Las células cultivadas en suspensión con agregados celulares de la línea celular C2 (línea celular de iPS procedente de fibroblastos de prepucio) se cultivaron en suspensión durante al menos 10 pases. Después, los factores se retiraron del medio de cultivo y las células se expusieron a Activina 10 ng/ml de durante 48 horas, en medio que contenía aumentadores de AMPc tales como forskolina, 8-bromoAMPc, GABA, IBMX y DBC. Diez días después, las células se analizaron para determinar los marcadores endodérmicos. La RT-PCR cuantitativa para Sox17 demuestra un aumento significativo en la expresión de Sox17 en células tratadas en comparación con controles no tratados (datos no mostrados). Como se muestra en las Figuras 10A-B, las células diferenciadas expresan PDX1, un factor de transcripción que indica la diferenciación en linaje de endodermo, principalmente en células β .

Diferenciación en células madre mesenquimatosas (MSC) - Se transfirieron células cultivadas en suspensión con agregados celulares en suspensión a medio que contiene suero durante 14 días y después se sembraron sobre gelatina de éter o Matrigel. 7-14 días después, las MSC resultantes se congelaron o se pasaron usando al mismo tiempo tripsina.

EJEMPLO 8 (Ejemplo de referencia)

CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES HUMANAS QUE SE CULTIVAN EN UN CULTIVO EN SUSPENSIÓN COMO CÉLULAS INDIVIDUALES

Diseño del estudio para caracterizar las nuevas hESC que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales

Se ensayaron tres grupos de células madre pluripotentes cultivadas (PSC):

1. hESC cultivadas con MEF en condiciones convencionales de dos dimensiones (2D).
2. hESCs cultivadas como agregado (esferoide, más de 200 células) en suspensión (3D)
3. hESCs cultivadas como células individuales (SC, menos de 50 células, la mayoría de ellas como células individuales) en suspensión (3D).

Las células se ensayaron para determinar la expresión de marcadores de pluripotencia usando citometría de flujo después del cultivo de al menos 15 pases en las condiciones anteriores.

Resultados experimentales

Las ESC humanas que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales presentan un patrón de expresión único similar al de las ESC de ratón "intactas" - Como se muestra en las Figuras 12A-J, los análisis de FACS de células madre pluripotentes cultivadas en suspensión como células individuales demuestran un patrón de expresión alterado en comparación con las hESC cultivadas en 2-D o en un cultivo en suspensión como agregados celulares. Por tanto, mientras que la mayoría de las hESC que se cultivan en 2-D o en un cultivo en suspensión como agregados celulares expresan los marcadores de pluripotencia TRA1-60 (Figuras 12A, 12C), TRA1-81 (Figuras 12B, 12D) y SSEA4 (Figura 12H), la mayoría de las hESC pluripotentes que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales no expresan los marcadores TRA1-60 (Figura 12E), TRA1-81 (Figura 12F) y SSEA4 (Figura 12J). En cambio, mientras que solo el 11 % de las hESC que se cultivan en 2-D o en un cultivo en suspensión como agregados

celulares expresan SSEA1 (Figura 12G), la mayoría de las hESC que se cultivan en un cultivo en suspensión como células individuales expresan SSEA1 (Figura 12I). Por tanto, las hESC que se cultivaron en suspensión como células individuales presentan un patrón de expresión modificado en comparación con las hESC cultivadas en 2-D o en un cultivo en suspensión como agregados celulares. Dicho patrón de expresión se parece al de las células ESC de ratón más "intactas", que no expresan TRA1-60, TRA1-81 y SSEA4, pero que expresan SSEA1.

La tabla 3, a continuación, resume los resultados de los análisis de FACS.

Tabla 3

<i>Patrón de expresión de células madre pluripotentes humanas en diversas condiciones de cultivo</i>				
	SSEA4	TRA60	TRA81	SSEA1
2D	+	+	+	-
Agregados 3D	+	+	+	-
Células individuales 3D	-	-	-	+

Tabla 3. Se proporcionan las identificaciones de expresión de las diversas células madre pluripotentes.

Las células cultivadas en suspensión como células individuales presentan niveles aumentados de OCT-4 - Se realizó análisis de RT-PCR en tiempo real en hESC cultivadas en 2-D, un cultivo en suspensión como agregados celulares o en un cultivo en suspensión como células individuales usando los cebadores enumerados en la Tabla 2 en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento. Como se muestra en la Figura 13A, los niveles de expresión de Nanog disminuyen ligeramente en un cultivo en suspensión de células individuales en comparación con las hESC cultivadas en 2-D. Por otro lado, se descubrió que la expresión de OCT4 aumentaba aproximadamente 8 veces en las hESC cultivadas en suspensión como SC en comparación con las hESC cultivadas en 2D.

EJEMPLO 9 (Ejemplo de referencia)

CARACTERIZACIÓN DE LA EFICACIA DE CLONACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES HUMANAS QUE SE CULTIVAN EN UN CULTIVO EN SUSPENSIÓN COMO CÉLULAS INDIVIDUALES

Resultados experimentales

Las ESC humanas que se cultivan en suspensión como células individuales o hESC que se cultivaron en 2-D se ensayaron para determinar su eficacia de clonación. Las células que se cultivaron en 2-D se tripsinizaron y se sembraron como células individuales, cada una en un solo pocillo de una placa de 96 pocillos cubierta con MEF (como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento) y se sembraron células que se cultivaron como células individuales en suspensión en un solo pocillo de una placa de 96 pocillos poco adhesiva (como se ha descrito en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento).

Las ESC humanas que se cultivan en suspensión como células individuales presentan una eficacia de clonación significativamente mayor en comparación con hESC cultivadas en 2-D - Como se muestra en la Tabla 4, se observó una eficacia de clonación significativamente mayor para hESC cultivadas en suspensión como células individuales (95,63 %) en comparación con hESC cultivadas en 2-D (4,33 %). Además, mientras que la adición del inhibidor de ROCK aumentó la eficacia de clonación de hESC cultivadas en 2-D, la eficacia de clonación de hESC cultivadas en suspensión como células individuales no aumentó en presencia del inhibidor de ROCK.

Tabla 4

<i>Eficacia de clonación de hESC en diversas condiciones de cultivo</i>	
<i>Condiciones de cultivo</i>	<i>Eficacia de clonación %</i>
2D + tripsina	4,33
2D + tripsina + inhibidor de RoCK	17,7
3D (células individuales desprovistas de agregados celulares) sin tripsina	95,63
3D (células individuales sin agregados celulares) sin tripsina pero con inhibidor de RoCK	87

Tabla 4. Se proporciona el porcentaje de clonación celular obtenido en las diversas condiciones de cultivo.

Las ESC humanas que se cultivan en suspensión como células individuales presentan mayor supervivencia a los ciclos de congelación y descongelación en comparación con las hESC cultivadas en 2-D - Para ensayar la capacidad de las células madre pluripotentes para sobrevivir a los ciclos de congelación y descongelación las hESC (que se cultivaron en suspensión como células individuales) se sometieron a un ciclo de congelación usando cualquiera de las siguientes soluciones de congelación:

- I. Solución de congelación de suero y animales (Biological Industries).
- II. DMEM complementado con DMSO al 10 % y FBS al 20 %.
- III. DMEM complementado con DMSO al 10 % y SR (reemplazo de suero) al 30 %.

Después de congelar durante aproximadamente 1-7 días a -80 °C los viales se transfirieron a nitrógeno líquido. Se descongelaron las células y se ensayó la viabilidad mediante tinción con azul de tripano. La supervivencia de las hESC al ciclo de congelación-descongelación fue de aproximadamente 80 % para hESC cultivadas en suspensión como células individuales, lo que es significativamente mayor que la supervivencia de hESC que se cultivan en 2-D a un ciclo de congelación-descongelación en condiciones de ensayo idénticas (hasta 50 %, datos no mostrados). La Figura 15 es una imagen representativa de ESC humanas cultivadas como células individuales en un cultivo en suspensión después de un ciclo de congelación-descongelación.

Las ESC humanas, que se cultivan en suspensión como células individuales muestran mayor supervivencia y eficacia de manipulaciones genéticas, en comparación con hESC cultivadas en 2-D - Las células se transfectaron usando la construcción de promotor de CMV-ácido nucleico de GFP (basado en plásmido N1) como se describe en "MATERIALES GENERALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES". Tras la manipulación genética, se evaluó la supervivencia de las células usando microscopía de contraste de fase. Como se muestra en la Figura 16A, más del 90 % de las células individuales suspendidas sobrevivieron al procedimiento. En cambio, de las células 2D cultivadas con MEF, solo se recuperaron hasta 17 células (de 10⁷ células) (datos no mostrados). Por otra parte, mientras que ninguna de las hESC que se cultivaron en 2-D eran verdes (datos no mostrados), algunas de las hESC cultivadas en 3-D como células individuales eran verdes, es decir, expresaban la construcción transgénica CMV-GFP (Figura 16B).

EJEMPLO 10 (Ejemplo de referencia)

LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES HUMANAS QUE SE CULTIVAN EN UN CULTIVO EN SUSPENSIÓN COMO CÉLULAS INDIVIDUALES SON CAPACES DE DIFERENCIARSE EN EL LINAJE DE CÉLULAS NEURALES

Resultados experimentales

Las ESC humanas que se cultivan en suspensión como células individuales son capaces de diferenciarse en el linaje de células neuronales - Para inducir diferenciación neural, se transfirieron hESC que se cultivan en suspensión como células individuales a un medio de diferenciación neuronal (sin bFGF y la quimera IL6RIL6) que incluía o bien ácido retinoico (10⁻³ M) o bien nogina (10 ng/ml) como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento. Se indujo diferenciación en 2-D mediante siembra en placas recubiertas con fibronectina de plasma humano (HPF) (a una concentración de 50 µg por cada 10 cm² de HPF) o en un cultivo en suspensión. Tres semanas después de la inducción de diferenciación, las células se sembraron para tñirlas con fibronectina, O4, GFAP, nestina y β-tubulina. Como se muestra en las Figuras 17A-C, las células se diferenciaron en células progenitoras neuronales que se tñieron positivamente con GFAP (proteína ácida fibrilar glial), un marcador de astrocitos, O4, un marcador de oligodendrocitos y β-tubulina y nestina, marcadores de neuronas. Estos resultados muestran de manera concluyente que las hESC que se cultivan en suspensión como células individuales son capaces de diferenciarse en la capa germinal embrionaria de ectodermo.

EJEMPLO 11 (Ejemplo de referencia)

UN NUEVO MÉTODO PARA DIFERENCIAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMATOSAS EN SUSPENSIÓN

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo método para diferenciar células madre pluripotentes en células madre mesenquimatosas en suspensión, de la siguiente manera.

Para inducir la diferenciación en MSC, se transfirieron células individuales cultivadas en suspensión gradualmente a uno de los siguientes medios:

- (1) Fy enriquecido; que consiste en DMEM/F12 al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene reemplazo de suero (SR) knockout al 10 %, FBS al 10 % (HyClone o Biological Industries) L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa).
- (2) MeSus I: que consiste en DMEM al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene FBS al 20 % (HyClone o Biological Industries) L-glutamina 2 mM, (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa).
- (3) MeSus II: que consiste en αMEM al 80 % (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), que contiene FBS al 20 % (HyClone o Biological Industries) L-glutamina 2 mM, (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique otra cosa).
- (4) MeSus III: que consiste en DMEM/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), ITS al 1 % (Invitrogen) L-glutamina 2 mM, (todos de Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique

otra cosa).

Se transfirieron ESC humanas que se cultivaron en un cultivo en suspensión como células individuales al medio de diferenciación de MSC gradualmente usando uno de los siguientes métodos:

- I. (i) 25 % de medio de diferenciación 75 % de pCM100F para un pase; (ii) 50 % de medio de diferenciación 50 % de pCM100F para un pase; (iii) 75 % de medio de diferenciación 25 % de pCM100F para un pase; (iv) 100 % de medio de diferenciación.
- II. (i) 50 % de medio de diferenciación 50 % de pCM100F para un pase; (ii) 75 % de medio de diferenciación 25 % de pCM100F para un pase; (iii) 100 % de medio de diferenciación
- III. (i) 50 % de medio de diferenciación 50 % de pCM100F para un pase; (ii) 100 % de medio de diferenciación.

Todos los medios y métodos de transferencia descritos anteriormente dieron como resultado diferenciación eficaz en MSC.

Las células se cultivaron después en suspensión (placa de Petri, matraces de agitación y/o biorreactores) y se pasaron cada 5-10 días mediante pipeta. Después de cultivarse las células durante al menos un pase con el medio de diferenciación, se ensayaron las características de MSC. Las Figuras 19A-B representan imágenes de MSC que se diferenciaron a partir de PSC cultivadas en suspensión como células individuales durante al menos 10 pases. Cuando las células se volvieron a sembrar en gelatina, demostraron morfología normal de MSC. La Figura 19A muestra las células CL1 que se diferenciaron en el medio Fy enriquecido y la Figura 19B muestra las células CL1 que se diferenciaron en el medio MeSUSII.

Para enriquecer a la población de MSC, se empleó la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) usando un anticuerpo anti-CD73 (Milteniy) según las instrucciones del fabricante. El CD73-MACS dio como resultado enriquecimiento de las MSC de aproximadamente el 40 % de células CD73 positivas a más del 80 % de células CD73 positivas.

Las MSC, que se generaron por diferenciación de hESC que se cultivaron en suspensión como células individuales, presentan un patrón de expresión de MSC normal - Como se muestra en las Figuras 18A-C, los análisis de FACS muestran que cuando las células se cultivaron en un medio sin contenidos de origen animal, 82,5 % de las MSC son CD73 positivas y solo 4,83 % son CD31 positivas. Además, cuando las MSC se cultivan en un medio que contiene suero, 99,3 % son CD105 positivas.

