

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 048**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/0735** (2010.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2010 PCT/IL2010/000937**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11058558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2010 E 10829622 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2499236**

54 Título: **Medios de cultivo, cultivos celulares y métodos de cultivo de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado**

30 Prioridad:

**12.11.2009 US 272860 P**

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

**13.08.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 779 048 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

Medios de cultivo, cultivos celulares y métodos de cultivo de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente divulgación, en algunos aspectos de la misma, se refiere a medios de cultivo sin xenógenos que pueden utilizarse para mantener células madre en un estado indiferenciado y pluripotente, y en algunos aspectos a medios de cultivo definidos, cultivos celulares que comprenden los mismos y métodos que utilizan los mismos para cultivar células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión.

El excepcional potencial de diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESC) las destaca como uno de los mejores modelos para estudiar el desarrollo humano temprano, destino de linaje, procesos de diferenciación y van a utilizarse para fines industriales y terapia a base de células.

Las células pluripotentes inducidas (iPS) son células somáticas que se reprograman a células similares a ESC capaces de diferenciarse para dar tejidos representativos de las tres capas germinales embrionarias tanto *in vitro* como *in vivo*. Se generaron células iPS humanas o de ratón por sobreexpresión de cuatro factores de transcripción, c-MyC, Oct4, Klf4 y Sox2 en células somáticas. Se mostró que las células iPS forman la misma morfología de colonias que las ESC y expresan algunos marcadores de ESC típicos tales como *Myb*, *Kit*, *Gdf3* y *Zic3*, pero de manera menos prominente marcadores tales como *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Uf1*, *Tcl1* y el gen receptor *LIF*, confirmando 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 hESC y células iPS derivadas de fibroblastos.

Estudios adicionales revelaron que podrían obtenerse células iPS transformando células somáticas con Oct4, Sox2, Nanog y Lin28, mientras se omitía el uso del oncogén C-Myc [Yu *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2008]. Las mejoras en métodos de derivación de células iPS incluyen el uso de plásmidos en lugar de vectores virales o derivación sin ninguna integración con el genoma, lo que podría simplificar el uso futuro de células iPS para aplicaciones clínicas [Yu J, *et al.*, Science. 2009, 324: 797-801].

Las células iPS disponibles actualmente son aquellas derivadas 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], fibroblasto de prepucio [Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008], tejidos cutáneos y dérmicos adultos [Hanna *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008], linfocitos b [Hanna *et al.* 2007] y células estomacales y hepáticas adultas [Aoi *et al.*, 2008].

Al igual que las hESC, se cultivan células iPS tradicionalmente con una capa de soporte en cultivo 2D, lo que permite su crecimiento continuo en el estado indiferenciado. Por ejemplo, se cultivaron células iPS en capas alimentadoras que consisten 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 en los métodos de cultivo incluyen cultivar células iPS en capas alimentadoras 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 a base de células) o con fines industriales, las células iPS deben cultivarse en un sistema de cultivo definido, sin xenógenos (por ejemplo, sin componentes animales) y escalable con procesos controlados.

La publicación PCT n.º WO2007/026353 da a conocer medios de cultivo sin xenógenos bien definidos que comprenden una isoforma de TGF-beta o la quimera formada entre IL6 y el receptor de IL6 soluble (IL6RIL6) para mantener células madre embrionarias humanas en un estado indiferenciado en un sistema de cultivo bidimensional.

La solicitud de patente estadounidense n.º 20050233446 da a conocer un medio definido que comprende bFGF, insulina y ácido ascórbico para mantener hESC cuando se cultivan en Matrigel™ en un estado indiferenciado.

Ludwig TE., *et al.*, 2006 (Nature Biotechnology, 24: 185-7) dan a conocer el medio definido TeSR1 para cultivar hESC en una matriz compuesta por colágeno IV, fibronectina, laminina y vitronectina.

La solicitud de patente estadounidense n.º 20090029462 da a conocer métodos de expansión de células madre pluripotentes en suspensión utilizando microportadores o encapsulación celular.

La publicación PCT n.º WO/2008/015682 da a conocer un método de expansión y mantenimiento de células madre embrionarias humanas en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia a sustrato.

La solicitud de patente estadounidense n.º 20070155013 da a conocer un método de crecimiento de células madre pluripotentes en suspensión utilizando un portador que se adhiere a las células madre pluripotentes.

La solicitud de patente estadounidense n.º 20080241919 (Parsons *et al.*) da a conocer un método de cultivo de 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 estadounidense n.º 20080159994 (Mantalaris *et al.*) da a conocer 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 estadounidense n.º 20070264713 da a conocer un método de cultivo de células madre indiferenciadas en suspensión sobre microportadores en recipientes utilizando un medio condicionado.

La solicitud de patente estadounidense n.º 2009191159 (Sakurada *et al.*) da a conocer métodos para expandir células madre pluripotentes inducidas en medio sin alimentador y sin suero.

## 15 **Sumario de la invención**

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, comprendiendo el método cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia a sustrato y desprovistas de encapsulación celular y que permiten la expansión de las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, en el que un medio de cultivo de dicho cultivo en suspensión es sin suero y sin células alimentadoras, dicho medio de cultivo comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de 400-600 µg/ml, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de 50-200 ng/ml, expandiendo y manteniendo de ese modo las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, donde las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

30 Según algunas realizaciones de la invención, una concentración del ácido ascórbico en el medio de cultivo es de aproximadamente 500 µg/ml (microgramos/mililitro).

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo comprende además reemplazo de suero.

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo está desprovisto de TGFβ3.

35 Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo comprende no más de 0,1 ng/ml de TGFβ3.

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo es sin portador proteico.

40 Según algunas realizaciones de la invención, el mantenimiento es durante al menos 5 pases.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:

45 (a) cultivar las células madre pluripotentes según el método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado de la invención, para obtener de ese modo células madre indiferenciadas y expandidas;

50 (b) someter dichas células madre indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;

(i) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar células estromales mesenquimatosas comprende aumentar los intervalos entre cambios de medio hasta 3-5 días, y después de 9-10 días retirar físicamente las células de aspecto de fibroblasto en forma de huso;

55 (ii) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar neuronas dopaminérgicas (DA) comprende cultivar de manera conjunta dichas células madre con las líneas celulares estromales de ratón PA6 o MS5, o con una combinación de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12), pleiotrofina (PTN), factor 2 de crecimiento similar a la insulina (IGF2) y efrina B1 (EFNB1);

60 (iii) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar neuronas de dopamina mesencefálicas (mesDA) comprende modificar genéticamente dichas células madre para expresar el factor de transcripción Lmx1a;

(iv) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar epitelio pulmonar (neumocitos de tipo II) comprende cultivar dichas células madre en presencia de un medio condicionado recogido de una línea celular de neumocitos;

65 (v) en el que la diferenciación de dichas células para dar células neuronales comprende cultivar dichas células madre

durante 5 días en presencia de un medio de reemplazo de suero complementado con inhibidor de TGF- $\beta$  y nogina, a continuación de lo cual las células se cultivan con cantidades crecientes de medio N2 en presencia de nogina 500 ng/ml,

5 generando de ese modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de generación de cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:

15 (a) cultivar las células madre pluripotentes según el método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado de la invención, para obtener de ese modo células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas; y

20 (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre en cuerpos embrioides; en el que dichas condiciones de cultivo incluyen un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y que está desprovisto de un factor inhibidor de la diferenciación;

25 generando de ese modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:

30 (a) cultivar las células madre pluripotentes según el método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado de la invención, para obtener de ese modo células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas;

35 (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre indiferenciadas y expandidas en cuerpos embrioides; en el que dichas condiciones de cultivo incluyen un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y está desprovisto de un factor inhibidor de la diferenciación; y

(c) someter células de dichos cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;

40 (i) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar cardiomiocitos comprende transferir dichos cuerpos embrioides de cuatro días de edad a portaobjetos de cámara o placas recubiertas de gelatina y permitir que se unan y se diferencien, y separar mecánicamente células que se contraen espontáneamente desde el día 8 de diferenciación en un medio bajo en calcio o PBS;

45 (ii) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides de cuatro días de edad para dar precursores neuronales comprende cultivar dichos cuerpos embrioides 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 de y fibronectina 5 mg/ml;

50 (iii) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar células de mielina y oligodendrocitos comprende cultivar dichos cuerpos embrioides en un medio DMEM con albúmina sérica bovina (BSA), piruvato, progesterona, putrescina, tiroxina, triyodotironina, insulina, transferrina, selenito de sodio, aminoácidos, neurotrofina 3, factor neurotrófico ciliar y Hepes,

55 (iv) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar diferenciación de mastocitos comprende transferir cuerpos embrioides de dos semanas de edad a placas de cultivo tisular que incluyen medio DMEM complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 mg/ml, medio condicionado con células WEHI-3 al 20% (v/v) y factor de células madre de rata recombinante 50 ng/ml;

60 (v) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar células hemato-linfoideas comprende transferir cuerpos embrioides de 2 a 3 días de edad a placas de cultivo permeables a gas en presencia del 7,5% de CO<sub>2</sub> y el 5% de O<sub>2</sub> utilizando una incubadora con contenido de oxígeno ajustable;

65 generando de ese modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y/o técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no están destinados a ser necesariamente limitativos.

### Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, a modo solo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica realizaciones de la invención.

En los dibujos:

las figuras 1A-C son fotografías que representan la morfología de colonias de células iPS cultivadas en un sistema de cultivo bidimensional sin xenógenos en presencia de los medios de cultivo novedosos sin xenógenos (por ejemplo, sin componentes animales, desprovistos de contaminación animal) según algunos aspectos de la divulgación. Se cultivaron J1.2-3 con capas de soporte de fibroblastos de prepucio (HFF) humano, mientras que se utiliza el siguiente medio de cultivo sin suero animal: figura 1A - medio HA70 durante 6 pases; figura 1B - medio HA40/4 durante 6 pases; y figura 1C - medio D2 durante 16 pases.

Las figuras 2A-C son fotografías que representan la tinción de inmunofluorescencia de células iPS con marcadores de pluripotencia. Se cultivaron células iPS J1.2-3 e iF4 en un sistema de cultivo bidimensional sin xenógenos (HFF) en presencia del medio de cultivo sin suero animal HA77 durante al menos 10 pases y luego se tiñeron con los siguientes marcadores de marcadores indiferenciados: figura 2A - células iPS J1.2-3 teñidas con Oct4; figura 2B - células iPS iF4 teñidas con SSEA4; y figura 2C - células iPS iF4 teñidas con TRA-1-81.

Las figuras 3A-C son fotografías que representan la morfología de la línea celular iPS J1.2-3 a partir de HFF cuando se cultiva en suspensión en los siguientes medios de cultivo sin xenógenos durante los pases indicados. Figura 3A - células iPS J1.2-3 cultivadas en el medio yFL3 durante 16 pases; figura 3B - células iPS J1.2-3 cultivadas en el medio CM100F durante 13 pases; figura 3C - células iPS J1.2-3 cultivadas en el medio yF100 durante 8 pases. Obsérvese que mientras se cultivan en suspensión, las células iPS crean una estructura similar a esferas que contiene células indiferenciadas.

La figura 4 es una fotografía que representa la morfología de las células iPS J1.2-3 cuando se cultivan sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) después de un período de cultivo prolongado en un cultivo en suspensión. Se cultivaron células J1.2-3 durante 37 pases en suspensión en el medio CM100F, a continuación de lo cual se cultivaron de nuevo con MEF, y forman una morfología de colonia de iPS típica 24 horas después de su cultivo con MEF.

Las figuras 5A-C son fotografías que representan la tinción de inmunofluorescencia de células iPS con marcadores de pluripotencia. Se cultivaron células J1.2-3 en suspensión utilizando medio CM100F durante más de 20 pases y luego se tiñeron con marcadores de células madre indiferenciadas. Figura 5A - TRA-1-81; figura 5B - TRA-1-60; figura 5C - SSEA4.

Las figuras 6A-D son fotografías que representan la inmunotinción de células iPS con marcadores de pluripotencia. Se cultivaron células J1.2-3 en suspensión utilizando el medio CM100F durante al menos 30 pases y luego se transfirieron a frascos giratorios y se cultivaron durante 30 días adicionales, a continuación de lo cual las células se tiñeron con marcadores de células madre indiferenciadas. Figura 6A - Oct4; figura 6B - TRA-1-81; figura 6C - TRA-1-60; y figura 6D - SSEA4.

### Descripción de aspectos específicos de la divulgación

La presente divulgación, en algunos aspectos de la misma, se refiere a medios de cultivo novedosos, cultivos celulares que comprenden los mismos y métodos que utilizan los mismos para mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos de expansión de hESC y células madre pluripotentes inducidas (iPS) en cultivos en suspensión o sistemas de cultivo bidimensionales, mientras que se mantienen las células en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la descripción siguiente o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras.

Los presentes inventores han diseñado siguiendo laboriosas experimentaciones medios de cultivo definidos que son sin suero y sin xenógenos (por ejemplo, desprovistos de contaminantes animales) y que pueden mantener células madre pluripotentes tales como ESC e iPS humanas en un estado indiferenciado en ausencia de soporte de células alimentadoras al tiempo que se conserva su potencial pluripotente para diferenciarse en las tres capas germinales embrionarias.

Por tanto, tal como se muestra en la sección ejemplos que sigue, se cultivaron células iPS en un estado indiferenciado en sistemas de cultivo bidimensionales que son o bien sin capa alimentadora (por ejemplo, en una matriz sintética; ejemplo 1) o bien a base de capa alimentadora sin xenógenos (por ejemplo, fibroblastos de prepucio; figuras 1A-C y 2A-C, ejemplo 2) en presencia de medios de cultivo definidos, sin xenógenos y sin suero (por ejemplo, mHA40/4, HA75, HA76, HA77, HA78 o HA74). Mientras que están en cultivo, las células madre pluripotentes presentan morfología indiferenciada, así como características morfológicas y moleculares típicas con respecto a iPS tales como cariotipo normal, expresión de marcadores de pluripotencia (por ejemplo, Oct4, SSEA4, TRA-1-81, TRA-1-60) y capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales embrionarias tanto *in vitro* (por formación de cuerpos embrionarios después de al menos 28 pases) como *in vivo* (por formación de teratomas después de al menos 31 pases).

Tal como se utiliza 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" abarca células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (células iPS).

La expresión "células madre embrionarias" puede comprender células que se obtienen a partir 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 etapa después de la implantación/previo a la gastrulación (véase el documento WO2006/040763] y células germinales embrionarias (EG) que se obtienen a partir del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de 10 semanas de gestación.

Según algunas realizaciones de la invención, las células madre pluripotentes dadas a conocer son células madre embrionarias, tales como de origen humano o de primate (por ejemplo, mono).

Las células madre embrionarias dadas a conocer pueden obtenerse utilizando métodos bien conocidos de cultivo celular. Por ejemplo, pueden aislarse células madre embrionarias humanas a partir de blastocistos humanos. Los blastocistos humanos se obtienen normalmente a partir de embriones preimplantados *in vivo* humanos o de embriones fertilizados *in vitro* (IVF). Alternativamente, un embrión humano de una sola célula puede expandirse a la fase 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 trofoectodérmicas se lisan y se retiran de la ICM intacta mediante pipeteo suave. A continuación, la ICM se siembra entonces en placa en un frasco de cultivo tisular que contiene el medio apropiado que permite su excrecencia. Después de 9 a 15 días, la excrecencia derivada de la ICM se disocia en agregados, o bien por disociación mecánica o bien por degradación enzimática, y las células se vuelven a sembrar en placa en un medio de cultivo de tejido fresco. Las colonias que demuestran morfología indiferenciada se seleccionan individualmente mediante micropipeta, se disocian mecánicamente en agregados y se siembran en placa de nuevo. Las células ES resultantes se dividen entonces de forma rutinaria cada 4-7 días. Para detalles adicionales sobre métodos de preparación de células ES humanas véase Thomson *et al.*, [patente estadounidense n.º 5.843.780; Science 282: 1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38: 133, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92: 7844, 1995]; Bongso *et al.*, [Hum Reprod 4: 706, 1989]; y Gardner *et al.*, [Fertil. Steril. 69: 84, 1998].

Se apreciará que células madre comercialmente disponibles también pueden utilizarse con este aspecto de la presente divulgación. Las células ES humanas pueden adquirirse a partir del registro de células madre embrionarias humanas de los NIH ([www.escri.nih.gov](http://www.escri.nih.gov)). Ejemplos no limitativos de líneas de células madre embrionarias comercialmente disponibles son BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03, TE04 y TE06.

Pueden obtenerse células de blastocistos extendidos (EBC) a partir de un blastocisto de al menos nueve días después de la fecundación en una fase previa a la gastrulación. Antes de cultivar el blastocisto, la zona pelúcida se digiere [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 entonces como embriones completos durante al menos nueve y no más de catorce días después de la fecundación (es decir, antes del evento de gastrulación) *in vitro* utilizando métodos convencionales de cultivo de células madre embrionarias.

Las células germinales embrionarias (EG) se preparan a partir de las células germinales primordiales obtenidas a partir de fetos de aproximadamente 8-11 semanas de gestación (en el caso de un feto humano) utilizando técnicas de laboratorio conocidas por cualquier experto en la técnica. Las crestas genitales se disocian y se cortan en trozos pequeños que posteriormente se disgregan para dar células por disociación mecánica. Las células EG entonces se hacen crecer en frascos de cultivo tisular con el medio adecuado. Las células se cultivan con reemplazo diario de

medio hasta que se observa una morfología celular consistente con células EG, normalmente después de 7-30 días o 1-4 pases. Para detalles adicionales sobre métodos de preparación de células EG humanas, véanse Shamblo *et al.*, [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95: 13726, 1998] y la patente estadounidense n.º 6.090.622.

5 La expresión “célula madre pluripotente inducida (iPS)” (o célula madre de tipo embrionario) tal como se utiliza 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).

10 Según algunas realizaciones de la invención, la célula iPS se caracteriza por una capacidad proliferativa que es similar a la de ESC y por tanto puede mantenerse y expandirse en cultivo durante un tiempo casi ilimitado.

15 Las células iPS pueden dotarse de pluripotencia por manipulación genética que reprograma la célula para adquirir características de células madre embrionarias. Por ejemplo, las células iPS dadas a conocer pueden generarse a partir de células somáticas por inducción de la expresión de Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc en una célula somática esencialmente tal como se describe en Takahashi y Yamanaka, 2006, Takahashi *et al.*, 2007, Meissner *et al.*, 2007 y Okita *et al.*, 2007). Adicional o alternativamente, las células iPS dadas a conocer pueden generarse a partir de células somáticas por inducción de la expresión de Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 esencialmente tal como se describe en Yu *et al.*, 2007 y Nakagawa *et al.*, 2008. Debe señalarse que la manipulación genética (reprogramación) de las células somáticas puede realizarse utilizando cualquier método conocido tal como utilizando plásmidos o vectores virales, o por derivación sin ninguna integración en el genoma [Yu J, *et al.*, Science. 2009, 324: 797-801].

20 Las células iPS dadas a conocer 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], fibroblasto de prepucio [Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008], tejidos cutáneos y dérmicos adultos [Hanna *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008], linfocitos b [Hanna *et al.* 2007] y células estomacales y hepáticas adultas [Aoi *et al.*, 2008].

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

30 Según algunas realizaciones de la invención, las células madre pluripotentes inducidas son células madre pluripotentes inducidas humanas.

35 Tal como se utiliza en el presente documento la expresión “medio de cultivo” se refiere a una sustancia líquida utilizada para soportar el crecimiento de células madre pluripotentes y mantener las mismas en un estado indiferenciado. El medio de cultivo utilizado por la invención según algunas realizaciones puede ser un medio a base de agua que incluye una combinación de sustancias tales como sales, nutrientes, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, todos de 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 según un aspecto de algunas realizaciones de la invención puede ser un medio de cultivo tisular sintético como el Ko-DMEM (productos de Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE.UU.), DMEM/F12 (Biological Industries, Biet HaMek, Israel), el medio Mab ADCB (HyClone, Utah, EE.UU.) complementado con los aditivos necesarios tal como se describe además en el presente documento.

40 La expresión “soporte de células alimentadoras” tal como se utiliza 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 de manera conjunta sobre las células alimentadoras o cuando las células madre pluripotentes se cultivan sobre una matriz (por ejemplo, una matriz extracelular, una matriz sintética) en presencia de un medio condicionado generado por las células alimentadoras. El soporte de las células alimentadoras depende de la estructura de las células alimentadoras mientras están en cultivo (por ejemplo, la matriz tridimensional formada por el cultivo de 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(s) capa(s) de células alimentadoras.

45 La expresión “ausencia de soporte de células alimentadoras” tal como se utiliza 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 condicionado generado de este modo.

50 Tal como se utiliza en el presente documento la expresión “sin suero” se refiere a que está desprovisto de un suero humano o animal.

55 Debe señalarse que la función del suero en protocolos de cultivo es dotar a las células cultivadas de un ambiente

similar al presente *in vivo* (es decir, dentro del organismo del que se derivan las células, por ejemplo, un blastocisto de un embrión). Sin embargo, la utilización de suero, que se deriva a partir de o bien una fuente animal (por ejemplo, suero bovino) o bien una fuente humana (suero humano), está limitada por las variaciones significativas en componentes séricos entre los individuos donantes (de los que se obtiene el suero) y el riesgo de tener contaminantes xenógenos (en caso de que se utilice un suero animal).

