

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 864**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0735** (2010.01)  
**C12N 5/074** (2010.01)  
**C12N 5/0775** (2010.01)  
**C12N 5/0789** (2010.01)  
**C12N 5/0797** (2010.01)  
**C07K 14/51** (2006.01)  
**A61K 6/00** (2006.01)  
**A61P 1/02** (2006.01)  
**A61K 35/545** (2015.01)  
**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2013 PCT/CN2013/071408**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14121449**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2013 E 13874559 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2954047**

54 Título: **Preparación de una estructura de tipo dental usando células madre**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.06.2020**

73 Titular/es:

**GUANGZHOU INSTITUTES OF BIOMEDICINE  
AND HEALTH, CHINESE ACADEMY OF  
SCIENCES (100.0%)  
190 Kaiyuan Avenue, Science Park, Luogang  
District  
Guangzhou, Guangdong 510530, CN**

72 Inventor/es:

**PEI, DUANQING;  
CAI, JINGLEI;  
LIU, PENGFEI;  
CHEN, SHUBIN y  
ZHANG, YANMEI**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 763 864 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**

Preparación de una estructura de tipo dental usando células madre

**Campo de la invención**

5 La presente descripción se refiere al campo de la biotecnología, en particular, la presente descripción se refiere al uso de una célula madre en la preparación de una estructura de tipo dental, un medio de cultivo, y método para preparar una célula de tipo epitelial, un estuche de ensayo para preparar un ameloblasto y un método para preparar un ameloblasto.

**Antecedentes de la invención**

10 Los productos diferenciados de iPSCs (células madre pluripotentes inducidas) han sido usados satisfactoriamente en modelos de enfermedades, lesiones y envejecimiento en animales, como enfermedad de Parkinson, beta-talasemia, enfermedad hepática, y lesión de la médula espinal.

Sin embargo, ningún órgano sólido o tejidos sólidos como los dientes han sido generados con iPSCs humanas.

**Sumario de la invención**

15 Considerando todo esto, la presente descripción se dirige a proporcionar el uso de una célula madre en la preparación de una estructura de tipo dental, un medio de cultivo, un método para preparar una célula de tipo epitelial, un estuche de ensayo para preparar un ameloblasto y un método para preparar un ameloblasto. La invención está definida en las reivindicaciones.

20 En un primer aspecto de la presente invención, según una realización de la presente descripción, se proporciona el uso de una célula madre en la preparación de una estructura de tipo dental, en que el tipo dental se produce en un animal mamífero por medio de trasplante de xenoinjertos y en que la célula madre es inducida a formar una célula de tipo epitelial y la célula de tipo epitelial es recombinada con un mesénquima dental de otro animal y cultivada para formar un explante reconstituido antes del trasplante del xenoinjerto, en que la célula madre es una célula madre de embrión o una célula madre pluripotente inducida y en que el animal mamífero se selecciona entre un grupo que consiste un ratón y una rata. Y en una realización, la célula madre pluripotente inducida puede ser producida a partir de una célula humana y la célula humana puede ser al menos una seleccionada entre un grupo que consiste en célula de orina, fibroblasto de la piel y célula madre del ligamento periodontal. Y en una realización, la estructura de tipo dental contiene ameloblastos.

30 La expresión "estructura de tipo dental" puede ser identificada con la sección de histología y teñida con anticuerpos de antígeno leucocitario humano-I (HLA-I, 1:50, abcam, Cat. nº ab70328) y antígeno de núcleo humano (hNA, 1:500, Millipore, Cat. nº 1969098), indicando la estructura y derivados de células humanas en la estructura de tipo dental. Puede ser usada la tinción inmunohistoquímica con Amelobastina (Amel, 1:100, Santa, Cat. nº sc-50534) para describir la apariencia de ameloblastos que secretan esmalte en las estructuras de tipo dental, que son producidas por las láminas epiteliales derivadas de hESCs o iPSCs.

35 En otro aspecto de la presente descripción, se puede proporcionar un medio de cultivo. Según una realización de la presente descripción, el medio de cultivo puede comprender: un medio basal, que medio DMEM/F12; un complemento N2; un ácido retinoico y un BMP-4. En una realización, el medio de cultivo puede comprender un complemento N2 de aproximadamente 1% p, un ácido retinoico aproximadamente 1 µM y BMP-4 de aproximadamente 25 ng/ml. Los inventores encuentran sorprendentemente que el medio de cultivo anteriormente citado puede ser eficazmente usado para inducir la diferenciación de una célula madre en forma de célula de tipo epitelial. Y la célula de tipo epitelial puede ser adicionalmente trasplantada en el cuerpo de un animal, para formar una estructura de tipo dental.

45 En otro aspecto de la presente descripción, se puede proporcionar un método para preparar una célula de tipo epitelial. Según una realización de la presente descripción, el método puede comprender cultivar una célula madre para inducir que la célula madre se diferencia en forma de la célula de tipo epitelial usando el medio de cultivo anteriormente descrito, en que la célula madre es una célula madre de embrión o una célula madre pluripotente inducida. Los inventores descubren sorprendentemente que el método usa el medio de cultivo anteriormente citado y entonces el método puede ser eficazmente usado para inducir la diferenciación de la célula madre en forma de célula de tipo epitelial. Y la célula de tipo epitelial puede ser adicionalmente trasplantada en el cuerpo de un animal, para formar una estructura de tipo dental. Según una realización de la presente descripción, la célula madre pluripotente es producida a partir de una célula humana. Según una realización de la presente descripción, la célula humana es al menos una seleccionada entre un grupo que consiste en célula de orina, fibroblasto de la piel y célula

madre de ligamento periodontal. El experto en la técnica puede obtener "células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs)" a partir de células de orina humanas mediante dos sistemas diferentes: 1) sistema retroviral basado en pMX (Oct4, Sox2, Klf4, y c-Myc, Addgene); 2) electroporación con vectores episomales oriP/EBNA (Oct4, Sox2 SV40LT, Klf4 y miR302/367). El experto en la técnica puede obtener "células madre pluripotentes inducidas humanas" (hiPSCs)" a partir de fibroblastos de piel humana y ligamento periodontal mediante el sistema retroviral basado en pMX (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc, Addgene) (Esteban, M.A. et al., Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010: 6,71-9; Cai, J. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem*. 2010: 285,11227-34). Bajo condiciones de cultivo de células madre embrionarias humanas (hESCs), las hiPSCs son muy similares a las hESCs en morfología celular, propiedades de crecimiento, expresión de marcadores superficiales, formación de teratomas y diferenciación *in vitro* multi-linaje.

