

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 973**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2005 PCT/US2005/034510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2006 WO06036925**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2005 E 05801117 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 1799811**

54 Título: **Cultivo de células madre embrionarias de primates**

30 Prioridad:

28.09.2004 US 952096
11.03.2005 US 78737

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.01.2021

73 Titular/es:

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 Walnut Street
Madison, WI 53726, US

72 Inventor/es:

THOMSON, JAMES, A. y
LEVENSTEIN, MARK

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 800 973 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

Cultivo de células madre embrionarias de primates

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a medios de cultivo y procedimientos para cultivar cultivos de células madre embrionarias de primates.

10 Las células madre embrionarias pluripotentes de primates (por ejemplo, mono y humano) se han derivado de embriones previos a la implantación. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5.843.780 y J. Thomson y col., 282 Science 1145-1147 (1998). A pesar del cultivo prolongado, estas células mantienen establemente un potencial de desarrollo para formar derivados avanzados de las tres capas germinales embrionarias.

15 Las líneas celulares ES de primates (particularmente humanos) tienen una utilidad generalizada en relación con la biología del desarrollo humano, el descubrimiento de fármacos, los ensayos farmacológicos y la medicina de trasplantes. Por ejemplo, el conocimiento actual del embrión humano posterior a la implantación se basa en gran medida en un número limitado de secciones histológicas estáticas. Debido a consideraciones éticas, los mecanismos subyacentes que controlan las decisiones de desarrollo del embrión humano temprano permanecen esencialmente
20 inexplorados.

Aunque el ratón es el pilar de la biología experimental del desarrollo de mamíferos, y aunque muchos de los mecanismos fundamentales que controlan el desarrollo se conservan entre ratones y humanos, existen diferencias significativas entre el desarrollo temprano del ratón y el humano. Por lo tanto, las células ES de los primates/humanos
25 deberían proporcionar nuevas ideas importantes sobre su diferenciación y función.

Los derivados diferenciados de las células ES de los primates podrían usarse para identificar dianas genéticas para nuevos fármacos, para probar la toxicidad o teratogenicidad de nuevos compuestos y podrían usarse en trasplantes para reemplazar las poblaciones celulares en la enfermedad. Las posibles condiciones que podrían tratarse mediante
30 el trasplante de células derivadas de células ES incluyen la enfermedad de Parkinson, infartos cardíacos, diabetes mellitus de inicio juvenil y leucemia. Véase, por ejemplo, J. Rossant y col. 17 Nature Biotechnology 23-4 (1999) y J. Gearhart, 282 Science 1061-2 (1998).

La capacidad proliferativa a largo plazo, el potencial de desarrollo después de un cultivo prolongado y la estabilidad
35 cariotípica son características clave con respecto a la utilidad de los cultivos de células madre embrionarias de primates. Los cultivos de dichas células (especialmente en las capas alimentadoras de fibroblastos) se han suplementado típicamente con suero animal (especialmente suero fetal bovino) para permitir la proliferación deseada durante dicho cultivo.

40 Por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.453.357, 5.670.372 y 5.690.296 se describieron diversas condiciones de cultivo, incluidas algunas que usan un tipo de factor de crecimiento de fibroblastos básico junto con suero animal. Desafortunadamente, el suero tiende a tener propiedades variables de un lote a otro, lo que afecta las características del cultivo.

45 En el documento WO 98/30679 se analizó el suministro de un suplemento sin suero como reemplazo del suero animal para apoyar el crecimiento de ciertas células madre embrionarias en cultivo. El reemplazo de suero incluyó albúminas o sustitutos de la albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de la transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de la insulina, uno o más precursores de colágeno y uno o más oligoelementos. Se observó que este reemplazo podría complementarse además con factor
50 inhibidor de leucemia, factor de acero o factor neurotrófico ciliar. Desafortunadamente, en el contexto de los cultivos de células madre embrionarias de primates (especialmente aquellos cultivados en capas alimentadoras de fibroblastos), estos medios de cultivo no resultaron satisfactorios.

En el contexto de los medios de cultivo de suero de nutrientes (por ejemplo, suero bovino fetal), el documento WO
55 99/20741 analiza el beneficio del uso de diversos factores de crecimiento tal como el bFGF en el cultivo de células madre de primates. Sin embargo, no se describen medios de cultivo sin suero de nutrientes.

En la patente de Estados Unidos 5.405.772 se describen medios de crecimiento para células hematopoyéticas y células estromales de la médula ósea. Se sugiere usar el factor de crecimiento de fibroblastos en un medio privado de
60 suero para este propósito. Sin embargo, no se describen las condiciones para el crecimiento de células madre embrionarias de primates.

Los primeros cultivos de células madre embrionarias humanas se cultivaron usando una capa de células alimentadoras de fibroblastos, que tiene la propiedad de permitir que las células madre embrionarias humanas proliferen sin permanecer diferenciadas. Más tarde, se descubrió que es suficiente exponer el medio de cultivo a células alimentadoras, para crear lo que se llama medio acondicionado, que tenía la misma propiedad que el uso de las células alimentadoras directamente. Sin el uso de células alimentadoras o medio acondicionado, las células madre embrionarias humanas en cultivo no podrían mantenerse en un estado indiferenciado. Dado que el uso de células alimentadoras, o incluso la exposición del medio a células alimentadoras, corre el riesgo de contaminación del cultivo con material no deseado, es deseable evitar el uso de células alimentadoras y medio acondicionado. El medio que no ha sido expuesto a células alimentadoras se denomina aquí medio no acondicionado.