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo sin suero no comprende suero ni porciones del mismo.

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo sin suero está desprovisto de albúmina sérica (por ejemplo, albúmina que se purifica a partir de suero humano o suero animal).

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo comprende reemplazo de suero.

Tal como se utiliza en el presente documento la expresión "reemplazo de suero" se refiere a una formulación definida, que sustituye la función del suero proporcionando a las células madre pluripotentes componentes necesarios para el crecimiento y la viabilidad.

Diversas formulaciones de reemplazo de suero se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles.

Por ejemplo, el reemplazo de suero GIBCO™ Knockout™ (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY EE.UU., n.º de catálogo 10828028) es una formulación sin suero definida optimizada para hacer crecer y mantener células ES indiferenciadas en cultivo. Debe señalarse que la formulación de reemplazo de suero GIBCO™ Knockout™ incluye Albumax (albúmina sérica bovina enriquecida con lípidos) que procede 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 calidad clínica generadas utilizando fibroblastos de prepucio de calidad clínica aprobados por la FDA en reemplazo de suero Knockout™ fabricado según cGMP (Invitrogen Corporation, EE.UU., n.º de catálogo 04-0095).

Según algunas realizaciones de la invención, la concentración de reemplazo de suero GIBCO™ Knockout™ en el medio de cultivo está en el intervalo de aproximadamente el 1% [volumen/volumen (v/v)] a aproximadamente el 50% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 5% (v/v) a aproximadamente el 40% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 5% (v/v) a aproximadamente el 30% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 30% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 25% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 20% (v/v), por ejemplo, aproximadamente el 10% (v/v), por ejemplo, aproximadamente el 15% (v/v), por ejemplo, aproximadamente el 20% (v/v), por ejemplo, aproximadamente el 30% (v/v).

Otro reemplazo de suero comercialmente disponible es el suplemento B27 sin vitamina A que está disponible de Gibco-Invitrogen, Corporation, Grand Island, NY EE.UU., n.º de catálogo 12587-010. El suplemento B27 es una formulación sin suero que incluye D-biotina, albúmina sérica bovina de fracción libre de ácidos grasos V (BSA), catalasa, L-carnitina HCl, corticosterona, etanolamina HCl, D-galactosa (anhíd.), glutatión (reducido), insulina humana recombinante, ácido linoleico, ácido linoléico, 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 de suplemento B27 es limitado dado que incluye albúmina de origen animal.

Según algunas realizaciones de la invención, el reemplazo de suero es sin xenógenos.

El término "xenógeno" es un prefijo basado en la palabra griega "xenos", es decir, un extraño. Tal como se usa en el presente documento la expresión "sin xenógenos" se refiere a que está desprovisto de cualquier componente que se derive de una especie de xenógeno (es decir, no igual, un extraño). Tales componentes pueden ser contaminantes tales como patógenos asociados (por ejemplo, que infectan) a la especie de xenógeno, componentes celulares de la especie de xenógeno o componentes a-celulares (por ejemplo, fluido) de la especie de xenógeno.

Por ejemplo, un reemplazo de suero sin xenógenos puede incluir una combinación de insulina, transferrina y selenio. Adicional o alternativamente, un reemplazo de suero sin xenógenos puede incluir albúmina, transferrina e insulina humana o producida de manera recombinante.

Los ejemplos no limitativos de composiciones comercialmente disponibles de reemplazo de suero sin xenógenos 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 (Sigma, n.º de catálogo S2640) que incluye albúmina sérica humana, transferrina humana e insulina recombinante humana y no contiene factores de crecimiento, hormonas esteroides, glucocorticoides, factores de adhesión celular, Ig detectable y mitógenos.

Según algunas realizaciones de la invención, las formulaciones de reemplazo de suero sin xenógenos ITS (Invitrogen corporation) y SR3 (Sigma) se diluyen en una razón de 1 a 100 para alcanzar una concentración de trabajo x1.

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo es capaz de mantener la célula madre pluripotente en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos aproximadamente 5 pases, al menos aproximadamente 10 pases, al menos aproximadamente 15 pases, al menos aproximadamente 20 pases, al menos aproximadamente 22 pases, al menos aproximadamente 25 pases, al menos aproximadamente 30 pases, al menos aproximadamente 35 pases, al menos aproximadamente 40 pases, al menos aproximadamente 45 pases, al menos aproximadamente 50 pases y más.

Según algunas realizaciones de la invención el medio de cultivo es capaz de expandir las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "expandir" se refiere a aumentar el número de células madre pluripotentes durante el período de cultivo (en al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50%, 100%, 200%, 500%, 1000%, y más). Se apreciará que el número de células madre pluripotentes que pueden obtenerse a partir de una sola célula madre pluripotente depende de la capacidad de proliferación de la célula madre pluripotente. La capacidad de proliferación de una célula madre pluripotente puede calcularse 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 período en el que el cultivo de células madre pluripotentes puede mantenerse en el estado indiferenciado (que es equivalente al número de pases multiplicado por los días entre cada pase).

Por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 1 de la sección ejemplos que sigue, las células iPS humanas podrían mantenerse en el estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en presencia de los medios de cultivo mHA40/4, HA75, HA76, HA78 y HA74/1 durante al menos 22 pases cuando se cultivan en una matriz sin alimentador. Dado que cada pase se produce cada 4-7 días, las células iPS humanas se mantuvieron durante 110 días (es decir, 2640 horas). Dado que el tiempo de duplicación de iPS humanas era de 36 horas, una sola célula iPS humana cultivada en estas condiciones podría expandirse para dar lugar a  $2^{73}$  (es decir,  $9,4 \times 10^{21}$ ) células iPS humanas.

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo es capaz de soportar la expansión de una sola célula madre pluripotente (por ejemplo, célula iPS humana o hESC) o una población de células madre pluripotentes por al menos  $2^{23}$  (es decir,  $8 \times 10^6$ ) en el plazo de aproximadamente un mes, por ejemplo, al menos  $2^{24}$  (es decir,  $16,7 \times 10^6$ ) en el plazo de aproximadamente un mes.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo sin suero y sin xenógenos comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento transformante beta-3 ( $TGF\beta_3$ ) y ácido ascórbico, en el que una concentración del ácido ascórbico en el medio de cultivo es de al menos  $50 \mu\text{g/ml}$  y en el que el medio de cultivo es capaz de mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en ausencia de soporte de células alimentadoras.

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 utilizado por el medio de cultivo de algunos aspectos de la divulgación 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 ascorbilo, estearato ascorbilo), un derivado funcional de la misma (una molécula derivada de ácido ascórbico que presenta la misma actividad/función cuando se utiliza en el medio de cultivo de la invención), o un análogo de la misma (por ejemplo, un equivalente funcional de ácido ascórbico que presenta una actividad análoga a la observada para ácido ascórbico cuando se utiliza en el medio de cultivo de la invención). Los ejemplos no limitativos de formulaciones de ácido ascórbico que pueden utilizarse en el medio de cultivo de algunas realizaciones de la invención incluyen el ácido L-ascórbico y 3-fosfato de ácido ascórbico.

El ácido ascórbico puede obtenerse a partir 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).

Tal como se mencionó, la concentración de ácido ascórbico en el medio de cultivo es de al menos aproximadamente  $50 \mu\text{g/ml}$ . Según algunos aspectos de la divulgación, el ácido ascórbico puede utilizarse en un intervalo de concentraciones tales como de aproximadamente  $50 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $50 \text{ mg/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $50 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $5 \text{ mg/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $50 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $1 \text{ mg/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $100 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $800 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $200 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $800 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $300 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $700 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $400 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $600 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, de aproximadamente  $450 \mu\text{g/ml}$  a aproximadamente  $550 \mu\text{g/ml}$ .

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de ácido ascórbico en el medio de cultivo es de al menos aproximadamente  $75 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, al menos aproximadamente  $100 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, al menos aproximadamente  $150 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, al menos aproximadamente  $200 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, al menos aproximadamente  $250 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, al menos aproximadamente  $300 \mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, al menos

aproximadamente 350 µg/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 400 µg/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 450 µg/ml, por ejemplo, aproximadamente 500 µg/ml.

5 Tal como se muestra en el ejemplo 1 de la sección ejemplos que sigue, los presentes inventores han utilizado diversos medios de cultivo que incluyen ácido ascórbico a una concentración de al menos 50 µg/ml (por ejemplo, los medios de cultivo mHA40/4, HA75, HA76, HA77, HA78 y HA74/1) para cultivar con éxito células iPS y mantener las mismas en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 15 pases en ausencia de soporte de células alimentadoras.

10 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. El bFGF utilizado en el medio de cultivo de algunos aspectos de la divulgación puede ser una proteína bFGF purificada, sintética o expresada de manera recombinante [(por ejemplo, polipéptido de bFGF humano de n.º registro de GenBank NP\_001997.5 (SEQ ID NO:31); polinucleótido de bFGF humano de n.º de registro de GenBank NM\_002006.4 (SEQ ID NO:32). Debe indicarse que para la preparación de un  
15 medio de cultivo sin xenógenos el bFGF se purifica preferiblemente a partir de una fuente humana o se expresa de manera recombinante tal como se describe además a continuación en el presente documento. El bFGF puede obtenerse a partir de diversas fuentes comerciales tales como Cell Sciences®, Canton, MA, EE.UU. (por ejemplo, números de catálogo CRF001A y CRF001B), productos de Invitrogen Corporation, 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).

Según algunos aspectos la concentración de bFGF en el medio de cultivo está en el intervalo de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml, por  
25 ejemplo, de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 20 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 30 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 40 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente  
30 50 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 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.

35 Según algunos aspectos de la divulgación la concentración de bFGF en el medio de cultivo es de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 2 ng/ml, al menos aproximadamente 3 ng, al menos aproximadamente 4 ng/ml, al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 6 ng/ml, al menos aproximadamente 7 ng, 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  
40 aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 30 ng/ml, al menos aproximadamente 35 ng/ml, al menos aproximadamente 40 ng/ml, al menos aproximadamente 45 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 55 ng/ml, al menos aproximadamente 60 ng/ml, al menos aproximadamente 70 ng/ml, al menos aproximadamente 80 ng/ml, al menos aproximadamente 90 ng/ml, al menos aproximadamente menos aproximadamente 95 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ml.

45 Como se muestra en el ejemplo 1 de la sección ejemplos que sigue, los presentes inventores han utilizado diversos medios de cultivo que incluyen bFGF en el intervalo de 5-200 ng/ml (por ejemplo, los medios de cultivo mHA40/4, HA75 y HA78, que incluyen bFGF 10 ng/ml; los medios de cultivo HA76 y HA77, que incluyen bFGF 100 ng/ml; y el medio de cultivo HA74/1 que incluye bFGF 50 ng/ml) para cultivar con éxito células iPS y mantener las mismas en un  
50 estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 15 pases en ausencia de soporte de células alimentadoras.

El factor de crecimiento transformante beta-3 (TGFβ<sub>3</sub>) está implicado en el control de la proliferación, diferenciación y otras funciones en muchos tipos celulares, actúa en la inducción de transformación y como un factor de crecimiento autocrino negativo. El TGFβ<sub>3</sub> puede obtenerse de diversas fuentes comerciales tales como R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de TGFβ<sub>3</sub> en el medio de cultivo está 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  
60 ejemplo, desde aproximadamente de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de TGFβ<sub>3</sub> en el medio de cultivo 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  
65 aproximadamente 1 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2 ng/ml, por ejemplo, al menos

aproximadamente 1,4 ng/ml, al menos aproximadamente 1,6 ng/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 1,8 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 2 ng/ml.

5 Tal como se muestra en el ejemplo 1 de la sección ejemplos que sigue, los presentes inventores han utilizado diversos medios de cultivo que incluyen TGFβ3 a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml (por ejemplo, los medios de cultivo mHA40/4, HA75, HA76, HA78 y HA74/1) para cultivar con éxito células iPS y mantener las mismas en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 22 pases en ausencia de soporte de células alimentadoras.

10 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende bFGF a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, TGFβ3 a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml y ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 50 μg/ml a aproximadamente 5000 μg/ml.

15 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de algunas realizaciones de la invención comprende bFGF a un intervalo de concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, TGFβ3 a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 5 ng/ml y ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400 μg/ml a aproximadamente 600 μg/ml.

20 Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo comprende además una mezcla de lípidos.

25 Tal como se utiliza en el presente documento la expresión “mezcla de lípidos” se refiere a una composición lipídica definida (por ejemplo, definida químicamente) necesaria para cultivar las células madre pluripotentes. Debe indicarse que la mezcla de lípidos se añade normalmente a un medio de cultivo que está desprovisto de suero o reemplazo de suero y por tanto sustituye a los lípidos que se añaden habitualmente a formulaciones de suero o reemplazo de suero.

Un ejemplo no limitativo de una mezcla de lípidos comercialmente disponible, que pueden utilizarse en el medio de cultivo de algunas realizaciones de la invención, incluyen el concentrado de lípidos definido químicamente disponible de Invitrogen (n.º de catálogo 11905-031).

30 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la mezcla de lípidos en el medio de cultivo es de aproximadamente el 0,5% [volumen/volumen (v/v)] a aproximadamente el 3% v/v, por ejemplo, de aproximadamente el 0,5% v/v a aproximadamente el 2% v/v, por ejemplo, de aproximadamente el 0,5% v/v a aproximadamente el 1% v/v, por ejemplo, aproximadamente el 1% v/v.

35 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de algunos aspectos de la divulgación comprende bFGF a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, TGFβ3 a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml, ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 50 μg/ml a aproximadamente 5000 μg/ml, reemplazo de suero sin xenógenos y una mezcla de lípidos.

40 Los ejemplos no limitativos de medios de cultivo sin xenógenos y sin suero que comprenden TGFβ3, bFGF y ácido ascórbico a una concentración de al menos 50 μg/ml y que pueden utilizarse para mantener células madre pluripotentes en estados proliferativos e indiferenciados incluyen los medios de cultivo HA75 y HA78.

45 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende además bicarbonato de sodio. Puede obtenerse bicarbonato de sodio de Biological Industries, Beit HaEmek, Israel.

50 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo es de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 10%, por ejemplo, de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 9%, por ejemplo, de aproximadamente el 7% a aproximadamente el 8%, por ejemplo, aproximadamente el 7,5%.

55 Los presentes inventores descubrieron que pueden mantenerse células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 15 pases cuando se cultivan en un medio de cultivo sin suero y sin xenógenos que comprende bFGF y ácido ascórbico pero no comprende una isoforma de TGFβ.

60 Tal como se utiliza en el presente documento la expresión “isoforma de TGFβ” se refiere a cualquier isoforma del factor de crecimiento transformante beta (β) incluyendo TGFβ1 (por ejemplo, TGFβ1 de *Homo sapiens*, n.º de registro de GenBank NP\_000651), TGFβ2 (por ejemplo, TGFβ2 de *Homo sapiens*, n.º de registro de GenBank NP\_003229) y TGFβ3 (por ejemplo, TGFβ3 de *Homo sapiens*, n.º de registro de GenBank NP\_003230) que funciona a través del mismo sistema de señalización de receptor en el control de la proliferación, diferenciación y otras funciones en muchos tipos celulares. El TGFβ actúa en la inducción de transformación y también actúa como un factor de crecimiento autocrino negativo.

65 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende no más de 1 ng/ml de la isoforma de TGFβ, por ejemplo, no más de 0,5 ng/ml, por ejemplo, no más de 0,1 ng/ml, por ejemplo, no más de 0,05 ng/ml, por

ejemplo, no más de 0,01 ng/ml de la isoforma de TGFβ.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo está completamente desprovisto de una isoforma de TGFβ (es decir, sin isoforma de TGFβ).

5 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml.

10 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml es capaz de mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado en ausencia de soporte de células alimentadoras.

15 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de ácido ascórbico en el medio de cultivo está entre aproximadamente 410 μg/ml y aproximadamente 590 μg/ml, entre aproximadamente 420 μg/ml y aproximadamente 580 μg/ml, entre aproximadamente 450 μg/ml y aproximadamente 550 μg/ml, entre aproximadamente 460 μg/ml y aproximadamente 540 μg/ml, entre aproximadamente 470 μg/ml y aproximadamente 530 μg/ml, entre aproximadamente 490 μg/ml y aproximadamente 520 μg/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 490 μg/ml y aproximadamente 510 μg/ml, por ejemplo, aproximadamente 500 μg/ml.

20 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de bFGF en el medio de cultivo está entre aproximadamente 50 ng/ml y aproximadamente 200 ng/ml, entre aproximadamente 60 ng/ml y aproximadamente 190 ng/ml, entre aproximadamente 70 ng/ml y aproximadamente 180 ng/ml, entre aproximadamente 80 ng/ml y aproximadamente 170 ng/ml, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 160 ng/ml, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 150 ng/ml, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 130 ng/ml, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 120 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ml.

30 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de bFGF en el medio de cultivo es de aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 165, aproximadamente 170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente 185, aproximadamente 190, aproximadamente 195, aproximadamente 200 ng/ml.

35 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml, comprende además reemplazo de suero sin xenógenos.

40 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml, comprende además una mezcla de lípidos.

45 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende bFGF a una concentración de 50-200 ng/ml y ácido ascórbico a una concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml y está desprovisto de bicarbonato de sodio.

50 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende bFGF a una concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml y ácido ascórbico a una concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml, reemplazo de suero sin xenógenos a una concentración de aproximadamente el 1% y mezcla de lípidos a una concentración de aproximadamente el 1%.

55 Un ejemplo no limitativo de un medio de cultivo sin isoforma de TGFβ, sin suero y sin xenógenos que comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400-600 μg/ml, bFGF a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml, reemplazo de suero sin xenógenos y una mezcla de lípidos y que es capaz de mantener células madre pluripotentes tales como hESC y células iPS humanas en un estado proliferativo e indiferenciado durante al menos 21 pases en ausencia de soporte de células alimentadoras es el medio de cultivo HA77 (ejemplo 1 de la sección ejemplos que sigue) o un medio de cultivo similar al medio HA77 pero que está desprovisto de bicarbonato de sodio, tal como un medio de cultivo que consiste en DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Israel, Sigma Israel), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation, Sigma, Israel), ácido ascórbico 500 μg/ml (Sigma, Israel), bFGF - 100 ng (Invitrogen corporation), SR3 - 1% (Sigma, Israel), y mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation, Sigma, Israel). Los presentes inventores han descubierto medios de cultivo altamente definidos y sin suero novedosos, que pueden mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en sistemas bidimensionales y tridimensionales (es decir, un cultivo en suspensión) en ausencia de soporte de células alimentadoras.

Tal como se utiliza 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.

5 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo sin suero que puede mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales en ausencia de soporte de células alimentadoras comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml.

10 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende entre aproximadamente 55-190 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 60-190 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 70-180 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 80-160 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90-150 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90-140 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90-130 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90-120 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90-110 ng/ml, por ejemplo, entre  
15 aproximadamente 95-105 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que comprende bFGF entre aproximadamente 50-200 ng/ml comprende además reemplazo de suero.

20 Un ejemplo no limitativo de un medio de cultivo que comprende bFGF a una concentración de entre aproximadamente 50-200 ng/ml es el medio YF100 que comprende un medio básico (por ejemplo, DMEM/F12, 85%), reemplazo de suero (15%), bFGF (100 ng/ml), L-glutamina (2 mM), β-mercaptoetanol (0,1 mM) y disolución madre de aminoácidos no esenciales (1%).

25 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo sin suero que puede mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales en ausencia de soporte de células alimentadoras consiste en un medio básico, ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, bFGF a un intervalo de concentración de entre aproximadamente 2 ng/ml y aproximadamente 20 ng/ml, L-glutamina y reemplazo de suero.

30 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo sin suero que puede mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales en ausencia de soporte de células alimentadoras consiste en un medio básico, ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, bFGF a un intervalo de  
35 concentración de entre aproximadamente 2 ng/ml y aproximadamente 20 ng/ml, L-glutamina, reemplazo de suero y una mezcla de lípidos.

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de ácido ascórbico es de aproximadamente 50 µg/ml.

40 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de ácido ascórbico es de aproximadamente 500 µg/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de bFGF es de aproximadamente 4 ng/ml.

45 El medio básico puede ser cualquier medio de cultivo tisular conocido tal como DMEM/F12 (Biological Industries, Israel, o Sigma Israel), Ko-DMEM (Invitrogen). La concentración del medio básico depende de la concentración de los otros componentes del medio tal como el reemplazo de suero.

50 El reemplazo de suero puede ser cualquier reemplazo de suero sin xenógenos (desprovisto de contaminantes animales) a un intervalo de concentración del 1-20% dependiendo del reemplazo de suero utilizado. Por ejemplo, si se utiliza el reemplazo de suero SR3 entonces la concentración en el medio es de aproximadamente el 1%.

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de L-glutamina es de aproximadamente 2 mM.

55 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la mezcla de lípidos (Sigma, Israel; o Invitrogen, Israel) es de aproximadamente el 1%.