En una realización, las "células de orina humanas" descritas en la presente memoria descriptiva son preferentemente células que son recogidas solamente de la corriente media de orina con 150-200 ml en recipientes esterilizados apropiados (hasta 500 ml). En una realización, la célula de orina humana puede ser obtenida a través de los siguientes procedimientos. Se centrifugaron muestras de orina a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se volvieron a poner en suspensión en PBS que contenía anfotericina B y penicilina/estreptomicina. Después de lavar con PBS, el sedimento celular de la muestra de orina se cultiva en medio primario que contiene DMEM/Ham's F12 1:1 (Hyclone), 10% de suero bovino fetal (FBS; PPA), estuche de ensayo SingleQuot CC-4127 REGM (Lonza), anfotericina B y penicilina/estreptomicina. El medio se mantuvo en un volumen pequeño durante los 2 primeros días. En los días siguientes, el medio se cambió a REBM (medio renal epitelial basa 2, Lonza) que contenía estuche de ensayo SingleQuot CC-4127 REGM (Lonza). Aparecieron rutinariamente células colonias visibles después de 3-6 días, normalmente 3-5 por muestra como promedio. El primer cambio de medio completo se hizo después de que se observaron las primeras células/colonias. Seguidamente las células se dividieron en una superficie más grande ayudadas por tripsina al 0,25% que contenía EDTA 1 mM cuando el cultivo creció de forma congruente. Se obtuvieron RPTECs a partir de una biopsia y se mantuvieron en medio celular de orina.

En una realización, los "fibroblastos de la piel" descritos en la presente memoria descriptiva son preferentemente células que son recogidas a partir de un trozo pequeño de tejido de piel humana. En una realización, el fibroblasto de la piel puede ser o tenido a partir de los siguientes procedimientos. El tejido de la piel fue desmenuzado en forma de pequeños cubos de tejido y seguidamente se dispusieron en placas en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% p (FBS; Hyclone), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina (Hyclone). Los queratinocitos de la piel parece que en primer lugar rodean los pequeños trozos de tejidos de piel. Con posterioridad se produjeron los fibroblastos de la piel. Se pueden usar células en los pasos P3 - P5.

En una realización, "células madre del ligamento periodontal" descritas en la presente memoria descriptiva son preferentemente células que son recogidas de tejidos de ligamento periodontal humano (PDL) separadas del primer tercio de la superficie radicular. En una realización, las células madre del ligamento periodontal pueden ser obtenidas a través de los siguientes procedimientos. Se trocearon tejidos de PDL en forma de cubos de tejido pequeños (aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) y fueron digeridos con una solución de 3 mg/ml de colagenasa (tipo () con 4 mg/ml de dispasa (ambos productos de la entidad Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) en medio esencial mínimo  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM, Hyclone, Road Logan, UT, USA) durante 15 minutos a 37°C con agitación vigorosa. Los explantes de tejidos se dispusieron seguidamente en placas y se cultivaron en  $\alpha$ -MEM complementado con 10% p de suero bovino fetal (FBS; Hyclone), 0,292 mg/ml de glutamina (Hyclone), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina (Hyclone) y 100  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico (Sigma - Aldrich). Se obtuvieron cultivos de colinas derivados de células únicas usando la técnica de dilución limitante y se cultivaron células de paso 0 (P0). Para evitar cambios en los comportamientos celulares que están asociados a un cultivo prologado, se pueden usar las células en los pasos P3 - P5.

En otro aspecto de la presente descripción, se puede proporcionar un estuche de ensayo para preparar un ameloblasto, y el estuche de ensayo puede comprender: un primer medio de cultivo, que es el medio de cultivo anteriormente descrito; un segundo medio de cultivo, que es medio DMEM complementado con FBS, aminoácido no esencial, glutamina, penicilina y estreptomicina, en que el primer medio de cultivo y el segundo medio de cultivo se proporcionan un recipiente diferente, respectivamente. Los inventores descubrieron sorprendentemente que el estuche de ensayo puede ser usado para preparar ameloblastos. Según una realización de la presente descripción, el estuche de ensayo puede comprender adicionalmente un tercer medio de cultivo, que es al menos uno seleccionado entre medio mTeSR1<sup>MC</sup>, medio E8 y medio acondicionado KSR. Según una realización de la presente descripción, el segundo medio de cultivo comprende FBS a aproximadamente 10% p, glutamina aproximadamente 2 mM, aminoácido no esencial aproximadamente 0,1 mM, penicilina en aproximadamente 100 U/ml y estreptomicina en aproximadamente 100 U/ml.

En una realización, la célula de tipo epitelial puede formar una lámina epitelial. En una realización, las células que se diferencian pueden ser recolectadas en forma de las láminas epiteliales intactas en el día 7 (D7) y D14 durante la diferenciación. Se pueden obtener trozos pequeños de láminas epiteliales el D21 durante la diferenciación. En una

realización, las células epiteliales que se diferencian de de hESCs y de iPSCs pueden ser identificadas con la expresión de marcador de células pluripotentes Oct4, marcadores epiteliales K18, p63, K19, CD29 y K14, y se observaron bajo microscopios electrónicos (EM).

5 Como se describe en la presente descripción, las láminas epiteliales intactas derivadas de células madre pueden ser adicionalmente inducidas a formar estructuras de tipo dental mediante recombinación en mesénquima dental.

