

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 942**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 15/08 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2001** **E 01986488 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 1337632**

54 Título: **Células diferenciadas adecuadas para tratamiento humano**

30 Prioridad:

27.11.2000 US 253443 P

27.11.2000 US 253357 P

13.02.2001 US 783203

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.09.2015

73 Titular/es:

ASTERIAS BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
230 Constitution Drive
Menlo Park, CA 94025, US

72 Inventor/es:

GOLD, JOSEPH D. y
LEBKOWSKI, JANE S.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 544 942 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

Células diferenciadas adecuadas para tratamiento humano.

5 Campo técnico

Esta invención se refiere en general a activar vectores víricos controlados. Más específicamente, describe una tecnología para retirar células no diferenciadas de poblaciones procedentes de células madre pluripotentes usando vectores líticos expresados de manera selectiva.

10 Antecedentes

Las células precursoras se han convertido en una preocupación principal en investigación médica. Muchos tejidos en el cuerpo tienen un depósito de reserva de precursores que pueden reemplazar células que son senescentes o están dañadas por lesión o enfermedad. Recientemente se ha realizado un considerable esfuerzo para aislar precursores de una serie de diferentes tejidos para uso en medicina regenerativa.

La Patente de EE.UU. 5.750.397 (Tsukamoto et al., Systemix) indica aislamiento y crecimiento de células madre hematopoyéticas humanas que son Thy-1+, CD34+ y son capaces de diferenciación en linajes linfoides, eritroides y mielomonocíticos. La Patente de EE.UU. 5.736.396 (Bruder et al.) indica métodos para diferenciación dirigida al linaje de células madres mesenquimales humanas, aisladas, usando un factor bioactivo apropiado. Las células derivadas se pueden introducir después en un huésped para regeneración o reparación de tejido mesenquimal.

La Patente de EE.UU. 5.716.411 (Orgill et al.) propone regenerar la piel en el sitio de una quemadura o herida, usando un autoinjerto epitelial. La Patente de EE.UU. 5.766.948 (F. Gage) indica un método para producir neuroblastos a partir de tejido cerebral animal. La Patente de EE.UU. 5.672.499 (Anderson et al.) indica obtener células madre de cresta neural de tejido embrionario. La Patente de EE.UU. 5.851.832 (Weiss et al., Neurospheres) indica aislamiento de células madre neurales putativas de fetos humanos de 8-12 semanas. La Patente de EE.UU. 5.968.829 (M. Carpenter) indica células madre neurales humanas procedentes de tejido del sistema nervioso central principal.

La Patente de EE.UU. 5.082.670 (F. Gage) indica un método para injertar células genéticamente modificadas para tratar defectos, enfermedad o daño del sistema nervioso central. Auerbach et al. (Eur. J. Neurosci. 12: 1.696, 2.000) indican que las células del SNC multipotenciales implantadas en cerebros de animales forman neuronas eléctricamente activas y funcionalmente conectadas. Brustle et al. (Science 285: 754, 1.999) indican que las células precursoras derivadas de células madres embrionarias interactúan con neuronas huésped y mielinizan con eficacia los axones en el cerebro y la médula espinal.

Se ha generado un considerable interés por el desarrollo de células madre embrionarias, que se piensa que tienen el potencial para diferenciarse que muchos tipos de células. Se realizó un trabajo inicial sobre células madre embrionarias en ratones. Las células madre de ratón pueden ser aisladas de tanto células embrionarias tempranas como tejido germinal. Las características deseables de las células madre pluripotentes son que sean capaces de proliferación in vitro en un estado no diferenciado, que retengan un cariotipo normal y que retengan el potencial para diferenciarse a derivados de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).

El desarrollo de preparaciones de células madre pluripotentes humanas está considerablemente menos avanzado que el trabajo con células de ratón. Thomson et al., propagaron células madre pluripotentes de primates inferiores (Patente de EE.UU. 5.843.780; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7.844, 1.995) y después de seres humanos (Science 282: 114, 1.998). Gearhart y colaboradores derivaron estirpes celulares germinales embrionarias humanas (hEG, por sus siglas en inglés) de tejido gonadal fetal (Shamblo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13.726, 1.998 y Patente de EE.UU. 6.090.622).