60 Los ejemplos no limitativos de un medio de cultivo de este tipo incluyen el medio HA13(a) modificado [DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 500 µg/ml, bFGF- 4 ng, y SR3- 1%]; el medio HA13(b) modificado [DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 500 µg/ml, bFGF - 4 ng, SR3 - 1% y una mezcla de lípidos (1%)]; el medio HA13(c) modificado [DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 50 µg/ml, bFGF - 4 ng y SR3 - 1%]; y el medio HA13(d) modificado [DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 50 µg/ml, bFGF - 4 ng, SR3 - 1% y una mezcla de lípidos (1%)]. Estos medios de cultivo fueron capaces de mantener células madre pluripotentes (por ejemplo, células hiPS y hESC) en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 20 pases cuando se cultivan en un sistema de cultivo bidimensional (por ejemplo, en un sistema de cultivo sin  
65 capa alimentadora; datos no mostrados) y durante al menos 20 pases cuando se cultivan en un sistema de cultivo

tridimensional (por ejemplo, cultivo en suspensión sin adherencia a un sustrato externo, encapsulación celular o a un portador proteico; datos no mostrados).

5 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo sin suero que puede mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales en ausencia de soporte de células alimentadoras comprende una quimera de IL6RIL6 a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 picogramos por mililitro (pg/ml).

10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "quimera de 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 según lo expuesto por el n.º de registro de GenBank AAH89410; SEQ ID NO:33; por ejemplo, una porción de los receptores de IL6 solubles según lo expuesto por los aminoácidos 112-355 (SEQ ID NO:34) del n.º de registro de GenBank AAH89410] y la interleucina-6 (IL6; por ejemplo, IL-6 humana según lo expuesto en el n.º de registro de GenBank CAG29292; SEQ ID NO:35) o una fracción biológicamente activa de la misma (por ejemplo, un dominio de unión de receptor).

15 Debe indicarse que al construir la quimera de IL6RIL6, las dos porciones funcionales (es decir, la IL6 y su receptor) pueden fusionarse directamente (por ejemplo, se unen o fusionan traduccionalmente, es decir, codificadas por un solo marco de lectura abierto) entre sí o conjugarse (unirse o fusionarse traduccionalmente) a través de un ligador adecuado (por ejemplo, un ligador polipéptidico). Según algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido quimérico de IL6RIL6 presenta una cantidad y patrón de glucosilación similar al receptor de IL6 y a la IL6 de origen natural. Por ejemplo, una quimera de IL6RIL6 adecuada es tal como se expone en SEQ ID NO:36 y en la figura 11 del documento WO 99/02552 de Revel M., *et al.*

20 Se apreciará que cualquiera de los factores proteínicos utilizados en el medio de cultivo de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera de IL6RIL6, bFGF, TGFβ3) puede expresarse de manera recombinante o sintetizarse bioquímicamente. Además, factores proteínicos de origen natural tales como bFGF y TGFβ pueden purificarse a partir de muestras biológicas (por ejemplo, de suero humano, cultivos celulares) utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

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

35 La expresión recombinante de los factores proteínicos de la presente divulgación (por ejemplo, la quimera de IL6RIL6) puede generarse utilizando técnicas recombinantes tal como se describe 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 & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, sección VIII, págs. 421-463. Específicamente, la quimera de IL6RIL6 puede generarse tal como se describe en la publicación PCT WO 99/02552 de Revel M., *et al.* y Chebath J, *et al.*, 1997.

45 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la quimera de IL6RIL6 en el medio de cultivo está 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.

55 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que contiene quimera de IL6RIL6 comprende además bFGF.

60 Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de bFGF en el medio de cultivo que contiene quimera de IL6RIL6 está en el intervalo de desde aproximadamente 1 ng/ml hasta aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 30 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 5 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 15 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 20 ng/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que contiene quimera de IL6RIL6 comprende además reemplazo de suero.

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de reemplazo de suero Knockout™ en el medio de cultivo que contiene quimera de IL6RIL6 está en el intervalo de aproximadamente el 1% (v/v) a aproximadamente el 50% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 5% (v/v) a aproximadamente el 40% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 5% (v/v) a aproximadamente el 30% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 30% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 25% (v/v), por ejemplo, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 20% (v/v), por ejemplo, aproximadamente el 15% (v/v).

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende quimera de IL6RIL6 a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 pg/ml, bFGF a un intervalo de concentración de aproximadamente 5-50 ng/ml y reemplazo de suero a una concentración de aproximadamente el 5-40%.

Por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 4 de la sección ejemplos que sigue, se mostró que el medio de cultivo CM100Fp era capaz de mantener células madre pluripotentes tales como células iPS humanas en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 50 pases en un cultivo en suspensión desprovisto de adherencia a sustrato.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo sin suero que puede mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales en ausencia de soporte de células alimentadoras comprende LIF a una concentración de al menos 2000 unidades/ml.

El factor inhibidor de leucemia (LIF) es una citocina pleiotrópica que está implicada en la inducción de la diferenciación hematopoyética, inducción de la diferenciación de células neuronales, regulador de conversión mesenquimatosa a epitelial durante el desarrollo renal, y también puede tener un papel en la tolerancia inmunitaria en la interfase materno-fetal. El LIF utilizado en el medio de cultivo de algunos aspectos de la divulgación puede ser una proteína LIF purificada, sintética o expresada recombinantemente [por ejemplo, polipéptido de LIF humano de n.º de registro de GenBank NP\_002300.1 (SEQ ID NO:37); polinucleótido de LIF humano de n.º de registro de GenBank NM\_002309.3 (SEQ ID NO:38). Debe indicarse que para la preparación de un medio de cultivo sin xenógenos, se purifica preferiblemente LIF a partir de una fuente humana o se expresa de manera recombinante. Puede obtenerse LIF humano recombinante a partir de diversas fuentes tales como Chemicon, EE.UU. (n.º de catálogo LIF10100) y AbD Serotec (MorphoSys US Inc, Raleigh, NC 27604, USA). Puede obtenerse LIF murino ESGRO® (LIF) de Millipore, EE.UU. (n.º de catálogo ESG1107).

Según algunos aspectos de la divulgación, la concentración de LIF en el medio de cultivo es de aproximadamente 2000 unidades/ml a aproximadamente 10.000 unidades/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2000 unidades/ml a aproximadamente 8.000 unidades/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2000 unidades/ml a aproximadamente 6.000 unidades/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2000 unidades/ml a aproximadamente 5.000 unidades/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2000 unidades/ml a aproximadamente 4.000 unidades/ml.

Según algunas realizaciones de la divulgación, la concentración de LIF en el medio de cultivo es de al menos aproximadamente 2000 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2100 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2200 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2300 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2400 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2500 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2600 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2700 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2800 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2900 unidades/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 2950 unidades/ml, por ejemplo, aproximadamente 3000 unidades/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que contiene LIF comprende además bFGF.

La concentración de bFGF en el medio de cultivo que contiene LIF está en el intervalo de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 30 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 5 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 10 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 15 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 20 ng/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo que contiene LIF comprende además reemplazo de suero.

- Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende LIF a una concentración de aproximadamente 2000-10.000 unidades/ml, bFGF a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml y reemplazo de suero Knockout™ a un intervalo de concentración de aproximadamente el 1% (v/v) a aproximadamente el 50% (v/v).
- 5 Según algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo comprende LIF a una concentración de aproximadamente 2000-5.000 unidades/ml, bFGF a una concentración de aproximadamente 5-50 ng/ml y reemplazo de suero a una concentración de aproximadamente el 5-30%.
- 10 Por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 4 de la sección ejemplos que sigue, se mostró que el medio de cultivo yFL3 era capaz de mantener células madre pluripotentes tales como células iPS humanas en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 10 pases cuando se cultivan en un cultivo en suspensión.
- 15 Según algunos aspectos de la divulgación, los componentes incluidos en el medio de cultivo de algunas realizaciones de la invención son sustancialmente puros, con un cultivo tisular y/o una calidad clínica.
- Según un aspecto de algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un cultivo celular que comprende la célula madre pluripotente de algunos aspectos de la divulgación y el medio de cultivo de algunos aspectos de la divulgación.
- 20 Según un aspecto de algunos aspectos de la divulgación, el cultivo celular es sin células alimentadoras (por ejemplo, está desprovisto de células alimentadoras o medio condicionado de células alimentadoras).
- Según algunos aspectos de la divulgación, las células madre pluripotentes que se incluyen en el cultivo celular de algunos aspectos de la divulgación presentan un cariotipo estable (estabilidad cromosómica) durante el período 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.
- 25 Según algunos aspectos de la divulgación, el cultivo celular de la divulgación presenta un tiempo de duplicación de al menos 20 horas, por ejemplo, un tiempo de duplicación que está entre 20 a 40 horas (por ejemplo, aproximadamente 36 horas), que representa de ese modo unas células madre pluripotentes, genéticamente estables, no tumorigénicas (por ejemplo, células iPS y hESC).
- 30 Según algunos aspectos de la divulgación, el cultivo celular de la invención se caracteriza por al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, por ejemplo, al menos el 70%, por ejemplo, al menos el 80%, por ejemplo, al menos el 85%, por ejemplo, al menos el 90%, por ejemplo, al menos el 95% de células madre pluripotentes indiferenciadas.
- 35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método de expansión y mantenimiento de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado y pluripotente, comprendiendo el método cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia a sustrato y desprovistas de encapsulación celular y que permiten la expansión de las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, en el que un medio de cultivo de dicho cultivo en suspensión es sin suero y sin células alimentadoras, dicho medio de cultivo comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de 400-600 µg/ml, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de 50-200 ng/ml, expandiendo y manteniendo de ese modo las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, el método de expansión y mantenimiento de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado se realiza mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio de cultivo que es sin suero, sin alimentadoras, sin matriz y sin portador proteico y que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en un intervalo de concentración de 50-200 ng/ml.
- 45 Según algunos aspectos de la divulgación, se efectúa el cultivo en un sistema de cultivo bidimensional tal como una matriz o una capa de células alimentadoras.
- 50 Por ejemplo, el cultivo en un sistema de cultivo bidimensional puede realizarse sembrando en placa las células madre pluripotentes sobre 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 utiliza una densidad de siembra en placa de entre aproximadamente 15.000 células/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 3.000.000 células/cm<sup>2</sup>.
- 55 Se apreciará que aunque se siembran habitualmente suspensiones unicelulares de células madre pluripotentes, también pueden utilizarse grupos pequeños. Con este fin, la digestión enzimática (como con la colagenasa tipo IV) utilizada para la disgregación de grupos (véase "Materiales generales y métodos experimentales" en la sección de ejemplos que sigue) se termina antes de que las células madre se dispersen completamente y las células se trituran con una pipeta de manera que se forman agregados (es decir, 10-200 células). Sin embargo, se toman medidas para
- 60
- 65

evitar grandes grupos que pueden provocar diferenciación celular.

Como se utiliza en el presente documento, el término “matriz” se refiere a cualquier sustancia a la que puedan adherirse las células madre pluripotentes y que, por tanto, pueden sustituir la función de unión celular de células alimentadoras. Una matriz de este tipo normalmente contiene componentes extracelulares a los que pueden adherirse las células madre pluripotentes y por tanto proporciona un sustrato de cultivo adecuado.

Según algunos aspectos de la divulgación, la matriz comprende una matriz extracelular.

La matriz extracelular puede estar compuesta por componentes derivados de la membrana basal o componentes de la matriz extracelular que forman parte de acoplamiento de receptor de molécula de adhesión-ligando. MATRIGEL® (Becton Dickinson, EE.UU.) es un ejemplo de una matriz comercialmente disponible que es adecuada para su uso con la presente invención. MATRIGEL® es una preparación soluble a partir de células tumorales de Engelbreth-Holm-Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida; MATRIGEL® también está disponible como una preparación reducida en factores de crecimiento. Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes que son adecuados para su uso con la presente invención incluyen matriz de prepucio, matriz de laminina, matriz de fibronectina, matriz de proteoglicano, matriz de entactina, matriz de sulfato de heparano, matriz de colágeno y similares, solas o en varias combinaciones de las mismas.

Según algunos aspectos de la divulgación, la matriz es sin xenógenos.

En casos en los que se desean condiciones de cultivo sin componentes animales completas, la matriz se deriva preferiblemente de una fuente humana o sintetizada utilizando técnicas recombinantes como las descritas anteriormente en el presente documento. Tales matrices incluyen, por ejemplo, fibronectina derivada de ser humano, fibronectina recombinante, laminina derivada de ser humano, matriz de fibroblasto de prepucio o una matriz de fibronectina sintética. La fibronectina derivada de ser humano puede ser a partir de fibronectina plasmática o fibronectina celular, ambas de las cuales pueden obtenerse de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. Laminina derivada de ser humano y matriz de fibroblasto de prepucio pueden obtenerse de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. Una matriz de fibronectina sintética puede obtenerse de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.

Según algunos aspectos de la divulgación, el cultivo se realiza en una capa de células alimentadoras.

Según algunos aspectos de la divulgación, el método de expansión y mantenimiento de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado se realiza cultivando las células madre pluripotentes sobre una capa de células alimentadoras en un medio de cultivo sin suero y sin xenógenos que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante beta-3 (TGFβ3) y ácido ascórbico, en el que una concentración del ácido ascórbico en el medio de cultivo es de al menos 50 µg/ml.

Según algunos aspectos de la divulgación, el método de expansión y mantenimiento de células madre pluripotentes en un estado indiferenciado se realiza cultivando las células madre pluripotentes sobre una capa de células alimentadoras en un medio de cultivo sin suero y sin xenógenos que comprende ácido ascórbico a un intervalo de concentración de aproximadamente 400-600 µg/ml, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 ng/ml, reemplazo de suero sin xenógenos y una mezcla de lípidos.

Según algunos aspectos de la divulgación, la capa de células alimentadoras es sin xenógenos.

Según algunos aspectos de la divulgación, la capa de células alimentadoras es una capa de células alimentadoras de fibroblastos de prepucio.

Según la invención, el cultivo se realiza en un cultivo en suspensión.

Según la invención, el cultivo en suspensión está desprovisto de adherencia a sustrato, por ejemplo, sin adherencia a un sustrato externo tal como componentes de la matriz extracelular, un microportador de vidrio o perlas.

Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se realiza en un medio de cultivo sin portador proteico.

Como se utiliza en el presente documento la expresión “portador proteico” se refiere a una proteína que actúa en la transferencia de proteínas o nutrientes (por ejemplo, minerales tales como el zinc) a las células en el cultivo. Tales portadores proteicos pueden ser, por ejemplo, albúmina (por ejemplo, albúmina sérica bovina), Albumax (albúmina enriquecida con lípidos) o plasmanato (proteínas aisladas en plasma humano). Dado que estos portadores se derivan de fuentes o bien humanas o bien animales, su uso en cultivos celulares de hESC o 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 portador proteico (por ejemplo, albúmina) es altamente ventajoso dado que permite un medio verdaderamente definido que puede fabricarse a partir de materiales recombinantes o sintéticos.

Según la invención, el cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se realiza en un medio de cultivo sin suero y sin células alimentadoras.

5 Debe indicarse que algunos protocolos de cultivo de células madre pluripotentes como células iPS y hESC incluyen microencapsulación de las células dentro de una membrana de hidrogel semipermeable, lo que permite el intercambio de nutrientes, gases y productos metabólicos con el medio a granel que rodea la cápsula (para detalles véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º 20090029462 de Beardsley *et al.*).

10 Según la invención, las células madre pluripotentes cultivadas en el cultivo en suspensión están desprovistas de encapsulación celular.

15 Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método de expansión de células madre pluripotentes inducidas (iPS) y mantenimiento de las células iPS en un estado indiferenciado. El método se realiza mediante el cultivo de las células iPS en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia a sustrato y desprovistas de encapsulación celular y que permiten la expansión de las células iPS en el estado indiferenciado.

20 Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se realiza en presencia del medio de cultivo que contiene quimera de IL6RIL6 en el que la concentración de la quimera de IL6RIL6 está en el intervalo de aproximadamente 50-200 picogramos por mililitro (pg/ml).

25 Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se realiza en presencia del medio de cultivo que contiene factor inhibidor de leucemia (LIF), en el que la concentración de LIF es de al menos aproximadamente 2000 unidades/ml.

30 Según algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se realiza en presencia de un medio que comprende factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en un intervalo de concentración de 50 ng/ml a 200 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 60 ng/ml y aproximadamente 190 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 70 ng/ml y aproximadamente 180 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 80 ng/ml y aproximadamente 170 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 160 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 150 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 130 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 90 ng/ml y aproximadamente 120 ng/ml, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ml.

35 Por ejemplo, un ejemplo no limitativo de un medio que se encontró adecuado para cultivar hESC y células iPS humanas en un cultivo en suspensión desprovisto de adherencia a sustrato y encapsulación celular es el medio yF100 que comprende reemplazo de suero y bFGF 100 ng/ml.

40 Según algunos aspectos de la divulgación, el cultivo de las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión se realiza en presencia de un medio que comprende la quimera de IL6RIL6 a un intervalo de concentración de aproximadamente 50-200 nanogramos por mililitro (ng/ml) y bFGF a una concentración en el intervalo de 1-50 ng/ml.

45 Por ejemplo, un ejemplo no limitativo de un medio que se encontró adecuado para cultivar hESC y células iPS humanas en un cultivo en suspensión desprovisto de adherencia a sustrato y encapsulación celular es el medio CM100F que comprende reemplazo de suero, la quimera de IL6RIL6 a una concentración de 100 ng/ml y bFGF a una concentración de 10 ng/ml.

50 Por ejemplo, usando los medios de cultivo CM100Fp, CM100F, yF100 o yFL3, los presentes inventores expandieron células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 50 pases (véanse por ejemplo, las figuras 3A-C, 4, 5A-C y 6A-D y se describe en los ejemplos 4 y 5 de la sección ejemplos que sigue).

55 El cultivo en un cultivo en suspensión según el método de algunas realizaciones de la invención se realiza sembrando en placa las células madre pluripotentes en un recipiente de cultivo a una densidad celular que promueve la supervivencia y proliferación celular pero limita la diferenciación. Habitualmente, se utiliza una densidad de siembra en placa de entre aproximadamente  $5 \times 10^4$  -  $2 \times 10^6$  células por ml. Se apreciará que aunque se siembran habitualmente suspensiones unicelulares de células madre, también pueden utilizarse pequeños grupos tales como 10-200 células.

60 Para proporcionar a las células madre pluripotentes un suministro suficiente y constante de nutrientes y factores de crecimiento mientras que están en el cultivo en suspensión, el medio de cultivo puede reemplazarse diariamente, o, en una programación predeterminada tal como cada 2-3 días. Por ejemplo, el reemplazo del medio de cultivo puede realizarse 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 formadas en un medio nuevo. Adicional o alternativamente, puede emplearse un sistema de cultivo en el que el medio de cultivo se somete a filtración o diálisis constante para proporcionar un suministro constante de nutrientes o factores de

65

crecimiento a las células madre pluripotentes.

Ya que grandes grupos de células madre pluripotentes pueden provocar diferenciación celular, se toman medidas para evitar grandes agregados de células madre pluripotentes. Según algunas realizaciones de la invención, los agregados de células madre pluripotentes formados se disocian cada 5-7 días y las células individuales o pequeños agregados de células o bien se dividen en recipientes de cultivo adicionales (es decir, se hacen pases) o bien permanecen en el mismo recipiente de cultivo pero con medio de cultivo adicional. Para la disociación de grandes agregados de células madre pluripotentes, un sedimento de células madre pluripotentes (que puede lograrse por centrifugación como se describió anteriormente en el presente documento) o un agregado de células madre pluripotentes aislado puede someterse a disociación mecánica y/o digestión enzimática.

Puede realizarse la digestión enzimática de agregado(s) de células madre pluripotentes sometiendo el/los grupo(s) a una enzima tal como colagenasa tipo IV (Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.) y/o dispasa (Invitrogen Corporation products, Grand Island NY, EE.UU.). El tiempo de incubación con la enzima depende del tamaño de los agregados de células presentes en el cultivo en suspensión. Normalmente, cuando los agregados de células madre pluripotentes se disocian cada 5-7 días mientras están en el cultivo en suspensión, la incubación de 20-60 minutos con colagenasa tipo IV 1,5 mg/ml da como resultado agregados de células pequeños que pueden cultivarse además en el estado indiferenciado. Alternativamente, pueden someterse agregados de células madre pluripotentes a incubación de aproximadamente 25 minutos con colagenasa tipo IV 1,5 mg/ml seguido de cinco minutos de incubación con dispasa 1 mg/ml. Debe indicarse que el pase de las ESC humanos con tripsina puede dar como resultado anomalías e inestabilidad cromosómica (véanse por ejemplo, Mitalipova MM, *et al.*, Nature Biotechnology, 23: 19-20, 2005 y Cowan CA *et al.*, N. Engl. J. de Med. 350: 1353-1356, 2004). Según algunas realizaciones de la invención, debe evitarse el pase de células iPS o hESC con tripsina.

Puede realizarse disociación mecánica de grandes agregados de células madre pluripotentes utilizando un dispositivo diseñado para romper los agregados para dar un tamaño predeterminado. Un dispositivo de este tipo puede obtenerse de Cellartis Goteborg, Suecia. Adicional o alternativamente, puede realizarse manualmente disociación mecánica utilizando una aguja tal como una aguja 27g (BD Microlance, Drogheda, Irlanda) mientras se visualizan los agregados bajo un microscopio invertido.