10 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un ameloblasto, según una realización de la presente descripción, y el método comprende preparar una célula de tipo epitelial mediante un método que comprende cultivar una célula madre usando un primero medio de cultivo, que es medio DMEM/F12 complementado con un complemento N2 de aproximadamente 1% p de ácido retinoico aproximadamente 1  $\mu$ M y  
 15 BPM-4 en aproximadamente 25 ng/ml, para inducir que la célula madre se diferencie en forma de la célula de tipo epitelial; recombinar la célula de tipo epitelial con un mesénquima dental en un primer animal para obtener una muestra recombinante; cultivar la muestra recombinante resultante para obtener un explante reconstituido y trasplantar el explante reconstituido a un segundo animal durante un tiempo predeterminado para formar el ameloblasto, en que la célula madre es una célula madre de embrión o una célula pluripotente inducida y en que el primer animal y el segundo animal se seleccionan independientemente entre un grupo que consiste en ratón y rata, respectivamente.

20 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de procedimientos para la generación de dientes a partir de hiPSCs derivadas de células de orina en un ejemplo de la presente descripción. Se desarrolla un sistema de cultivo quimérico para la regeneración dental a partir de células de orina hESCs y humana derivada de iPSCs. Brevemente, haciendo referencia a la Fig. 1, pueden ser inducidas hESCs o hiPSCs para producir láminas epiteliales capaces de sustituir el epitelio dental de ratón E14.5 en un procedimiento de reconstitución. Los explantes reconstituidos pueden ser seguidamente cultivados in vitro durante 1-2 días y trasplantados por debajo de la cápsula sub-renal de ratón durante 3 semanas ( $\geq$  2 semanas) para la regeneración dental (Fig. 1).

25 Según una realización de la presente descripción, la célula madre es cultivada durante aproximadamente 5-10 días, preferentemente de forma aproximada 7 días, usando el medio de cultivo anteriormente descrito, Según una realización de la presente descripción, el segundo animal es preferentemente de inmunodeficiencia, que puede ser provocada administrando una dosis de ciclosporina A al animal. Según la realización de la presente descripción, el primer animal es un ratón fetal y el segundo animal es un ratón con supresión inmunológica. Según una realización de la presente descripción, el mesénquima dental es mecánicamente separado del germen dental y el germen dental  
 30 es digerido usando una proteasa antes de la separación. Según una realización de la presente descripción, la proteasa es una Dispasa de aproximadamente 0,75 mg/ml. Según una realización de la presente descripción, la muestra recombinante resultante es cultivada usando medio DMEM complementado con FBS, aminoácido no esencial, glutamina, penicilina y estreptomycin. Según una realización de la presente descripción, el tejido recombinante es trasplantado a un espacio bajo una cápsula renal del ratón con supresión inmunológica. Según una  
 35 realización de la presente descripción, el tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 4 semanas. Según una realización de la presente descripción, el tiempo predeterminado es de aproximadamente 3 semanas. Según una realización de la presente descripción, la célula madre es cultivada usando al menos uno seleccionado entre medio mTeSR1<sup>MC</sup>, medio E8 y medio acondicionado KSR antes de preparar la célula de tipo epitelial, en que el medio es sustituido con el medio de cultivo anteriormente descrito cuando la célula madre cultivada alcanza una confluencia  
 40 de aproximadamente 60-80%, para obtener la célula de tipo epitelial. Se encuentra sorprendentemente por los inventores que el método anteriormente descrito puede ser eficazmente usado para producir un ameloblasto. Y el ameloblasto puede estar contenido en una estructura de tipo dental. Con el examen histológico, seguido de descalcificación, lo inventores encuentran que la estructura de tipo dental contiene pulpa dental, dentina, espacio de esmalte y órgano de esmalte. con un espectroscopio Raman y un método de nanoindentación, los inventores  
 45 encuentran que la estructura de tipo dental tiene composiciones similares a la de los dientes humanos de adulto tanto en esmalte como en dentina. Y la dureza del esmalte en las estructuras de tipo dental regenerativa formadas a partir de célula madre de embrión alcanza un octavo de la del diente humano adulto, y la dureza del esmalte en las estructuras de tipo dental formadas a partir de iPSC pueden alcanzar de un cuarto a un tercio de la de los dientes humanos de adulto. Las estructuras de tipo dental obtenidas en los ejemplos de la presente descripción fueron confirmadas por propiedades físicas como el módulo de elasticidad y la dureza mediante nanoindentación y los  
 50 constituyentes mediante espectroscopía Raman.

55 Se conocía que las iPSCs (célula madre pluripotente inducida) podían ser eficazmente reprogramadas a partir de muchos tipos de células como queratinocitos, células madre neurales, células madre adiposas, meningiocitos, membrana perióstica y tejidos extraembrionarios. Y los inventores encontraron de forma interesante que el riñón contiene una red extensiva de túbulos, cuya superficie frontal es mayor que la piel. Como parte de una fisiología normal, aproximadamente 2000 a 7000 células de este sistema tubular y las partes descendentes del tracto urinario (uréter, vejiga y uretra) se desprenden y son excretadas en la orina diariamente. Estas células, en lo que sigue denominadas células de orina, no solo no están deterioradas, sino que son completamente funcionales y pueden ser  
 60 usadas para estudios in vitro. Aparte de esto, pueden ser recogidas en cualquier momento sin asistencia médica y se expanden fácilmente.

El experto en la técnica puede generar iPSCs humanas a partir de células tubulares renales en la orina (también denominadas células de orina humanas (hU)) mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, el experto en la técnica puede generar iPSC usando vectores retrovirales de factores de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. De forma más importante, las iPSCs procedentes de orina exhiben una excelente capacidad para diferenciarse, sugiriendo que la orina puede ser una fuente preferida para generar iPSCs. Y el experto en la técnica puede también derivar células madre pluripotentes inducidas por orina humana exentas de integración (ihU-iPSCs) a partir de células de orina humana (hU) mediante vectores episomales oriP/EBNA que portan una combinación de factores de reprogramación Oct4, Sox2, SV40LT, Klf4 y miR302/367 a través de electroporación (Yu, J. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science 2009:324, 797-801; Liao, B. et al. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. The Journal of biological chemistry 2011:286, 17359-17364). Por tanto, la presente invención describe el uso de una célula madre en la generación de las estructuras de tipo dental a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas y células madre embrionarias humanas (hESCs).