Tanto las células hES como las hEG presentan las características buscadas desde hace mucho tiempo de las células madres pluripotentes: se pueden cultivar in vitro sin diferenciación, presentan un cariotipo normal y se mantienen capaces de producir una serie de tipos diferentes de células. Las estirpes de células madre embrionarias humanas clonalmente derivadas mantienen pluripotencia y potencial proliferativo durante periodos prolongados en cultivo (Amit et al., Dev. Biol. 227: 271, 2.000). Estas células implican una considerable promesa para uso en tratamiento humano, actuando como depósito para regeneración de casi cualquier tejido comprometido por anomalía genética, traumatismo o una enfermedad.

La Publicación de Patente Internacional WO 99/20741 (Geron Corp.) se refiere a métodos y a materiales para cultivar células madre primordiales derivadas de primate. En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para cultivar células madre primordiales derivadas de primate en un estado sustancialmente no diferenciado, con una presión osmótica baja y niveles bajos de endotoxina. El medio básico se combina con un suero de nutriente eficaz para soportar el crecimiento de las células madre primordiales derivadas de primate y un sustrato de células alimentadoras o un componente de matriz extracelular derivado de células alimentadoras. El medio puede incluir

además aminoácidos no esenciales, un antioxidante y factores de crecimiento que son nucleósidos o una sal de piruvato.

5 Un reto significativo para el uso de células madre para tratamiento es controlar el crecimiento y la diferenciación en el tipo particular de tejido requerido para tratamiento de cada paciente.

10 La Patente de EE.UU. 4.959.313 (M. Taketo, Jackson Labs) proporciona una secuencia potenciadora particular que produce la expresión de un gen exógeno o recombinante de franqueo a partir de un activador que acompaña al gen que no produce normalmente expresión en células no diferenciadas. La Patente de EE.UU. 5.639.618 (D. A. Gay, Plurion Inc.) propone un método para: aislar una célula madre específica del linaje in vitro, en el que se transfecta una célula madre embrionaria pluripotente con una construcción en que un elemento genético específico del linaje se une de manera operable a un gen indicador, cultivar la célula en condiciones en que la célula se diferencie y después de separación de las células que expresan el indicador se separen de otras células.

15 La Patente de EE.UU. 6.087.168 (Levesque et. al., Cedars Sinai Med. Ctr.) se refiere a transdiferenciar células epidérmicas en neuronas viables útiles para tanto tratamiento de células como tratamiento de genes. Las células de la piel se transfectan con un factor de transcripción neurogénico y se cultivan en un medio que contiene un oligonucleótido antisentido que corresponde a un regulador negativo de diferenciación neuronal.

20 La Publicación de Patente Internacional WO 97/32025 (McIvor et al., U. Minnesota) propone un método para injertar células madre hematopoyéticas resistentes a fármacos. Las células en el injerto son aumentadas por un gen de resistencia a fármacos (tal como dihidrofolato reductasa resistente a metotrexato), bajo el control de un activador funcional en células madre. Las células son administradas a un mamífero, que después se trata con el fármaco para incrementar el injerto de células transgénicas en relación a las células no transgénicas.

25 La Publicación de Patente Internacional WO 98/39427 (Stein et al., U. Massachusetts) se refiere a métodos para expresar genes exógenos en células diferenciadas tal como tejido esquelético. Las células madre (por ejemplo, de médula ósea) se ponen en contacto con un ácido nucleico en el que el gen se une a un elemento que controla la expresión en células diferenciadas. Es ejemplar el activador de osteocalcina de rata. La Publicación de Patente Internacional WO 99/10535 (Liu et al., Yale U.) propone un procedimiento para estudiar los cambios en la expresión de los genes en células madre. Se prepara un perfil de expresión de genes de una población de células madre y después se compara a un perfil de expresión de genes de células diferenciadas.

30 La Publicación de Patente Internacional WO 99/19469 (Braetscher et al., Biotransplant) se refiere a un método para cultivar células madres embrionarias pluripotentes del cerdo. Se inserta un gen marcador seleccionable en las células de manera que se regule mediante un control o secuencia activadora en las células ES, ejemplificado por el activador OCT-4 porcino.

35 La Publicación de Patente Internacional WO 00/15764 (Smith et al., U. Edinburgh) se refiere a propagación y derivación de células madres embrionarias. Las células se cultivan en presencia de un compuesto que inhibe de manera selectiva la propagación o la supervivencia de células distintas de las células ES por inhibición de una ruta de señalización esencial para que se propaguen las células diferenciadas. Son ejemplares los compuestos que inhiben SHP-2, MEK o la cascada ras/MAPK.