Diferenciación de MSC en suspensión en un linaje celular adipogénico - Las MSC en suspensión se sometieron a un protocolo de diferenciación hacia el linaje adipogénico en un sistema de cultivo 2D o en un cultivo en suspensión, como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento. En resumen, se sembraron MSC a una densidad de 20.000 células/cm² en placas de 6 pocillos o en una concentración de 1x10⁶-5x10⁶ células/ml en un cultivo en suspensión y se cultivaron en presencia del medio adipogénico durante 4 semanas con cambios de medio dos veces a la semana. Como se muestra en la Figura 19D, las MSC (que se generaron por diferenciación de hESC que se cultivaron en suspensión como células individuales) fueron capaces de diferenciarse en el linaje celular adipogénico, presentando vacuolas ricas en lípidos dentro de las células.

Diferenciación de MSC en suspensión en un linaje celular osteogénico - Las MSC en suspensión se sometieron a un protocolo de diferenciación hacia el linaje osteogénico en un sistema de cultivo 2D o en un cultivo en suspensión, como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento. En resumen, se sembraron MSC a una densidad de 2000-3000 células/cm² en placa de 6 pocillos o en una concentración de 1x10⁶-5x10⁶ células/ml en un cultivo en suspensión y se cultivaron en presencia del medio osteogénico durante 4 semanas con cambios de medio dos veces a la semana. Como se muestra en la Figura 19C, las MSC (que se generaron por diferenciación de hESC que se cultivaron en suspensión como células individuales) fueron capaces de diferenciarse en el linaje celular osteogénico, que presenta células mineralizadas, detectado por tinción con rojo de alizarina.

Diferenciación de MSC en suspensión en un linaje celular condrogénico - Las MSC en suspensión se sometieron a un protocolo de diferenciación hacia el linaje condrogénico en un sistema de cultivo 2D o en un cultivo en suspensión, como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente en el presente documento. En resumen, se centrifugaron 2x10⁵ MSC a 300 g durante 5 minutos en tubos de 15 ml de polipropileno Falcon para formar un sedimento celular. Las células se cultivaron en medio condrogénico como un sedimento en un tubo durante 9 semanas con cambios de medio dos veces a la semana sin alterar la masa celular. Se realizaron secciones celulares después de fijar los sedimentos celulares con PFA al 4 % e incluirlos en agarosa de bajo punto de fusión (1,5 %). Las células se tiñeron con azul alcian, que tiñe la matriz de condrocitos del linaje celular condrogénico (datos no mostrados), demostrando la capacidad de las MSC para diferenciarse en el linaje celular condrogénico.

EJEMPLO 12 (Ejemplo de referencia)

LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES HUMANAS QUE SE CULTIVAN EN UN CULTIVO DE

SUSPENSIÓN COMO CÉLULAS INDIVIDUALES SON CAPACES DE DIFERENCIARSE EN LA LÍNEA CELULAR DEL ENDODERMO

Resultados experimentales

Se cultivaron células C2 durante más de 10 pases como células individuales en suspensión en el medio de cultivo pCM100F. Para la diferenciación del endodermo, el bFGF y la quimera IL6RIL6 se retiraron del medio de cultivo y se añadió activina A en concentración de 10 ng/ml durante 48 horas en un cultivo en suspensión. 10 días después de la exposición a activina A, las células se sembraron en una matriz Matrigel™ o HFF (fibroblastos de prepucio humano) o se cultivaron en un sistema de cultivo tridimensional (en suspensión) y se tiñeron con PDX1. Cuando los niveles de expresión del gen de SOX 17 se ensayaron mediante PCR en tiempo real, se pudo observar un aumento durante la diferenciación del día 2 al 10 después de exposición a activina A (datos no mostrados). Las Figuras 20A-B muestran la expresión de PDX1 en las células, que demuestra diferenciación en células endodérmicas.

REFERENCIAS

(SE CITAN REFERENCIAS ADICIONALES EN EL TEXTO)

- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J y Thomson JA. "Clonally derived human embryonic stem cells lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture". *Dev Biol* 227:271-278, 2000.
- Amit, M., Shariki, K., Margulets, V., e Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder and serum-free culture system for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70, 837-845.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science*. 2008.
- Bhattacharya, B. *et al.* (2004). Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* 103, 2956-2964.
- Germanguz I, Sedan O, Zeevi-Levin N, Shtrichman R, Barak E, Ziskind A, Eliyahu S, Meiry G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Binah O. Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med*. 11 de diciembre de 2009. [Publicación electrónica previa a la impresión].
- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007, 318(5858):1920-1923.
- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008,133(2):250-264.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6, 88-95.
- King, T.D., Gandy, J.C. y Bijur, G.N. (2006). The protein phosphatase-1/inhibitor-2 complex differentially regulates GSK3 dephosphorylation and increases sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 levels. *Exp. Cell Res.* 312, 3693-3700.
- Kristensen, D.M., Kalisz, M., y Nielsen, J.H. (2005). Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS*. 113, 756-772.
- Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchiew J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(8):2883-2888.
- Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007, 25(10):1177-1181.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008, 26(1):101-106.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008, 451(7175):141-146.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006, 126(4):663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007, 131(5):861-872.
- 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, 1145-1147.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92, 7844-7848.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Hearn, J.P. (1995). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* 55, 254-259.
- Yu J, Hu K., Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009, 324(5928):797-801.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Technion Research & Development Foundation Ltd. Amit, Michal Itskovitz-Eldor, Joseph	
	<120> NUEVOS MÉTODOS Y MEDIOS DE CULTURA PARA CULTIVAR CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES	
10	<130> 52175	
	<150> US 61/380.388 <151> 07-09-2010	
15	<160> 51	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1 <211> 225 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 1	
	gacaacaatg agaaccttca ggagatatgc aaagcagaaa ccctcgtgca ggcccgaaag	60
	agaaagcgaa ccagtatcga gaaccgagtg agaggcaacc tggagaattt gttcctgcag	120
	tgcccgaaac ccacgctgca gcagatcagc cacatcgccc agcagcttgg gctcgagaag	180
	gatgtggtcc gagtgggtccg agtgtggttc tgtaaccggc gccag	225
30	<210> 2 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 2 gagaacaatg agaaccttca gga	23
40	<210> 3 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 3 ttctggcgcc ggttacagaa cca	23
50	<210> 4 <211> 2098 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 4	

ES 2 746 482 T3

attataaatc tagagactcc aggatttttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat	60
gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggagggtcc	120
tatttctcta acatctttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtccac	180
ctcttaaatt ttttcctcct cttcctctat actaacatga gtgtggatcc agcttgtccc	240
caaagcttgc cttgctttga agcatccgac tgtaaagaat cttcacctat gcctgtgatt	300
tgtgggcctg aagaaaacta tccatccttg caaatgtctt ctgctgagat gcctcacacg	360
gagactgtct ctctcttcc ttcctccatg gatctgctta ttcaggacag ccctgattct	420
tccaccagtc ccaaaggcaa acaaccact tctgcagaga agagtgtcgc aaaaaggaa	480
gacaagggtcc cggtaagaa acagaagacc agaactgtgt tctcttccac ccagctgtgt	540
gtactcaatg atagatttca gagacagaaa tacctcagcc tccagcagat gcaagaactc	600
tccaacatcc tgaacctcag ctacaaacag gtgaagacct ggttccagaa ccagagaatg	660
aatctaaga ggtggcagaa aaacaactgg ccgaagaata gcaatggtgt gacgcagaag	720
gcctcagcac ctacctacc cagcctttac tcttctacc accagggatg cctggtgaac	780
ccgactggga acctccaat gtggagcaac cagacctgga acaattcaac ctggagcaac	840
cagaccaga acatccagtc ctggagcaac cactcctgga aactcagac ctggtgcacc	900
caatcctgga acaatcaggc ctggaacagt ccctctata actgtggaga ggaatctctg	960
cagtcctgca tgcagttcca gccaaattct cctgccagtg acttggaggc tgccttgaa	1020
gctgctggg aaggccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtatttttag tactccacaa	1080
accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga	1140
gtgaaactga tattactcaa tttcagctctg gacactggct gaatccttcc tctcccctcc	1200
tcccatccct cataggattt ttcttgtttg gaaaccacgt gttctggttt ccctgatgcc	1260
catccagtca atctcatgga ggggtggagta tgggtggagc ctaatcagcg aggtttcttt	1320
tttttttttt ttctatttgg atcttctctg agaaaatact tttttttttt ttttttttga	1380
aacggagtct tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg cgcggtcttg gctcactgca	1440
agctccgtct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc ctcccagaca gctgggacta	1500
caggcgcccc ccacctcgcc cggctaatat tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac	1560
tgtgttagcc aggatggtct cgatctcctg acctgtgat ccaccgcct cggcctccct	1620
aacagctggg atttacaggc gtgagccacc gcgccctgcc tagaaaagac attttaataa	1680
ccttggctgc cgtctctggc tatagataag tagatctaact actagtttgg atatcttttag	1740
ggtttagaat ctaacctcaa gaataagaaa tacaagtaca aattggtgat gaagatgtat	1800
tcgtattgtt tgggattggg aggttttctt tattttttta aaactattga ggtaaagggt	1860
taagctgtaa catacttaat tgatttctta ccgttttttg ctctgttttg ctatatcccc	1920
taatttgttg gttgtgctaa tctttgtaga aagaggctct gtatttgctg catcgtaatg	1980
acatgagtac tgctttagtt ggtttaagtt caaatgaatg aaacaactat ttttccttta	2040
gttgatttta ccctgatttc accgagtgtt tcaatgagta aatatacagc ttaaacad	2098

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 746 482 T3

	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
5	<400> 5		
	actaacatga ggtggatcc	20	
	<210> 6		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
15	<400> 6		
	tcatcttcac acgtcttcag	20	
	<210> 7		
20	<211> 933		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 7		
	atgagccagc aactgaagaa acgggcaaag acaagacacc agaaaggcct ggggtggaaga	60	
	gccccagtg gggctaagcc caggcaaggc aagtcaagcc aagacctgca ggcggaata	120	
	gaacctgtca gcgcggtgtg ggccttatgt gatggctatg tgtgctatga gcctggccct	180	
	caggctctcg gaggggatga tttctcagac tgttacatag aatgcgtcat aaggggtgag	240	
	ttttctcaac ccaccttgga agaggactca ctttttgagt ccttggaata ctaaagaaa	300	
	ggatcagaac aacagctttc tcaaaagggt ttccaagcaa gctcccttga atgttctttg	360	
	gaatacatga aaaaaggggt aaagaaagag cttccacaaa agatagttgg agagaattcg	420	
	cttgagtatt ctgagtacat gacaggcaag aagcttccgc ctggaggaat acctggcat	480	
	gacctatcag atcctaaaca gctcgcagaa ttgctagaa agaagcccc cataaataaa	540	
	gaatatgaca gtctgagcgc aatcgcttgt cctcagagtg gatgcactag gaagttgagg	600	
	aatagagctg ccctgagaaa gcatctcctc attcatggtc cccgagacca cgtctgtgcg	660	
	gaatgtggga aagcgttcgt tgagagctca aaactaaaga gacatttcct gggtcact	720	
	ggagagaagc cgtttcgggt cacttttgaa ggtgcggaa agcgttctc tctggacttt	780	
	aatttgcgta cgcacgtgcg catccacacg ggggagaaac gtttcgtgtg tccctttcaa	840	
	ggctgcaaca ggaggtttat tcagtcaaat aacctgaaag cccacatcct aacgcatgca	900	
25	aatacgaaca agaatacaca agagggaag tag	933	
	<210> 8		
	<211> 23		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
35	<400> 8		
	gcgtacgcaa attaaagtcc aga	23	
	<210> 9		
	<211> 25		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
5	<400> 9	
	cagcatccta aacagctcgc agaat 25	
10	<210> 10	
	<211> 1220	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
	gggagcgggc gagtaggagg gggcgccggg ctatatatat agcggctcgg cctcggggcg 60	
	gcctggcgct cagggaggcg cgcactgctc ctcagagtcc cagctccagc cgcgcgcttt 120	
	cgcgccggct cgcgcgtcca tgcagccggg gtagagcccg gcgcgccggg gcccgctcgc 180	
	ttgcctcccg cactcctcgc gttgcgcact cctgcccgag gtcggccgtg cgcctccgcg 240	
	ggacgccaca ggcgcagctc tgcccccag cttcccgggc gcactgaccg cctgaccgac 300	
	gcacggccct cgggcgggga tgcgggggccc cgggacggcc gcggtagcgc tgctcccggc 360	
	ggtcctgctg gccttgctgg cgcctgggc gggcgagggg gcgcgcccg caccactgc 420	
	acccaacggc acgtggagg ccgagctgga gcgcgctgg gagagcctgg tggcgtctc 480	
	gttggcgcgc ctgcgggtgg cagcgcagcc caaggaggcg gccgtccaga gcggcgccgg 540	
	cgactacctg ctgggcatca agcggctcgc gcggctctac tgcaacgtgg gcacggtctt 600	
	ccacctccag gcgtccccc acggccgcgc cggcgccgcg cagcgggaca cccgcgacag 660	
	cctgctggag ctctcgccc tggagcgggg cgtggtgagc atcttcggcg tggccagccg 720	
	gttcttcgtg gccatgagca gcaagggcaa gctctatggc tcgcccttct tcaccgatga 780	
	gtgcacgttc aaggagattc tccttcccaa caactacaac gcctacgagt cctacaagta 840	
	ccccggcatg ttcacgccc tgagcaagaa tgggaagacc aagaagggga accgagtgtc 900	
	gcccaccatg aaggtcacc acttccctcc caggctgtga cctccagag gacccttgc 960	
	tcagcctcgg gaagccctg ggagggcagt gccgagggtc accttggtgc actttcttcg 1020	
	gatgaagagt ttaatgcaag agtaggtgta agatatttaa attaatatt taaatgtgta 1080	
	tatatggcca ccaaattatt tatagttctg cgggtgtgtt ttttaatttt ctggggggaa 1140	
	aaaaagacaa aacaaaaaac caactctgac ttttctggtg caacagtgga gaatcttacc 1200	
15	attggatttc ttttaacttgt	1220
	<210> 11	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
25	<400> 11	
	ctacaacgcc tacgagtcct aca 23	
30	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
5	<400> 12 gttgaccag aaaagtcaga gttg 24	
10	<210> 13 <211> 1085 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
	cacagcgccc gcatgtacaa catgatggag acggagctga agccgccggg cccgcagcaa 60	
	acttcggggg gcggcggcgg caactccacc gcggcggcgg ccggcggcaa ccagaaaaac 120	
	agcccgagcc gcgtcaagcg gcccatgaat gccttcattg tgtggtcccg cgggcagcgg 180	
	cgcaagatgg cccaggagaa cccaagatg cacaactcgg agatcagcaa gcgcctgggc 240	
	gccgagtggg aacttttgtc ggagacggag aagcggccgt tcatcgacga ggctaagcgg 300	
	ctgcgagcgc tgcacatgaa ggagcaccgg gattataaat accggccccc gcggaaaacc 360	
	aagacgctca tgaagaagga taagtacacg ctgcccggcg ggctgctggc ccccggcggc 420	
	aatagcatgg cgagcggggg cggggtgggc gccggcctgg gcgcggggcg gaaccagcgc 480	
	atggacagtt acgcgcacat gaacggctgg agcaacggca gctacagcat gatgcaggac 540	
	cagctggggt acccgcagca cccgggcctc aatgcgcacg gcgcagcgcga gatgcagccc 600	
	atgcaccgct acgacgtgag cgccctgcag tacaactcca tgaccagctc gcagacctac 660	
	atgaacggct cgccaccta cagcatgtcc tactcgcagc agggcacccc tggcatggct 720	
	cttggtccca tgggttcggg ggtcaagtcc gaggccagct ccagccccc tgtggttacc 780	
	tcttcctccc actccagggc gccctgccag gccggggacc tccgggacat gatcagcatg 840	
	tatctccccg gcgcgaggt gccggaacc gccgcccga gcagacttca catgtcccag 900	
	cactaccaga gcggcccggt gcccggcacg gccattaacg gcacactgcc cctctcacac 960	
	atgtgagggc cggacagcga actggagggg ggagaaattt tcaaagaaaa acgagggaaa 1020	
	tgggaggggt gaaaagagg agagtaagaa acagcatgga gaaaacccgg tacgctcaaa 1080	
15	aaaaa	1085
	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
25	<400> 14 ccccggcgg caatagca 18	
30	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	