Según algunas realizaciones de la invención, después de la disociación enzimática o mecánica de los grandes agregados de células, los agregados de células madre pluripotentes disociados se rompen además para dar pequeños agregados utilizando puntas de pipeta Gilson de 200 µl (por ejemplo, pipeteando arriba y abajo las células).

El recipiente de cultivo utilizado para cultivar las células madre pluripotentes en suspensión según el método de algunas realizaciones de la invención puede ser cualquier recipiente de cultivo tisular (por ejemplo, con un grado de pureza adecuado para cultivar células madre pluripotentes) que tiene una superficie interna diseñada de manera que las células madre pluripotentes cultivadas en el mismo son incapaces de adherirse o unirse a una superficie de este tipo (por ejemplo, células tratadas sin cultivo tisular, para evitar la unión o adherencia a la superficie). Preferiblemente, con el fin de obtener un cultivo escalable, el cultivo según algunas realizaciones de la invención se realiza utilizando un sistema de cultivo controlado (preferiblemente un sistema de cultivo controlado por ordenador) en el que parámetros de cultivo tales como la temperatura, la agitación, el pH y la pO<sub>2</sub> se realizan automáticamente utilizando un dispositivo adecuado. Una vez que se registran los parámetros de cultivo, se fija el sistema para el ajuste automático de parámetros de cultivo según sea necesario para la expansión de células madre pluripotentes.

Tal como se describe en la sección ejemplos que sigue, las células madre pluripotentes se cultivaron en condiciones dinámicas (es decir, en condiciones en las que las células madre pluripotentes se someten a un movimiento constante mientras que están en el cultivo en suspensión; véanse por ejemplo, las figuras 6A-D; ejemplo 5) o en condiciones no dinámicas (es decir, un cultivo estático; véanse por ejemplo, las figuras 3A-C, 4 y 5A-C; ejemplo 4) al tiempo que conservan su capacidad proliferativa, pluripotente y estabilidad de cariotipo durante al menos 30 pases.

Para cultivo no dinámico de células madre pluripotentes, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en placas Petri de 58 mm sin recubrimiento (Greiner, Frickenhausen, Alemania).

Para cultivo dinámico de células madre pluripotentes, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en frascos giratorios [por ejemplo, de 200 ml a 1000 ml, por ejemplo 250 ml que puede obtenerse de CellSpin de Integra Biosciences, Fernwald, Alemania; de 100 ml que puede obtenerse de Bellco, Vineland, NJ; o en un Erlenmeyer de 125 ml (Corning Incorporated, Corning NY, EE.UU.)] que pueden conectarse a una unidad de control y por tanto presentar un sistema de cultivo controlado. El recipiente de cultivo (por ejemplo, un frasco giratorio, un Erlenmeyer) se agita de manera continua. Según algunas realizaciones de la invención, los recipientes de cultivo se agitan a 90 revoluciones por minuto (rpm) utilizando un agitador (S3.02.10L, ELMi Ltd, Riga, Letonia). Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo se cambia diariamente.

Según algunas realizaciones de la invención, cuando se cultivan según las enseñanzas de la presente invención, se monitoriza el crecimiento de las células madre pluripotentes para determinar su estado de diferenciación. El estado de diferenciación puede determinarse utilizando diversos enfoques incluyendo, por ejemplo, evaluación morfológica (por

ejemplo, tal como se muestra en las figuras 1A-C, 3A-C) y/o detección del patrón de expresión de marcadores típicos del estado indiferenciado utilizando técnicas inmunológicas tales como citometría de flujo para marcadores unidos a la 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 según el método de algunas realizaciones de la invención reveló la expresión de Oct4, antígeno embrionario específico de fase (SSEA) 4, antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81 (figuras 2A-C, 5A-C y 6A-D). Adicionalmente, el nivel de transcritos de marcadores de indiferenciación (por ejemplo, Oct4, Nanog, Sox2, Rex1, Cx43, FGF4) o marcadores de diferenciación (por ejemplo, albúmina, glucagones,  $\alpha$ -actina cardíaca,  $\beta$ -globulina, Flk1, AC133 y neurofilamento) específicos pueden detectarse utilizando técnicas basadas en ARN tales como análisis por RT-PCR y/o análisis de microalineamientos de ADNc.

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

Los presentes inventores han descubierto que los medios de cultivo sin xenógenos y sin suero novedosos de la divulgación pueden utilizarse para derivar nuevas líneas de células madre pluripotentes.

Por tanto, como se muestra además en la sección ejemplos que sigue, utilizando el medio de cultivo HA40/4, los presentes inventores fueron capaces de derivar una nueva línea de hESC denominada "WC1" a partir de blastocistos completos cultivados sobre una capa alimentadora de fibroblastos de prepucio humano (ejemplo de referencia 3 de la sección ejemplos que sigue).

El término "derivar" tal 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 pluripotente inducida o madre embrionaria.

Según algunos aspectos de la divulgación, la línea de células madre pluripotentes es una línea de células madre embrionarias, y el método de derivar la línea de células madre embrionarias se realiza: (a) obteniendo una célula madre embrionaria a partir de un blastocisto de fase previa a la implantación, un blastocisto de fase posterior a la implantación y/o un tejido genital de un feto; y (b) cultivando la célula madre embrionaria en el medio de cultivo de algunas realizaciones de la invención, derivando de ese modo la línea de células madre embrionarias.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "línea de células madre embrionarias" se refiere a células madre embrionarias que se derivan de una sola 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 el cultivo manteniendo al mismo tiempo el estado indiferenciado y la capacidad pluripotente.

La obtención de una célula madre embrionaria a partir de un blastocisto de fase previa a la implantación, blastocisto de fase posterior a la implantación y/o un tejido genital de un feto puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, tal como se describió anteriormente y en el ejemplo de referencia 3 de la sección ejemplos que sigue. Brevemente, se retira la zona pelúcida de un blastocisto de 5-7 días utilizando disolución ácida de Tyrode (Sigma, St Louis MO, EE.UU.), se retira la capa de trofoblastos específicamente o bien mediante inmunocirugía o bien mecánicamente utilizando agujas 27g y la ICM expuesta se cultiva o bien directamente en un sistema de cultivo adecuado (por ejemplo, capas alimentadoras, matriz sin alimentadoras o cultivo en suspensión) en presencia de cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento durante 4-10 días (en caso de que se utilice un blastocisto previo a la implantación) o bien se somete a implantación *in vitro* mediante cultivo de la ICM durante 6-8 días (para obtener células de un blastocisto de 13 días de edad en caso de que se utilice un blastocisto posterior a la implantación/previo a la gastrulación) sobre capas alimentadoras o un sistema de cultivo sin alimentadoras que permite la implantación del blastocisto en la superficie, tras lo cual se aíslan las células implantadas y pueden cultivarse además sobre capas alimentadoras, matriz sin alimentadoras o un cultivo en suspensión en presencia de cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento tal como se describe en el presente documento. Al utilizar el tejido genital de un feto, las crestas genitales se disocian y se cortan en trozos pequeños que luego se disgregan para dar células por disociación mecánica. Las células EG de células individuales se cultivan en cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente en el presente documento durante 4-10 días.

Según algunos aspectos de la divulgación, la línea de células madre pluripotentes es una línea de células madre pluripotentes inducidas (células iPS), y el método de derivar la línea de células iPS se realiza: (a) induciendo una célula somática a una célula madre pluripotente; y (b) cultivando la célula madre pluripotente en el medio de cultivo de algunos aspectos de la divulgación, derivando de ese modo la línea de células madre pluripotentes inducidas.

Tal como se utiliza en el presente documento la expresión "línea de células madre pluripotentes inducidas" se refiere a células madre pluripotentes derivadas de una sola célula madre pluripotente inducida, las cuales se caracterizan por la capacidad de proliferar en cultivo manteniendo al mismo tiempo el estado indiferenciado y la capacidad pluripotente.

Los métodos de inducción de células madre pluripotentes se conocen bien en la técnica y se dan ejemplos en Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2008, Yu J, *et al.*, Science. 2009, 324: 797-801; Park *et al.*, 2008; Hanna *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008; Aoi *et al.*, 2008.

Una vez obtenidas las células ESC o iPS, se cultivan además 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 tal como se describió 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 preservando al mismo tiempo su capacidad pluripotente. Por ejemplo, tal como se muestra en la sección ejemplos que sigue, usando el 15% de reemplazo de suero y el 10% de DMSO, se congelaron y descongelaron con éxito células iPS humanas.

Tal como se describe en los ejemplos 1, 2, 4 y 5 de la sección ejemplos que sigue, 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) tal como se evidencia *in vitro* (por la formación de EB) e *in vivo* (por la formación de teratomas) después de un período prolongado de cultivo (por ejemplo, de al menos 20 o 30 pases) en los sistemas de cultivo bidimensionales (por ejemplo, matrices sin alimentadoras o alimentadoras de prepucio) o tridimensionales (por ejemplo, cultivos en suspensión estática o dinámica). Por tanto, hESC o células iPS humanas cultivadas según las enseñanzas de la presente invención pueden utilizarse como fuente para generar células específicas de linaje diferenciadas. Tales células pueden obtenerse directamente de las ESC 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 diferenciación subsecuente de células de los EB en células específicas de linaje.

Por tanto, según un aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un método de generación de cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes. El método se realiza (a) cultivando las células madre pluripotentes según el método de expansión de células madre pluripotentes de la invención, para obtener de ese modo células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas; y (b) sometiendo las células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar las células madre a cuerpos embrioides, en el que dichas condiciones de cultivo incluyen un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y que está desprovisto de un factor inhibidor de diferenciación; generando de ese modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cuerpos embrioides" se refiere a estructuras morfológicas compuestas por una población de ESC, células de blastocistos extendidos (EBC), células germinales embrionarias (EGC) y/o células madre pluripotentes inducidas que se han sometido a diferenciación. La formación de EB se inicia tras la eliminación de factores de bloqueo de la diferenciación de los cultivos de células madre pluripotentes. En la primera etapa de formación de EB, las células madre pluripotentes proliferan en pequeñas masas de células que luego proceden a la diferenciación. En la primera fase de la diferenciación, después de 1-4 días en cultivo para o bien ESC humanas o bien células iPS humanas, se forma una capa de células endodérmicas sobre la capa externa de la masa pequeña, dando como resultado "EB simples". En la segunda fase, después de 3-20 días tras la diferenciación, se forman "EB complejos". Los EB complejos se caracterizan por una diferenciación extensa de células ectodérmicas y mesodérmicas y tejidos derivados.

Por tanto, el método según algunas realizaciones de la invención implica el cultivo de las células madre pluripotentes según el método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado para obtener células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas y luego someter las células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas (por ejemplo, ESC o células iPS) a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar las células madre pluripotentes a cuerpos embrioides. Tales condiciones de cultivo están substancialmente desprovistas de factores inhibidores de la diferenciación que se emplean cuando las células madre pluripotentes van a expandirse en un estado indiferenciado, tales como TGFβ<sub>3</sub>, ácido ascórbico a una concentración de al menos 50 µg/ml, bFGF y/o la quimera de IL6RIL6.

Para la formación de EB, las células madre pluripotentes (ESC o células iPS) se retiran de sus capas de células alimentadoras, 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 está desprovisto de factores inhibidores de la diferenciación (véanse, por ejemplo, los ejemplos 1, 2, 4 y 5 de la sección ejemplos que sigue). 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,  $\alpha$ -mercaptoetanol 0,1 mM y disolución madre de aminoácidos no esenciales al 1%.

Monitorizar la formación de EB está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica y puede realizarse mediante evaluaciones morfológicas (por ejemplo, tinción histológica) y determinación de la expresión de marcadores específicos de diferenciación [por ejemplo, utilizando técnicas inmunológicas o análisis basados en ARN (por ejemplo, RT-PCR, microalineamiento de ADNc)].

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

El método de este aspecto de la presente invención incluye además la etapa (c) de someter células de los cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje; en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar cardiomiocitos comprende transferir dichos cuerpos embrioides de cuatro días de edad a portaobjetos de cámara o placas recubiertos con gelatina y permitir que se unan y se diferencien, y separar mecánicamente células que se contraen espontáneamente desde el día 8 de diferenciación en un medio bajo en calcio o PBS;

(ii) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides de cuatro días de edad para dar precursores neuronales comprende cultivar dichos cuerpos embrioides 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;

(iii) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar células de mielina y oligodendrocitos comprende cultivar dichos cuerpos embrioides en un medio DMEM con albúmina sérica bovina (BSA), piruvato, progesterona, putrescina, tiroxina, triyodotironina, insulina, transferrina, selenito de sodio, aminoácidos, neurotrofina 3, factor neurotrófico ciliar y Hepes,

(iv) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar diferenciación de mastocitos comprende transferir cuerpos embrioides de dos semanas de edad a placas de cultivo tisular que incluyen medio DMEM complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 mg/ml, medio condicionado con células WEHI-3 al 20% (v/v) y factor de células madre de rata recombinantes 50 ng/ml;

(v) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar células hemato-linfoides comprende transferir cuerpos embrioides de 2-3 días de edad a placas de cultivo permeables a gas en presencia del 7,5% de CO<sub>2</sub> y el 5% de O<sub>2</sub> utilizando una incubadora con contenido de oxígeno ajustable;

generando de ese modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

Tales condiciones de cultivo se describen además en el presente documento.

Según algunas realizaciones de la invención, el método de este aspecto de la invención incluye además aislar células específicas de linaje tras la etapa (b).

Tal como se utiliza 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 muestran predominantemente al menos una característica asociada a un fenotipo de linaje específico. Se apreciará que todos los linajes celulares se derivan de las tres capas germinales embrionarias. Por tanto, por ejemplo, se derivan hepatocitos y células pancreáticas del endodermo embrionario, se derivan tejidos óseo, cartilaginoso, elástico, conjuntivo fibroso, miocitos, células miocárdicas, células de médula ósea, células vasculares (concretamente células endoteliales y musculares lisas) y células hematopoyéticas de mesodermo embrionario y se derivan células neuronales, de retina y epidérmicas del ectodermo embrionario.

Según algunas realizaciones preferidas de la invención, se realiza el aislamiento de células específicas de linaje mediante la clasificación de células de los EB mediante clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

Se conocen en la técnica métodos de aislamiento de células diferenciadas derivadas de EB mediante análisis de FACS. Según un método, los EB se disgregan utilizando una disolución de tripsina y EDTA (al 0,025% y al 0,01%, respectivamente), se lavan con suero fetal bovino (FBS) al 5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incuban durante 30 min sobre hielo con anticuerpos marcados de manera fluorescente dirigidos contra antígenos de superficie celular característicos de un linaje celular específico. Por ejemplo, se aíslan células endoteliales uniendo un anticuerpo dirigido contra la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria-1 (PECAM1), tales como los anticuerpos frente a PECAM1 marcados de manera fluorescente (30884X) disponibles de PharMingen (PharMingen, Becton Dickinson Bio Sciences, San Jose, CA, EE.UU.) tal 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). Se aíslan células

hematopoyéticas utilizando anticuerpos marcados de manera fluorescente tales como CD34-FITC, CD45-PE, CD31-PE, CD38-PE, CD90-FITC, CD117-PE, CD15-FITC, clase I-FITC, todas de las cuales IgG1 están 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 instrumento FACScan (Becton Dickinson Bio Sciences) utilizando yoduro de propidio para excluir células muertas con el software o bien PC-LYSIS o bien CELLQUEST. Se apreciará que pueden enriquecerse células aisladas adicionalmente utilizando anticuerpos segundos marcados de manera magnética y columnas de separación magnética (MACS, Miltenyi) tal como describen por 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).

Según algunas realizaciones de la invención, el aislamiento de células específicas de linaje se realiza mediante una separación mecánica de células, tejidos y/o estructuras similares a tejidos contenidas en los EB.

Por ejemplo, pueden aislarse cardiomiocitos que latan a partir de EB tal como se da a conocer en la solicitud de patente estadounidense n.º 20030022367 de Xu *et al.* Los EB de cuatro días de edad de la presente invención se transfieren a portaobjetos de cámara o placas recubiertas de gelatina y se permite que se unan y se 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 utilizando digestión con colagenasa B durante 60-120 minutos a 37°C, dependiendo de la actividad colagenasa. Las células disociadas se resuspenden entonces en un medio KB de diferenciación (KCl 85 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, EGTA 1 mM, creatina 5 mM, glucosa 20 mM, Na<sub>2</sub>ATP 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. Tras 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.

Según algunas realizaciones de la invención, el aislamiento de células específicas de linaje se realiza sometiendo a los EB a factores de diferenciación para inducir de ese modo la diferenciación de los EB en células diferenciadas específicas de linaje.

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

Para diferenciar los EB de algunas realizaciones de la invención en precursores neuronales, se cultivan EB de cuatro días de edad 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 neuronales resultantes pueden trasplantarse además para generar células neuronales *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 neuronales se tripsinizan y se trituran para dar suspensiones unicelulares en presencia de ADNasa al 0,1%.

Los EB de algunas realizaciones de la invención pueden diferenciarse a células de mielina y oligodendrocitos cultivando 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. & Sato, G. H., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76, 514-517; Raff, M. C., Miller, R. H., & Noble, M., 1983, Nature 303: 390-396]. Brevemente, los EB se disocian utilizando tripsina al 0,25%/EDTA (5 min a 37°C) y se trituran para dar suspensiones unicelulares. Las células suspendidas se siembran en placa en frascos que contienen medio SATO complementado con suero equino al 5% y suero de ternera fetal (FCS) al 5%. Después de 4 días en cultivo, los frascos se agitan suavemente para suspender las células que se adhieren de manera floja (principalmente oligodendrocitos), mientras que los astrocitos se mantienen adheridos a los frascos y además producen medio condicionado. Los oligodendrocitos primarios se transfieren a frascos nuevos que contienen medio SATO durante dos días adicionales. Después de un total de 6 días en cultivo, las oligosferas o bien se disocian parcialmente y resuspenden en medio SATO para trasplante celular, o bien se disocian completamente y se siembran en placa en un medio condicionado con oligosferas que se deriva de la etapa de agitación previa [Liu, S. *et al.*, (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 6126-6131].

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

Para generar células hemato-linfoides a partir de los EB de algunas realizaciones de la invención, los EB de 2-3 días

se transfieren a placas de cultivo permeables a gas en presencia del 7,5% de CO<sub>2</sub> y el 5% de O<sub>2</sub> utilizando una incubadora con contenido de oxígeno ajustable. Después de 15 días de diferenciación, las células se recogen y se disocian por digestión suave con colagenasa (0,1 unidad/mg) y dispasa (0,8 unidad/mg), ambas están disponibles de F.Hoffman-La Roche Ltd, Basilea, Suiza. Se aíslan células positivas para CD45 utilizando anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CD45 M1/9.3.4.HL.2 y microperlas paramagnéticas (Miltenyi) conjugadas con anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de rata tal como se describe en Potocnik, A.J. *et al.*, (Immunology Hematolymphoid 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 positivas para CD45 aisladas pueden enriquecerse además utilizando un solo pase sobre una columna MACS (Miltenyi).

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

Adicional o alternativamente, pueden obtenerse células específicas de linaje induciendo directamente las células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas tales como células iPS o ESC a condiciones de cultivo adecuadas para la diferenciación de linaje celular específico.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes. El método se realiza (a) cultivando las células madre pluripotentes según el método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado de la invención, para obtener de ese modo células madre indiferenciadas y expandidas; y (b) sometiendo las células madre indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje,

(i) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar células estromales mesenquimatosas comprende aumentar los intervalos entre cambios de medio hasta 3-5 días, y después de 9-10 días retirar físicamente las células de aspecto de fibroblasto en forma de huso;

(ii) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar neuronas dopaminérgicas (DA) comprende cultivar de manera conjunta dichas células madre con las líneas celulares estromales de ratón PA6 o MS5, o con una combinación de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12), pleiotrofina (PTN), factor 2 de crecimiento similar a la insulina (IGF2) y efrina B1 (EFNB1);

(iii) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar neuronas de dopamina mesencefálicas (mesDA) comprende modificar genéticamente dichas células madre para expresar el factor de transcripción Lmx1a;

(iv) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar epitelio pulmonar (neumocitos de tipo II) comprende cultivar dichas células madre en presencia de un medio condicionado recogido de una línea celular de neumocitos;

(v) en el que la diferenciación de dichas células para dar células neuronales comprende cultivar dichas células madre durante 5 días en presencia de un medio de reemplazo de suero complementado con inhibidor de TGF-β y nogina, a continuación de lo cual las células se cultivan con cantidades crecientes de medio N2 en presencia de nogina 500 ng/ml,

generando de ese modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

A continuación se presentan ejemplos no limitativos 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 positivas para CD73 y negativas para SSEA-4 a partir de hESC aumentando mecánicamente la fracción de células diferenciadas similares a fibroblastos formadas en cultivos de hESC, esencialmente tal como se describe en Trivedi P y Hematti P. Exp Hematol. 2008, 36(3):350-9. Brevemente, para inducir la diferenciación de hESC, los intervalos entre cambios de medio se aumentan hasta 3-5 días, y las células en la periferia de las colonias de ESC se convierten en células de aspecto de fibroblasto en forma de huso. Después de 9-10 días en estas condiciones, cuando aproximadamente el 40-50% de las células en el cultivo adquieren el aspecto de fibroblasto, las porciones indiferenciadas de colonias de ESC se eliminan físicamente y las células diferenciadas restantes se someten a pase a nuevas placas de cultivo en las mismas condiciones.