Se proporcionan aspectos y ventajas adicionales de las realizaciones de la presente descripción en parte en las siguientes descripciones, o resultarán evidentes en parte a partir de las siguientes descripciones, o podrán ser divulgadas a partir de la práctica de las realizaciones de la presente descripción

### Breve descripción de los dibujos

Las características y ventajas que anteceden, así como características y ventajas adicionales de las mismas, se comprenderán más claramente como consecuencia de una descripción detallada de realizaciones preferidas cuando se toman conjuntamente con los dibujos, en las cuales:

La Fig. 1 es una representación esquemática de procedimientos para la generación de dientes a partir de hESCs y hiPSCs derivadas de células de orina en un ejemplo de la presente descripción.

La Fig. 2 muestra las propiedades de los linajes epiteliales derivados de hESC/iPSC en un ejemplo de la presente descripción.

La Fig. 3 muestra las estructuras de tipo dental formadas a partir de la línea H1 ESC y las líneas de hiPSC en 3 semanas en un ejemplo de la presente descripción.

### Descripción detallada de la realización

La presente descripción será descrita en detalle haciendo referencia a los ejemplos que siguen. Las prácticas de laboratorio estándar están ilustradas en los ejemplos que siguen, que se usan para ilustrar el modo de realización de la presente invención. El alcance de la presente invención no se debe interpretar que está limitado a estos ejemplos. Según lo que se describe en la presente memoria descriptiva y el nivel común de los expertos en la técnica, debe apreciarse que los ejemplos siguientes son solamente para ilustrar y puede estar sometidos a diversos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la presente invención. Salvo que se establezca otra cosa, todas las tecnologías implicadas son tecnologías convencionales en embriología, biología de células madre, biología molecular, inmunología de fisiología de tejidos, histología, ingeniería genética u otros campos, como es bien conocido por los expertos en la técnica

#### Procedimientos generales

##### Cultivo celular:

Se cultivaron células de orina humanas en un medio primario que contenía DMEM/Ham's F12 1:1 (Hyclone), 10% p de suero bovino fetal (FBS; PAA), estuche de ensayo SingleQuot CC-4127 REGM (Lonza), anfotericina B y penicilina/estreptomycin durante 2 días y seguidamente se cambió a medio REBM (Renal Epithelial Basal 2 Medium, Lonza) que contenía estuche de ensayo SingleQuot CC-4127 REGM (Lonza) (al que se hace referencia como medio de orina humano) durante los días siguientes. Se adquirieron hESCs de referencia de la entidad NATIONAL STEM CELL BANK IN USA. Las iPSCs generadas a través de vectores retrovirales o vectores episomales oriP/EBNA (exentos de integración) se obtuvieron de la entidad South Stem Cell Bank en China. Se cultivaron hESCs y iPSCs de referencia en las placas revestidas con Matrigel en medio mTesR1.

##### Generación de dientes:

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de procedimientos para la generación de dientes a partir de hESCs de referencia y células de orina derivadas de hiPSCs en un ejemplo de la presente descripción. Se desarrolló un sistema de cultivo químico para la regeneración dental a partir de hESCs humanas y células de orina humanas derivadas de iPSCs. Brevemente, haciendo referencia a la Fig. 1, las hESCs o hiPSCs se puede inducir que

produzcan láminas epiteliales capaces de sustituir el epitelio dental de ratón E14.5 en un procedimiento de reconstitución. Los explantes reconstituidos pueden ser seguidamente cultivados in vitro durante 1-2 días y ser trasplantados por debajo de la cápsula sub-renal de ratón durante 3 semanas ( $\geq 2$  semanas) para la regeneración metal (Fig. 1).

5 Ejemplo 1: Producción de láminas epiteliales a partir de hESCs de referencia y iPSCs derivadas de células de orina humanas exenta de integración (ifhU-iPSCs)

Se dispuso en primer lugar un modo de obtener epitelios dentales a partir de hESCs de referencia o ifhU-iPSCs y se decidió sobre una propuesta específica de bases basada en RA y BMP4 en medio N2 que comprendía un complemento de N2 de aproximadamente 1% p, un ácido retinoico aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y un BMP-4 de aproximadamente 25 ng/ml. Para estos fines, se obtuvieron células epiteliales con morfología de tipo queratinocitos en D7 (Fig. 2a). Seguidamente se permitió que las células crecieran en forma de láminas epiteliales sin paso y se hicieron más densas en el D14 y se desprendieron ligeramente con algo de muerte celular en el D21 (Fig. 2a). Las células en diferenciación en el D7, 14 y 21 se recolectaron y se investigaron en cuanto a la expresión de marcadores pluripotentes y progenitores de queratinocitos mediante qPCR y transferencia Western. Durante la diferenciación epitelial, las H1-ESCs de referencia y las ifhU-iPSCs se comportaron de forma parecida, como se mostró con los marcadores examinados a nivel de RNA (Oct4, K18, p63, K19, CD29 y K14), mostrando expresiones sobre-reguladas en marcadores epiteliales e infra-regulación de marcador pluripotente Oct4 (Fig. 2b). Se observaron también tendencias similares para la expresión de proteínas (Oct4, K18 and p63, Fig. 2c). Además, la expresión de p63 y K14 se verificó mediante inmunofluorescencia. Se detectó p63 más temprano en el D7 y continuamente expresado el D21, mientras que la expresión de K14 fue detectada posteriormente en el D21 (Fig. 2d). Como consecuencia, se obtuvieron capas homogéneas de células epiteliales en forma de láminas a partir de las hESCs de referencia y las ifhU-iPSCs en el D7 (Fig. 2d). Estas láminas recolectadas en el D7 eran resistentes y flexibles, mostrando la superficie lisa y suave en el lado apical según se observó mediante microscopía electrónica de exploración (SEM) (Fig. 2e). Las láminas resultaron ser duras con núcleos salientes el día D14 (Fig. 2e). Bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM), pudieron ser claramente observados desmosomas entre las células epiteliales en los D7 y D14 (Fig. 2e). De forma conjunta, estos resultados sugieren que las láminas epiteliales generadas en el D7 a partir de hESC de referencia o de U-iPSCs tenían las propiedades deseadas para ser inducidas para una regeneración dental.