ES 2 746 482 T3

	<400> 15		
	tcggcgccgg ggagatacat	20	
5	<210> 16		
	<211> 1310		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 16		
	aaattgagcc cgcagcctcc cgcttcgctc tctgctcctc ctgttcgaca gtcagccgca	60	
	tcttcttttg cgtcgccagc cgagccacat cgctcagaca ccatggggaa ggtgaaggtc	120	
	ggagtcaacg gatttggctg tattgggcgc ctggtcacca gggctgcttt taactctggt	180	
	aaagtggata ttgttgccat caatgacccc ttcattgacc tcaactacat ggtttacatg	240	
	ttccaatatg attccaccca tggcaaattc catggcaccg tcaaggctga gaacgggaag	300	
	cttgtcatca atggaaatcc catcaccatc ttccaggagc gagatccctc caaaatcaag	360	
	tggggcgatg ctggcgctga gtacgtcgtg gagtccactg gcgtcttcac caccatggag	420	
	aaggctgggg ctcatcttga ggggggagcc aaaagggtca tcatctctgc cccctctgct	480	
	gatgccccca tggtcgtcat ggggtgtgaac catgagaagt atgacaacag cctcaagatc	540	
	atcagcaatg cctcctgcac caccaactgc ttagcaccac tggccaaggt catccatgac	600	
	aactttggta tcgtggaagg actcatgacc acagtccatg ccatcactgc caccagaag	660	
	actgtggatg gccctcctcg gaaactgtgg cgtgatggcc gcggggctct ccagaacatc	720	
	atccctgcct ctactggcgc tgccaaggct gtgggcaagg tcatccctga gctgaacggg	780	
	aagctcactg gcatggcctt ccgtgtcccc actgccaacg tgtcagtggg ggacctgacc	840	
	tgccgtctag aaaaacctgc caaatatgat gacatcaaga aggtgggtgaa gcaggcgctg	900	
	gagggccccc tcaagggcat cctgggctac actgagcacc aggtgggtctc ctctgacttc	960	
	aacagcgaca cccactcctc cacctttgac gctggggctg gcattgccct caacgaccac	1020	
	tttgtcaagc tcatctcctg gtatgacaac gaatttggct acagcaacag ggtggtggac	1080	
	ctcatggccc acatggcctc caaggagtaa gaccctgga ccaccagccc cagcaagagc	1140	
	acaagaggaa gagagagacc ctactgctg gggagtccct gccacactca gtccccacc	1200	
	acactgaatc tcccctcctc acagttgcca ttagagcccc ttgaagaggg gaggggccta	1260	
	gggagccgca ccttgtcatg taccatcaat aaagtaccct gtgctcaacc	1310	
15	<210> 17		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 17		
	aatcccatca ccatctcca	20	
25	<210> 18		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 18
 gcctgcttca ccaccttct 19

 <210> 19
 <211> 543
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Proteína quimérica IL6R/IL6
 15 <400> 19

ES 2 746 482 T3

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
275 280 285

ES 2 746 482 T3

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
340 345 350

Ser Leu Pro Val Glu Phe Met Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys
355 360 365

Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile
370 375 380

Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys
385 390 395 400

Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu
405 410 415

Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys
420 425 430

Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr
435 440 445

Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe
450 455 460

Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val
465 470 475 480

Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr
485 490 495

Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala
500 505 510

Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser
515 520 525

Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
530 535 540

<210> 20
<211> 6883
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

accctctttt cttatcattg acatttaaac tctggggcag gtcctcgcgt agaacgcggc 60
tgtcagatct gccacttccc ctgccgagcg gcggtgagaa gtgtgggaac cggcgctgcc 120

ES 2 746 482 T3

```

aggctcacct gcctccccgc cctccgctcc caggaatctg agaattgctc tcacacacca      180
accagcaac atccgtggag aaaactctca ccagcaactc ctttaaaaca ccgtcatttc      240
aaaccattgt ggtcttcaag caacaacagc agcacaaaaa accccaacca aacaaaactc      300
ttgacagaag ctgtgacaac cagaaaggat gcctcataaa gggggaagac ttttaactagg      360
ggcgcgacga tgtgtgaggc cttttattgt gagagtggac agacatccga gatttcagag      420
ccccatattc gagccccgtg gaatccccgc gccccagcc agagccagca tgcagaacag      480
tcacagcgga gtgaatcagc tcggtggtgt ctttgtcaac gggcggccac tgcgggactc      540
cacccgccag aagattgtag agctagetca cagcggggcc cggccgtgcg acatttcccg      600
aattctgcag gtgtccaacg gatgtgtgag taaaattctg ggcagggtatt acgagactgg      660
ctccatcaga cccagggcaa tcggtggtag taaaccgaga gtagcgactc cagaagttgt      720
aagcaaaata gcccagtata agcgggagtg cccgtccatc ttgcttggg aaatccgaga      780
cagattactg tccgaggggg tctgtaccaa cgataacata ccaagcgtgt catcaataaa      840
cagagtcttt cgcaacctgg ctagcgaaaa gcaacagatg ggcgcagacg gcatgtatga      900
taaactaagg atgttgaacg ggcagaccgg aagctggggc acccgccctg gttggtatcc      960
ggggacttcg gtgccagggc aacctacgca agatggctgc cagcaacagg aaggaggggg      1020
agagaatacc aactccatca gttccaacgg agaagattca gatgaggctc aaatgcgact      1080
tcagctgaag cggaagctgc aaagaaatag aacatccttt acccaagagc aaattgaggc      1140
cctggagaaa gagtttgaga gaacccatta tccagatgtg ttgcccagag aaagactagc      1200
agccaaaata gatctacctg aagcaagaat acagggtatg ttttctaate gaagggccaa      1260
atggagaaga gaagaaaaac tgaggaatca gagaagacag gccagcaaca cacctagtca      1320
tattcctatc agcagtagtt tcagcaccag tgtctaccaa ccaattccac aaccaccac      1380
accggtttcc tccttcacat ctggctccat gttgggccga acagacacag ccctcacaaa      1440
cacctacagc gctctgccgc ctatgccag cttcaccatg gcaataaacc tgcctatgca      1500
acccccagtc cccagccaga cctcctcata ctctgcatg ctgccacca gcccttcggt      1560
gaatgggcgg agttatgata cctacacccc cccacatatg cagacacaca tgaacagtca      1620
gccaatgggc acctcgggca ccacttcaac aggactcatt tcccctggtg tgtcagttcc      1680
agttcaagtt cccggaagtg aacctgatat gtctcaatac tggccaagat tacagtaaaa      1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaggaaat attgtgttaa ttcagtcagt gactatgggg      1800
acacaacagt tgagctttca ggaaagaaag aaaaatggct gttagagccg cttcagttct      1860
acaattgtgt cctgtattgt accactgggg aaggaaatgga cttgaaacaa ggacctttgt      1920
atacagaagg cacgatatca gttggaacaa atcttcattt tggtatccaa acttttatc      1980
attttggtgt attatttgta aatgggcatt tgtatgttat aatgaaaaaa agaacaatgt      2040
agactggatg gatgtttgat ctgtgttggc catgaagttg tttttttttt ttttaaaaag      2100
aaaaccatga tcaacaagct ttgccacgaa ttaagagtt ttatcaagat atatcgaata      2160
cttctacca tctgttcata gtttatggac tgatgttcca agtttgtatc attcctttgc      2220
atataattaa acctggaaca acatgcacta gatttatgtc agaaatatct gttggttttc      2280
caaaggttgt taacagatga agtttatgtg caaaaaaggg taagatataa attcaaggaa      2340

```


ES 2 746 482 T3

gaaaaaaagt tgatagctaa aaggtagagt gtgtcttcga tataatccaa tttgttttat	2400
gtcaaaatgt aagtatttgt cttccctaga aatcctcaga atgatttcta taataaagtt	2460
aatttcattt atatttgaca agaatataga tgttttatac acattttcat gcaatcatat	2520
gtttcttttt tggccagcaa aagttaattg ttcttagata tagttgtatt actgttcacg	2580
gtccaatcat tttgtgcac tagagttcat tcctaataca ttaaaagtgc ttgcaagagt	2640
tttaaaactta agtgttttga agttgttcac aactacatat caaaattaac cattgttgat	2700
tgtaaaaaac catgccaaag cctttgtatt tcctttatta tacagtttcc tttttaacct	2760
tatagtgtgg tgttacaagt tttatttcca tgttagatca acatttctaa ccaatggta	2820
ctttcacaca cactctgttt tacatcctga tgatccttaa aaaataatcc ttatagatac	2880
cataaatcaa aaacgtgtta gaaaaaatt ccacttacag caggggtgag atctgtgccc	2940
atttataccc acaacatata tacaaaaatg taacatttcc cagttagcca ttttaattcta	3000
aagctcaaag tctagaaata atttaaaaat gcaacaagcg attagctagg aattgttttt	3060
tgaattagga ctggcatttt caatctgggc agatttccat tgtcagccta tttcaacaat	3120
gatttcactg aagtatatcc aaaagtagat ttcttaaagg agactttctg aaagctgttg	3180
cctttttcaa ataggccctc tcctttttct gtctcctcc cctttgcaca agaggcatca	3240
tttcccattg aaccactaca gctgttccca tttgaatctt gctttctgtg cggttgtgga	3300
tggttgaggg gtggaggggg gatgttgcac gtcaaggaat aatgagcaca gacacatcaa	3360
cagacaacaa caaagcagac tgtgactggc cgggtgggaat taaaggcctt cagtcattgg	3420
cagcttaagc caaacattcc caaatctatg aagcagggcc cattgttggt cagttgttat	3480
ttgcaatgaa gcacagttct gatcatgttt aaagtggagg cacgcagggc aggagtgtt	3540
gagcccaagc aaaggatgga aaaaaataag cctttgttggt gtaaaaaagg actgtctgag	3600
actttcattt gttctgtgca acatataagt caatacagat aagtcttctc ctgcaaactt	3660
cactaaaaag cctggggggt ctggcagttc agattaaaat gcttgacat gcagaaacct	3720
ctggggacaa agacacactt ccactgaatt atactctgct ttaaaaaaat ccccaaaagc	3780
aatgatcag aatgtagaa attaattgaa ggatttaaac atgaccttct cgttcaatat	3840
ctactgtttt ttagttaagg aattacttgt gaacagataa ttgagattca ttgctccggc	3900
atgaaatata ctaataattt tattccacca gagttgctgc acatttgag acaccttct	3960
aagttgcagt ttttgtatgt gtgcatgtag ttttgttcag tgtcagcctg cactgcacag	4020
cagcacattt ctgcagggga gtgagcacac atacgcactg ttggtacaat tgccggtgca	4080
gacatttcta cctcctgaca ttttgacgcc tacattccct gagggctgtg tgetgagga	4140
actgtcagag aagggctatg tgggagtgca tgccacagct gctggctggc ttacttcttc	4200
cttctcgctg gctgtaattt ccaccacggt caggcagcca gttccggccc acggttctgt	4260
tgtgtagaca gcagagactt tggagaccgc gatgtcgac gccagggtgca agagggtgga	4320
atgggagaaa aggagtgacg tgggagcgga gggctctgtat gtgtgactt gggcacgtat	4380
atgtgtgctc tgaaggctcag gattgccagg gcaaagtagc acagtctggt atagtctgaa	4440
gaagcggctg ctcagctgca gaagccctct ggtccggcag gatgggaacg gctgccttgc	4500
cttctgcccc caccctaggg acatgagctg tccttccaaa cagagctcca ggcactctct	4560