10

Por lo tanto, se puede ver que todavía existe la necesidad de técnicas para cultivar de manera estable células madre embrionarias de primates sin el requisito del uso de suero animal.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

15

En un aspecto, la invención proporciona un medio de cultivo que comprende albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo libre de suero animal y conteniendo al menos 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos seleccionado de entre el grupo que consiste en FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, el medio adecuado para cultivar células madre embrionarias de primates en ausencia de suero y en ausencia de células alimentadoras y también en ausencia de medio expuesto a células alimentadoras, donde al menos el 90 % de las células madre en el medio de cultivo expresan Oct-4, SSEA4 o Tral-60. En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para cultivar células madre embrionarias de primates, que comprende: cultivar las células madre en un cultivo libre de suero fetal de mamífero y en un medio de cultivo de células madre que incluye aminoácidos, vitaminas, sales, minerales, transferrina o un sustituto de transferrina, insulina o un sustituto de insulina, albúmina, y una concentración mínima del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) de 100 ng/ml, donde el FGF se selecciona de entre el grupo que consiste en FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, y donde el medio es capaz de soportar el cultivo y la proliferación de células madre pluripotentes euploides proliferativas indiferenciadas humanas, sin células alimentadoras o exposición del medio a células alimentadoras, y donde al menos el 90 % de las células madre en el cultivo expresan Oct-4, SSEA4 o Tral-60.

20

25

30

35

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para cultivar células madre embrionarias de primates en medios definidos sin suero y sin células alimentadoras, comprendiendo el procedimiento: cultivar las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o un sustituto de insulina, el medio de cultivo libre de suero fetal de mamífero y conteniendo al menos 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos seleccionado de entre el grupo que consiste en FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, soportando el medio que la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células alimentadoras o medio acondicionado, y donde al menos el 90 % de las células madre en el cultivo expresan Oct-4, SSEA4 o Tral-60.

40

45

Los factores de crecimiento de fibroblastos son moléculas esenciales para el desarrollo de los mamíferos. Actualmente hay más de veinte ligandos de factor de crecimiento de fibroblastos conocidos y cinco receptores de factor de crecimiento de fibroblastos de señalización para ellos (y sus variantes empalmadas). Véase en general D. Ornitz y col., 25 J. Biol. Chem. 15292-7 (1996); patente estadounidense 5.453.357. Se espera que existan ligeras variaciones en estos factores entre las especies y, por lo tanto, el término factor de crecimiento de fibroblastos no está limitado por especies. Sin embargo, preferimos usar factores de crecimiento de fibroblastos humanos. Estos compuestos están fácilmente disponibles en cantidad de Gibco BRL-Life Technologies y otros.

50

Se debe tener en cuenta que, para los fines de esta patente, el cultivo aún puede estar libre del suero especificado a pesar de que un componente discreto (por ejemplo, albúmina de suero bovino) se haya aislado del suero y a continuación se suministra de manera exógena. El punto es que cuando se agrega el propio suero, surgen problemas de variabilidad. Sin embargo, cuando se agrega uno o más componentes purificados bien definidos de dicho suero, estos no varían.

55

Preferentemente, las células madre embrionarias de primates que se cultivan son células madre embrionarias humanas que son verdaderas líneas de células ES en las que: (i) son capaces de proliferación indefinida in vitro en un estado indiferenciado; (ii) son capaces de diferenciarse a derivados de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) incluso después de un cultivo prolongado; y (iii) mantienen un cariotipo normal (son euploides) durante todo el cultivo prolongado. Por lo tanto, estas células se denominan pluripotentes.

60

El cultivo permite que las células madre embrionarias proliferen de manera estable en el cultivo durante más de un mes (preferentemente durante seis meses; incluso más preferentemente durante doce meses) mientras se mantiene el potencial de las células madre para diferenciarse en derivados de tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo, y mientras se mantiene el cariotipo de las células madre.

También se describe en el presente documento otro procedimiento para cultivar células madre embrionarias de primates. Se cultivan las células madre en un cultivo sustancialmente libre de suero fetal de mamífero (preferentemente también sustancialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia de un factor de crecimiento capaz de activar un receptor de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, donde el factor de crecimiento se suministra a partir de una fuente que no sea solo una capa alimentadora de fibroblastos. Si bien el factor de crecimiento es preferentemente un factor de crecimiento de fibroblastos, también podría ser otros materiales como ciertos péptidos pequeños sintéticos (por ejemplo, producidos por variantes de ADN recombinante o mutantes) diseñados para activar los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos. Véase en general T. Yamaguchi y col., 152 Dev. Biol. 75-88 (1992) (receptores de señalización).