Para inducir la diferenciación de hESC para dar neuronas dopaminérgicas (DA), las células pueden cultivarse de manera conjunta 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 2 de crecimiento similar a la insulina (IGF2) y efrina B1 (EFNB1) esencialmente tal 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 mesencefálicas (mesDA), las hESC pueden modificarse genéticamente para expresar el factor de transcripción Lmx1a (por ejemplo, utilizando un vector lentiviral con el promotor de PGK y Lmx1a) esencialmente tal como se describe en Friling S., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2009, 106: 7613-7618.

Para generar epitelio pulmonar (neumocitos de tipo II) a partir de hESC, las ESC pueden cultivarse en presencia de un medio de cultivo celular comercialmente disponible (Small Airway Growth Medium; Cambrex, College Park, MD), o alternativamente, en presencia de un medio condicionado recogido de una línea celular de neumocitos, (por ejemplo, la línea de células de adenocarcinoma pulmonar humano A549) tal como se describe en Rippon HJ., *et al.*, *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5: 717-722.

Para inducir la diferenciación de células iPS humanas o hESC para dar células neuronales, las células madre pluripotentes pueden cultivarse durante aproximadamente 5 días en presencia de un medio de reemplazo de suero complementado con inhibidor de TGF- $\beta$  (SB431542, Tocris; por ejemplo, 10 nM) y nogina (R&D; por ejemplo, 500 ng/ml), a continuación de lo cual las células se cultivan con cantidades crecientes (por ejemplo, el 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 tal como se describe en Chambers SM., *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2009, 27: 275-280.

Además de los cultivos primarios específicos de linaje, los EB de la divulgación pueden utilizarse para generar líneas celulares específicas de linaje que son capaces de una expansión ilimitada en cultivo.

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

Se apreciará que dado que las células específicas de linaje o líneas celulares obtenidas según las enseñanzas de la invención se desarrollan por procesos de diferenciación similares a los que se producen de manera natural en el embrión humano, pueden utilizarse además para la terapia a base de células humanas y la regeneración de tejidos.

Por tanto, la divulgación prevé la utilización de las células específicas de linaje expandidas y/o diferenciadas o líneas celulares de algunas para tratar un trastorno que requiere terapia de reemplazo celular.

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

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

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

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

Las células específicas de linaje de algunos aspectos de la divulgación pueden utilizarse para examinar factores (tales como fármacos de molécula pequeña, péptidos, polinucleótidos, y similares) o condiciones (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a la diferenciación del precursor de linaje a células diferenciadas terminalmente. Por ejemplo, pueden someterse a prueba sustancias, toxinas o posibles factores de diferenciación que afectan al crecimiento mediante su adición al medio de cultivo.

Tal como se utiliza en el presente documento el término “aproximadamente” se refiere a  $\pm$  el 10%.

Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye pero no se limita a”.

El término “que consiste en” significa “que incluye y limitado a”.

El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir componentes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los componentes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalos. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalos es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha dado a conocer específicamente todos los subintervalos posibles, así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que ha dado a conocer subintervalos específicamente tal 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.

Cuando se indica un intervalo numérico en el presente documento, pretende incluir cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases “que oscila/oscila entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que oscila/oscila de” un primer número indicado “a” un segundo número indicado se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y pretenden incluir los números indicados primero y segundo y todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, que incluye, pero sin limitarse a, las maneras, medios, técnicas y procedimientos o bien conocidos o bien fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “tratar” incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de un estado, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de un estado o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de un estado.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que se describen por claridad en el contexto de realizaciones independientes, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que se describen por brevedad en el contexto de una sola realización, pueden también proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no sea operativa sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento y tal como se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de manera no limitativa.

En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook *et al.*, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (Eds.) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes estadounidenses 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 & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (Eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen ampliamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 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). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo se conocen bien en la técnica y se proporcionan por comodidad del lector.

### Materiales generales y métodos experimentales

#### *Líneas celulares*

*Cultivo de células iPS* - Se cultivaron líneas de células madre pluripotentes inducidas (iPS) J1.2-3 e iF4 [Park *et al.*, 2008] derivadas de fibroblasto de prepucio y fibroblastos adultos respectivamente, con fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (MEF) tal como se describió anteriormente [Park *et al.*, 2008]. Las siguientes combinaciones de medios de cultivo se sometieron a prueba para determinar su capacidad para soportar el crecimiento de células iPS en cultivos unidos [bidimensionales (2D)]:

*Condiciones de cultivo en dos dimensiones:* Se cultivaron líneas celulares iPS humanas con MEF o sobre matrices sintéticas en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba. Se hicieron pases de las células cada de cuatro a seis días utilizando colagenasa tipo IV 1 mg/ml (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.) y se sembraron en placa a una densidad de  $1 \times 10^4$  -  $3 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$ .

#### *Medios utilizados para cultivos 2D -*

(i) medio de cultivo básico yF10 que consiste en el 85% de DMEM/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), el 15% de reemplazo de suero (SR; Invitrogen) inactivado, L-glutamina 2 mM,  $\alpha$ -mercaptoetanol 0,1 mM, disolución madre de aminoácidos no esenciales al 1% y factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) 10 ng/ml, todos de productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU., a menos que se indique lo contrario. Este medio de cultivo básico se utilizó como control y para el crecimiento rutinario de células iPS con MEF inactivado o fibroblastos de prepucio como capas alimentadoras en cultivos 2D.

(ii) mHA40/4 DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Israel), ITS al 1% [Invitrogen Corporation; la premezcla de ITS es una disolución madre X100 consiste en 1,25 mg de insulina, 1,25 mg de transferrina y 1,25 mg de ácido de selenio], TGF $\beta_3$  2 ng/ml (de R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation), ácido ascórbico 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma, Israel), bFGF - 10 ng (Invitrogen corporation), albúmina sérica humana - 0,5% (Sigma, n.º de catálogo A1653), bicarbonato de Na (7,5%) (Biological Industries, Israel), mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation).

(iii) HA75 DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Israel), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation), ácido ascórbico 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma), bFGF - 10 ng (Invitrogen corporation), TGF $\beta_3$  2 ng/ml (R&D Systems Minneapolis MN, EE.UU.), SR3 (reemplazo de suero) - 1% (Sigma, Israel), mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation).

(iv) HA76 DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), ITS al 1% (Invitrogen corporation), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation), ácido ascórbico 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma, Israel), bFGF - 100 ng (Invitrogen corporation), TGF $\beta_3$  2 ng/ml (R&D Systems Minneapolis, MN, EE.UU.), suero de albúmina sérica humana - 1% (Sigma, n.º de catálogo A1653), bicarbonato de Na (7,5%) (Biological Industries, Israel), mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation).

(v) HA77 DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Israel, Sigma Israel), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation, Sigma, Israel), ácido ascórbico 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma, Israel), bFGF - 100 ng (Invitrogen corporation), bicarbonato de sodio (7,5%) (Biological Industries, Israel), SR3 - 1% (Sigma), mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation, Sigma, Israel). Debe indicarse que el HA77 DMEM/F12 (94%) también puede utilizarse sin bicarbonato de Na en absoluto y sin embargo soportar el cultivo de células madre pluripotentes (por ejemplo, hESC e iPSC) en un estado indiferenciado, pluripotente y proliferativo durante al menos 10 pases.

(vi) HA78 DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Israel), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation), ácido ascórbico 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma, Israel), bFGF - 10 ng/ml (Invitrogen corporation), TGF $\beta_3$  2 ng/ml (R&D Systems Minneapolis MN,

EE.UU.), SR3™ - 1% (Sigma, Israel), bicarbonato de Na (7,5%) (Biological Industries, Israel), mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation).

5 (v) HA74/1 DMEM/F12 (94%) (Biological Industries, Israel), ITS al 1% (Invitrogen corporation), L-glutamina 2 mM (Invitrogen corporation), ácido ascórbico 500 µg/ml (Sigma, Israel), bFGF - 50 ng/ml (Invitrogen corporation), TGFβ<sub>3</sub> 2 ng/ml (R&D Systems Minneapolis, MN, EE.UU.) albúmina sérica humana - 0,5% (Sigma, Israel, n.º de catálogo A1653), bicarbonato de Na (7,5%) (Biological Industries, Israel), mezcla de lípidos definida al 1% (Invitrogen corporation).

10 Debe indicarse que cuando se utilizó albúmina humana recombinante (SIGMA, n.º de catálogo A7223) en lugar de albúmina sérica humana (SIGMA, n.º de catálogo A1653) en los medios de cultivo mHA40/4, HA76, HA74/1, se encontró que estos medios de cultivo soportan el crecimiento de células iPS en un estado indiferenciado y pluripotente durante un período prolongado de cultivo. Por tanto, estos resultados demuestran que puede utilizarse albúmina humana recombinante en lugar de albúmina sérica humana en los medios de cultivo de algunas realizaciones de la invención y proporcionar de ese modo condiciones sin xenógenos definidas.

15 *Condiciones de cultivo en sistemas de cultivo tridimensionales (cultivo en suspensión): Medios utilizados para cultivos en suspensión -*

20 (i) Medio CM100Fp que consiste en el medio de cultivo básico (medio de cultivo básico yF10) complementado con quimera de IL6RIL6 100 pg/ml. Se produjo IL6RIL6 de 85 Kda y se purificó tal como se describe y fue donado por InterPharm, grupo Merck-Serono (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).

25 (ii) Medio CM100F que consiste en el medio de cultivo básico (medio de cultivo básico yF10) complementado con quimera de IL6RIL6 100 ng/ml. Se produjo IL6RIL6 de 85 Kda y se purificó tal como se describe y fue donado por InterPharm, grupo Merck-Serono (Nes-Ziona, Israel y Ginebra, Suiza).

30 (iii) Medio básico yF100 (medio de cultivo básico yF10) en el que se utilizó bFGF 100 ng/ml en lugar de bFGF 10 ng/ml. Se encontró que este medio soporta cultivo en suspensión de hESC con la misma eficiencia que CM100F.

(iv) El medio yFL3 consiste en el medio de cultivo básico yF10 con bFGF 4 ng/ml en lugar de bFGF 10 ng/ml y complementado con 3000 unidades/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF). Debe indicarse que se cultivaron células iPS con el medio yFL3 que comprendía bFGF 4 o 10 ng/ml con la misma eficiencia.

35 (v) El medio HA13(a) modificado consiste en DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 500 µg/ml, bFGF - 4 ng y SR3 - 1%. Se encontró que soporta iPSC en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales.

40 (vi) El medio HA13(b) modificado consiste en DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 500 µg/ml, bFGF - 4 ng, SR3 - 1% y una mezcla de lípidos (1%). Se encontró que soporta iPSC en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales.

(vii) El medio HA13(c) modificado consiste en DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 50 µg/ml, bFGF - 4 ng y SR3 - 1%. Se encontró que soporta iPSC en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales.

45 (viii) El medio HA13(d) modificado consiste en DMEM/F12 (95%), L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 50 µg/ml, bFGF - 4 ng, SR3 - 1% y una mezcla de lípidos (1%). Se encontró que soporta iPSC en sistemas de cultivo bidimensionales y tridimensionales.

50 *Cultivo en cultivos en suspensión estática (tridimensionales) -* Para iniciar cultivos en suspensión, las células iPS se retiraron de su placa de cultivo utilizando colagenasa tipo IV 1,5 mg/ml (Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE.UU.), además se rompieron en pequeños agregados utilizando puntas de pipeta Gilson de 200 µl, y se cultivaron en suspensión en placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania) a una densidad celular de 1 x 10<sup>6</sup> - 5 x 10<sup>6</sup> células/placa (5-8 ml de medio en placas de 58 mm). Las placas de Petri se mantuvieron estáticas en una incubadora a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando se requería, se retiraron agregados en diferenciación del cultivo durante los tres primeros pases, mientras que las células se adaptaron a las nuevas condiciones de cultivo. El medio en el cultivo en suspensión se cambió diariamente, y se hicieron pases de las células cada 5-7 días, o bien por corte manual de agregados utilizando agujas de 27 g (solo en los pases 1-3) o por pipeteado suave utilizando puntas de pipeta Gilson de 200 ml. Alternativamente, se hicieron pases de las células utilizando tripsina-EDTA (0,25%, Biological Industries, Beit Haemek, Israel) combinado con un tratamiento de una hora con un inhibidor de 10 M ROCK (EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA, EE.UU.) antes de la incubación con tripsina. Para calcular el tiempo de duplicación de las células, se contaron las células iPS J1.2-3 e iF4 y se hicieron crecer en suspensión durante 8 días con medios de cultivo CM100F o CM100Fp. Las células se contaron cada dos días. Se calculó el tiempo medio de duplicación de cuatro repeticiones biológicas.

65 *Cultivo en frascos giratorios (tridimensional) -* Se cultivaron agregados de células iPS en placas de Petri estáticas

durante al menos un pase, y luego se transfirieron a frascos giratorios de 250 ml (Cell Spin 250 o 100, Integra BioSciences) en los medios de cultivo sometidos a prueba, se agitaron de manera continua a 90 revoluciones por minuto (rpm) utilizando una placa magnética, y se colocaron en una incubadora del 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio se cambió cada dos días. Cada 5-7 días los agregados se dividieron con una razón de 1:2.

5 *Inmunofluorescencia de células cultivadas en sistemas de cultivo 2-D o 3-D* - Para la inmunotinción fluorescente, se fijaron iPS indiferenciadas hechas crecer en sistemas de cultivo 2-D o 3-D en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba o vueltos a cultivar en MEF con paraformaldehído al 4% y se expusieron los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Se utilizaron anticuerpos conjugados con Cys 3 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.) como anticuerpos secundarios (1:200). Los anticuerpos primarios (1:50) incluyen SSEA 1, 3 y 4 (Hybridoma Bank, Iowa, EE.UU.), TRA1-60 y TRA1-81 (Chemicon International, Temecula CA, EE.UU.) y Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.).

15 *Inmunohistoquímica de células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2-D o 3-D* - Después de la desparafinización, las secciones tisulares se tiñeron utilizando el kit de tinción Dako LSAB+ para determinar la presencia de marcadores de ectodermo ( $\beta$ -3-tubulina 1:500, Chemicon International, Temecula CA EE.UU.), mesodermo (CD31 1:20) y endodermo ( $\beta$ -fetoproteína 1:20) (ambos de DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Como controles, se realizaron tanto tinción de isotipo de IgG como de anticuerpos secundarios. El anticuerpo secundario se conjugó con peroxidasa.

20 *Análisis de cariotipo de células cultivadas en sistemas de cultivo 2-D o 3-D* - El análisis de cariotipo (bandeo G) se realizó en al menos 10 células de cada muestra, dos muestras por prueba, tal como se describió anteriormente [Amit *et al.*, 2003]. Los cariotipos se analizaron y notificaron de acuerdo con el "Sistema internacional para la nomenclatura citogenética humana" (ISCN).

25 *Formación de cuerpo embrioides (EB) de células cultivadas en sistemas de cultivo 2-D o 3-D* - Para la formación de EB, se hicieron pases de iPS tal como se describió y se transfirieron a placas de Petri de 58 mm (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Los EB se hicieron crecer en medio que consistía en el 80% de DMEM/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), complementado con el 10% de suero bovino fetal (FBS) (HyClone, Utah, EE.UU.), el 10% de reemplazo de suero (SR; Invitrogen) inactivado, L glutamina 2 mM,  $\alpha$ -mercaptoetanol 0,1 mM y disolución madre de aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE.UU.). Se recogieron EB de 30 10-14 días para el aislamiento del ARN y el 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 incrustaron en parafina. Se desparafinaron secciones de 1-5  $\mu$ m y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E).

35 *RT-PCR de células cultivadas en sistemas de cultivo 2-D o 3-D* - Se aisló ARN total a partir de iPS hechas crecer durante 10, 15 y 20 pases en los sistemas de cultivo bidimensionales o tridimensionales sin xenógenos en los medios sometidos a prueba y a partir de EB de 10-14 días (formados a partir de células cultivadas en 2-D, 3-D en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba o células cultivadas en MEF) utilizando Tri-Reagent (Sigma, St. Louis MO, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc a partir de 1  $\mu$ g de ARN total utilizando transcriptasa inversa de MMLV ARNasa H minus (Promega, Madison WI, EE.UU.). La reacción PCR incluyó desnaturalización durante 5 minutos a 94°C seguida de ciclos repetidos de 94°C durante 30 segundos, temperatura de hibridación tal como se indica en la tabla 1, a continuación en el presente documento, durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Los cebadores de PCR y las condiciones de reacción se describen en la tabla 1, a continuación en el presente documento. Los productos de la PCR se fraccionaron por tamaño usando electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se usaron marcadores de ADN para 30 confirmar el tamaño de los fragmentos resultantes. Para PCR cuantitativa (QPCR), la densitometría de genes sometidos a prueba se normalizó a GAPDH. Se realizaron tres repeticiones para cada línea sometida a prueba.

Tabla 1

50

*Condiciones y cebadores de RT-PCR*

Producto génico (Número de registro)	Cebadores directos (D) e inversos (I) (SEQ ID NO:) proporcionados en una dirección 5'→3'	Condición de reacción	Tamaño (pb)
Oct-4 (S81255)	D: 5'-GAGACAATGAGAACCTTCAGGA (SEQ ID NO:1) I: 5'-TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA (SEQ ID NO:2)	30 ciclos a 60°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	219
Albúmina (AF542069)	D: 5'-TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG (SEQ ID NO:3) I: 5'-AAGGCAAGTCAGCAGCCATCTCAT (SEQ ID NO:4)	35 ciclos a 60°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	302
$\alpha$ -fetoproteína (BC027881)	D: 5'-GCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAA (SEQ ID NO:5) I: 5'-TCCCTGAAGAAAATTGGTTAAAAT (SEQ ID NO:6)	30 ciclos a 60°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	216

Producto génico (Número de registro)	Cebadores directos (D) e inversos (I) (SEQ ID NO:) proporcionados en una dirección 5'→3'	Condición de reacción	Tamaño (pb)
NF-68KD (NFH) (AY156690; X15307; X15309)	D: 5'-GAGTGAATGGCAGGATACCTA (SEQ ID NO:7) I: 5'-TTTCCTCTCCTTCTTACCTTC (SEQ ID NO:8)	30 ciclos a 60°C en MgCl <sub>2</sub> 2 mM	473
α-actina cardiaca (NM_005159)	D: 5'-GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC (SEQ ID NO:9) I: 5'-AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA (SEQ ID NO:10)	35 ciclos a 65°C en MgCl <sub>2</sub> 2 mM	486
β-Actina (NM_001101)	D: 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG (SEQ ID NO:11) I: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC (SEQ ID NO:12)	35 ciclos a 62°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	838
Sox2 (Z31560)	D: 5' CCCCCGGCGCAATAGCA (SEQ ID NO:13) I: 5' TCGGCGCCGGGAGATACAT (SEQ ID NO:14)	35 ciclos a 60°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	448
Rex1 (AF450454)	D: 5' GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA (SEQ ID NO:15) I: 5' CAGCATCTAAACAGCTCGCAGAAT (SEQ ID NO:16)	35 ciclos a 56°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	306
CX43 (NM_000165)	D: 5' TACCATGCGACCAGTGGTGCCT (SEQ ID NO:17) I: 5' GAATTCTGGTTATCATCGGGGAA (SEQ ID NO:18)	35 ciclos a 61°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	295
FGF4 (NM_002007)	D: 5' CTACAACGCCTACGAGTCCTACA (SEQ ID NO:19) I: 5' GTTGACCAGAAAAGTCAGAGTTG (SEQ ID NO:20)	35 ciclos a 52°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	370
Glucagón (X03991)	D: 5' CTCAGTGATCCTGATCAGATGAACG (SEQ ID NO:21) I: 5' AGTCCCTGGCGGCAAGATTATCAAG (SEQ ID NO:22)	35 ciclos a 65°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	370
β-globulina (V00499)	D: 5' ACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGC (SEQ ID NO:23) I: 5' TAGCCACACCAGCCACCACTTCTG (SEQ ID NO:24)	35 ciclos a 65°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	410
Flk1 (NM_002253)	D: 5' ATGCACGGCATCTGGGAATC (SEQ ID NO:25) I: 5' GCTACTGTCTGCAAGTTGCTGTC (SEQ ID NO:26)	35 ciclos a 65°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	537
AC133 (NM_006017)	D: 5' CAGTCTGACCAGCGTAAAA (SEQ ID NO:27) I: 5' GGCCATCCAAATCTGTCTA (SEQ ID NO:28)	35 ciclos a 65°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	200
Nanog (NG_004095)	D: 5' ACTAACATGAGTGTGGATCC (SEQ ID NO:29) I: 5' TCATCTTACACGTTCTCAG (SEQ ID NO:30)	35 ciclos a 61°C en MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM	800

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

5 *Formación de teratomas a partir de células cultivadas en 2-D* — Se recogieron células iPS (iF4 y J1.2-3) de 4-6 pocillos de una placa de 6 pocillos (cada pocillo tiene un área de superficie total de 10 cm e incluye 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células) y se inyectaron en los músculos de las extremidades traseras de un ratón de cuatro semanas de edad con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) beis macho. Diez semanas después de la inyección, se recogieron los teratomas resultantes y se prepararon para el análisis histológico utilizando el mismo método mencionado para los EB.