40 Klug et al. (J. Clin. Invest. 98: 216, 1.996) propone una estrategia para seleccionar de manera genética cardiomiocitos de células madre embrionarias de ratón de diferenciación. Se transfectó de manera estable un gen de fusión que consistía en el activador de cadena pesada de α -miosina cardíaca y un ADNc que codifica aminoglicósido fosfotransferasa, en las células ES. Las estirpes resultantes se diferenciaron in vitro y se seleccionaron usando G418. Se indicó que los cultivos de cardiomiocitos seleccionados eran altamente diferenciados. Cuando se volvió a injertar en ratones, los injertos de cardiomiocitos derivados de ES fueron detectables tanto tiempo como 7 semanas después de implantación.

45 Schuldiner et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11.307, 2.000) indican los efectos de ocho factores de crecimiento sobre la diferenciación de células de células madre embrionarias humanas. Después de iniciar la diferenciación a través de formación de cuerpos embrioides, se cultivaron las células en presencia de bFGF, TGF- β 1, activina-A, BMP-4, HGF, EGF, β NGF o ácido retinoico. Cada factor de crecimiento presentó un efecto único sobre la ruta de diferenciación, pero ninguno de los factores de crecimiento dirigió la diferenciación exclusivamente a un tipo de célula.

50 Hay una necesidad de nuevas propuestas para generar poblaciones de células diferenciadas adecuadas para administración humana.

Sumario de la invención

65 Se describe un sistema para agotar células relativamente no diferenciadas de una población de células heterogénea, tal como se puede obtener por diferenciación de células madre. La población se trata con un vector que pone un gen

efector letal o potencialmente letal bajo control de un elemento génico que permite que el gen se exprese a un nivel superior en la subpoblación no diferenciada. Esto produce una población relativamente enriquecida para células maduras y adecuada para uso en medicina regenerativa.

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende la estructura P-X, donde X es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto que es letal para una célula en la que se expresa o hace una célula en la que se expresa susceptible de un efecto letal de un agente externo y P es un elemento de control transcripcional que hace que X se exprese preferentemente en células madre pluripotentes de primate (pPS, por sus siglas en inglés) no diferenciadas. La línea de conexión en P-X indica que los elementos genéticos están unidos de manera operable, sean o no adyacentes en la molécula de ácido nucleico.

X es referido en la descripción que sigue como una secuencia efectora. X puede codificar una toxina, una proteína que induzca o medie la muerte celular programada o una enzima (tal como timidina cinasa) que convierta un profármaco (tal como ganciclovir) en un compuesto que sea letal para una célula en que se expresa X. Se proporcionan otros ejemplos más adelante en esta descripción.

En algunas realizaciones, P-X es una molécula heteróloga introducida, que significa que la célula o sus ascendientes fueron modificados genéticamente con un vector que comprende P-X. En otras realizaciones, P es un elemento de control transcripcional endógeno. Después de transfección, X puede ser expresado de manera transitoria en células no diferenciadas en la población o P-X puede ser heredable y ser expresado en progenie no diferenciada. Ejemplos no limitantes para P incluyen el activador OCT-4 y el activador de telomerasa transcriptasa inversa (TERT, por sus siglas en inglés). Las células también pueden contener un gen Y de resistencia a fármacos bajo control de P, representado en esta descripción como P-X-Y, que indica una relación funcional donde P regula la transcripción de tanto X como Y, estando los elementos en cualquier orientación en la secuencia que une las funciones de esta manera.

También se describen vectores de polinucleótidos adaptados para modificar genéticamente células madre de este modo.

Se modifican genéticamente las células madre en la población de manera que contengan una molécula de ácido nucleico comprendiendo la estructura P-X como ya se describió. De esta manera, un gen que es letal para una célula en que se expresa, o la hace susceptible de un efecto letal de un agente externo, se pone bajo control de un elemento de control transcripcional que hace que el gen se exprese de manera preferente en células no diferenciadas. La población de células se puede modificar genéticamente cuando aún sean predominantemente no diferenciadas (antes de que se haga que se diferencien) o cuando ya comprenda predominantemente células diferenciadas.