También se describe en el presente documento un sistema de cultivo para cultivar células madre embrionarias de primates. Tiene un factor de crecimiento de fibroblastos básico humano suministrado por otros que no sean solo la capa alimentadora de fibroblastos. El sistema de cultivo está sustancialmente libre de suero animal.

También se describen en el presente documento líneas celulares (preferentemente líneas celulares clonadas) derivadas usando el procedimiento anterior. "Derivadas" se usa en su sentido más amplio para abarcar líneas derivadas directa o indirectamente.

De este modo, se evita la variabilidad en los resultados debido a las diferencias en los lotes de suero animal. Además, se ha descubierto que evitar el uso de suero animal mientras se usa el factor de crecimiento de fibroblastos puede aumentar la eficiencia de la clonación.

Por lo tanto, es una ventaja de la presente invención proporcionar condiciones de cultivo para líneas de células madre embrionarias de primates donde las condiciones son menos variables y permiten una clonación más eficiente. Otras ventajas de la presente invención serán evidentes después del estudio de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

En algunos de los siguientes experimentos, uno de los inventores aquí usó los procedimientos y sistemas de cultivo descritos en el presente documento para cultivar líneas de células ES humanas sin agregar suero al medio de cultivo. Dos líneas celulares de ES humanas derivadas clonalmente proliferaron durante más de ocho meses después de la derivación clonal y mantuvieron la capacidad de diferenciarse a derivados avanzados de las tres capas germinales embrionarias cuando se cultivaron en un medio sin suero como constituyente.

En otro de los experimentos que se exponen a continuación, ahora se ha demostrado que la adición de cantidades relativamente grandes de un factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGF) ayuda en el cultivo y el crecimiento de células madre embrionarias humanas, incluso en ausencia de suero y células alimentadoras. Esto permite el cultivo de células madre que nunca han sido expuestas ni a células animales ni a medios en los que se hayan cultivado células animales. Estas condiciones de cultivo de células madre (es decir, sin células alimentadoras y sin medio acondicionado) se denominan aquí independientes del alimentador. Se han descrito condiciones de cultivo anteriores, basadas en el uso de medio acondicionado con células alimentadoras, que se describen como libres de alimentador. Sin embargo, el uso de medio acondicionado no resuelve la dependencia del uso de células alimentadoras, que aún deben usarse para acondicionar el medio. Las técnicas descritas aquí permiten el cultivo indefinido e independiente del alimentador de células madre embrionarias humanas que tienen cariotipo normal y con respecto al que las células madre permanecen indiferenciadas.

Las técnicas para la derivación inicial, el cultivo y la caracterización de la línea de células ES humanas H9 (descrita en el presente documento solo como referencia) se describieron en J. Thomson y col., 282 Science 1145-1147 (1998). Los experimentos que se describen a continuación son solo de referencia y se realizaron con esta y otras líneas celulares, pero los procesos y resultados son independientes de las líneas de células ES particulares.

Aquí se describe que la adición del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ayuda en el cultivo y la clonación de células ES humanas. La adición de FGF es importante en dos aspectos distintos. Primero, la adición de FGF a niveles moderados (por ejemplo, 4 ng/ml) permite el cultivo de células ES humanas no diferenciadas en un medio desprovisto de suero. En este nivel, la tasa de diferenciación de las células madre se ralentiza, en comparación con los niveles inferiores de FGF, pero las células eventualmente se diferenciarán. En segundo lugar, la adición de FGF a niveles más altos hace que las condiciones de cultivo del medio alimentador sean independientes, ya que no se requieren células alimentadoras para mantener indefinidamente la pluripotencia de las células ES humanas euploides indiferenciadas en el cultivo.

Se cree que este primer fenómeno es activado por la acción de FGF al interactuar con los receptores de FGF en las

células ES humanas. Para evitar el uso de suero, no es particularmente crítico cuál de las muchas variantes conocidas de FGF se usan en el cultivo. Aquí se usa comúnmente FGF básico o bFGF, también conocido como FGF2, pero eso es solo porque bFGF es uno de los miembros fácilmente disponibles comercialmente de la familia de factores FGF. Se han identificado más de veinte miembros diferentes de la familia FGF, y se les conoce como FGF-1 a FGF-27. Si bien la concentración de FGF aquí se da en cantidades de bFGF, debe entenderse que esto pretende cuantificar la cantidad de estimulación de los receptores de FGF y que la concentración de FGF puede tener que ajustarse, hacia arriba o hacia abajo, para otros miembros de la familia FGF. Para bFGF, la concentración preferida de FGF en el medio de células ES está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 ng/ml, siendo útiles concentraciones en un intervalo en exceso de aproximadamente 4 ng/ml para evitar la necesidad de suero en el medio.