ES 2 746 482 T3

tggggacagc atggcaggct ctgtgtggta gcagtgcctg ggagttggcc ttttactcat	4620
tgttgaaata atttttgttt attatttatt taacgataca tataattata tatttatcaa	4680
tgggggtatct gcagggatgt tttgacacca tcttccagga tggagattat ttgtgaagac	4740
ttcagtagaa tcccaggact aaacgtctaa attttttctc caaacttgac tgacttggga	4800
aaaccagggtg aatagaataa gagctgaatg ttttaagtaa taaacgttca aactgctcta	4860
agtaaaaaaa tgcattttac tgcaatgaat ttctagaata tttttccccc aaagctatgc	4920
ctcctaacc ttaaatggtg aacaactggt ttcttgctac agctcactgc catttcttct	4980
tactatcatc actaggtttc ctaagattca ctcatacagt attatttgaa gattcagctt	5040
tgttctgtga atgtcatctt aggattgtgt ctatatctt ttgcttattt ctttttactc	5100
tgggcctctc atactagtaa gattttaaaa agccttttct tctctgtatg tttggctcac	5160
caaggcgaaa tatatattct tctctttttc atttctcaag aataaacctc atctgctttt	5220
ttgtttttct gtgttttggc ttggtactga atgactcaac tgctcggtt taaagttcaa	5280
agtgtaahta cttagggtta gtactgctta tttcaataat gttgacggtg actatctttg	5340
gaaagcagta acatgctgtc ttagaaatga cattaataat gggcttaaac aaatgaatag	5400
gggggtcccc ccactctcct tttgtatgcc tatgtgtgtc tgatttgta aaagatggac	5460
aggggaattga ttgcagagtg tcgcttcctt ctaaagtagt tttattttgt ctactgttag	5520
tatttaaaga tcctggaggt ggacataagg aataaatgga agagaaaagt agatattgta	5580
tggtggttac taaaaggaaa ttcaaaaagt cttagaacct gagcacctga gcaaactgca	5640
gtagtcaaaa tatttatctc atgttaaaga aaggcaaatc tagtgtaaga aatgagtacc	5700
atatagggtt ttgaagttca tatactagaa acacttaaaa gatatactt cagatattac	5760
gtttggcatt gttcttaagt atttatatct ttgagtcaag ctgataatta aaaaaatct	5820
gttaatggag tgtatatctc ataagtatc aaaatggtgt ctatacctaa ggtagcatta	5880
ttgaagagag atatgtttat gtagtaagtt attaacataa tgagtaacaa ataatgtttc	5940
cagaagaaag gaaaacacat tttcagagtg cgtttttatc agaggaagac aaaaatacac	6000
acccctctcc agtagcttat ttttaciaag ccggcccagt gaattagaa	

REIVINDICACIONES

1. Una población aislada de células madre pluripotentes humanas que comprende al menos 50 % de células madre pluripotentes humanas caracterizadas por una identificación de expresión OCT4⁺/TRA1-60/TRA1-81⁺/SSEA1⁺/SSEA4⁻, en donde dichas células madre pluripotentes humanas son capaces de diferenciarse en las capas germinales embrionarias endodermo, ectodermo y mesodermo.
2. La población aislada de células madre pluripotentes humanas de la reivindicación 1, en donde cuando las células madre pluripotentes humanas son células madre embrionarias humanas que se cultivan en suspensión como células individuales, dichas células madre embrionarias humanas presentan una eficacia de clonación de 95 % $\pm$ 10 %.
3. Un método para expandir y mantener células madre pluripotentes (PSC) en un estado indiferenciado, comprendiendo el método:
 - (a) pasar las PSC en un cultivo en suspensión por disociación mecánica de agregados de PSC a células individuales o grupos en condiciones desprovistas de una disociación enzimática, comprendiendo cada uno de dichos grupos no más de 200 PSC, durante al menos 2 y no más de 10 pases, para obtener de este modo un cultivo en suspensión de PSC desprovisto de agregados; y
 - (b) pasar sin disociación dicho cultivo en suspensión de PSC desprovisto de dichos agregados y que comprende células individuales o grupos pequeños, comprendiendo cada uno de los grupos no más de 200 PSC, expandiendo y manteniendo de este modo las PSC en el estado indiferenciado.
4. El método de la reivindicación 3 en donde, en la etapa (a), dicho pase es durante al menos 3 y no más de 7 pases.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde cada uno de dichos grupos no comprende más de 150 PSC.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dichas condiciones de cultivo están desprovistas de un inhibidor de quinasa asociada a Rho (ROCK).
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde dichas células madre pluripotentes son células madre pluripotentes humanas.
8. Un método para generar células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, para obtener de este modo células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados; y
 - (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje, generando de este modo células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes.
9. Un método para generar cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, para obtener de este modo células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados; y
 - (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas expandidas desprovistas de agregados a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre pluripotentes en cuerpos embrioides; generando de este modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde dicho cultivo en suspensión comprende un medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y factor neurotrófico ciliar (CNTF).
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde dicho cultivo en suspensión comprende un medio de cultivo que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a una concentración de al menos 50 ng/ml y una quimera IL6RIL6.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde dicho cultivo en suspensión comprende un medio de cultivo que comprende un reemplazo de suero sin contaminantes animales y una quimera IL6RIL6.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde dicho cultivo en suspensión comprende un medio de cultivo sin suero que comprende un receptor de interleucina 6 soluble (sIL6R) e interleucina 6 (IL6), en donde una

concentración de dicho sIL6R es al menos 5 ng/ml y en donde una concentración de dicho IL6 es al menos 3 ng/ml.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde dicho cultivo en suspensión comprende un medio de cultivo que comprende interleucina 11 (IL11) y oncostatina.

5 15. Una población aislada de células madre pluripotentes humanas (PSC) desprovistas de agregados celulares generados según el método de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde el cultivo en suspensión desprovisto de agregados comprende células individuales o grupos pequeños, comprendiendo cada uno de los grupos no más de 200 PSC, en donde dicha población aislada de PSC humanas comprende al menos 50 % de PSC humanas
10 caracterizadas por una identificación de expresión OCT4⁺/TRA1-60⁻/TRA1-81⁻/SSEA1⁺/SSEA4⁻ y es capaz de diferenciarse en las capas germinales embrionarias endodermo, ectodermo y mesodermo.

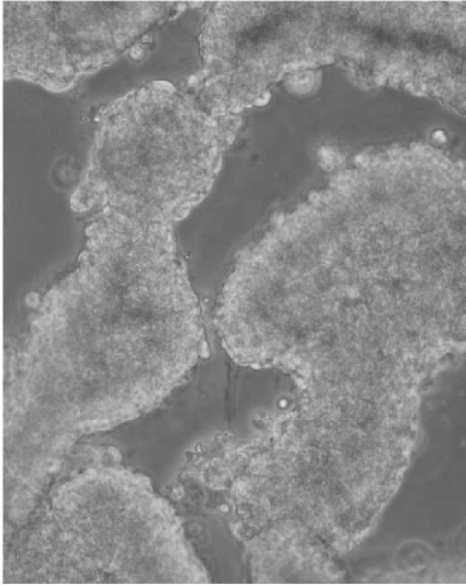


FIG. 1A

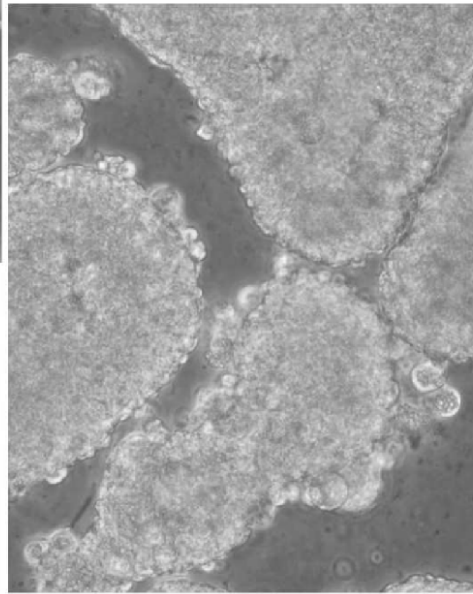


FIG. 1B

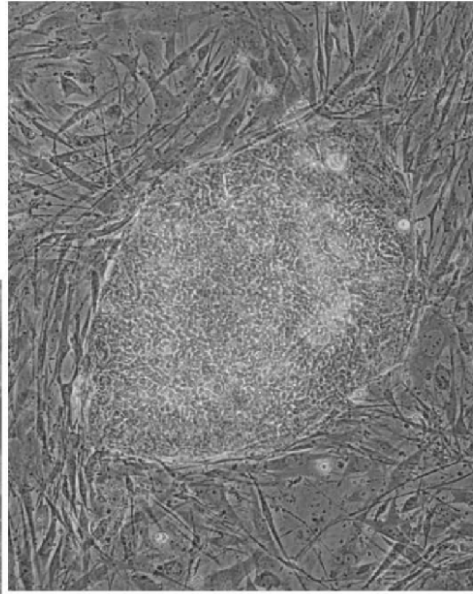
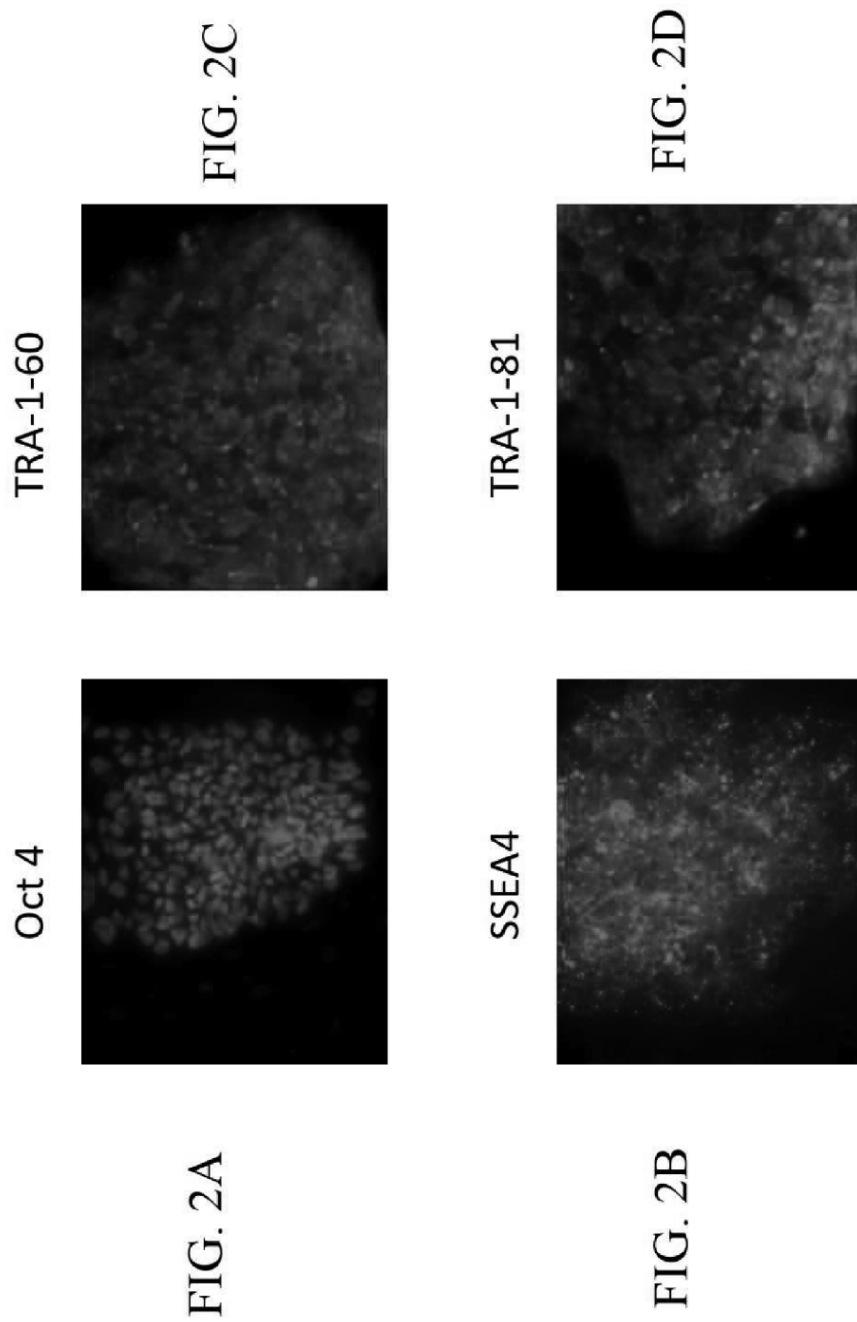