10 *Formación de teratomas a partir de células cultivadas en suspensión (sistemas de cultivo 3-D)* - Se recogieron células iPS (iF4 y J1.2-3) a partir de cuatro a seis placas de 58 mm (a partir de cultivo en suspensión, cada placa incluye 1,5-2,5 x 10<sup>6</sup> células) y se inyectaron en los músculos de las extremidades traseras de ratones de cuatro semanas de edad con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) beis macho. Diez semanas después de la inyección, se recogieron los teratomas resultantes y se prepararon para el análisis histológico utilizando el mismo método mencionado para los EB.

20 Ejemplo 1

*Las células madre pluripotentes inducidas pueden mantenerse en un estado indiferenciado y pluripotente cuando se cultivan en sistemas de cultivo 2-d sin xenógenos y sin alimentadoras*

25 Los experimentos descritos a continuación se realizaron utilizando células iPS que se cultivaron según los métodos,

condiciones de cultivo y medios de cultivo descritos en la sección “Materiales generales y métodos experimentales” anteriormente.

#### *Resultados experimentales*

5 *Las células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2D utilizando medio sin xenógenos y sin suero y sistema sin capas de soporte presentan morfología indiferenciada y características típicas de iPS* - Varias combinaciones de medios posibles (HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40/4) se sometieron a prueba para determinar la capacidad para soportar cultivos de células iPS sin capa alimentadora y sin xenógenos (desprovistos de cualquier contaminante animal). Todos los medios sometidos a prueba (es decir, HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40/4) se encontraron adecuados para soportar cultivos de iPS durante al menos 15 pases. Utilizando los medios sometidos a prueba en condiciones sin capa alimentadora utilizando una matriz sintética Matrigel™, se cultivaron células iPS de manera continua durante al menos 15 pases manteniendo al mismo tiempo sus rasgos de iPS incluyendo proliferación indiferenciada, estabilidad de cariotipo y pluripotencia (datos no mostrados). No pudieron observarse diferencias morfológicas entre las colonias hechas crecer en los sistemas de cultivo sometidos a prueba y las hechas crecer en MEF en presencia del medio yF10, correspondientemente, los rasgos morfológicos permanecieron sin cambios a nivel unicelular, haciendo que las células sean pequeñas y redondas, mostrando alta proporción de núcleo con respecto a citoplasma, con una notable presencia de uno a tres nucleolos y espaciamiento típico entre las células (datos no mostrados). Similar a células cultivadas en MEF en presencia de un medio de control (medio de cultivo básico de yF10), se hicieron pases rutinariamente de las células iPS hechas crecer en una matriz sintética Matrigel™ (BD Bioscience) en presencia de todos los medios sometidos a prueba (HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40/4) cada de cinco a siete días, con la misma proporción de 1 a 2, 2 a 3 o 1 a 3, indicando un tiempo de duplicación de la población similar al de las iPS hechas crecer en MEF con el medio de control. Se hicieron pases de las células iPS a una misma eficiencia de siembra de aproximadamente 1 millón de células por 10 cm<sup>2</sup>, con la misma tasa de viabilidad de más del 90%. Utilizando reemplazo de suero (SR) al 15% y DMSO al 10%, las células iPS se congelaron y descongelaron con éxito.

30 *Células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2D en medio sin componentes animales y sistemas sin capas de soporte expresan marcadores de pluripotencia* - Varios marcadores de superficie típicos de células iPS y ESC indiferenciadas de primate se examinaron utilizando tinción inmunofluorescente [tal como se describe en Thomson *et al.*, 1995, 1996, 1998]. Se encontró que células cultivadas con los medios sometidos a prueba durante al menos 15 eran fuertemente positivas a los marcadores de superficie SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 y Oct 4 (datos no mostrados). Al igual que en otras ESC de primates, la tinción con SSEA3 fue débil y la tinción para SSEA1 fue negativa (datos no mostrados).

35 *Células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2D en medios sin componentes animales y sistemas sin capas de soporte forman EB in vitro y teratomas in vivo* - El potencial de desarrollo de las células después de un cultivo prolongado en las condiciones sometidas a prueba se examinó *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrioides (EB). Las células iPS cultivadas en sistemas de cultivo sin capas alimentadoras en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba (HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40/4) formaron EB similares a los creados por ESC hechas crecer en MEF (datos no mostrados). Por ejemplo, la capacidad de las células iPS para formar EB se mostró después de 28 pases en el medio HA40/4 y 20 pases en el medio HA77. Dentro de estos EB, las células iPS se diferenciaron en tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias [Itskovitz-eldor *et al.*, 2000]. Tras su inyección a ratones beis SCID, las células iPS cultivadas en las condiciones sometidas a prueba formaron teratomas que contenían tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias (datos no mostrados), demostrando de ese modo su plena pluripotencia. Por ejemplo, la capacidad de las células iPS para formar teratomas se mostró después de 31 pases en el medio mHA40/4; después de 24 pases en el medio HA74/1; y después de 16 pases en el medio HA77.

#### Ejemplo 2

50 *Las células madre pluripotentes inducidas pueden mantenerse en un estado indiferenciado y pluripotente cuando se cultivan en capas alimentadoras sin xenógenos en presencia de medio sin xenógenos y sin suero*

55 Los experimentos descritos a continuación en el presente documento se realizaron utilizando células iPS que se cultivaron según los métodos, condiciones de cultivo y medios de cultivo descritos en la sección “Materiales generales y métodos experimentales” anteriormente.

#### *Resultados experimentales*

60 *Las células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2D utilizando medio sin xenógenos, sin suero y capa de células alimentadoras sin xenógenos presentan morfología indiferenciada y características típicas de iPS* - Varias combinaciones de medios posibles (HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40/4) se sometieron a prueba para determinar su capacidad de soportar cultivos sin xenógenos (desprovistos de cualquier contaminante animal) de iPS utilizando fibroblasto de prepucio como capas de células alimentadoras. Todos los medios sometidos a prueba se encontraron adecuados para soportar cultivos de iPS. Utilizando los medios sometidos a prueba en condiciones sin xenógenos con fibroblastos de prepucio como capa de soporte, se cultivaron células iPS de manera continua durante

al menos 22 pases manteniendo al mismo tiempo sus rasgos de iPS incluyendo la proliferación indiferenciada (figuras 1A-C y datos no mostrados), estabilidad de cariotipo y pluripotencia. No pudieron observarse diferencias morfológicas entre colonias hechas crecer en los sistemas de cultivo sometidos a prueba y las hechas crecer en MEF en presencia del medio de control yF10, correspondientemente, los rasgos morfológicos permanecieron sin cambios a nivel unicelular, haciendo que las células sean pequeñas y redondas, presentando alta proporción de núcleos con respecto a citoplasma, con una notable presencia de uno a tres nucleolos y espaciamiento típico entre las células (datos no mostrados). Similar a las células hechas crecer en MEF, se hicieron pases rutinariamente de las células iPS cultivadas en células alimentadoras de fibroblasto de prepucio en presencia de todos los medios de cultivo sometidos a prueba (HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40\4) cada de cinco a siete días, con la misma proporción de 1 a 2, 2 a 3 o 1 a 3, indicando un tiempo de duplicación de la población similar a las iPS hechas crecer en MEF en presencia de un medio yF10 de control. Se hicieron pases de las células iPS a una misma eficiencia de siembra de aproximadamente 1 millón de células por 10 cm<sup>2</sup>, con la misma tasa de viabilidad de más del 90%. Utilizando reemplazo de suero (SR) al 15% y DMSO al 10%, las células iPS se congelaron y descongelaron con éxito.

*Células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2D en medio sin componentes animales y capa de soporte sin xenógenos expresan marcadores de pluripotencia* - Varios marcadores de superficie típicos de células iPS indiferenciadas de primate se examinaron utilizando tinción inmunofluorescente [tal como se describe en Thomson *et al.*, 1995, 1996, 1998]. Se encontró que las células cultivadas con los medios sometidos a prueba durante al menos 15 pases eran fuertemente positivas a marcadores de superficie SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 y Oct 4 (figuras 2A-C). Al igual que en otras ESC de primates, la tinción con SSEA3 fue débil y la tinción para SSEA1 fue negativa (datos no mostrados).

*Células iPS cultivadas en sistemas de cultivo 2D en medio sin componentes animales y capas alimentadoras sin xenógenos forman EB in vitro y teratomas in vivo* - El potencial de desarrollo de las células después de un cultivo prolongado en las condiciones sometidas a prueba se examinó *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrioides (EB). Las células iPS cultivadas en capas de células alimentadoras sin xenógenos (fibroblastos de prepucio) en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba (HA74/1, HA75, HA76, HA77, HA78, HA40\4) formaron EB similares a los creados por ESC hechas crecer en MEF en presencia del medio de control yF10 (datos no mostrados). Dentro de estos EB, las células iPS se diferenciaron en tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias [Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000]. Tras su inyección en ratones beis SCID, las células iPS cultivadas en las condiciones sometidas a prueba forman teratomas que contenían tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias (datos no mostrados), demostrando de ese modo su plena pluripotencia.

### Ejemplo de referencia 3

*Derivación de una línea de células madre embrionarias en el medio de cultivo sin xenógenos de la invención*

Después de la digestión de la zona pelúcida mediante la disolución ácida de Tyrode (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), se colocaron blastocistos completos sobre fibroblastos de prepucio humanos inactivados mitóticamente (HFF) en presencia del medio HA40/4, excepto que el medio no contenía bicarbonato sódico. Inicialmente, se hicieron pases de las células mecánicamente utilizando jeringas de insulina (BD plastipak, n.º de catálogo 300013) y después de 4 pases se hicieron pases de las células cada de cuatro a seis días utilizando colagenasa tipo IV 1 mg/ml (productos de Gibco Invitrogen corporation, San Diego, CA, EE.UU.). La línea ESC humana resultante se designó "WC1".

### Ejemplo 4

*Las células madre pluripotentes inducidas pueden mantenerse en un estado indiferenciado y pluripotente en cultivos en suspensión estática*

El cultivo de células iPS en suspensión presenta ventajas significativas con respecto a cultivos convencionales, particularmente cuando se trata de obtener grandes cantidades de células para el trasplante celular y de tejido.

Los experimentos descritos a continuación en el presente documento se realizaron utilizando células iPS que se cultivaron según los métodos, condiciones de cultivo y medios de cultivo descritos en la sección "Materiales generales y métodos experimentales" anteriormente.

### *Resultados experimentales*

*Las células iPS pueden mantenerse en un estado indiferenciado en cultivos en suspensión* - Las células iPS (las líneas J1.2-3 e iF4) que se hicieron crecer con MEF o en condiciones sin capas alimentadoras [Amit *et al.*, 2004], se colocaron en cultivos en suspensión. Después de 24 horas en cultivo en suspensión con el medio de cultivo sometido a prueba CM100F, CM100Fp, yFL3 (que comprende bFGF 4 ng/ml o 10 ng/ml y complementado con 3000 unidades/ml de LIF), o yF100, las células iPS crearon agregados esferoides o estructuras en forma de disco que se mantuvieron durante al menos 20 pases (figuras 3A-C y datos no mostrados). El examen histológico de las iPS que se cultivaron en suspensión durante al menos 10 pases reveló una población homogénea de células pequeñas con núcleos grandes. Los esferoides crecieron y se dividieron mecánicamente cada 5-7 días manteniendo su morfología, permitiendo la expansión de los cultivos en suspensión. Alternativamente, utilizando tratamiento con inhibidor de ROCK y tripsina-

EDTA, pudieron disociarse células suspendidas para dar células individuales y aún formarse esferoides de la misma morfología y rasgos, permitiendo de ese modo una expansión celular eficiente. Algunos cultivos se llevaron a cabo durante más de 50 pases (un año de cultivo continuo). Las dos líneas de células iPS diferentes, J1.2-3 e iF4, que se cultivaron en suspensión tal como se describe en el presente documento con los medios de cultivo sometidos a prueba, mostraron comportamiento y morfología esferoide e histología similares.

El medio yF100 (el medio de cultivo básico yF10 que incluye bFGF 100 ng/ml en lugar de 10 ng/ml), el CM100Fp y el yFL3 (el medio de cultivo básico yF10 que incluye bFGF 4 ng/ml en lugar de 10 ng/ml y complementado con 3000 unidades/ml de LIF) se encontró que soportan el crecimiento de ESC humanas en cultivo en suspensión en un estado proliferativo, indiferenciado y pluripotente.

*Las células iPS que se cultivaron en suspensión y se cultivaron de nuevo en sistemas de cultivo 2-D mantienen la morfología típica de colonias de células iPS* - Después de al menos 10 pases en suspensión, cuando se devolvieron al cultivo 2D con MEF o superficie de fibronectina, todos los agregados esferoides adheridos a los MEF o superficie de fibronectina y después de 24-48 horas demostraron morfología típica de colonias de células iPS, mostrando una alta proporción de núcleo con respecto a citoplasma con una notable presencia de uno a tres nucleolos y con un espaciado típico entre las células (figura 4).

*Las células iPS mantienen su fenotipo de células madre indiferenciadas mientras se cultivan en cultivos en suspensión (cultivos 3D)* - Se examinaron varios marcadores de superficie típicos de células iPS y ESC indiferenciadas de primate utilizando tinción inmunofluorescente [tal como se describe en Thomson *et al.*, 1998; Bhattacharya, *et al.* 2004; Kristensen *et al.*, 2005]. Se encontró que células iPS humanas que se cultivaron en suspensión con los medios de cultivo sometidos a prueba durante al menos 30 pases eran fuertemente positivas para SSEA4, TRA-1-60 y TRA-81 y el Oct4 (figuras 5A-C). Al igual que con otras ESC de primates [Thomson *et al.*, 1995 y 1996] y con ESC cultivadas con MEF, la tinción con SSEA3 fue débil y negativa para SSEA1 (datos no mostrados). La tinción de los marcadores de células madre se mantuvo alta cuando las células cultivadas en suspensión se devolvieron a cultivos 2D con MEF (datos no mostrados). Los análisis de RT-PCR mostraron que, de manera similar a las células cultivadas con MEF, las células iPS cultivadas en suspensión durante al menos 10 pases expresaron marcadores genéticos de pluripotencia [King *et al.*, 2006] incluyendo *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1* y *FGF4* (datos no mostrados). No se detectó diferencia significativa en la expresión génica de *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rx1* y *FGF4* entre células iPS cultivadas en suspensión, en comparación con células iPS cultivadas en MEF, ni con células iPS que se cultivaron de nuevo con MEF después de cultivo continuo en suspensión, similar a hESC en las mismas condiciones.

*Las células iPS que se cultivan en suspensión mantienen el cariotipo normal* - Se llevó a cabo análisis de cariotipo por bandeo de Giemsa en células después de 30 pases en suspensión, y se encontró que las células presentan un cariotipo normal 46,XY (datos no mostrados). Por tanto, el cariotipo del cultivo de células en suspensión permaneció estable.

*Las células iPS que se cultivan en suspensión mantienen su pluripotencia in vitro* - Tras una expansión prolongada en cultivos en suspensión con los medios de cultivo sometidos a prueba, las células iPS conservaron su capacidad de diferenciación pluripotente, tal como se demostró por la formación *in vitro* de EB. Cuando las células iPS que se cultivaron en suspensión durante más de 20 pases se transfirieron a un medio que contenía suero sin la adición de los factores de crecimiento, se observó formación de EB quísticos después de 7-10 días, de manera similar a los EB cavitados formados a partir de hESC después de 10 días en cultivo [Itskovitz *et al.*, 2000], y EB quísticos después de 14-20 días. Dentro de los EB formados a partir de las células iPS, hubo tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias típicas de diferenciación de células iPS (datos no mostrados).

Por ejemplo, la capacidad de células iPS para formar EB se demostró después de 22 pases en presencia del medio CM100p en un cultivo en suspensión; la capacidad de formar EB se demostró después de 23 pases en presencia del medio yF100 en un cultivo en suspensión; la capacidad de formar EB se demostró después de 8 pases en presencia del medio yFL3 en un cultivo en suspensión.

*Las células iPS que se cultivan en suspensión mantienen su pluripotencia in vivo* - La pluripotencia de las células iPS en suspensión se demostró además *in vivo* por la formación de teratomas. Se inyectaron células cultivadas en suspensión durante al menos 20 pases en ratones SCID beis, y 10 semanas después se formaron tumores (datos no mostrados). Dentro de estos teratomas, se observaron tejidos representativos de las tres capas germinales.

Por ejemplo, la capacidad de las células iPS para formar teratomas se demostró después de 20 pases en el CM100 en un cultivo en suspensión; y la capacidad de formar teratomas se mostró después de 10 pases en el yFL3 en un cultivo en suspensión.

#### Ejemplo 5

*Las células madre pluripotentes inducidas pueden mantenerse en un estado indiferenciado y pluripotente en cultivos en suspensión dinámica*

Los experimentos descritos a continuación en el presente documento se realizaron utilizando células iPS que se cultivaron según los métodos, condiciones de cultivo y medios de cultivo descritos en la sección “Materiales generales y métodos experimentales” anterior.

## 5 Resultados experimentales

Las células iPS que se cultivan en cultivos en suspensión con agitación mantienen su estado indiferenciado - Se cultivaron células iPS de la línea J1.2-3 en suspensión en frascos giratorios durante al menos un mes utilizando los medios de cultivo sometidos a prueba. Un examen después de un mes mostró que las características morfológicas de los agregados esferoides formados por las células se mantuvieron similares a las observadas cuando las células iPS se cultivan estáticamente en placas de Petri (datos no mostrados). Además, las células iPS expresaron fuertemente marcadores de hESC indiferenciadas tales como Oct-4, TRA-1-81, TRA-1-60 y SSEA4 (figuras 6A-D). Cuando se volvieron a cultivar en MEF, las células iPS en los agregados volvieron a unirse, formando de nuevo colonias típicas de células iPS (datos no mostrados). Se encontró que el cariotipo de las células cultivadas durante un mes en el frasco giratorio era normal (datos no mostrados).

Las células iPS que se cultivan en cultivos en suspensión dinámica mantienen un cariotipo normal - Las células iPS que se cultivaron durante 30 pases en cultivos en suspensión estática (en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba) y luego durante 3 pases en suspensión dinámica (agitación) (en presencia de los medios de cultivo sometidos a prueba) se encontró que presentan un cariotipo normal 46,XY. Por tanto, el cariotipo del cultivo de células iPS en suspensión permaneció estable.

Las células iPS que se cultivan en suspensión dinámica mantienen su pluripotencia *in vitro* - El potencial de desarrollo de las células iPS que se cultivaron en cultivos en suspensión dinámica se examinó *in vitro* mediante la formación de EB. Se cultivaron iPS en suspensión estática durante más de 20 pases, luego en suspensión dinámica durante al menos 10 pases adicionales, y luego se transfirieron a un medio que contenía suero sin la adición de los factores de crecimiento, y se observó la formación de EB quísticos después de 7-10 días, de manera similar a EB cavitados formados a partir de hESC después de 10 días en cultivo [Itskovitz *et al.*, 2000], y EB quísticos después de 14-20 días. Dentro de los EB formados a partir de células iPS se encontraron tipos celulares representativos de las tres capas germinales embrionarias típicas de la diferenciación de células iPS (datos no mostrados).

Las células iPS que se cultivan en suspensión dinámica mantienen su pluripotencia *in vivo* - La pluripotencia de células iPS cultivadas en suspensión dinámica demostrada *in vivo* por la formación de teratomas. Se cultivaron células en suspensión estática durante al menos 20 pases y luego en suspensión dinámica durante 10 pases adicionales y luego se inyectaron en ratones SCID beis. Después de 10 semanas de la inyección en los ratones se formaron tumores. Dentro de estos teratomas se observaron tejidos representativos de las tres capas germinales (datos no mostrados).

Este estudio presenta un novedoso enfoque para cultivar células iPS indiferenciadas utilizando o bien sistema de cultivo 2D definido o bien cultivos en suspensión. Los presentes inventores demuestran que, en estas condiciones, dos líneas de células iPS, una derivada de fibroblastos adultos y otra derivada de fibroblasto de prepucio, podrían hacerse crecer y expandirse a través de muchos pases manteniendo al mismo tiempo sus rasgos incluyendo pluripotencia y cariotipos estables. Cuando las células iPS se transfieren a suspensión en presencia de un medio de diferenciación (por ejemplo, DMEM/F12 complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, reemplazo de suero inactivo al 10%, L-glutamina 2 mM,  $\alpha$ -mercaptoetanol 0,1 mM y disolución madre de aminoácidos no esenciales al 1%), forman espontáneamente cuerpos embrioides (EB). Por otro lado, utilizando los sistemas de cultivo sometidos a prueba (por ejemplo, en presencia de los medios de cultivo CM100F, CM100Fp, yF100 o yFL3), las células iPS forman espontáneamente esferoides que consisten en células indiferenciadas.

Esta es la primera descripción de un método para la expansión continua de iPS indiferenciadas en cultivos en suspensión y agitación 3D, que podría aplicarse adecuadamente a la producción de células a gran escala.