10 Sorprendentemente, se ha descubierto que para el segundo atributo de FGF en un medio de células ES humanas, la selección de la variante de FGF tiene cierta importancia. Para este propósito, se ha descubierto que cuando la concentración de bFGF es de aproximadamente 100 ng/ml, esta condición es suficiente para evitar la necesidad de células tanto séricas como alimentadoras, haciendo que el alimentador de cultivo sea independiente. Para este propósito, se ha descubierto que los miembros de la familia FGF FGF2 (bFGF), FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18 son suficientes a 100 ng/ml de cultivo cada uno para hacer que el alimentador de cultivo de células ES humanas sea independiente. Por el contrario, se ha descubierto que los miembros de la familia FGF FGF1 (FGF ácido), FGF1 β , FGF3, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF10, FGF16, FGF19 y FGF 20 no son suficientes a 100 ng/ml para soportar la independencia del alimentador. Creemos, pero no tenemos datos actuales, que los resultados que usan estas formas de FGF no son el resultado de la concentración y que concentraciones más altas del FGF particular tampoco tendrían éxito en apoyar la independencia del alimentador. Para FGF9, nuestros datos sugieren que a este nivel (100 ng/ml) FGF9 admite el cultivo de células ES humanas, pero los datos han sido ligeramente más equívocos.

25 La cantidad mínima exacta de las variantes efectivas de FGF que serán suficientes para soportar las células ES humanas como alimentadores independientes en cultivo no se conoce con precisión en este momento, pero se puede determinar mediante ensayos empíricos. Se sabe que para FGF2, 4 ng/ml añadidos al medio solo son insuficientes para el mantenimiento indefinido de células ES humanas euploides indiferenciadas en cultivo, mientras que 100 ng/ml de FGF2 solo en el medio son suficientes. Mientras que las células ES cultivadas en un medio no acondicionado que contiene tan poco como 4 ng/ml permanecerán indiferenciadas durante algún tiempo, y tal vez uno o dos pases, las células posiblemente comenzarán a diferenciarse. En nuestras manos, la capacidad de un medio para cultivar células ES para permanecer indefinidamente indiferenciadas y euploides se demuestra cuando las células se cultivan durante al menos seis pases mientras se mantienen proliferantes, indiferenciadas, euploides y se mantiene la morfología característica de las células ES humanas. Como se usa en el presente documento, una concentración de mantenimiento de un FGF es la concentración de ese FGF necesaria para apoyar el mantenimiento de las células ES humanas en un estado indiferenciado, euploide y proliferativo durante al menos seis pases. Para FGF2, la concentración de mantenimiento mínima es de entre 4 ng/ml y 100 ng/ml y la concentración de mantenimiento mínima exacta se puede determinar usando los siguientes protocolos para interpolar esas cantidades. Para cada uno de otro FGF eficaz, por ejemplo, FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, la concentración de mantenimiento mínima correspondiente para cada FGF se puede determinar mediante ensayos similares.

40 Los cultivos de células ES humanas en los medios de células ES humanas definidas que se describen a continuación en los ejemplos de referencia se pueden cultivar indefinidamente en ausencia total de células alimentadoras de fibroblastos y sin medios acondicionados mientras permanecen euploides. Las células ES son, por lo tanto, verdaderamente independientes del alimentador. Las células ES humanas conservan todas las características de las células ES humanas, incluida la morfología característica (pequeñas y compactas con membranas celulares indistintas), la proliferación y la capacidad de diferenciarse en muchos, si no todos, los tipos de células en el cuerpo humano. Las células ES humanas también conservarán la característica de que pueden formar las tres capas celulares primordiales cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos. En particular, las células ES retienen la capacidad de diferenciarse en ectodermo, mesodermo y endodermo. Las células ES aún presentan marcadores indicativos del estado de las células ES, como la expresión del factor de transcripción nuclear Oct4, que está asociado con la pluripotencia. A lo largo del proceso y al final, las células ES humanas retienen los cariotipos normales.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

55 En los primeros experimentos descritos en el presente documento, las células ES humanas se colocaron en placas sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (irradiación gamma 35). El medio de cultivo para el presente trabajo consistió en 80 % de medio de Eagle modificado por Dulbeco "KnockOut" (DMEM) (Gibco BRL, Rockville, MD), L-Glutamina 1 mM, β -mercap-toetanol 0,1 mM y 1% de reservas de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, Rockville, MD), suplementado con 20 % de suero bovino fetal (HyClone, Logan, UT) o 20 % de KnockOut SR, un sustituto sin suero originalmente optimizado para células ES de ratón (Gibco BRL, Rockville, MD). Los componentes de KnockOut SR son los descritos para los sustitutos de suero en el documento WO 98/30679.

En experimentos alternativos, el medio se suplementó con suero o con el sustituto de suero mencionado anteriormente KnockOut SR, y con o sin factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF, 4 ng/ml). El intervalo de concentración preferido de bFGF en el cultivo fue de entre 0,1 ng/ml y 500 ng/ml.

- 5 Para determinar la eficacia de la clonación en condiciones de cultivo variables, los cultivos H-9 se disociaron en células individuales durante 7 minutos con tripsina al 0,05 %/EDTA al 0,25 %, se lavaron por centrifugación y se colocaron en placas sobre fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente (10^5 células ES por pocillo de una placa de 6 pocillos). Para confirmar el crecimiento a partir de células individuales para la derivación de líneas de células ES clonales, se seleccionaron células individuales mediante observación directa con un microscopio estereoscópico y se transfirieron por micropipeta a pocillos individuales de una placa de 96 pocillos que contiene alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón con medio que contiene 20 % de sustituto de suero y 4 ng/ml de bFGF.