FIG. 1C



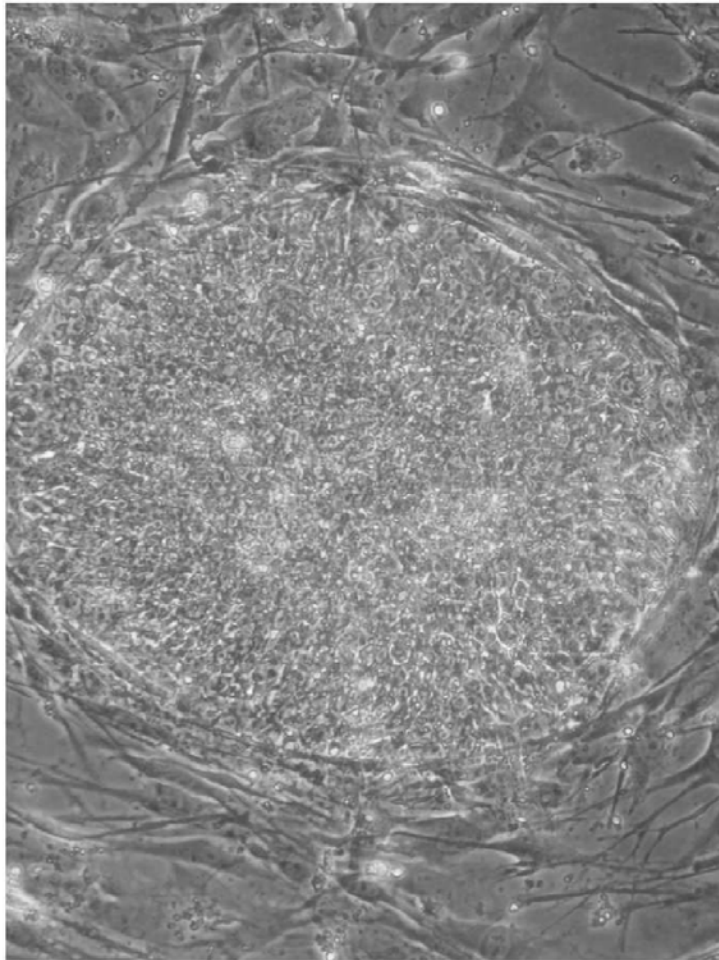


FIG. 3A

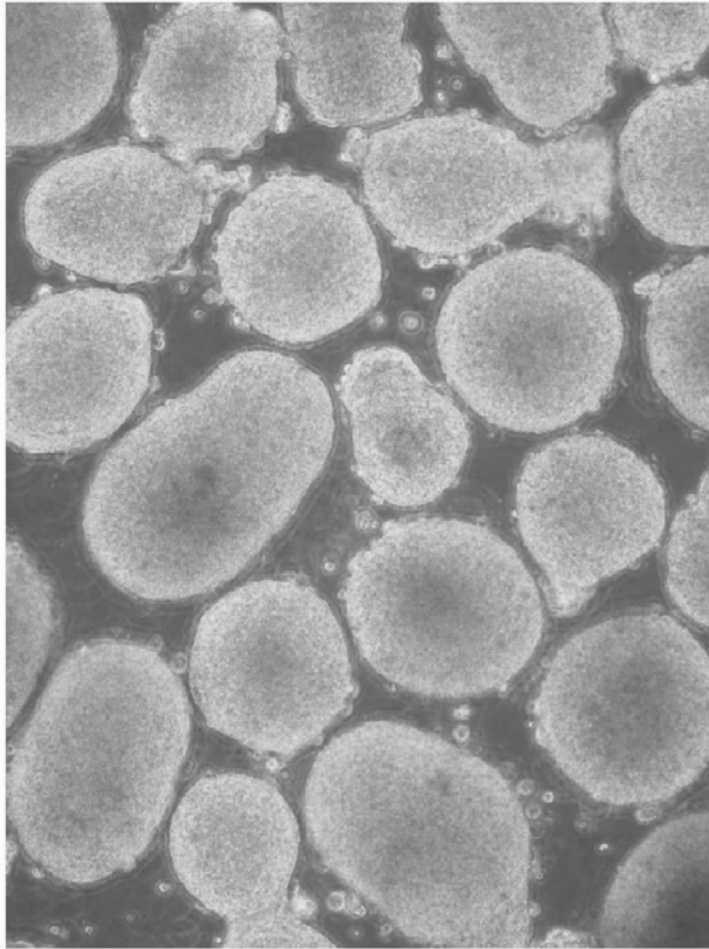


FIG. 3B

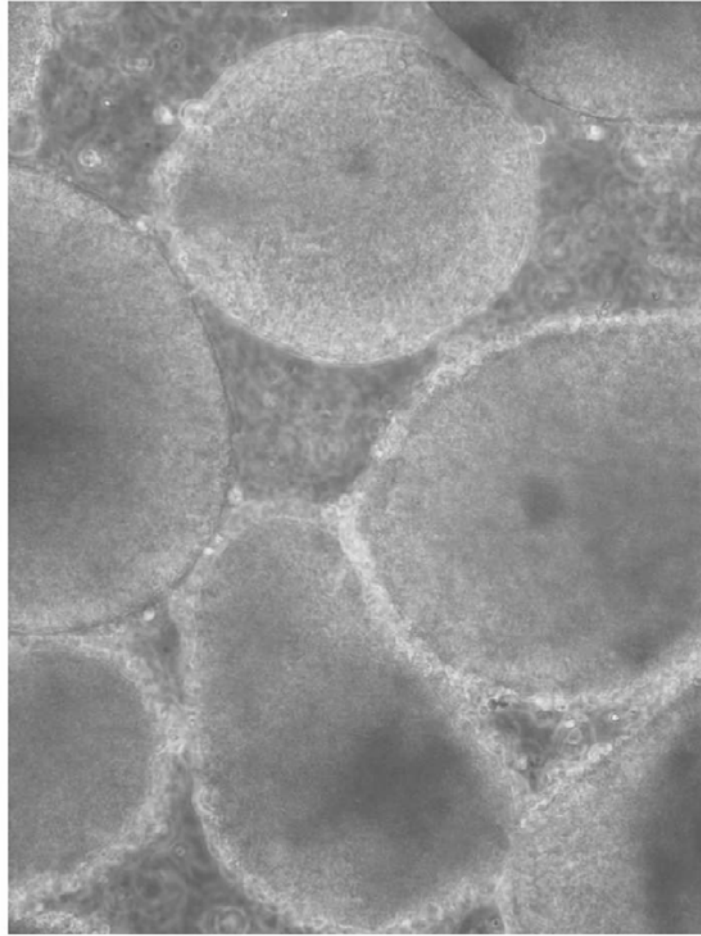


FIG. 3C

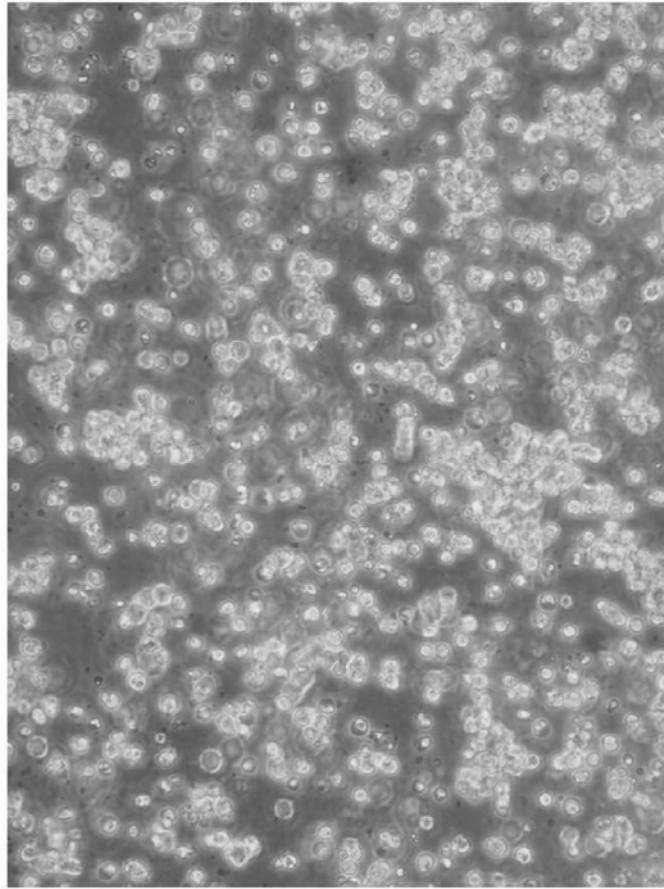


FIG. 4A

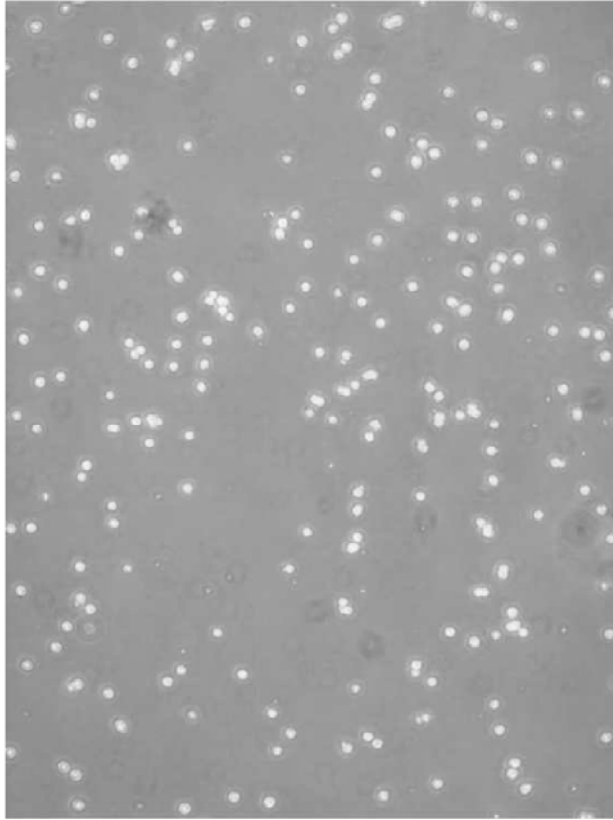


FIG. 4B

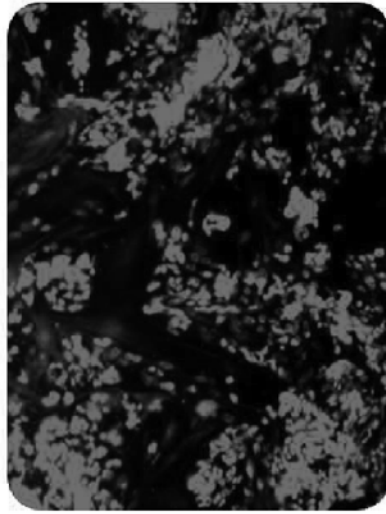


FIG. 5C

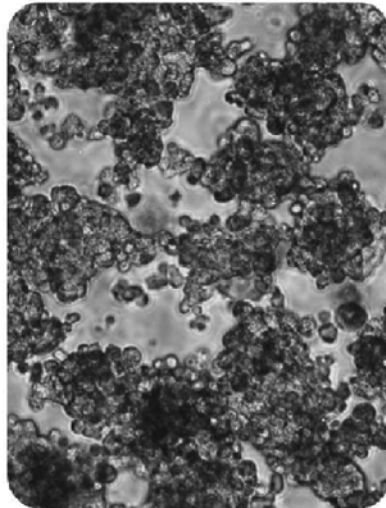


FIG. 5B

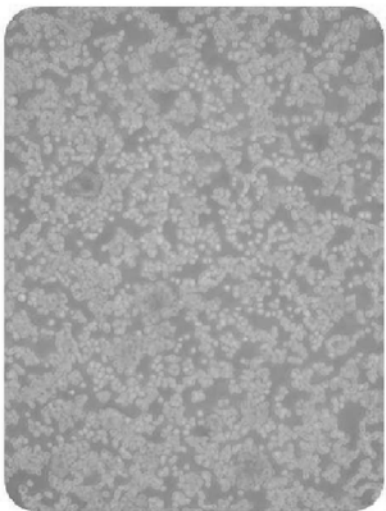


FIG. 5A

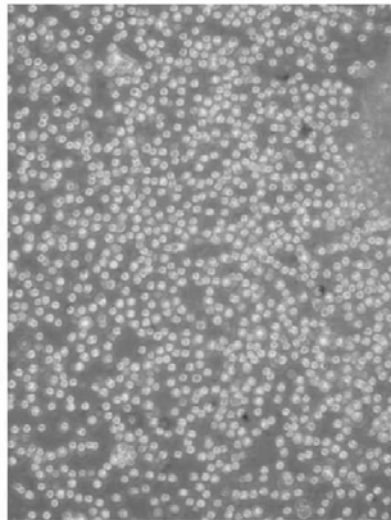


FIG. 6A