Si X es letal para la célula, entonces las células madre no diferenciadas se pueden agotar simplemente por cultivo de la población de células en condiciones donde se exprese X. Si X hace la célula susceptible de efectos letales de un agente externo (tal como un fármaco o profármaco), entonces se agotan las células madre no diferenciadas por combinación de las células con el agente externo. Esto se puede hacer poniendo en contacto las células in vitro con el agente en cultivo de tejido, o administrando las células al individuo de manera simultánea o de manera secuencial con el agente externo, si no está ya presente.

Los reactivos de esta invención pueden actuar sobre poblaciones celulares que contengan cualquier tipo de células madre. Son especialmente adecuados para aplicación a células madre pluripotentes de primate, tales como las células madre embrionarias humanas.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la descripción que sigue.

Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 proporciona un análisis de expresión de OCT-4 y hTERT en células hES cultivadas con células alimentadoras (mEF) o matriz extracelular (Matrigel® o laminina) con medio regular (MR) o medio condicionado (MC). El panel superior es una copia de un gel que muestra la expresión de OCT-4 y hTERT al nivel de ARNm por RT-PCR. El panel inferior es un gráfico de barras que compara el nivel de expresión para células cultivadas en diferentes sustratos, expresado como la relación de OCT-4 o hTERT al patrón 18s. Las células hES cultivadas en Laminina y Matrigel® en medio condicionado presentan patrones de expresión similares a los de células cultivadas sobre una capa alimentadora.

La Figura 2 es una reproducción en medios tonos de un gel que muestra actividad de telomerasa medida en células hES cultivadas por ensayo de actividad TRAP. Todas las condiciones de cultivo mostraron actividad positiva de la telomerasa después de 40 días en cultivo sin alimentador.

La Figura 3 es una reproducción en medios tonos que muestra la expresión del gen indicador de GFP en células hES transducidas con retrovirus y después diferenciadas. Las células hES fueron transferidas a cultivo en suspensión para formar cuerpos embrioides, cultivados durante unos 4 días adicionales, se volvieron a poner en placas sobre extensiones recubiertas de gelatina y se cultivaron durante una semana y

después se fijaron y se fotografiaron bajo fluorescencia para expresión de GFP. Los paneles a la izquierda muestran iluminación de campo brillante; los paneles a la derecha muestran fluorescencia debido a expresión de GFP.

La Figura 4 muestra los resultados de un estudio en que se modificaron genéticamente de manera transitoria células hES en cultivo sin alimentador por lipofección. El panel A es una reproducción en medios tonos de una micrografía de luz que muestra la morfología de células hES sobre laminina después de haber sido transfectadas. El panel B es una reproducción en medios tonos de una micrografía de fluorescencia que muestra expresión de GFP en la misma colonia. El panel C es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células que expresan GFP en diversas condiciones.

La Figura 5 es un mapa de vector T_{PAC} denominado pGRN376. Este es un vector de adenovirus de 7.185 pb que comprende el gen de la timidina cinasa (*tc*) de herpes simple bajo control de un activador tomado de la secuencia aguas arriba del gen humano para telomerasa transcriptasa inversa (hTERT). La expresión de *tc* es activada en células que expresan hTERT, tales como células madres embrionarias no diferenciadas.

La Figura 6 es un gráfico lineal de dos paneles, que muestra el efecto del vector de la timidina cinasa T_{PAC} sobre células hES no diferenciadas. 48 h después de volver a ponerlas en placas, se transdujeron las células con vector T_{PAC} a un MOI de 30 ó 100, o se simuló la transducción (no vector añadido). Cuatro h después, se cambiaron las células a medio fresco que contenía el profármaco ganciclovir (GCV). El día 3, los pozos tratados con vector T_{PAC} + GCV contenían 8% tantas células como los pozos de control.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra la valoración de GCV en células hES tratadas con vector T_{PAC}. 4 h después de transducción con el vector, se añadió medio fresco que contenía GCV a la concentración mostrada. GCV -20 µM fue óptimo en las condiciones ensayadas.

La Figura 8 es un gráfico de barras de dos paneles que muestra la valoración de GCV sobre células hES transducidas y simulada la transducción de vector T_{PAC} de dos estirpes diferentes. Ambas estirpes son sensibles a GCV después de tratamiento con el vector T_{PAC}.