- Los clones se expandieron por pase de rutina cada 5-7 días con 1 mg/ml de colagenasa tipo IV (Gibco BRL, Rockville, MD). Seis meses después de la derivación, las células H9 presentaron un cariotipo XX normal mediante técnicas estándar de bandas G (20 extensiones cromosómicas analizadas). Sin embargo, siete meses después de la derivación, en una sola preparación de cariotipo, las extensiones cromosómicas 16/20 presentaron un cariotipo XX normal, pero las extensiones 4/20 demostraron anomalías aleatorias, incluida una con una translocación al brazo corto del cromosoma 13, una con un cromosoma 20 invertido, una con una translocación al brazo corto número 4 y otra con fragmentación múltiple. Posteriormente, a los 8, 10 y 12,75 meses después de la derivación, las células H9 presentaron cariotipos normales en las 20 extensiones cromosómicas examinadas.

- Se observó que la eficiencia de clonación de las células ES humanas en condiciones de cultivo descritas previamente que incluían suero animal era pobre (independientemente de la presencia o ausencia de bFGF). También se observó que en ausencia de suero animal la eficiencia de clonación aumentó, y aumentó aún más con bFGF. Ahora se ha establecido que la adición de FGF facilitó el cultivo de células ES humanas en general y es de particular ayuda para facilitar la clonación de cultivos de ES humanas.

- Los datos expresados a continuación son el número total de colonias resultantes de 10^5 células ES individualizadas tratadas, +/- error estándar de la media (porcentaje de eficiencia de clonación de colonias). Con suero fetal al 20 % y sin bFGF hubo un resultado de 240 +/- 28. Con suero al 20 % y bFGF (a 4 ng/ml) el resultado fue aproximadamente el mismo, 260 +/- 12. En ausencia del suero (presencia de 20 % de sustituto del suero) el resultado sin bFGF fue 633 +/- 43 y el resultado con bFGF fue de 826 +/- 61. Por tanto, el suero afectó negativamente la eficiencia de clonación, y la presencia del bFGF en ausencia de suero tuvo un beneficio sinérgico adicional en cuanto a la eficiencia de clonación.

- El cultivo a largo plazo de células ES humanas en presencia de suero no requiere la adición de bFGF suministrado de manera exógena, y (como se señaló anteriormente) la adición de bFGF al medio que contiene suero no incrementa significativamente la eficiencia de clonación de células ES humanas. Sin embargo, en un medio sin suero, bFGF aumentó la eficiencia de clonación inicial de las células ES humanas.

- Además, se ha descubierto que el suministro de bFGF exógeno es muy importante para la continua proliferación indiferenciada de células madre embrionarias de primates en ausencia de suero animal. En un medio sin suero que carece de bFGF exógeno, las células ES humanas se diferenciaron uniformemente por dos semanas de cultivo. La adición de otros factores como LIF (en ausencia de bFGF) no impidió la diferenciación.

- Los resultados percibidos son particularmente aplicables a las líneas clonales. A este respecto, los clones para expansión se seleccionaron colocando células individualmente en pocillos de una placa de 96 pocillos bajo observación microscópica directa. De 192 células H-9 tratadas en pocillos de placas de 96 pocillos, se expandieron con éxito dos clones (H-9.1 y H-9.2). Ambos clones se cultivaron posteriormente de forma continua en medios complementados con sustituto de suero y bFGF.

- Las células H9.1 y H9.2 mantuvieron un cariotipo XX normal incluso después de más de 8 meses de cultivo continuo posterior a la clonación. Los clones H-9.1 y H-9.2 mantuvieron el potencial de formar derivados de las tres capas germinales embrionarias incluso después de un cultivo a largo plazo en un medio sin suero. Después de 6 meses de cultivo, se confirmó que los clones H9.1 y H9.2 tenían cariotipos normales y a continuación se inyectaron en ratones SCID-beige.

- Tanto las células H9.1 como H9.2 formaron teratomas que contenían derivados de las tres capas germinales embrionarias, incluidos el riñón embrionario del epitelio intestinal (endodermo), el músculo estriado, el músculo liso, el hueso, el cartílago (mesodermo) y el tejido neural (ectodermo). El intervalo de diferenciación observado dentro de los teratomas de las células H9.1 y H9.2 de alto pase fue comparable al observado en los teratomas formados por las células H9 parentales de bajo pase.

Debería apreciarse a partir de la descripción anterior que, si bien el suero animal es favorable al crecimiento, es una mezcla compleja que puede contener compuestos beneficiosos y perjudiciales para el cultivo de células ES humanas. Además, diferentes lotes de suero varían ampliamente en su capacidad para soportar una proliferación vigorosa e indiferenciada de células ES humanas. Reemplazar el suero con un componente claramente definido reduce la variabilidad de los resultados asociados con esta variación del lote de suero, y debería permitir estudios de diferenciación más cuidadosamente definidos.

Además, la menor eficiencia de clonación en un medio que contiene suero sugiere la presencia de compuestos en suero usado convencionalmente que son perjudiciales para la supervivencia de las células madre, particularmente cuando las células se dispersan en células individuales. Evitar el uso de estos compuestos es por lo tanto altamente deseado.