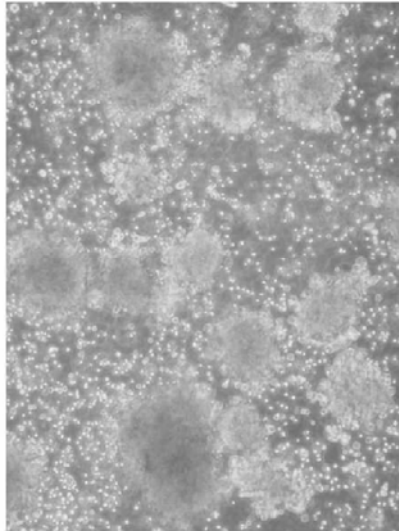


FIG. 6B

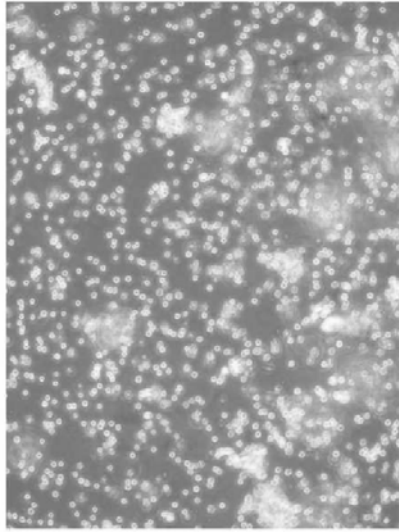


FIG. 6C

Nestina

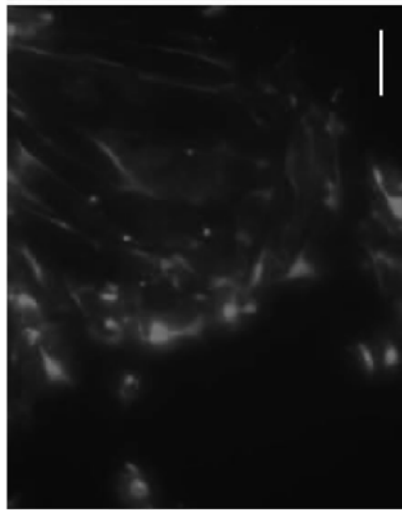


FIG. 7A

β tubulina

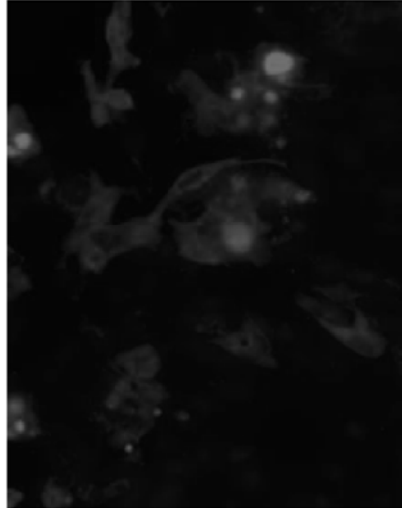


FIG. 7B

PSA NCAM

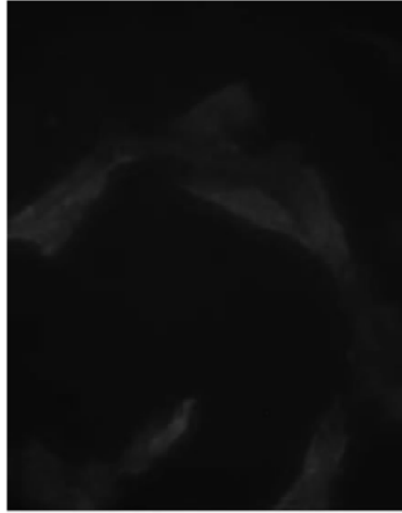


FIG. 7C

FIG. 8A

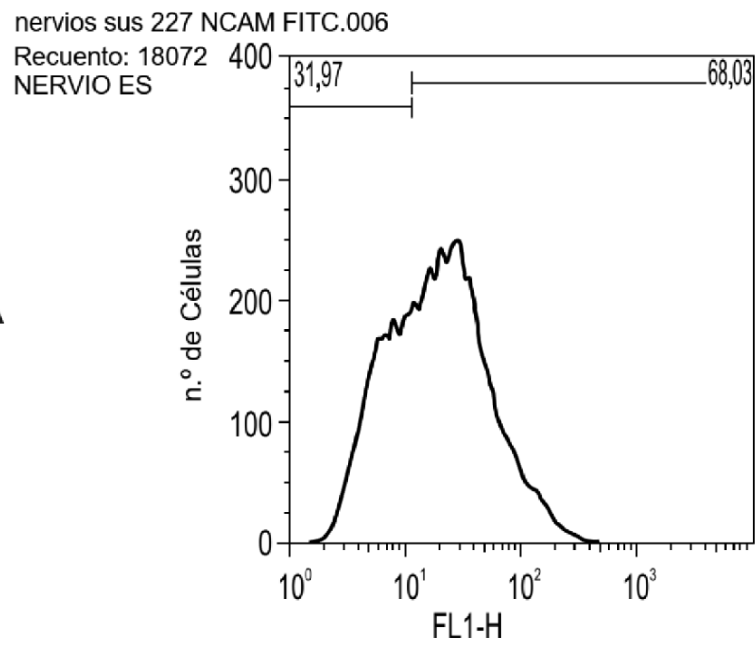
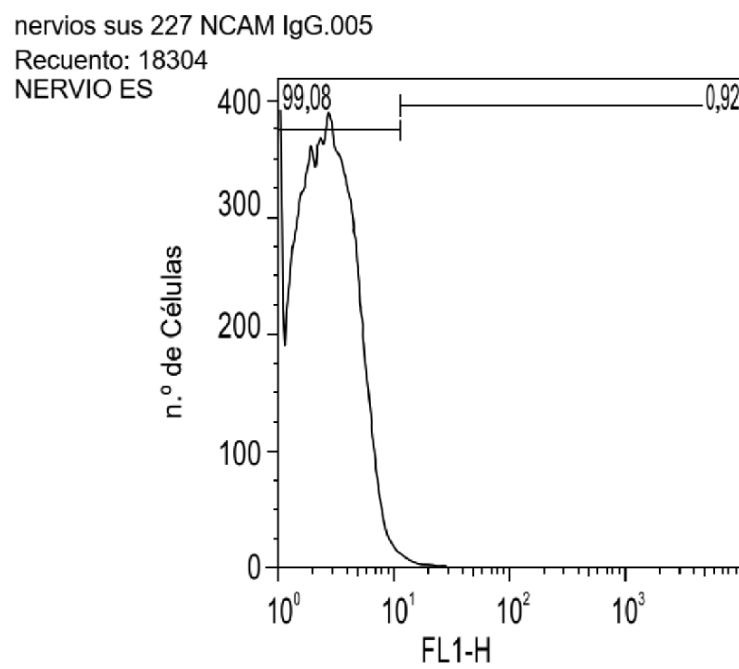


FIG. 8B



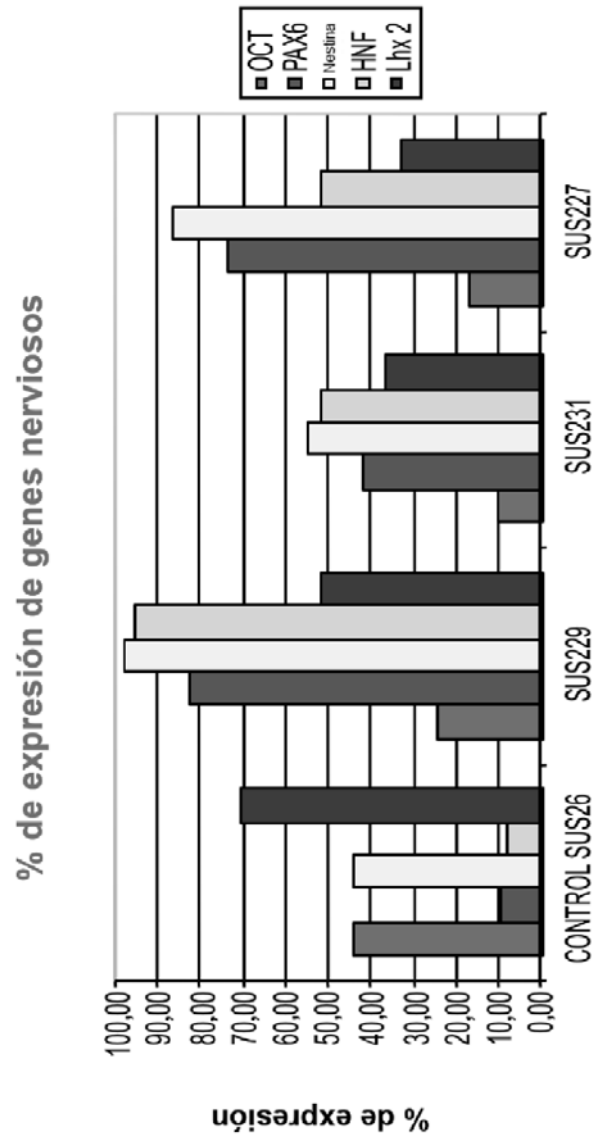
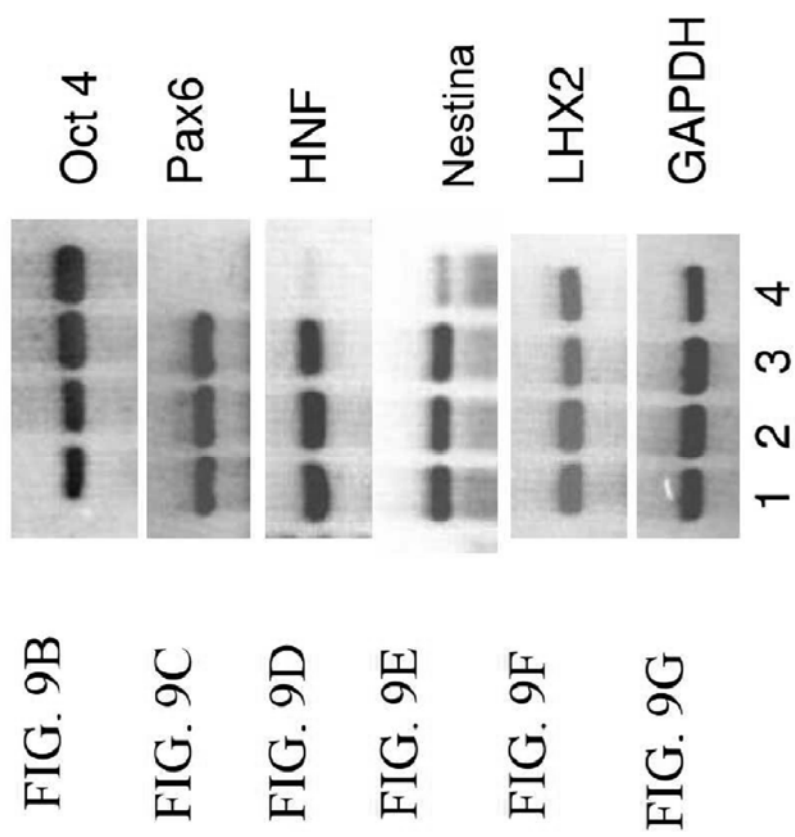