En los detalles, la Fig. 2 muestra las propiedades de los linajes epiteliales derivados de hESC/iPSC de referencia en un ejemplo de la presente descripción.

En la Fig. 2,

(a) muestra el procedimiento de diferenciación epitelial de hESCs de referencia o hiPSCs a través de complemento de RA y BMP4 en medio N2 durante 7 días, cambiando seguidamente a DSFM para una diferenciación adicional. La barra de escala corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

35 (b) muestra qPCR de experimentos representativos que muestran la infra-regulación de factor de transcripción específico para ESC (Oct4) y la sobre-regulación de marcadores epiteliales queratinizados (K18, p63, K19, CD29, K14).

(c) muestra la transferencia Western para Oct4, p63 y K18 de lisados de células epiteliales derivadas de H1 o ifhU1-iPSCs; GAPDH es el testigo de carga.

40 (d) muestra capturas de contraste de fases y tinción de inmunofluorescencia [IF: p63 (rojo), K14 (verde), DAPI (azul)] de láminas epiteliales derivadas de H1 y ifhU1-iPSCs en el D7 y el D21. Las barras de escalas corresponden a 2000 y 200  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

45 (e) muestra imágenes de microscopio electrónico de exploración (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TME) de láminas epiteliales derivadas de H1-ESCs de referencia y ifhU1-iPSCs en el D7 y el D14. Las cabezas de flechas blancas indican desmosomas entre células epiteliales de la lámina. Las barras de escalas en SEM y TEM corresponden a 20 y 0,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Ejemplo 2: Generación de estructura de tipo dental a partir de láminas epiteliales derivadas de hESCs de referencia y ifhU-iPSCs

Se recolectaron láminas epiteliales del D7 y se recombinaron con el mesénquima dental de ratón en un medio TeSR1®, medio E8 o medio acondicionado KSR (en que el medio comprende FBS a aproximadamente 10% p, glutamina aproximadamente 2 mM, aminoácido no esencial aproximadamente 0,1 mM, penicilina a aproximadamente 100 U/ml y estreptomycin a aproximadamente 100 U/ml), antes de un trasplante a cápsula sub-renal de ratón (Fig. 1). Después de 3 semanas, se observaron estructuras de tipo dental en el riñón (Fig. 3a). Se

aislaron estructuras de tipo dental derrapándolas de la cápsula sub-renal y el hueso circundante (Fig. 3a, columnas de la izquierda). Las materias recombinantes mostraron una estructura de tipo dental intacta con pulpa dental, dentina, espacio de esmalte y órgano de esmalte (Fig. 3a, columnas de en medio). Los órganos de esmalte tenían ameloblastos alargados con una estructura de tipo contorno arrugado y capa papilar (Fig. 3a, columnas de en medio). Se observó también la expresión de ameloblastina (Amel) ubicada en la capa de ameloblastos y su capa papilar (Fig. 3a). Se confirmó el origen humano del componente epitelial en secciones cruzadas de diente recombinante antes del aislamiento mediante inmunotinciones con anticuerpos específicos humanos contra antígeno leucocitario I (HAL-I) y antígeno de núcleo humano (hNA) (Fig. 3b). Ambos anticuerpos se tiñeron negativamente en la pulpa dental, cartílago, estructuras circundantes de tipo óseo, que se desarrollaron a partir del mesénquima dental (Fig. 3b). Como era de esperar, ambos anticuerpos específicos humanos se tiñeron positivamente para los ameloblastos (Fig. 3b1), capa papilar contigua (Fig. 3b2) y células epiteliales escamosas en el quiste (Fig. 3b3). Además, se localizó tinción de HLA-I positiva en el citoplasma, mientras que se localizó complementariamente hNA en el núcleo (Fig. 3b4, b5). Como testigo, sin recombinación con láminas epiteliales derivadas de hESCs de referencia o ifhU-iPSCs, los mesénquimas detales de ratón trasplantados bajo condiciones idénticas formaron estructura de tipo óseo en su lugar (n = 10/10), según se confirmó mediante tinción positiva de sialoproteína ósea (BSP) en la estructura de tipo óseo completa con incorporación de osteocitos (Fig. 3c).

Ejemplo 3: Caracterización de propiedades físicas de estructuras de tipo dental y proporción de generación de estructura de tipo dental

Se analizaron la dureza y módulo de elasticidad de dientes de seres humanos adultos (grupo humano), dientes de ratones de 3 semanas desarrollados a partir de gérmenes dentales bajo cápsula renal grupo Mouse WT) y los dientes regenerativos de los grupos de ESCs de referencia y ifhU-iPSCs mediante nano-indentación (Fig. 3d). En el caso del esmalte, la dureza y el módulo de elasticidad de H1-ESCs de referencia y dos grupos de ifhU-iPSCs fueron inferiores a los de grupos humanos de de Mouse WT (Fig. 3d, gráficos de la derecha). De forma interesante, la dureza del grupo de ifhU5-iPSCs era aproximadamente 4 veces más elevado que el del grupo de H1-ESCs de referencia (Fig. 3d, gráficos de la derecha). Se analizaron además las propiedades físicas de los dientes mediante espectroscopía Raman. Se mostró que todos tenían espectros similares con una intensidad comparable (Fig. 3e). En los 5 grupos examinados, el esmalte de los dientes estaba altamente mineralizado y los espectros mostraron casi el mismo espectro de la hidroxiapatita  $[Ca_5(PO_4)_3OH]$ , el mineral principal en los dientes (Fig. 3e). Estas estructuras de tipo dental mostraron también indicios similares de proteínas con picos Raman en dentina, incluido el pico de hidroxiapatita en comparación con dientes humanos (Fig. 3e). Estos resultados indicaban que los dientes regenerativos a partir de las H1-ESCs de referencia y dos grupos de ifhU-iPSCs tenían constituyentes similares con dientes humanos y de ratón. Se analizó un total de 8 líneas de hiPSC a partir de tres donantes de orina (U1, 5 y 7) en cuanto a la regeneración dental y tuvieron una tasa de éxito de hasta 30% (Fig. 3f).