Cultivo independiente de alimentador

Otras investigaciones se dirigieron más tarde al cultivo de líneas de células ES en concentraciones más altas de FGF, pero en ausencia de células séricas y alimentadoras. Se han usado tres formulaciones de medio diferentes en este trabajo, y esas formulaciones de medio se denominan en el presente documento UM100, BM+ y DHEM. La nomenclatura UM100 se refiere al medio no acondicionado al que se le han agregado 100 ng/ml de bFGF. El medio UM100 contiene el producto de sustituto sérico 'Gibco Knockout', pero no incluye ni requiere el uso de células alimentadoras de fibroblastos de ningún tipo. El medio BM+ es medio basal (DMEM/F12) más aditivos, descritos a continuación, que también permite el cultivo de células sin células alimentadoras, pero este medio omite el producto sustitutivo del suero. Por último, el nombre DHEM se refiere a un medio de células madre embrionarias humanas definidas. Este medio, también descrito a continuación, es suficiente para el cultivo, la clonación y la proliferación indefinida de células ES humanas, ya que está compuesto completamente de constituyentes inorgánicos y solo proteínas humanas, a diferencia del medio BM+ que contiene albúmina bovina.

El cultivo de líneas de células ES humanas H1 y H9 en medios UM100/BM+/DHEM

UM100 se preparó como sigue: los medios no acondicionados (UM) consistieron en 80 % (v/v) de DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) y 20 % (v/v) de sustituto sérico 'Knockout' (Gibco/Invitrogen) suplementado con glutamina 1 mM (Gibco/Invitrogen), β-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma - St. Louis, MO) y 1 % de reservas de aminoácidos no esenciales (Gibco/Invitrogen). Para completar el medio, se añadieron 100 ng/ml de bFGF y el medio se filtró a través de un filtro de nailon de 0,22 μm (Nalgene).

El medio BM+ se preparó como sigue: 16,5 mg/ml de BSA (Sigma), 196 mg/ml de insulina (Sigma), 108 mg/ml de transferrina (Sigma), 100 ng/ml de bFGF, glutamina 1 mM (Gibco/Invitrogen), β-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma) y reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % (Gibco/Invitrogen) se combinaron en DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) y la osmolalidad se ajustó a 340 mOsm con NaCl 5M. A continuación, se filtró el medio a través de un filtro de nailon de 0,22 μm (Nalgene).

El medio DHEM se preparó como sigue: 16,5 mg/ml de HSA (Sigma), 196 mg/ml de insulina (Sigma), 108 mg/ml de transferrina (Sigma), 100 ng/ml de bFGF, glutamina 1 mM (Gibco/Invitrogen), β-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma), reserva de aminoácidos no esenciales al 1 % (Gibco/Invitrogen), suplementos vitamínicos (Sigma), oligoelementos (Cell-gro®), y 0,014 mg/L a 0,07 mg/L de selenio (Sigma), se combinaron en DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) y la osmolaridad se ajustó a 340 mOsm con NaCl 5M. Se observa que los suplementos vitamínicos en el medio pueden incluir tiamina (6,6 g/L), glutatión reducido (2mg/L) y ácido ascórbico PO₄. Además, los oligoelementos usados en el medio son una combinación de oligoelementos B (Cell-gro®, Cat #: MT 99-175-Cl) y C (Cell-gro®, Cat #: MT 99-176-Cl); cada uno de los cuales se vende como una solución 1,000 X. Es bien sabido en la técnica que los oligoelementos B y C contienen la misma composición que los oligoelementos I y II de Cleveland, respectivamente. (Véase Cleveland, W.L., Wood, I. Erlanger, B.F., J. Imm. Methods 56: 221-234, 1983.) A continuación, se filtró el medio a través de un filtro de nailon de 0,22 μm (Nalgene). Finalmente, se agregaron lípidos estériles definidos (Gibco/Invitrogen) para completar el medio.

Las células madre embrionarias humanas H1 o H9 que previamente se cultivaban en células alimentadoras MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) se pasaron mecánicamente con dispasa (1 mg/ml) y se colocaron en placas sobre Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA). El medio apropiado se cambió diariamente hasta que se determinó que la densidad celular era adecuada para el pase celular. Las células se pasaron a continuación con dispasa como se describe y se mantuvieron en Matrigel (Becton Dickinson).

Tasas de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento de las células ES humanas en los diversos medios, las células se colocaron en placas a una densidad de aproximadamente 5×10^5 células/pocillo por triplicado en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos (Nalgene). En los días 3, 5 y 7, los pocillos triplicados se trataron con tripsina/EDTA (Gibco/Invitrogen), se individualizaron y se contó el número de células. El día 7, se trataron pozos adicionales con tripsina, se contaron y se usaron para volver a sembrar una nueva placa a una densidad celular de aproximadamente 2×10^5 células/pocillo. Los cultivos del día 7, que habían sido procesados con tripsina, se analizaron en busca de marcadores superficiales de células ES Oct4, SSEA4 y Tral-60 mediante análisis FACS. Las tasas de crecimiento se recogieron durante 3 pases consecutivos. Los experimentos de tasa de crecimiento muestran que las células ES humanas cultivadas con UM100 crecen tan sólidamente como las células ES humanas cultivadas con CM.