FIG. 9A



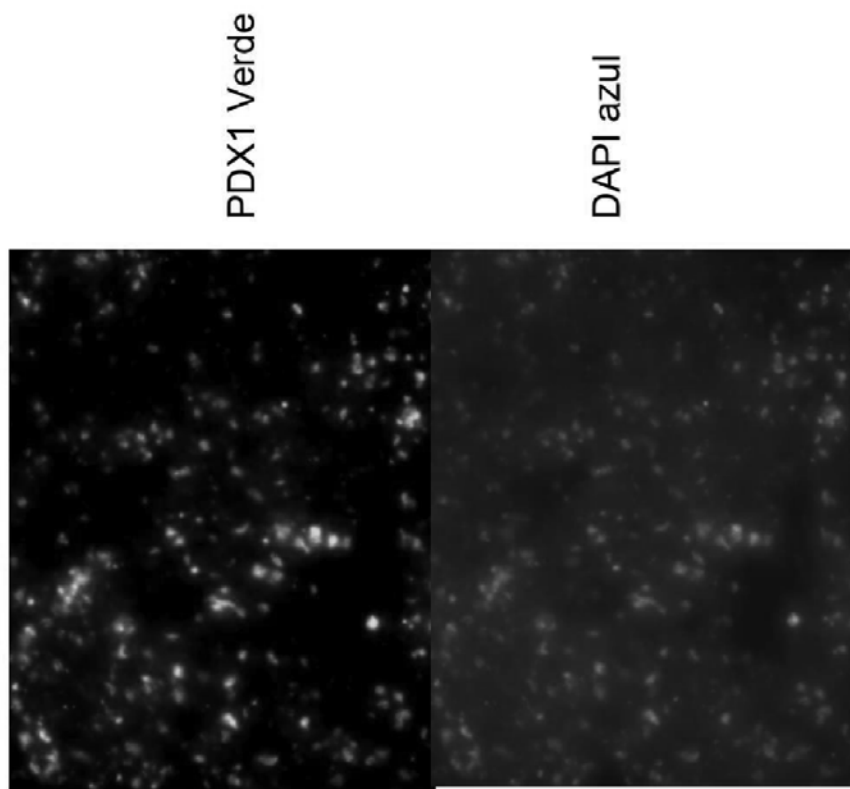


FIG. 10A

FIG. 10B

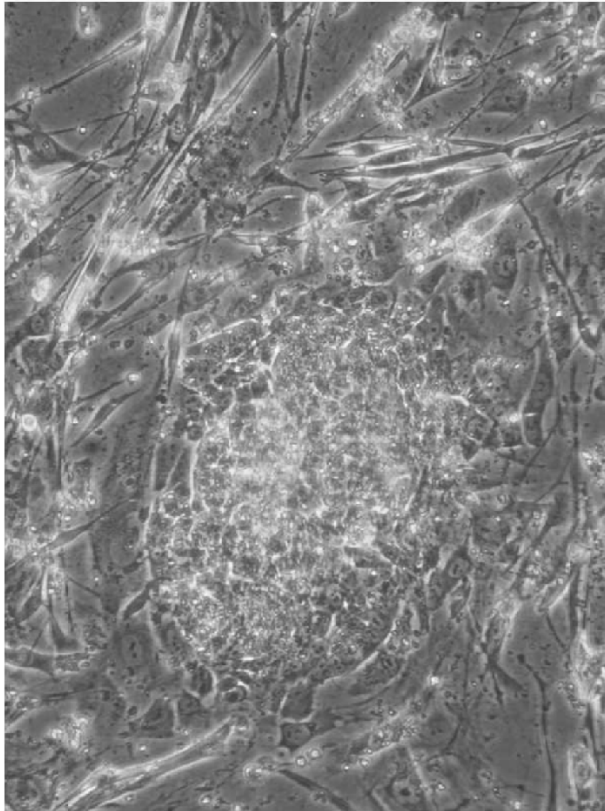


FIG. 11B

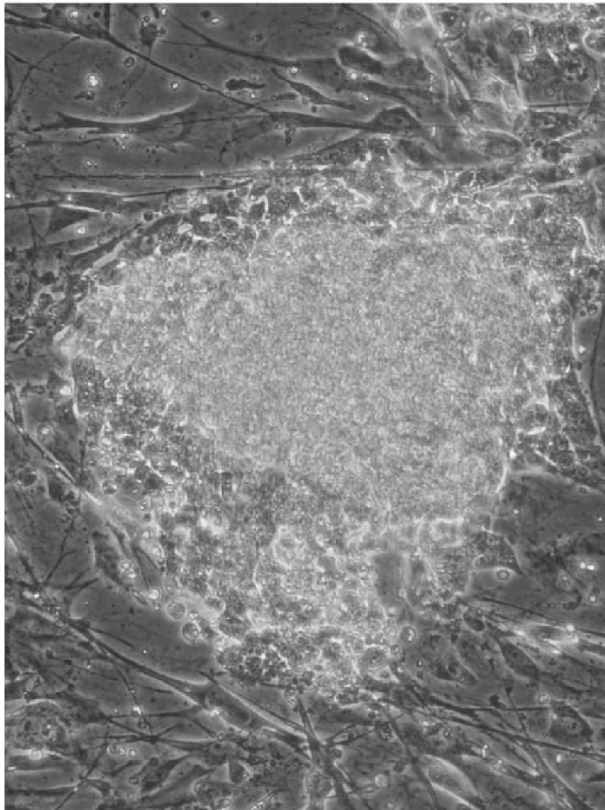
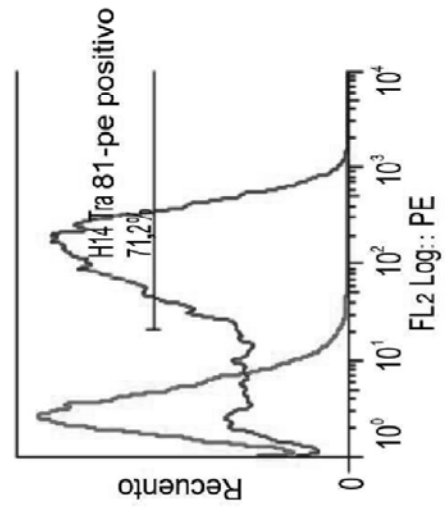
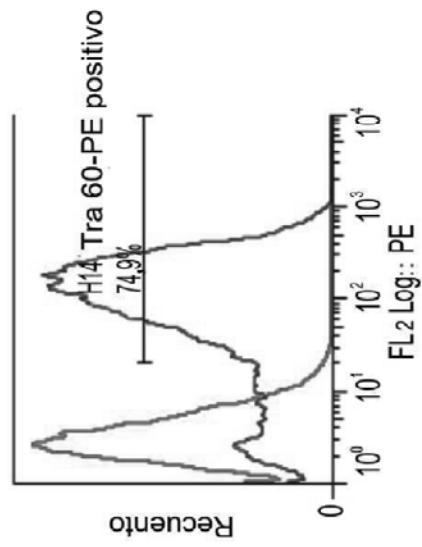
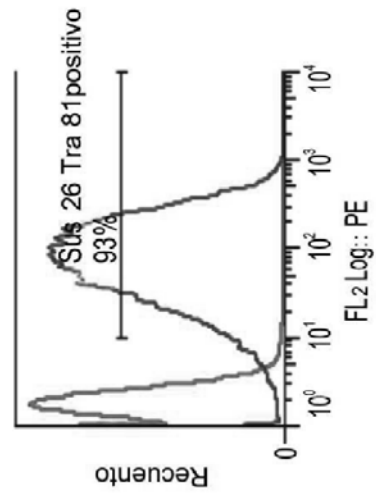
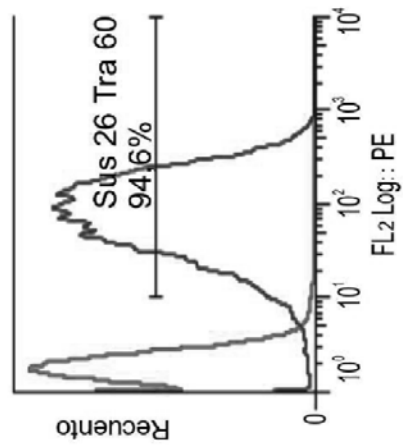