En los detalles, la Fig. 3 muestra estructuras de tipo dental formadas a partir de línea de H1ESC de referencia y líneas de hiPSC en 3 semanas en un ejemplo de la presente descripción.

En la Fig. 3,

(a) Las dos columnas de la izquierda muestran capturas de contraste de fases de estructuras de tipo dental antes y después de ser aisladas a del hueso circundante partir de grupos de H1-ESC de referencia y ifhU1-iPSC (el diente está indicado mediante una línea de puntos); tres columnas a la derecha: tinción con hexamatoxilina-eosina (HE) y tinción inmunohistológica (IHC: Ameloblastin, Amel) de secciones de dientes relativas (H1-ESC de referencia, sección sagital; ifhU1-iPSC: sección transversal), que muestran las estructuras de tipo dental que contienen pulpa dental (dp), dentina (d), espacio de esmalte (es) y una capa de ameloblastos (Am) en ambos grupos. Los ameloblastos fueron mostrados al mismo aumento elevado en el compartimento azul. La expresión Amel positiva se localizó específicamente en estos ameloblastos con la capa papilar (flechas negras). La capa papilar fue adicionalmente señalada mediante cabezas de flechas negras al aumento elevado en el compartimento verde. Barra de escalas: las figuras superiores e inferiores en la misma columna comparten la misma barra de escala a 500, 500, 400, 100 y 100  $\mu$ m de izquierda a derecha, por orden.

(b) Muestra la tinción inmunohistológica y de inmunofluorescencia en secciones transversales de los dientes derivados de ifhU1-iPSCs: en la parte superior, la expresión de HLA-I estaba específicamente localizada en el citoplasma de células y tejidos derivados de iPSC humanas, que incluyen la capa de ameloblastos (cabezas de flechas negras en b1 y b2) y quiste derivado de epitelio (flechas negras en b3), en la parte inferior, expresión complementaria de hNA (verde) en el núcleo de las mismas zonas en ameloblastos (cabezas de flechas blancas) y células epiteliales de quistes (flecha blanca). El asterisco \* indica quiste. indica un quiste. La DAPI se muestra en azul. Los aumentos más elevados de hNA y DAPI en ameloblastos (cabezas de flechas blancas) se mostraron en b4 y b5, respectivamente. Las barras de escalas corresponden a 200  $\mu$ m.

(c) Muestra una imagen de un trozo de hueso detectado a partir de mesénquima dental E14.5 que está siendo trasplantado bajo cápsula renal durante 3 semanas con expresión positiva de BSP. Barras de escalas: 1000, 100 y 100  $\mu$ m, por orden.

(d) Muestra análisis de nano-indentación: Izquierda: imágenes representativas de superficies de esmalte y dentina fracturadas en el grupo de dientes humanos de adultos (humano), grupo de dientes de ratones de 3 semanas a partir de gérmenes dentales E14.5 (Mouse-WT), grupos de dientes regenerativos de H1-ESCs de referencia y ifhU-iPSCs; derecha: dureza y módulo de elasticidad de esmalte y dentina en los grupos anteriores (cada grupo: n = 3).

5 (e) Muestra análisis de espectroscopía Raman de esmalte y dentina de hESCs de referencia y ifhUiPSCs humanas y de ratón que mostraron una gran similitud para todos los grupos de picos Raman, incluidos 961 cm<sup>-1</sup> (hidroxiapatita) en esmalte y dentina y 1669 cm<sup>-1</sup> (vibración de estiramiento de C=O),, 2885 cm<sup>-1</sup> y 2941 cm<sup>-1</sup> (vibración de estiramiento de C-H) en dentina.

(f) Muestra las eficacias de estructuras de tipo dental para la línea de H1 ESC de referencia y 8 líneas de iPSC.

10 Ejemplo 4:

En este ejemplo, se usan una célula madre embrionaria humana de referencia (H1-ESC) y ocho líneas diferentes de iPSC derivadas de células de orina para preparar ameloblastos, respectivamente, de una forma similar a los ejemplos anteriores. Las eficacias respectivas de obtención de ameloblastos se comparan entre estas células madre, y los resultados se muestran en la siguiente Tabla I.

15 Tabla I

Líneas de clones de iPSC	Número de dientes nuevos formados/Número de muestras recombinantes	Eficacia en términos de porcentaje
HI-ESC de referencia	15/50	30%
vUC1-iPSC-C1	6/42	14,3%
UC1-iPSC-C1	12/50	24%
UC5-iPSC-C1	13/56	32,2%
UC5-iPSC-C2	15/59	25,4%
UC5-iPSC-C3	6/40	15%
UC7-iPSC-C3	12/52	23,1%
UC7-iPSC-C6	7/60	11,7%
UC7-iPSC-C9	17/59	28,8%

En la tabla anterior, vUC1-iPSC-C1 representa una línea de col de iPSC obtenida usando un sistema retroviral, y las otras 7 líneas representan líneas de clones de iPSC obtenidas por medio de electroporación.

20 Como se muestra en la Tabla I, la célula madre embrionaria humana y las iPSC pueden formar una estructura de tipo dental que contiene ameloblastos, y la eficacia de la célula madre embrionaria humana de referencia (H1-ESC) puede alcanzar el 30%, que es mayor que la de las iPSC. La totalidad de las ocho líneas de iPSC anteriormente citadas derivan de célula de orina, las cuales pueden tener diferentes eficacias unas respecto a otras. Seguidamente se llegó a la conclusión de que tanto la célula madre embrionaria humana como las iPSC pueden ser usadas para preparar ameloblastos con una eficacia relativa superior.