10

Dinámica de unión

Para determinar la tasa de unión de las células ES humanas en los diversos medios, las células se colocaron en placas a una densidad de aproximadamente 2×10^5 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos (Nalgene). En momentos que varían de 30 minutos a 48 horas, las células no unidas se lavaron y las células unidas se eliminaron con tripsina/EDTA (Gibco/Invitrogen) y se contaron. Estos experimentos se realizaron para examinar si los datos de la tasa de crecimiento con UM100 se debieron a una combinación de mejor unión celular y a un menor crecimiento en comparación con tasas de crecimiento equivalentes para UM100 y CM. Descubrimos que los porcentajes de unión eran equivalentes para ambos medios en todos los momentos. Por lo tanto, crecen al mismo ritmo.

15

Análisis FACS de células ES humanas

Las células ES humanas se eliminaron de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos (Nalgene) con tripsina/EDTA (Gibco/Invitrogen) + suero de pollo al 2% (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH) durante 10 minutos a 37°C . Las células se diluyeron en un volumen igual de tampón FACS (PBS + FBS al 2 % + azida sódica al 0,1 %) y se filtraron a través de un filtro de células 80 μm (Nalgaizene). Los sedimentos se recogieron durante 5 minutos a 1000 RPM y se resuspendieron en 1 ml de paraformaldehído al 0,5 %. Las células ES humanas se fijaron durante 10 minutos a 37°C y los sedimentos se recogieron como se describe. Las células ES se resuspendieron en 2 ml de tampón FACS y se contó el número total de células con un hemocitómetro. Las células se sedimentaron como se describe y se permeabilizaron durante 30 minutos en hielo en metanol al 90 %. Las células ES humanas se sedimentaron como se describe y 1×10^5 células se diluyeron en 1 ml de tampón FACS + Triton X-100 al 0,1 % (Sigma) en un tubo FACS (Becton Dickinson). hESC se sedimentaron como se describe y se resuspendieron en 50 ml de anticuerpo primario diluido en tampón FACS + Triton X-100 al 0,1 % (Sigma). Se aplicaron muestras de anticuerpos de control apropiados en paralelo. Las hESC se incubaron durante la noche a 4°C . Los sobrenadantes se eliminaron y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente en 50 ml de anticuerpo secundario (Molecular Probes/Invitrogen). El análisis FACS se realizó en un clasificador de células Facscalibur (Becton Dickinson) con el software CellQuest (Becton Dickinson). Este procedimiento para realizar el análisis FACS permite detectar marcadores de la superficie celular, para así demostrar que se tienen células ES. El resultado observado fue que las células ES humanas cultivadas en UM100 fueron 90 % positivas para Oct-4 como población. Esto es comparable a las células ES cultivadas con CM y confirma que las células son una población de células ES. Para el análisis de SSEA4 y Tral-60, el proceso se realizó como para Oct-4, excepto que las células no se trataron en paraformaldehído o metanol. Después de la tinción celular, las células se resuspendieron en tampón FACS (sin Triton) y se analizaron como se describe con anticuerpos apropiados en tampón FACS, nuevamente sin Triton. Los cultivos de células ES no diferenciados promediaron aproximadamente un 90 % de resultados positivos para estos dos marcadores de superficie celular también. Esto fue demostrado por el análisis FACS analizado anteriormente.

45

Resultados

Las células de la línea de células ES humanas H1 ahora se han cultivado en el medio UM100 durante más de 33 pases (más de 164 duplicaciones de población) mientras se conserva la morfología y las características de las células ES humanas. Las células H1 se cultivaron en el medio BM+ durante más de 6 pases (70 días) manteniendo la morfología y las características de las células ES humanas. Las células H9 han sido cultivadas en medio DHEM durante más de 5 pases (67 días). Las células ES humanas H9 y H7 también se cultivaron en medio UM100 en un estado indiferenciado durante 22 pases y 21 pases, respectivamente. Los ensayos posteriores de las células cultivadas con BM+ y UM100 establecieron cariotipos normales.

55

El estudio de las formas de células FGF

ES humanas de la línea H1 se cultivó en condiciones estándar en medio acondicionado durante tres pases antes de cambiar a los medios de prueba. Para las condiciones de prueba, las células se cultivaron en medio acondicionado durante 24 horas (día 0) y a continuación se cambiaron a los medios de prueba al día siguiente (día 1). Posteriormente, las células se cultivaron en los respectivos medios de prueba. La línea de células ES humanas H9 también se cultivó

60

en Matrigel en medios acondicionados durante cinco pases antes de cambiar a los medios de prueba en paralelo.