FIG. 11A





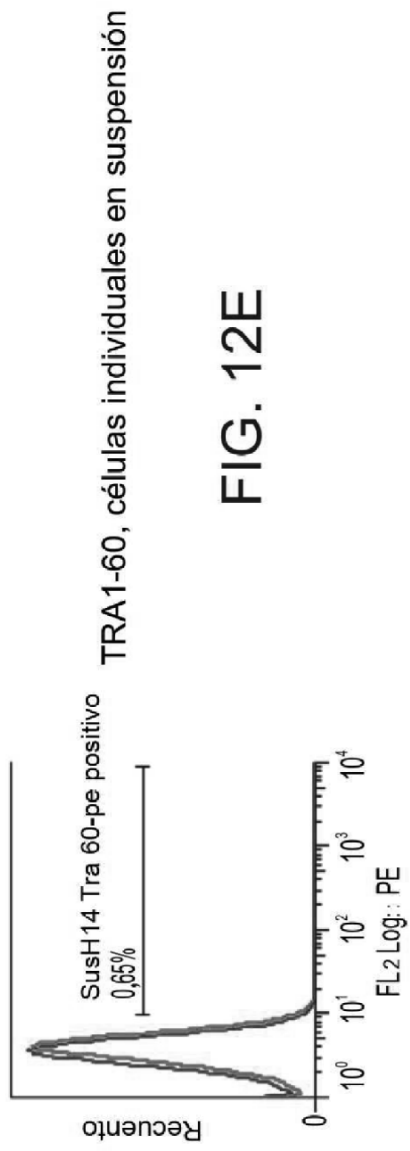


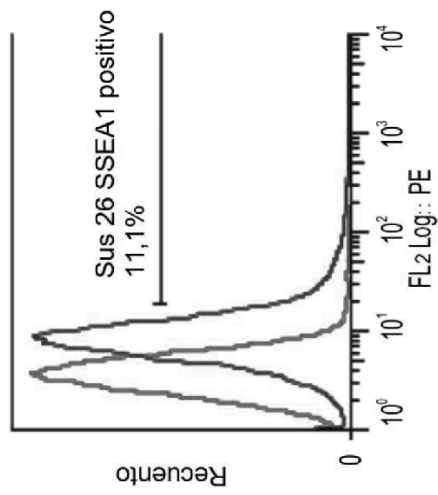
FIG. 12E

TRA1-60, células individuales en suspensión



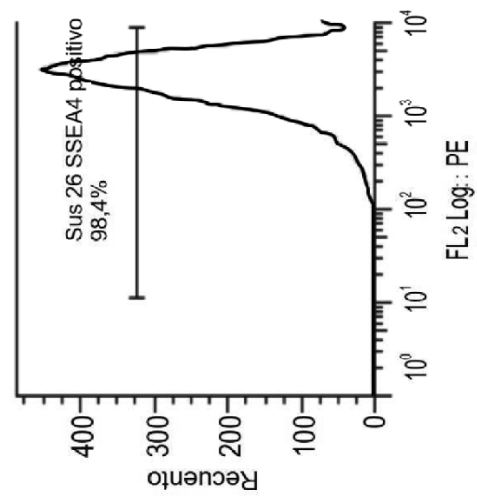
FIG. 12F

TRA1-81, células individuales en suspensión



SSEA1 agregados de suspensión

FIG. 12G



SSEA4 agregados de suspensión

FIG. 12H

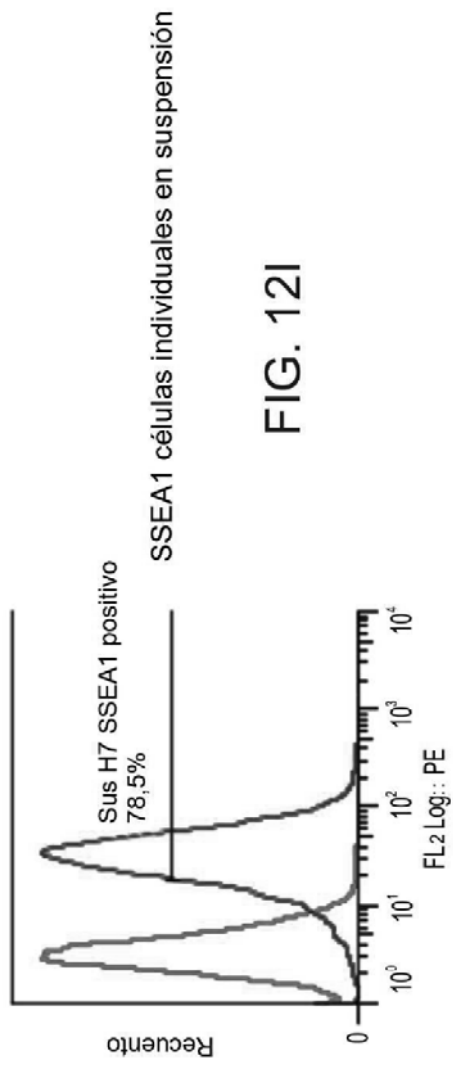


FIG. 12I

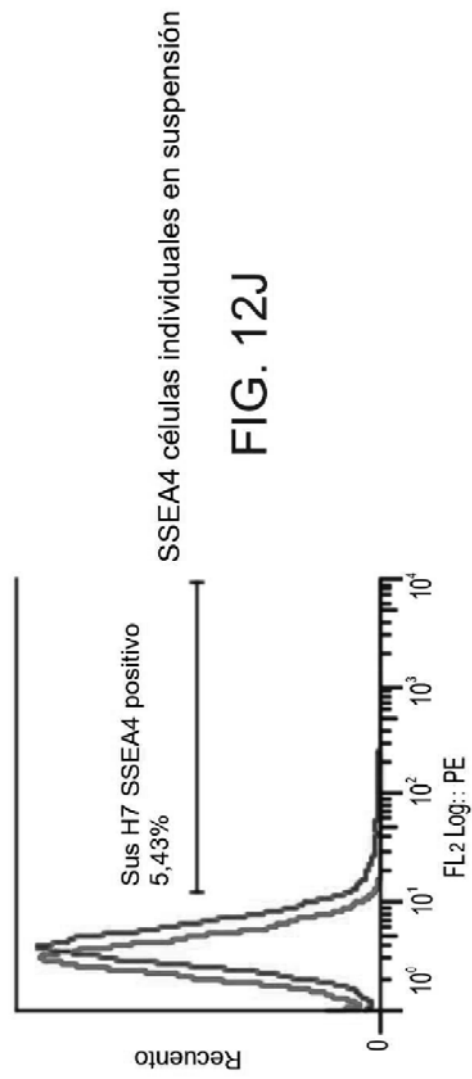


FIG. 12J

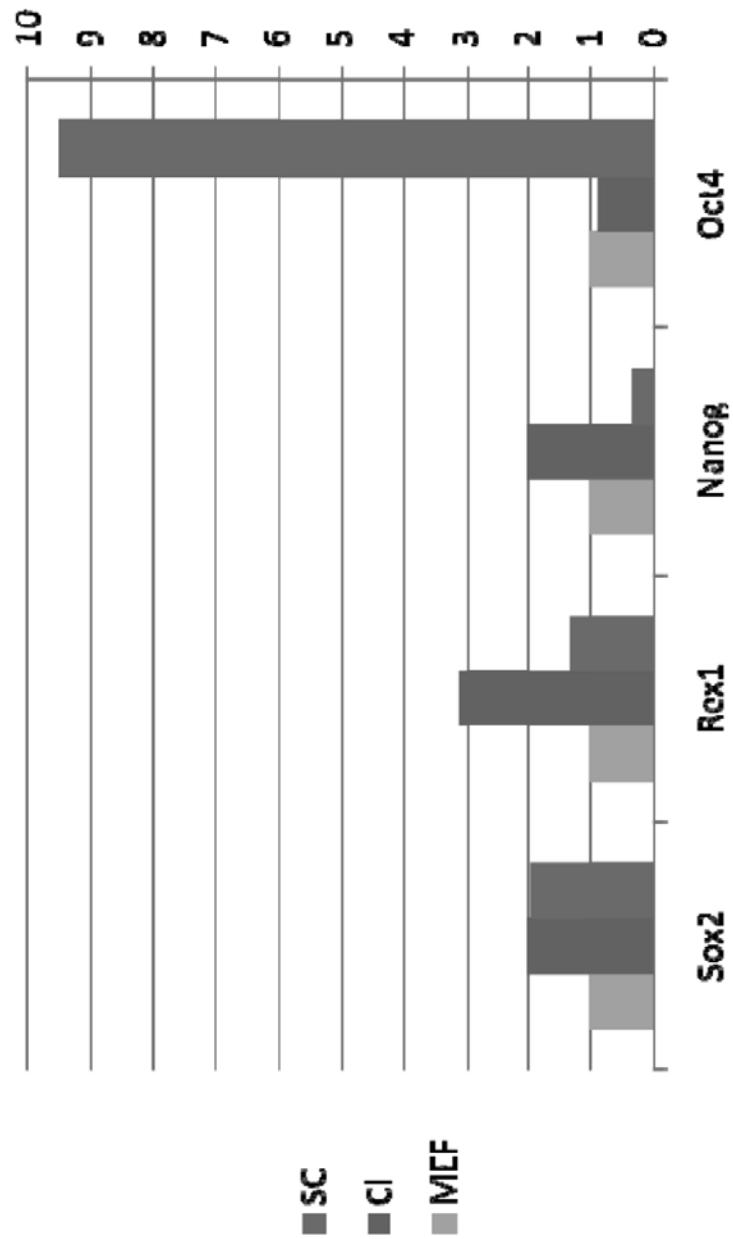


FIG. 13A

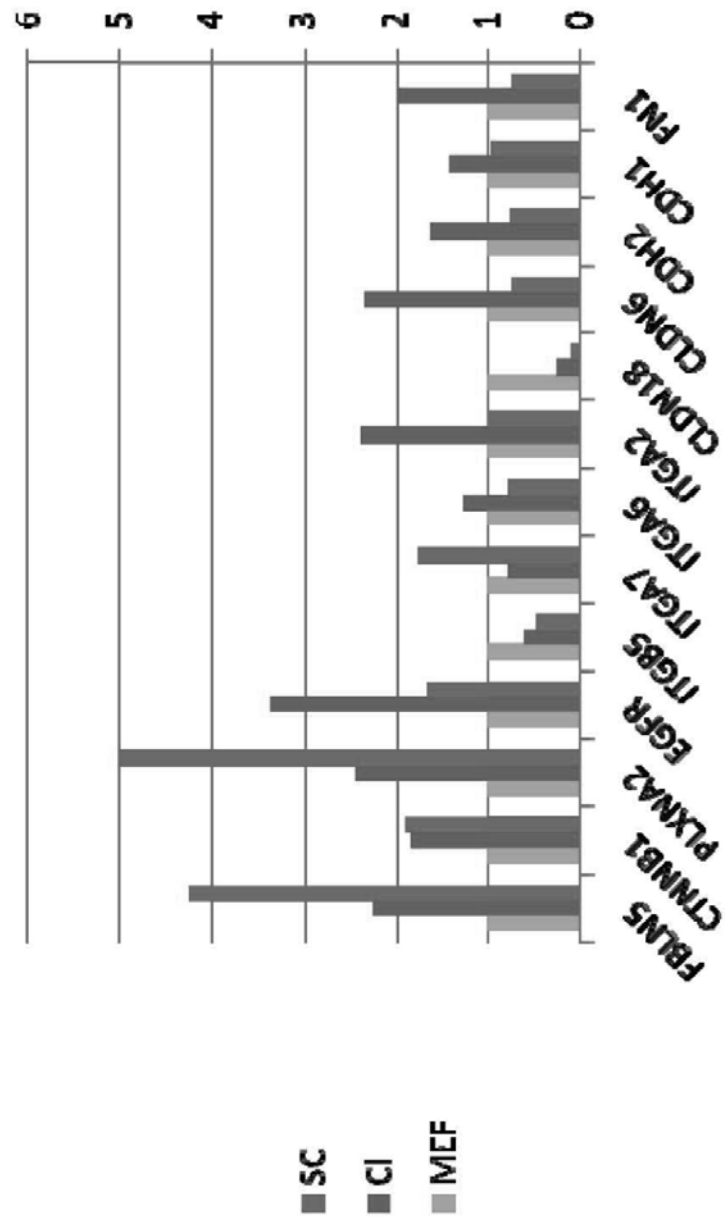


FIG. 13B

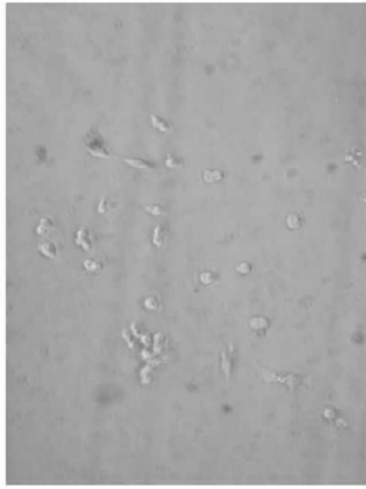


FIG. 14

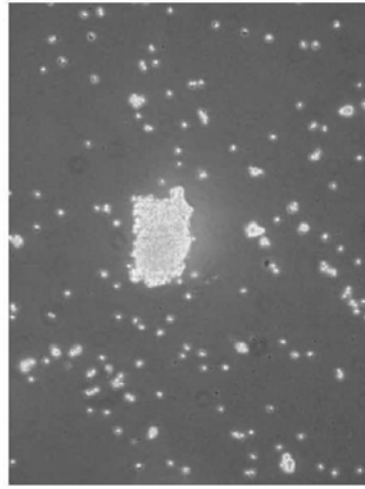


FIG. 15



FIG. 16B

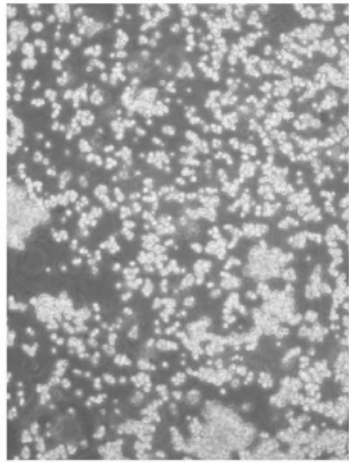


FIG. 16A

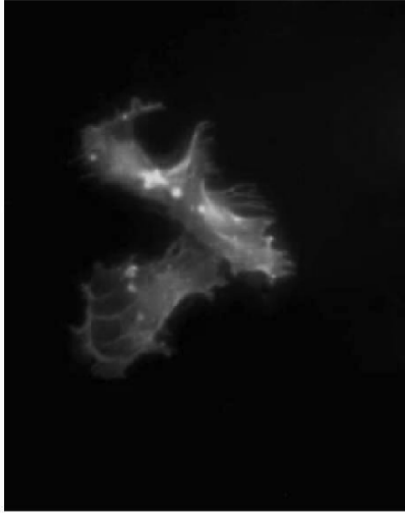


FIG. 17B



FIG. 17A

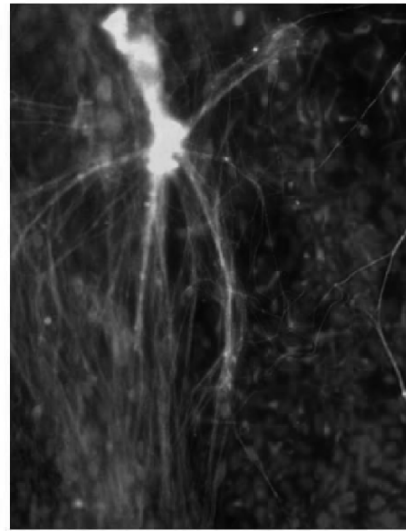


FIG. 17C

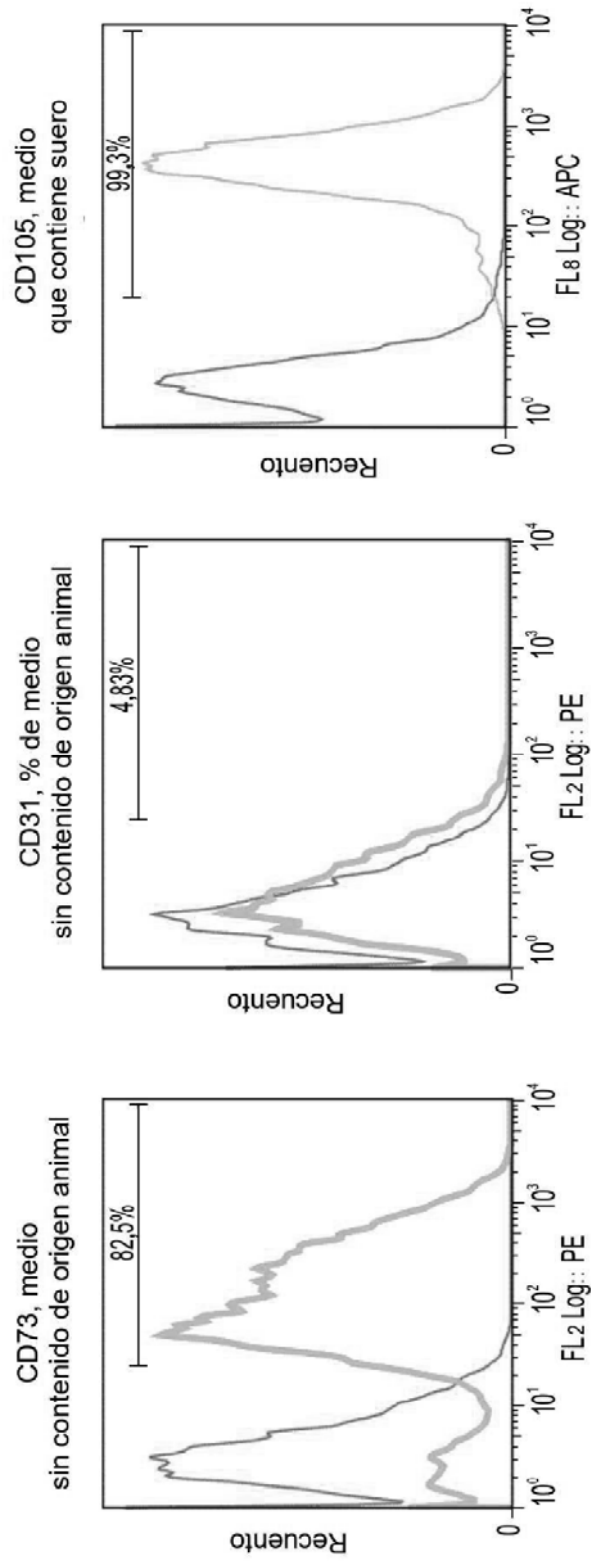


FIG. 18A

FIG. 18B

FIG. 18C

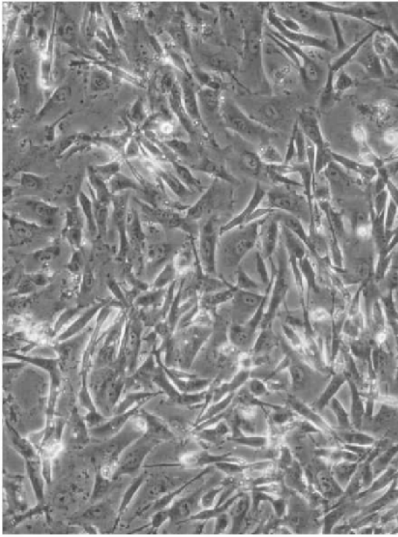


FIG. 19B

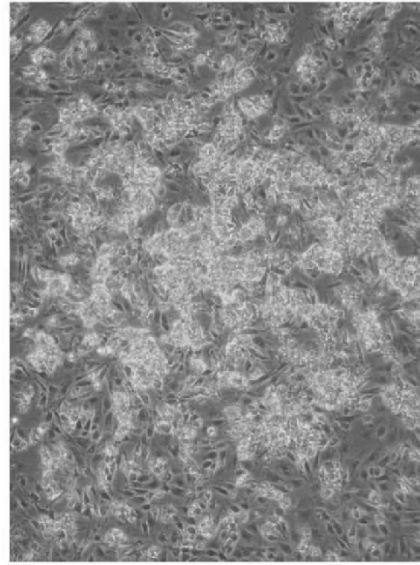


FIG. 19D

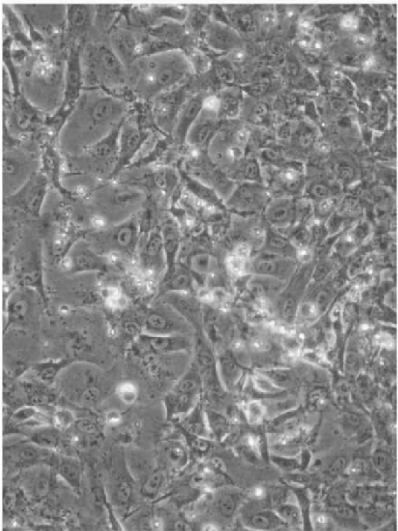


FIG. 19A

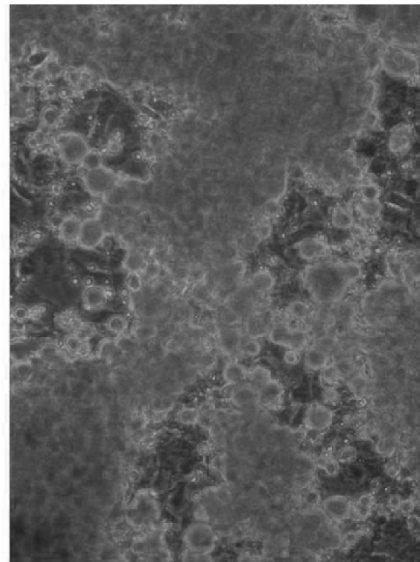


FIG. 19C

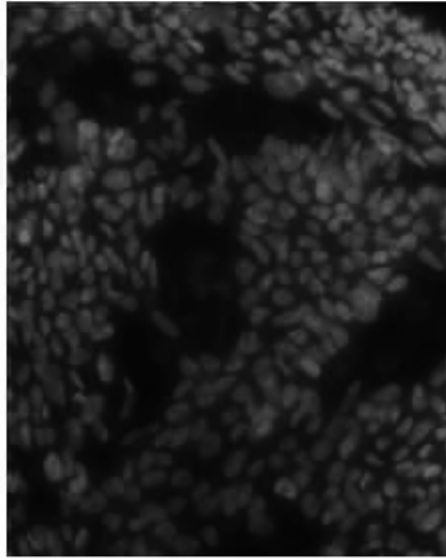


FIG. 20B

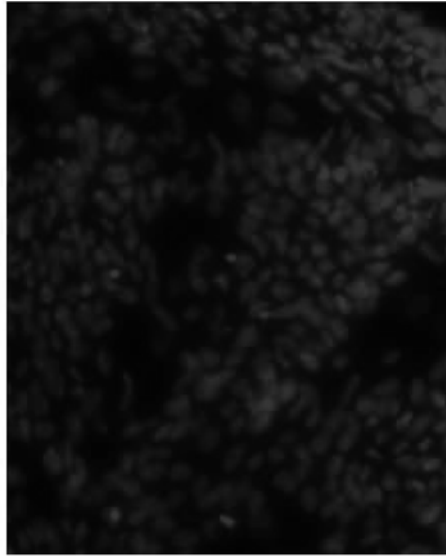


FIG. 20A