25 Aunque se han mostrado y descrito ejemplos explicativos, se debe apreciar por los expertos en la técnica que se puede hacer cambios, alternativas, modificaciones y sus equivalentes que caen todos dentro del alcance de las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una célula madre en la preparación de una estructura de tipo dental, en que la estructura de tipo dental se produce en un animal mamífero por medio de un trasplante de xenoinjerto, y en que se induce a que la célula madre forme una célula de tipo epitelial y la célula de tipo epitelial es recombinada con un mesénquima dental de otro animal y se cultiva para formar un explante reconstituido antes del trasplante del xenoinjerto, en que la célula madre es una célula madre embrionaria o una célula madre pluripotente inducida y en que el animal se selecciona entre el grupo que consiste en un ratón y una rata.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la célula madre pluripotente inducida es producida a partir de una célula humana y la célula humana es al menos una seleccionada entre un grupo que consiste en célula de orina, fibroblasto de la piel y célula madre del ligamento periodontal.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que la estructura de tipo dental contiene un ameloblasto.
4. Un método para preparar un ameloblasto, que comprende:
- preparar una célula de tipo epitelial mediante un método que comprende cultivar una célula madre usando un primer medio de cultivo, que es medio DMEM/F12 complementado con un complemento N2 de aproximadamente 1% p, un ácido retinoico aproximadamente 1  $\mu$ M y un BMP4 de aproximadamente 25 ng/ml, para inducir que la célula madre se diferencie en forma de la célula de tipo epitelial;
- recombinar la célula de tipo epitelial con un mesénquima dental de un primer animal para obtener una muestra recombinante;
- cultivar la muestra recombinante resultante para obtener un explante reconstituido; y
- trasplantar el explante reconstituido en un segundo animal durante un período de tiempo predeterminado para formar el ameloblasto;
- en que la célula madre es una célula madre embrionaria o una célula madre pluripotente inducida, y en que el animal se selecciona entre el grupo que consiste en un ratón y una rata.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la célula madre es cultivada durante aproximadamente 5-10 días, preferentemente de forma aproximada 7 días, el primer animal es un ratón fetal y el segundo animal es un ratón desprovisto de inmunidad y el período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 4 semanas, preferentemente de forma aproximada 3 semanas.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el mesénquima dental está mecánicamente separado de un germen dental y el germen dental es digerido usando una proteasa antes de la separación y la proteasa es una Dispasa de aproximadamente 0,75 mg/ml.
7. El método de la reivindicación 4, en el que la muestra recombinante resultante es cultivada usando un medio DMEM complementado con FBS, aminoácido no esencial, glutamina, penicilina y estreptomina.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el tejido recombinante es trasplantado en un espacio bajo una cápsula renal del ratón desprovisto de inmunidad.
9. El método de la reivindicación 4, en el que la célula madre es cultivada usando al menos uno seleccionado entre medio mTeSR1<sup>MC</sup>, medio E8 y medio acondicionado KSR antes de preparar la célula de tipo epitelial,
- en que el medio es sustituido con el primer medio de cultivo cuando las células madre cultivadas alcanzan una confluencia de aproximadamente 60-80%, para obtener la célula de tipo epitelial.