Las células se pasaron usando los siguientes procedimientos. Los cultivos celulares se dejaron crecer a densidades adecuadas (lo cual tomó aproximadamente 7 días) en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos y a continuación, los
5 cultivos se trataron con 1 ml de dipasa (1 mg/ml) (Gibco/Invitrogen) durante 5-7 minutos a 37 °C. A continuación, se eliminó la dipasa y se reemplazó con 2 ml del medio de crecimiento apropiado. Usando una pipeta de 5 ml, las células se eliminaron mecánicamente de la placa de cultivo de tejidos y a continuación, se dispersaron mediante pipeteo. Las células se sedimentaron, a continuación, en una centrífuga clínica durante 5 minutos a 1000 rpm. El sedimento se volvió a suspender en un volumen apropiado de medio y se volvió a colocar en una placa con la dilución deseada.

10

La formulación de los medios fue consistente además de la selección de FGF añadido. El medio base era UM100, siendo el FGF variable dependiendo de la condición de prueba deseada. Se probaron las siguientes variantes de FGF, cada una añadida al medio a 100 ng/ml: FGF1 (FGF ácido), FGF1 β (isoforma de FGF ácido), FGF2 (FGF básico), FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20. Todos los FGF se
15 adquirieron comercialmente o se produjeron en huéspedes recombinantes.

Se valoró la competencia de la forma particular de FGF para soportar cultivos de células ES humanas después de cada pase. Las condiciones que se consideraron capaces de admitir cultivos soportados por cultivo de células ES humanas que proliferaron adecuadamente en un estado no diferenciado en el cultivo, independiente de las células
20 alimentadoras, se pudieron superar de manera efectiva y continuaron expresando los marcadores de células ES humanas Oct4, SSEA4 y Tra1-60. Las condiciones que se consideraron como no capaces de admitir células ES humanas en cultivo dieron lugar a cultivos en los que la diferenciación significativa de las células era evidente por observación morfológica, y las células no podían proliferar tras el pase de la colonia. Las variantes de FGF que soportaron el cultivo de células ES humanas fueron FGF2, FGF4, FGF17 y FGF18. Las variantes de FGF que no
25 admitían el mantenimiento de las células ES humanas en un estado no diferenciado fueron FGF1, FGF1B, FGF3, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF10, FGF16, FGF19 y FGF20. Los resultados para el medio con FGF9 agregado estaban inicialmente en el margen. Al repetir el procedimiento, parece probable que el FGF9 suplementado a 100 ng/ml también pueda admitir células ES humanas no diferenciadas en cultivo.

30 En la actualidad, los medios complementados con FGF4, FGF17 y FGF20 han admitido cultivos de células ES humanas no diferenciadas de células H1 durante 8 pases. Las réplicas similares con FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18 en las líneas de células ES humanas H9 y H14 se han extendido por 3 y 2 pases respectivamente.

Si bien el factor de crecimiento de fibroblastos humano básico producido recombinantemente se usó en los
35 experimentos anteriores, el factor de crecimiento de fibroblastos aislado naturalmente también debería ser adecuado.

Aplicación industrial

La presente invención proporciona procedimientos para cultivar células madre embrionarias de primates y medios de
40 cultivo para su uso con las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo que comprende albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo libre de suero animal y conteniendo al menos 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos seleccionado de entre el grupo que consiste en FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, el medio adecuado para cultivar células madre embrionarias de primates en ausencia de suero y en ausencia de células alimentadoras y también en ausencia de medio expuesto a células alimentadoras, donde al menos el 90 % de las células madre en el medio de cultivo expresan Oct-4, SSEA4 o Tral-60.
2. El medio de la reivindicación 1, donde las células madre embrionarias de primates son células madre embrionarias humanas.
3. El medio de la reivindicación 1 o 2, donde el factor de crecimiento de fibroblastos está presente en una concentración de 100 ng/ml.
4. Un procedimiento para cultivar células madre embrionarias de primates, que comprende: cultivar las células madre en un cultivo libre de suero fetal de mamífero y en un medio de cultivo de células madre que incluye aminoácidos, vitaminas, sales, minerales, transferrina o un sustituto de transferrina, insulina o un sustituto de insulina, albúmina, y una concentración mínima del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) de 100 ng/ml, donde el FGF se selecciona de entre el grupo que consiste en FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, y donde el medio es capaz de soportar el cultivo y la proliferación de células madre pluripotentes euploides proliferativas indiferenciadas humanas, sin células alimentadoras o exposición del medio a células alimentadoras, y donde al menos el 90 % de las células madre en el cultivo expresan Oct-4, SSEA4 o Tral-60.
5. Un procedimiento para cultivar células madre embrionarias de primates en medios definidos sin suero y sin células alimentadoras, comprendiendo el procedimiento: cultivar las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o un sustituto de insulina, el medio de cultivo libre de suero fetal de mamífero y conteniendo al menos 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos seleccionado de entre el grupo que consiste en FGF4, FGF9, FGF17 y FGF18, soportando el medio la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células alimentadoras o medio acondicionado, y donde al menos el 90 % de las células madre en el cultivo expresan Oct-4, SSEA4 o Tral-60.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, donde dicha etapa de cultivo incluye las células madre embrionarias que proliferan en cultivo durante más de un mes mientras se mantiene el potencial de las células madre para diferenciarse en derivados de tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo, y mientras se mantiene el cariotipo de las células madre.