Los inventores presentan por primera vez un sistema de cultivo en suspensión para la expansión de iPS indiferenciadas, basado en medio sin suero y factores de crecimiento definidos. Este sistema de cultivo en suspensión utiliza o bien placas de Petri, Erlenmeyer con agitación o bien frascos giratorios. Dos líneas de células iPS de piel adulta y fibroblasto de prepucio de recién nacido se cultivaron según el método novedoso de la invención como pequeños esferoides que mantienen todos los rasgos típicos de células ESC/iPS tras un cultivo prolongado de más de 25 pases (86 duplicaciones), incluyendo cariotipo estable y pluripotencia. Estos resultados demuestran que es posible cultivar células iPS en un medio definido sin capa alimentadora utilizando cultivo 3D.

Además, cuando se aplica a un sistema dinámico durante un mes, el número de agregados celulares de células iPS humanas aumentó en veces, manteniendo al mismo tiempo las características únicas de las células. Estos resultados hacen que el sistema de suspensión propuesto sea adecuado tanto para el cultivo rutinario de células iPS o hESC en 3D como para la producción en masa de células iPS y hESC para fines terapéuticos.

Las enseñanzas de la invención presentan sistemas de cultivo escalables, reproducibles y controlados. Estos resultados presentan un avance significativo hacia el objetivo final deseado de obtener un método facilitador para el

cultivo a gran escala de células iPS indiferenciadas y hESC necesarias para usos tanto clínicos como industriales.

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

- 5
- Bibliografía**
- (En el texto se citan referencias adicionales)
- 10 Amit, M., Shariki, K., Margulets, V., & Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder and serum-free culture system for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70, 837-845.
- Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J. 2003. *Biol Reprod.* 68(6): 2150-6. Human feeder layers for human embryonic stem cells.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 King, T.D., Gandy, J.C. & 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., & Nielsen, J.H. (2005). Cytokine signaling in embryonic stem cells. *APMIS.* 113, 756-772.
- 35 Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu 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.
- Ludwig TE., *et al.*, 2006 (*Nature Biotechnology*, 24: 185-7).
- 40 Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007, 25(10):1177-1181.
- 45 Okita K., *et al.*, 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-318.
- 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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. USA.* 92, 7844-7848.
- 65 Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Hearn, J.P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* 55, 254-259.

Yu, Y., Vodyanik MA., Smuga-Otto K., *et al.*, 2007. Science, 318, 1917-1920.

Yu J, *et al.*, 2009; Science. 2009, 324: 797-801.

5

**Lista de secuencias**

<110> Technion Research & Development Foundation Ltd.  
Amit, Michal  
10 Itskovitz-Eldor, Joseph

<120> MEDIOS DE CULTIVO, CULTIVOS CELULARES Y MÉTODOS DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES EN UN ESTADO INDIFERENCIADO

15 <130> 49545

<150> Documento US 61/272.860  
<151> 12-11-2009

20 <160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1  
**gagaacaatg agaaccttca gga** 23

35 <210> 2  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 2  
**ttctggcgcc ggttacagaa cca** 23

45 <210> 3  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 3  
**tgcttgaatg tgctgatgac aggg** 24

60 <210> 4  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

65 <400> 4

	<b>aaggcaagtc agcagccatc tcac</b>	<b>24</b>
	<210> 5 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5		
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
10		
	<400> 5 <b>gctggattgt ctgcaggatg gggaa</b>	<b>25</b>
	<210> 6 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15		
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
20		
	<400> 6 <b>tcccctgaag aaaattgggtt aaaat</b>	<b>25</b>
	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25		
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
30		
	<400> 7 <b>gagtgaaatg gcacgatacc ta</b>	<b>22</b>
35		
	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
45		
	<400> 8 <b>tttctctctcc ttcttcacct tc</b>	<b>22</b>
	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
55		
	<400> 9 <b>ggagtatatgg tgggtatggg tc</b>	<b>22</b>
	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 10		
5	<b>agtgggtgaca aaggagtagc ca</b>		22
	<210> 11		
	<211> 32		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 11		
15	<b>atctgggcacc acaccttcta caatgagctg cg</b>		32
	<210> 12		
	<211> 32		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
25	<400> 12		
	<b>cgtcatactc ctgcttgctg atccacatct gc</b>		32
	<210> 13		
30	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 13		
	<b>cccccggcgg caatagca</b>		18
40	<210> 14		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 14		
	<b>tcggcgccgg ggagatacat</b>		20
50	<210> 15		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 15		
60	<b>gcgtacgcaa attaaagtcc aga</b>		23
	<210> 16		
	<211> 25		

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 16	
	<b>cagcatccta aacagctcgc agaat</b>	<b>25</b>
10	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 17	
	<b>taccatgcga ccagtgggct gct</b>	<b>23</b>
20	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 18	
	<b>gaattctggg tatcatcggg gaa</b>	<b>23</b>
30	<210> 19	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
40	<400> 19	
	<b>ctacaacgcc tacgagtcct aca</b>	<b>23</b>
	<210> 20	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
50	<400> 20	
	<b>gttgaccag aaaagtcaga gttg</b>	<b>24</b>
	<210> 21	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 21	

	<b>ctcagtgatc ctgatcagat gaacg</b>	<b>25</b>
	<210> 22 <211> 25	
5	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
10	<400> 22 <b>agtccctggc ggcaagatta tcaag</b>	<b>25</b>
	<210> 23 <211> 25	
15	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
20	<400> 23 <b>acctgactcc tgaggagaag tctgc</b>	<b>25</b>
	<210> 24 <211> 25	
25	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
30	<400> 24 <b>tagccacacc agccaccact ttctg</b>	<b>25</b>
35	<210> 25 <211> 20	
	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 25 <b>atgcacggca tctgggaatc</b>	<b>20</b>
45	<210> 26 <211> 24	
	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 26 <b>gctactgtcc tgcaagttgc tgtc</b>	<b>24</b>
55	<210> 27 <211> 20	
60	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 27	
5	<b>cagtctgacc agcgtgaaaa</b>	20
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 28	
15	<b>ggccatccaa atctgtccta</b>	20
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
25	<400> 29	
	<b>actaacatga gtgtggatcc</b>	20
	<210> 30	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
35	<400> 30	
	<b>tcaccttcac acgtcttcag</b>	20
	<210> 31	
40	<211> 288	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 31	

ES 2 779 048 T3

Met Val Gly Val Gly Gly Gly Asp Val Glu Asp Val Thr Pro Arg Pro  
 1 5 10 15

Gly Gly Cys Gln Ile Ser Gly Arg Gly Ala Arg Gly Cys Asn Gly Ile  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ala Ala Trp Glu Ala Ala Leu Pro Arg Arg Arg Pro Arg  
 35 40 45

Arg His Pro Ser Val Asn Pro Arg Ser Arg Ala Ala Gly Ser Pro Arg  
 50 55 60

Thr Arg Gly Arg Arg Thr Glu Glu Arg Pro Ser Gly Ser Arg Leu Gly  
 65 70 75 80

Asp Arg Gly Arg Gly Arg Ala Leu Pro Gly Gly Arg Leu Gly Gly Arg  
 85 90 95

Gly Arg Gly Arg Ala Pro Glu Arg Val Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 100 105 110

Gly Thr Ala Ala Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala Arg Gly Ser Arg Pro  
 115 120 125

Gly Pro Ala Gly Thr Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys  
 145 150 155 160

Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile  
 165 170 175

His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His  
 180 185 190

Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys  
 195 200 205

Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu  
 210 215 220

Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu  
 225 230 235 240

Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp  
 245 250 255

Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr  
 260 265 270

Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser  
 275 280 285

- 5 <210> 32
- <211> 6774
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

ES 2 779 048 T3

<400> 32

cgccccaga aaaccgagc gagtagggg cggcgcgag gagggaggag aactgggggc	60
gcgggaggct ggtgggtgtg gggggtggag atgtagaaga tgtgacgccg cggcccggcg	120
ggtgccagat tagcggacgc ggtgcccgcg gttgcaacgg gatcccgggc gctgcagctt	180
gggaggcggc tctccccagg cggcgtccgc ggagacacc atccgtgaac cccagggtccc	240
gggccgccg ctcgccgcgc accaggggcc ggcggacaga agagcggccg agcggctcga	300
ggctggggga ccgcgggcgc ggccgcgcgc tgccgggcgg gaggtgggg ggccggggcc	360
ggggccgtgc cccggagcgg gtcggaggcc ggggccgggg ccgggggacg gcggtcccc	420
gcgcggctcc agcggctcgg ggatcccggc cgggccccgc agggaccatg gcagccggga	480
gcatcaccac gctgcccgcc ttgcccagg atggcggcag cggcgccttc ccgccggcc	540
actcaagga cccaagcgg ctgtactgca aaaacggggg cttcttctg cgcattccacc	600
ccgacggccg agttgacggg gtccgggaga agagcgacc tcacatcaag ctacaacttc	660
aagcagaaga gagaggagt gtgtctatca aaggagtgtg tgctaaccgt tacctggcta	720
tgaaggaaga tggaagatta ctggcttcta aatgtgttac ggatgagtgt ttctttttg	780
aacgattgga atctaataac tacaatactt accggccaag gaaatacacc agttgggatg	840
tggcactgaa acgaaactgg cagtataaac ttggatccaa aacaggacct gggcagaaag	900
ctatactttt tcttccaatg tctgctaaga gctgatttta atggccacat ctaattctcat	960
ttcacatgaa agaagaagta tattttagaa atttgtaaat gagagtaaaa gaaaataaat	1020
gtgtatagct cagtttgat aattggtaaa acaattttt atccagtagt aaaatatgta	1080
accattgtcc cagtaaagaa aaataacaaa agttgtaaaa tgtatattct cccttttata	1140
ttgcatctgc tgttaccag tgaagcttac ctgagcaat gatcttttc acgcatttgc	1200
tttattcgaa aagaggcttt taaaatgtgc atgttttagaa acaaaatttc ttcattgaaa	1260
tcatacat tagaaaatca cagtcagatg ttaaatcaat ccaaaatgct cactatttct	1320
tatgtcattc gttagtctac atgtttctaa acatataaat gtgaatttaa tcaattcctt	1380
tcatagtttt ataattctct ggcagttcct tatgatagag tttataaaac agtcctgtgt	1440
aaactgctgg aagttcttcc acagtcaggt caattttgtc aaacccttct ctgtaccat	1500
acagcagcag cctagcaact ctgctggtga tgggagttgt attttcagtc ttcgccagg	1560
cattgagatc catccactca catcttaagc attcttctg gcaaaaattt atggtgaatg	1620
aatatggctt tagggcgcag atgatataca tatctgactt cccaaaagct ccaggatttg	1680

# ES 2 779 048 T3

tgtgctgttg ccgaatactc aggacggacc tgaattctga ttttatacca gtctcttcaa	1740
aaacttctcg aaccgctgtg tctcctacgt aaaaaagag atgtacaaat caataataat	1800
tacactttta gaaactgtat catcaaagat tttcagttaa agtagcatta tgtaaaggct	1860
caaacatta ccctaacaaa gtaaagtttt caatacaaat tctttgcctt gtggatatca	1920
agaaatocca aatatTTTTt ttaccactgt aaattcaaga agcttttgaa atgctgaata	1980
tttctttggc tgctacttgg aggcttatct acctgtacat ttttggggtc agctcttttt	2040
aacttcttgc tgctcttttt cccaaaagggt aaaaatatag attgaaaagt taaaacattt	2100
tgcatggctg cagttccttt gtttcttgag ataagattcc aaagaactta gattcatttc	2160
ttcaacaccg aaatgctgga ggtgtttgat cagttttcaa gaaacttggga atataaataa	2220
ttttataatt caacaagggt tttcacattt tataaggttg atttttcaat taaatgcaaa	2280
tttggtggc aggattttta ttgccattaa catatttttg tggctgtttt ttctacacat	2340
ccagatggtc cctctaactg ggctttctct aattttgtga tgttctgtca ttgtctccca	2400
aagtatttag gagaagcctt ttaaaaagct gccttcctct accactttgc tggaaagctt	2460
cacaattgtc acagacaaag atttttgttc caatactcgt tttgcctcta tttttcttgt	2520
ttgtcaaata gtaaatagata tttgcccttg cagtaattct actggtgaaa aacatgcaaa	2580
gaagaggaag tcacagaaac atgtctcaat tcccatgtgc tgtgactgta gactgtctta	2640
ccatagactg tcttaccat cccctggata tgctcttgtt tttccctct aatagctatg	2700
gaaagatgca tagaaagatg ataagtttt aaaacataag gcattcgtct gccatttttc	2760
aattacatgc tgacttcctt tacaattgag atttgccat aggttaaaca tggttagaaa	2820
caactgaaag cataaaagaa aaatctagcg cgggtgcagt ggctcatgcc tatattccct	2880
gcactttggg aggccaaaagc agggagatcg cttgagccca ggagttcaag accaacctgg	2940
tgaaaccccg tctctacaaa aaaacacaaa aaatagccag gcatgggtggc gtgtacatgt	3000
ggtctcagat acttgggagg ctgagggtgg agggttgatc acttgaggct gagaggcaaa	3060
ggttgcagtg agccataatc gtgccactgc agtccagcct aggcacaga gtgagacttt	3120
gtctcaaaaa aagagaattt ttccttaata agaaaagtaa tttttactct gatgtgcaat	3180
acatttgtaa ttaatttat tatttaagat ggtagcacta gtcttaaat gtataaata	3240
tcccctaaca tgtttaaatg tccattttta ttcattatgc tttgaaaaat aattatgggg	3300
aaatacatgt ttgttattaa atttattatt aaagatagta gcactagtct taaattgat	3360
ataacatctc ctaacttgtt taaatgtcca tttttattct ttatgtttga aaataaatta	3420
tggggatcct atttagctct tagtaccact aatcaaaagt tcggcatgta gctcatgatc	3480
tatgctgttt ctatgtcgtg gaagcaccgg atgggggtag tgagcaaate tgcctgctc	3540
agcagtcacc atagcagctg actgaaaatc agcactgcct gagtagtttt gatcagttta	3600
acttgaatca ctaactgact gaaaattgaa tgggcaaata agtgcttttg tctccagagt	3660
atgcgggaga ccttccacc tcaagatgga tatttcttcc ccaaggattt caagatgaat	3720
tgaaattttt aatcaagata gtgtgcttta ttctgttcta tttttatta ttttaataa	3780
ctgtaagcca aactgaaata acatttgctg ttttataggt ttgaagaaca taggaaaaac	3840
taagaggttt tgtttttatt tttgctgatg aagagatatg tttaaatatg ttgtattgtt	3900

# ES 2 779 048 T3

ttgtttagtt acaggacaat aatgaaatgg agtttatatt tgttatttct attttgttat	3960
atthaataat agaattagat tgaataaaaa tataatggga aataatctgc agaatgtggg	4020
ttttcctggt gttccctct gactctagtg cactgatgat ctctgataag gctcagctgc	4080
tttatagttc tctggctaata gcagcagata ctcttctgc cagtggtaat acgatttttt	4140
aagaaggcag tttgtcaatt ttaatcttgt ggataccttt atactcttag ggtattattt	4200
tatacaaaag ccttgaggat tgcattctat tttctatatg accctcttga tatttaaaaa	4260
acactatgga taacaattct tcatttacct agtattatga aagaatgaag gagttcaaac	4320
aaatgtgttt cccagttaac tagggtttac tgtttgagcc aatataaatg tttactggt	4380
tgtgatggca gtattcctaa agtacattgc atgttttctt aaatacagag tttaaataat	4440
ttcagtaatt cttagatgat tcagcttcat cattaagaat atcttttggt ttatggtgag	4500
ttagaaatgc cttcatatag acatagtctt tcagacctct actgtcagtt ttcatctta	4560
gctgctttca gggttttatg aattttcagg caaagcttta atttatacta agcttaggaa	4620
gtatggctaa tgccaacggc agtttttttc ttcttaattc cacatgactg aggcataat	4680
gatctctggg taggtgagtt gttgtgacaa ccacaagcac ttttttttt tttaaagaaa	4740
aaaaggtagt gaatttttaa tcatctggac tttaaagaag attctggagt atacttaggc	4800
ctgaaattat atatatgttg cttggaatg tgttttctt caattacatc tacaagtaag	4860
tacagctgaa attcagagga ccataagag ttcacatgaa aaaaatcaat ttatttgaaa	4920
aggcaagatg caggagagag gaagcctgc aaacctgcag actgcttttt gcccaatata	4980
gattgggtaa ggtgcaaaa cataagctta attagctcac atgctctgct ctcacgtggc	5040
accagtggt agtgtgagag aattaggctg tagaacaat gcccttctct ttcagcattc	5100
acaccactac aaaatcatct tttatatcaa cagaagaata agcataaact aagcaaaagg	5160
tcaataagta cctgaaacca agattggcta gagatatatc ttaatgcaat ccattttctg	5220
atggattggt acgagttggc tatataatgt atgtatggta ttttgatttg tgtaaaagtt	5280
ttaaaaatca agctttaagt acatggacat ttttaataa aatatttaa gacaatttag	5340
aaaattgcct taatatcatt gttggctaaa tagaataggg gacatgcata ttaaggaaaa	5400
ggtcatggag aaataatatt ggtatcaaac aaatacattg atttgtcatg atacacattg	5460
aatttgatcc aatagttaa ggaataggta ggaaaatttg gttctattt ttcgatttcc	5520
tgtaaatcag tgacataaat aattcttagc ttattttata tttccttgc ttaaatactg	5580
agctcagtaa gttgtgtag gggattattt ctgagttgag actttcttat atgacatttt	5640
actatgtttt gacttctga ctattaataa taaatagtag atacaatttt cataaagtga	5700
agaattatat aatcactgct ttataactga cttattata tttattcaa agttcattta	5760
aaggctaata ttcactctct gtgatggaat ggtcaggaat ttgttttctc atagttaat	5820
tccaacaaca atattagtcg tatccaaaat aacctttaat gctaaacttt actgatgat	5880
atccaaagct tctcattttc agacagatta atccagaagc agtcataaac agaagaatag	5940
gtggtatggt cctaatgata ttatttctac taatggaata aactgtaata ttgaaatta	6000
tgctgctaat tatatcagct ctgaggtaat ttctgaaatg ttcagactca gtcggaacaa	6060
attggaaaat ttaaattttt attcttagct ataaagcaag aaagtaaca cattaatttc	6120

# ES 2 779 048 T3

```
ctcaacattt ttaagccaat taaaaatata aaagatacac accaatatct tcttcaggct 6180
ctgacaggcc tcttgaaaac ttccacatat ttttcaactg cagtataaag tcagaaaata 6240
aagttaacat aactttcact aacacacaca tatgtagatt tcacaaaatc cacctataat 6300
tggtcaaagt ggttgagaat atatTTTTTA gtaattgcat gcaaaatTTT tctagcttcc 6360
atcctttctc cctcgtttct tctttttttg ggggagctgg taactgatga aatcTTTTcc 6420
caccttttct cttcagaaa tataagtggg ttgttttggg taacgtgata cattctgtat 6480
gaatgaaaca ttggagggaa acatctactg aatttctgta atttaaaata ttttgctgct 6540
agttaactat gaacagatag aagaatctta cagatgctgc tataaataag tagaaaatat 6600
aaatttcac ctaaaaatat gctatTTTaa aatctatttc ctatattgta tttctaatca 6660
gatgtattac tcttattatt tctattgtat gtgttaatga ttttatgtaa aaatgtaatt 6720
gcttttcacg agtagtatga ataaaattga ttagtttggg ttttcttggc tccc 6774
```

<210> 33

<211> 365

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

ES 2 779 048 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

ES 2 779 048 T3

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

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 Gly Ser Arg Arg Arg Gly Ser Cys Gly Leu  
 355 360 365

<210> 34  
 <211> 44  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

Val Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu  
 1 5 10 15

Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr  
 20 25 30

10 Thr Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn  
 35 40

<210> 35  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

ES 2 779 048 T3

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro  
20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr  
35 40 45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile  
50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser  
65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala  
85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu  
100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr  
115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln  
130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
195 200 205

Leu Arg Gln Met  
210

<210> 36  
<211> 543  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Proteína quimérica IL6R/IL6

<400> 36

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

ES 2 779 048 T3

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

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

ES 2 779 048 T3

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> 37  
 <211> 202  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

Met Lys Val Leu Ala Ala Gly Val Val Pro Leu Leu Leu Val Leu His  
1 5 10 15

Trp Lys His Gly Ala Gly Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn Ala  
20 25 30

Thr Cys Ala Ile Arg His Pro Cys His Asn Asn Leu Met Asn Gln Ile  
35 40 45

5

10

ES 2 779 048 T3

Arg Ser Gln Leu Ala Gln Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe Ile  
 50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Ala Gln Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Leu Asp Lys  
 65 70 75 80

Leu Cys Gly Pro Asn Val Thr Asp Phe Pro Pro Phe His Ala Asn Gly  
 85 90 95

Thr Glu Lys Ala Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr Leu  
 100 105 110

Gly Thr Ser Leu Gly Asn Ile Thr Arg Asp Gln Lys Ile Leu Asn Pro  
 115 120 125

Ser Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Leu Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu  
 130 135 140

Arg Gly Leu Leu Ser Asn Val Leu Cys Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His  
 145 150 155 160

Val Gly His Val Asp Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Ser Gly Lys Asp  
 165 170 175

Val Phe Gln Lys Lys Lys Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys  
 180 185 190