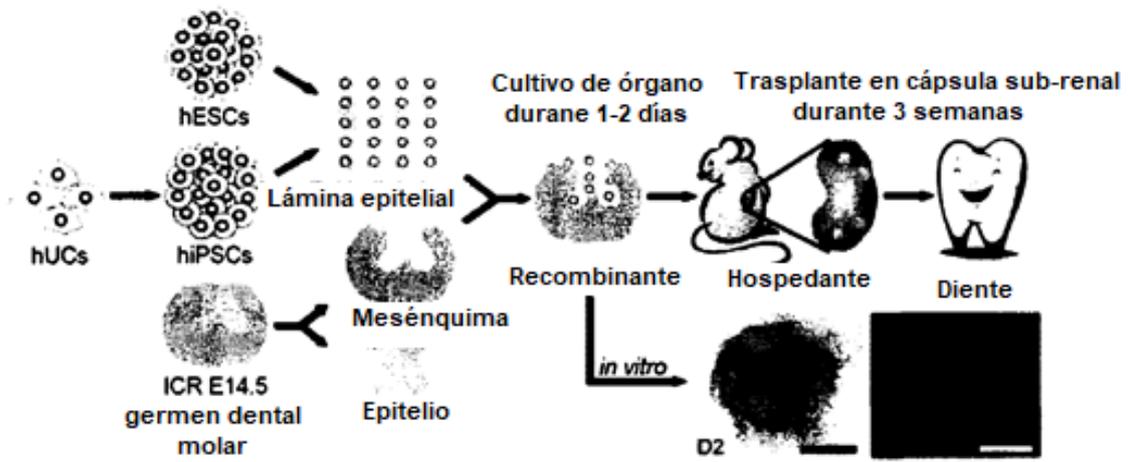


Fig. 1

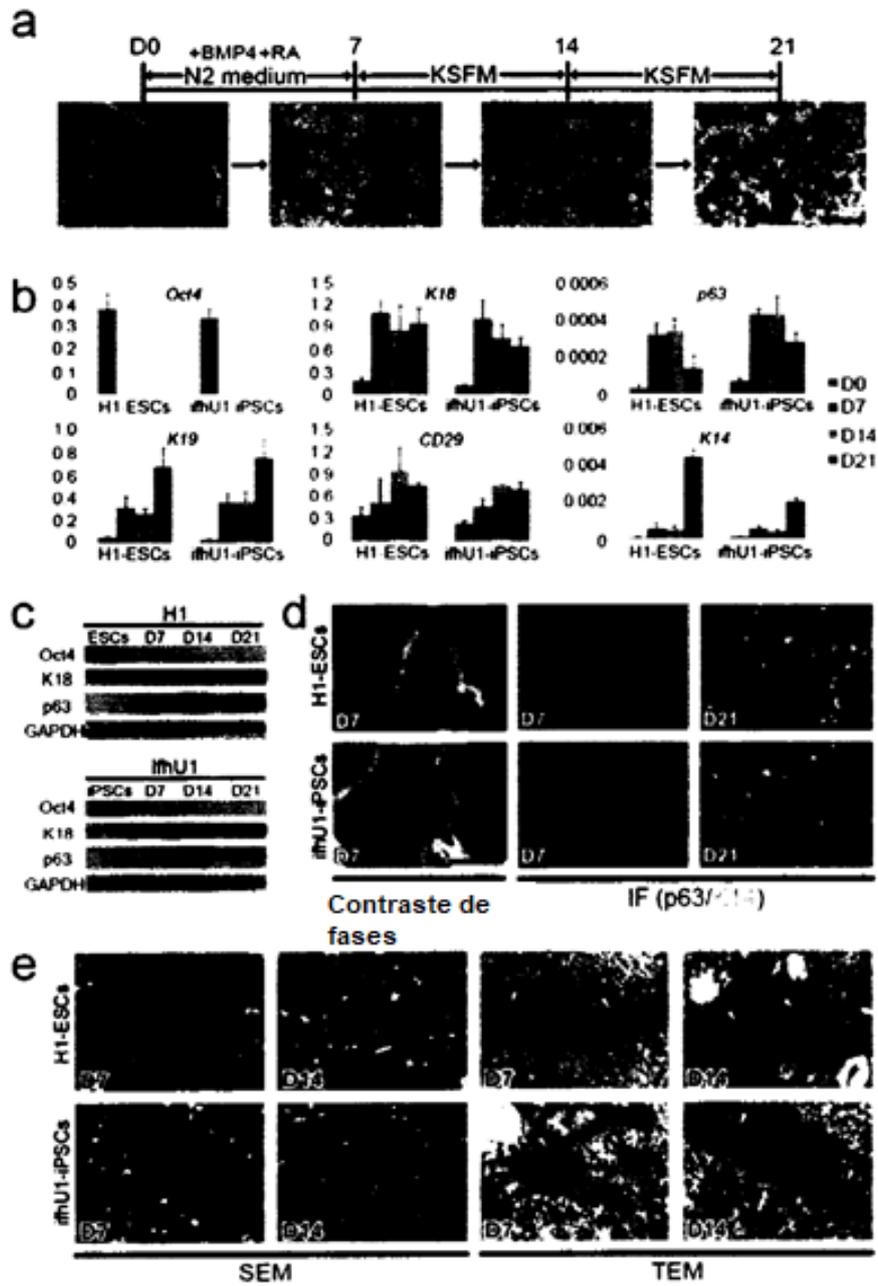


Fig. 2

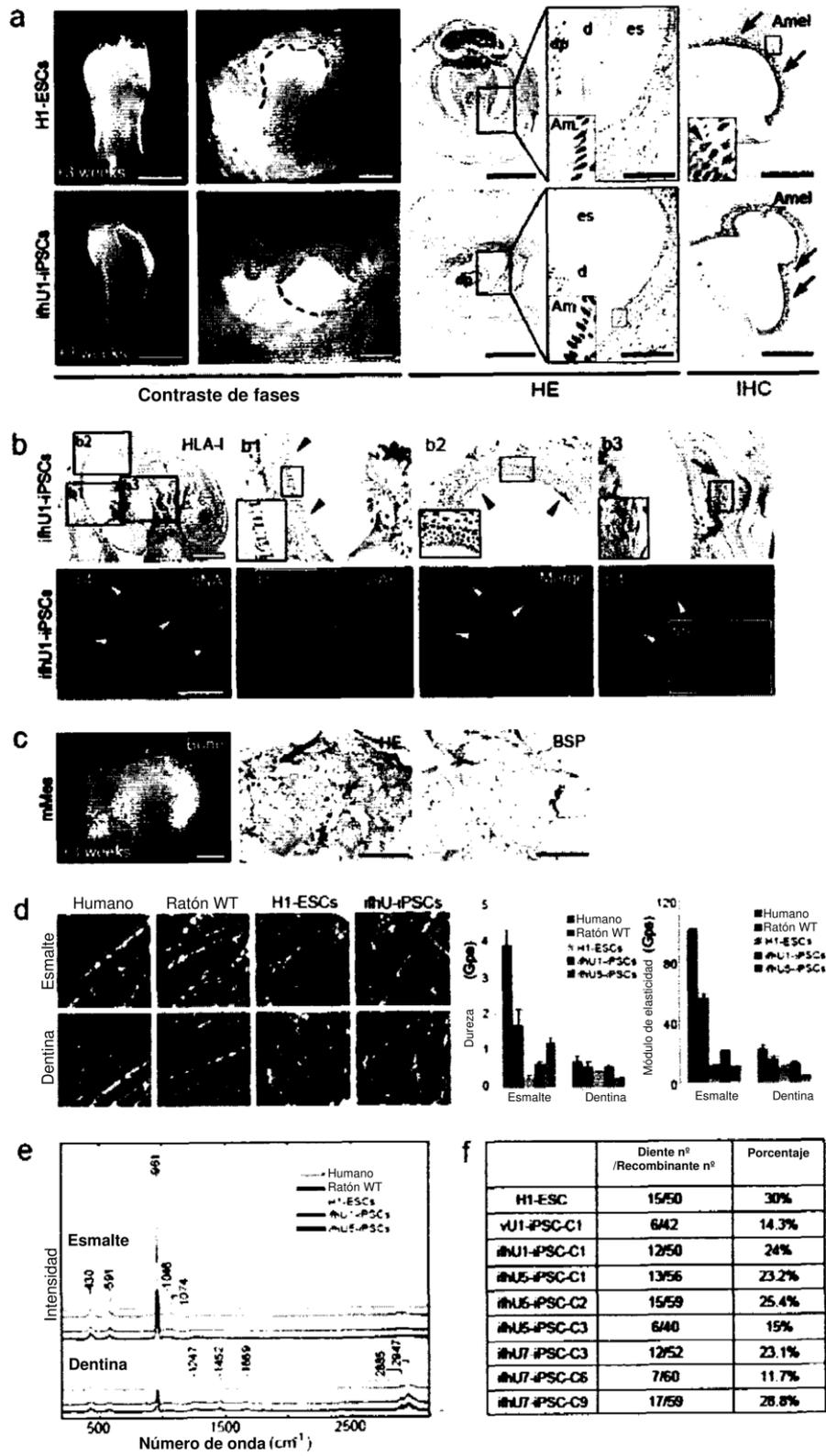


Fig. 3