Gln Ile Ile Ala Val Leu Ala Gln Ala Phe  
 195 200

<210> 38  
 <211> 3935  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

tacaacacag gctccagtat ataatcagg caaattcccc atttgagcat gaacctctga 60  
 aaactgccgg catctgaggt ttctccaag gccctctgaa gtgcagccca taatgaaggt 120  
 cttggcgcca ggagttgtgc ccctgctggt ggttctgcac tggaaacatg gggcggggag 180  
 ccccccccc atcaccctg tcaacgccac ctgtgccata cgccaccat gtcacaacaa 240  
 cctcatgaac cagatcagga gccaactggc acagctcaat ggcagtgcc atgcctctt 300  
 tattctctat tacacagccc agggggagcc gttcccaac aacctggaca agctatgtgg 360  
 ccccaactgt acggaactcc cgcccttcca cgccaacggc acggagaagg ccaagctggt 420  
 ggagctgtac cgcatagtcg tgtacctg cactccctg ggcaacatca cccgggacca 480  
 gaagatcctc aacccagtg ccctcagcct ccacagcaag ctcaacgcca ccgccgacat 540  
 cctgcgaggg ctccttagca acgtgctgtg ccgctgtgc agcaagtacc acgtgggcca 600  
 tgtggactgt acctacggcc ctgacacctc gggtaaggat gtcttccaga agaagaagct 660  
 gggctgtcaa ctctgggga agtataagca gatcatcgcc gtgttgccc aggccttcta 720  
 gcaggaggtc ttgaagtgtg ctgtgaaccg agggatctca ggagttgggt ccagatgtgg 780  
 gggcctgtcc aagggtggct ggggcccagg gcacgcgctaa acccaaatgg gggctgctgg 840

10

# ES 2 779 048 T3

cagaccccga ggggtgctgg ccagtccact ccactctggg ctgggctgtg atgaagctga	900
gcagagtgga aacttcata gggagggagc tagaagaagg tgccccttcc tctgggagat	960
tgtggactgg ggagcgtggg ctggacttct gcctctactt gtccccttgg ccccttgctc	1020
actttgtgca gtgaacaaac tacacaagtc atctacaaga gccctgacca cagggtgaga	1080
cagcagggcc caggggagtg gaccagcccc cagcaaatta tcaccatctg tgcctttgct	1140
gccccttagg ttgggactta ggtgggccag aggggctagg atcccaaagg actccttgctc	1200
ccctagaagt ttgatgagtg gaagatagag aggggcctct gggatggaag gctgtcttct	1260
tttgaggatg atcagagaac ttgggcatag gaacaatctg gcagaagttt ccagaaggag	1320
gtcacttggc attcagctc ttggggaggc agagaagcca ccttcaggcc tgggaaggaa	1380
gacactyggga ggaggagagg cctggaaagc tttggtaggt tcttcttct cttccccgtg	1440
atcttccctg cagcctggga tggccagggt ctgatggctg gacctgcagc aggggtttgt	1500
ggaggtgggt agggcagggg caggttgcta agtcaggtgc agaggttctg agggaccag	1560
gctcttctc tgggtaaagg tctgtaagaa ggggctgggg tagctcagag tagcagctca	1620
catctgaggc cctgggaggc cttgtgaggt cacacagagg tacttgaggg ggactggagg	1680
ccgtctctgg tccccagggc aagggaacag cagaacttag ggtcagggtc tcagggaacc	1740
ctgagctcca agcgtgctgt gcgtctgacc tggcatgatt tctatttatt atgatatcct	1800
atztatatta acttattggt gctttcagtg gccaaagtaa tcccccttc cctggtcct	1860
actcaacaaa atatgatgat ggtccccgac acaagcgcca gggccagggc ttagcagggc	1920
ctggtctgga agtcgacaat gttacaagtg gaataagcct tacgggtgaa gctcagagaa	1980
gggtcggatc tgagagaatg gggagggcctg agtgggagtg gggggccttg ctccaccccc	2040
ccccatcccc tactgtgact tgctttaggg tgtcagggtc caggctgcag gggctgggcc	2100
aatttgtgga gaggccgggt gcctttctgt cttgattcca ggggctgggt tcacactggt	2160
cttggggccc ccagcattgt gttgtgaggc gactgttcc tggcagatat tgtgccccct	2220
ggagcagtgg gcaagacagt ccttgtggcc caccctgtcc ttgtttctgt gtccccatgc	2280
tgcctctgaa atagcgccct ggaacaaccc tgcccctgca cccagcatgc tccgacacag	2340
cagggaaact cctcctgtgg cccggacacc catagacggt gcggggggcc tggctgggcc	2400
agaccccagc aaggtggggt agactggggg gatcagctgc ccattgctcc caagaggagg	2460
agagggaggc tgcagatgcc tgggactcag accaggaagc tgtgggccct cctgctccac	2520
ccccatccca ctcccaccca tgtctgggct cccaggcagc gaaccgatc tcttctttg	2580
tgtggggccc aggcgagtgg agaaacgccc tccagtctga gagcagggga gggaaaggagg	2640
cagcagagtt ggggcagctg ctccagagcag tgttctggct tcttctcaa ccctgagcgg	2700
gctgccggcc tccaaagtcc tccgacaaga tgatggtact aattatggta cttttcactc	2760
actttgcacc tttccctgtc gctctctaag cactttacct ggatggcgcg tggcagtggt	2820
gcaggcaggt cctgagccct ggggttgggg tggaggtgct gggccggagt tgtccatctg	2880
tccatcccaa cagcaagacg aggatgtggc tgttgagatg tggccacac tcaccctgt	2940
ccaggatgca gggactgctt tctccttctt gcttcatccg gcttagcttg gggctggctg	3000
cattccccca ggatgggctt cgagaaagac aaacttctct gaaaccaga gttgctgatt	3060

# ES 2 779 048 T3

ccacccgggg ggccccgctg actcgcccat cacctcatct cctgtggac ttgggagetc	3120
tgtgccaggc ccaccttgcg gccctggctc tgagtcgctc tcccaccag cctggacttg	3180
gccccatggg acccatcctc agtgctcctt ccagatcccg tccggcagct tggcgtccac	3240
cctgcacagc atcactgaat cacagagcct ttgcgtgaaa cagctctgcc aggcggggag	3300
ctgggtttct cttccctttt tatctgctgg tgtggaccac acctgggcct ggccggagga	3360
agagagagtt taccaagaga gatgtctcgg gcccttatt tattatttaa acattttttt	3420
aaaaagcact gctagtttac ttgtctctcc tcccacgtt ccccatcgtc ctccttgtec	3480
ctgacttggg gcacttccac cctgaccag ccagtcagc tctgccttgc cggtctcca	3540
gagtagacat agtgtgtggg gttggagctc tggcaccgg ggaggtagca tttccctgca	3600
gatggtacag atgttcctgc cttagagtca tctctagttc cccacctcaa tcccggcatc	3660
cagccttcag tccgcccac gtgctagctc cgtgggcca ccgtgcggcc ttagaggttt	3720
ccctccttc tttccactga aaagcacatg gccttgggtg acaaatcct cttt gatgaa	3780
tgtaccctgt ggggatgttt catactgaca gattattttt atttattcaa tgcatattt	3840
aaaatattta tttttatata caaatgaata cttttttttt taagaaaaa aagagaaatg	3900
aataaagaat ctactcttga aaaaaaaaa aaaaa	3935

## REIVINDICACIONES

1. Método de expansión de células madre pluripotentes y mantenimiento de las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado, comprendiendo el método cultivar las células madre pluripotentes en un cultivo en suspensión en condiciones de cultivo desprovistas de adherencia a sustrato y desprovistas de encapsulación celular y que permiten la expansión de las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, en el que un medio de cultivo de dicho cultivo en suspensión es sin suero y sin células alimentadoras, dicho medio de cultivo comprende ácido ascórbico en un intervalo de concentración de 400-600  $\mu\text{g/ml}$ , factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en un intervalo de concentración de 50-200 ng/ml, expandiendo y manteniendo de ese modo las células madre pluripotentes en el estado indiferenciado, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo comprende no más de 0,1 ng/ml de TGF $\beta$ 3.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo está desprovisto de TGF $\beta$ 3.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho medio comprende además reemplazo de suero.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho medio de cultivo es sin portador proteico.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho mantenimiento es durante al menos 5 pases.
7. Método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:
- (a) cultivar las células madre pluripotentes según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para obtener de ese modo células madre indiferenciadas y expandidas;
- (b) someter dichas células madre indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;
- (i) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar células estromales mesenquimatosas comprende aumentar los intervalos entre cambios de medio hasta 3-5 días, y después de 9-10 días retirar físicamente las células de aspecto de fibroblasto en forma de huso;
- (ii) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar neuronas dopaminérgicas (DA) comprende cultivar de manera conjunta dichas células madre con las líneas celulares estromales de ratón PA6 o MS5, o con una combinación de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12), pleiotrofina (PTN), factor 2 de crecimiento similar a la insulina (IGF2) y efrina B1 (EFNB1);
- (iii) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar neuronas de dopamina mesencefálicas (mesDA) comprende modificar genéticamente dichas células madre para expresar el factor de transcripción Lmx1a;
- (iv) en el que la diferenciación de dichas células madre para dar epitelio pulmonar (neumocitos de tipo II) comprende cultivar dichas células madre en presencia de un medio condicionado recogido de una línea celular de neumocitos;
- (v) en el que la diferenciación de dichas células para dar células neuronales comprende cultivar dichas células madre durante 5 días en presencia de un medio de reemplazo de suero complementado con inhibidor de TGF- $\beta$  y nogina, a continuación de lo cual las células se cultivan con cantidades crecientes de medio N2 en presencia de nogina 500 ng/ml,
- generando de ese modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.
8. Método de generación de cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:
- (a) cultivar las células madre pluripotentes según el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para obtener de ese modo células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas; y
- (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo

adecuadas para diferenciar dichas células madre en cuerpos embrioides; en el que dichas condiciones de cultivo incluyen un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y que está desprovisto de un factor inhibidor de la diferenciación;

5 generando de ese modo los cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

10 9. Método de generación de células específicas de linaje a partir de células madre pluripotentes, comprendiendo el método:

(a) cultivar las células madre pluripotentes según el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para obtener de ese modo células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas;

15 (b) someter dichas células madre pluripotentes indiferenciadas y expandidas a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar dichas células madre indiferenciadas y expandidas en cuerpos embrioides; en el que dichas condiciones de cultivo incluyen un cultivo en suspensión en presencia de un medio de cultivo que contiene suero o reemplazo de suero y que está desprovisto de un factor inhibidor de la diferenciación; y

20 (c) someter células de dichos cuerpos embrioides a condiciones de cultivo adecuadas para diferenciar y/o expandir células específicas de linaje;

25 (i) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar cardiomiocitos comprende transferir dichos cuerpos embrioides de cuatro días de edad a portaobjetos de cámara o placas recubiertas de gelatina y permitir que se unan y se diferencien, y separar mecánicamente células que se contraen espontáneamente desde el día 8 de diferenciación en un medio bajo en calcio o PBS;

30 (ii) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides de cuatro días de edad para dar precursores neuronales comprende cultivar dichos cuerpos embrioides 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;

35 (iii) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar células de mielina y oligodendrocitos comprende cultivar dichos cuerpos embrioides en un medio DMEM con albúmina sérica bovina (BSA), piruvato, progesterona, putrescina, tiroxina, triyodotironina, insulina, transferrina, selenito de sodio, aminoácidos, neurotrofina 3, factor neurotrófico ciliar y Hepes,

40 (iv) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar diferenciación de mastocitos comprende transferir cuerpos embrioides de dos semanas de edad a placas de cultivo tisular que incluyen medio DMEM complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 mg/ml, medio condicionado con células WEHI-3 al 20% (v/v) y factor de células madre de rata recombinante 50 ng/ml;

45 (v) en el que la diferenciación de dichos cuerpos embrioides para dar células hemato-linfoideas comprende transferir cuerpos embrioides de 2-3 días de edad a placas de cultivo permeables a gas en presencia del 7,5% de CO<sub>2</sub> y el 5% de O<sub>2</sub> utilizando una incubadora con contenido de oxígeno ajustable;

50 generando de ese modo las células específicas de linaje a partir de las células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas humanas.

10. Método según la reivindicación 8 o 9, en el que dicho factor inhibidor de la diferenciación comprende TGFβ<sub>3</sub>, ácido ascórbico a una concentración de al menos 50 μg/ml, bFGF y/o una quimera de IL6RIL6.

55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho ácido ascórbico se proporciona a una concentración de 500 μg/ml.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho bFGF se proporciona a una concentración de entre 90 ng/ml y 120 ng/ml.

60



FIG. 1A



FIG. 1B

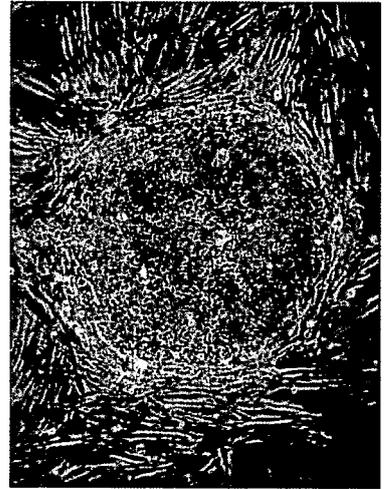


FIG. 1C

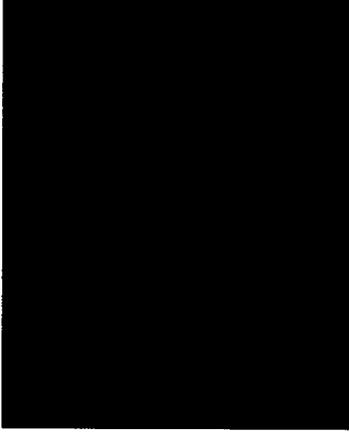


FIG. 2A



FIG. 2B

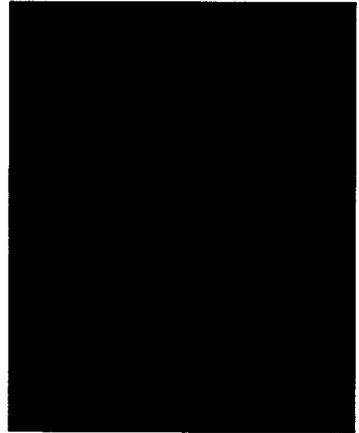


FIG. 2C

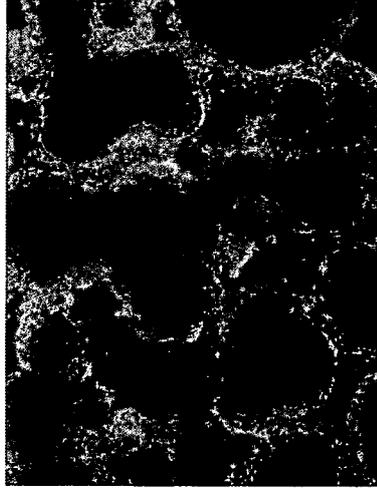


FIG. 3C

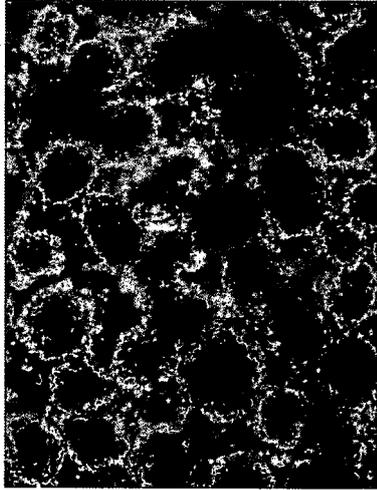


FIG. 3B

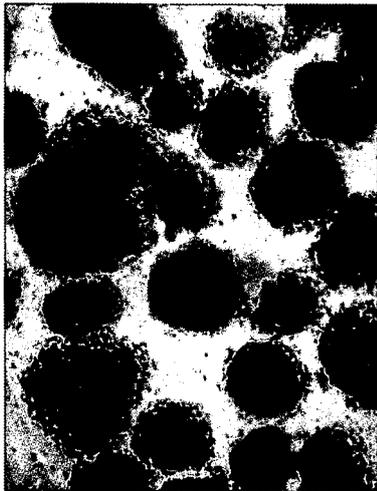


FIG. 3A

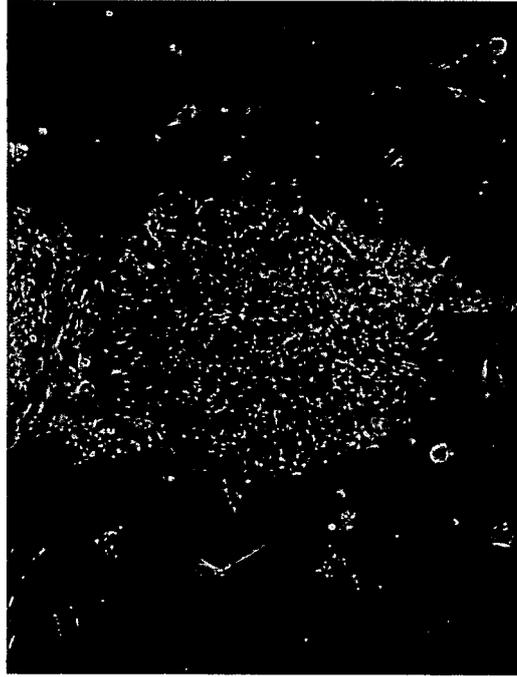


FIG. 4

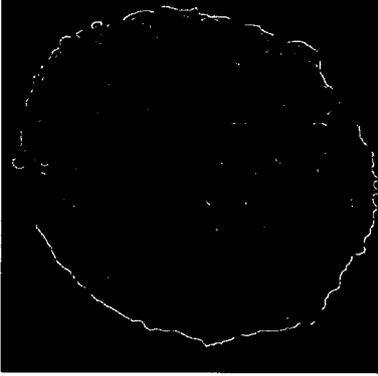


FIG. 5A

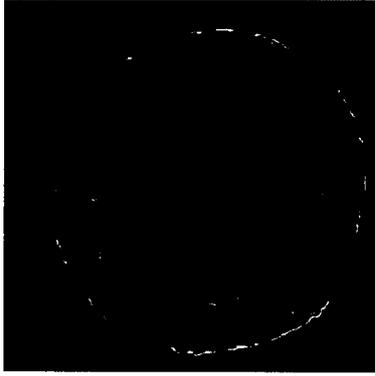


FIG. 5B

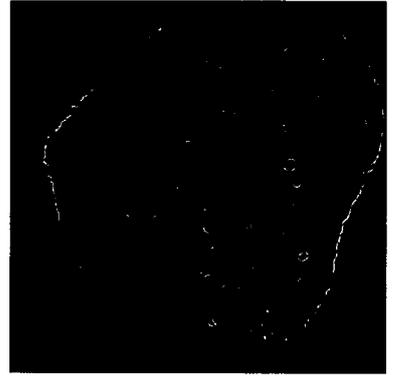


FIG. 5C

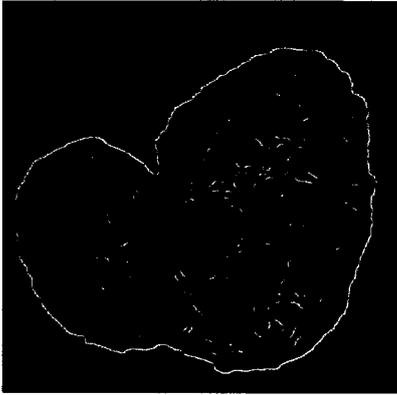


FIG. 6B

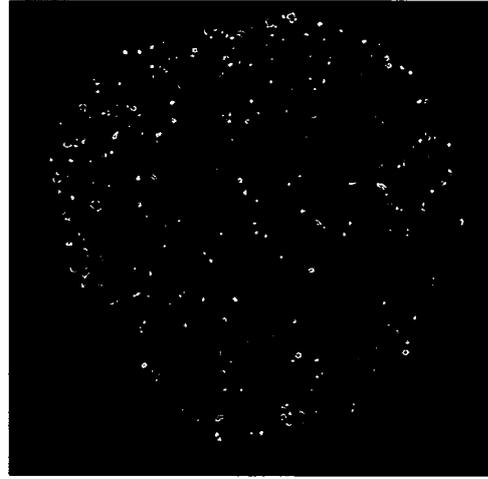


FIG. 6D

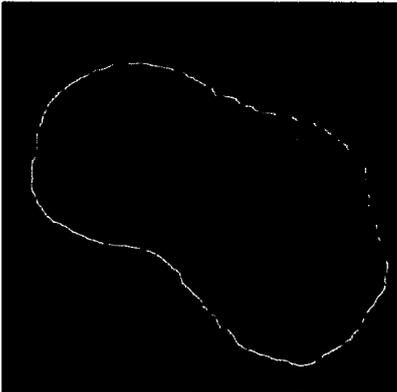


FIG. 6A

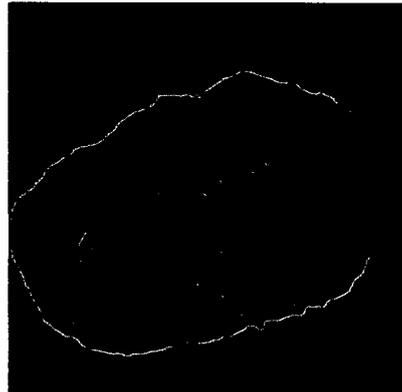


FIG. 6C