La Figura 9 muestra el efecto de tratamiento de T_{PAC} + GCV en poblaciones de células mixtas obtenidas de diferenciación de células hES. Se alimentaron las células a diario con medio condicionado para mantener el estado no diferenciado o con ácido retinoico 500 nM o DMSO al 0,5%, para inducir diferenciación en células comprometidas de fenotipo mixto. 7 días más tarde, se infectaron con el vector T_{PAC} a un MOI de 30, más GCV 20 µM. El Panel Superior es un gráfico de barras que muestra el número de células que sobreviven en cultivo. El tratamiento con T_{PAC} + GCV eliminó células cultivadas en cada condición. En cada caso, el cultivo de células supervivientes produjo poblaciones que parecían altamente diferenciadas y sustancialmente exentas de morfología no diferenciada. El Panel Inferior es una reproducción en medios tonos de un gel que muestra análisis RT-PCR de las células supervivientes. Esas células cultivadas con medio condicionado (mEF-MA) o DMSO no presentaron expresión detectable de OCT-4, mientras 2 de cada 4 muestras tratadas con ácido retinoico (AR) mostraron productos de multiplicación consistentes con niveles muy bajos de expresión de OCT-4.

La Figura 10 es una micrografía reproducida de una estirpe celular hES que ha sido transducida por combinación con un vector de adenovirus de control (Panel A) o pGRN376 (Panel B), que contiene el gen de la *tc* bajo control del activador de TERT. Los dos pozos de células transducidas se cultivaron durante 3 días en un medio que contenía ganciclovir. Se observaron colonias no diferenciadas típicas de cultivos de células hES normales en los pozos de control. En los pozos tratados con pGRN376, desapareció la mayoría o todas las colonias de células ES no diferenciadas y sólo quedaron células diferenciadas.

La Figura 11 es una gráfica lineal de dos paneles que muestra la sensibilidad a fármacos de células no diferenciadas que contienen el gen de la timidina cinasa conducido por activador de telomerasa (T_{PAC}). Los paneles superior e inferior muestran sensibilidad a los profármacos ganciclovir (GCV) y (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), respectivamente. Ganciclovir a una concentración tan baja como 2,5 µM destruye virtualmente todas las células ES T_{PAC} no diferenciadas en ~4 días.

La Figura 12(A) y (B) comprende reproducciones en blanco y negro de micrografías de fluorescencia de células ES diferenciadas. Las estirpes celulares H9-376m-18, H9-376m-62 y H9-376m-6 contienen el gen de T_{PAC}; H9-pGK-neo-1 es la estirpe celular de control transfectada sólo con el plásmido de selección de fármaco. Las células transfectadas de manera estable se diferenciaron en cuerpos embrioides y se pusieron en placas para análisis de inmunocitoquímica. Al menos tres de las estirpes de células madre que contenían T_{PAC} mostraron áreas que teñían la actina específica del músculo, α-fetoproteína, β-tubulina y troponina cardíaca I, representativo de las tres capas germinativas embrionarias.

Descripción detallada de la invención

Las células madre de diversos tipos se han convertido en una modalidad extremadamente atractiva en medicina regenerativa. Se pueden hacer proliferar en cultivo y después diferenciar in vitro o in situ en los tipos de células necesarios para el tratamiento. Recientemente, se ha demostrado que las células madre embrionarias humanas expresan de manera continua un alto nivel de telomerasa, permitiéndoles mantener la longitud del telómero y crecer casi indefinidamente en cultivo.

Hasta ahora, los esfuerzos para diferenciar células madre se han dirigido principalmente hacia la identificación de condiciones de cultivo que favorezcan la excrecencia de una población de células con características fenotípicas de un tipo de tejido deseable para medicina regenerativa. Schuldiner et al. (*supra*) indican los efectos de factores de

crecimiento sobre la diferenciación de células madre embrionarias humanas. En la Patente de EE.UU. 5.639.613, se transfectan células madre con un gen específico del linaje que está unido de manera operable a un gen indicador, que se usa después para seleccionar células que expresan el indicador. En la patente internacional WO 97/32025, se aumentan las células madre hematopoyéticas mediante un gen de resistencia a fármacos y después se injertan en un individuo. Las células son administradas a un mamífero, que se trata después con el fármaco para incrementar el injerto de células transgénicas. Klug et al. (*supra*) usaron una construcción en la que el activador de cadena pesada de α -miosina cardíaca controló la expresión de aminoglicósido fosfotransferasa. Se seleccionaron células diferenciadas transfectadas usando G418, que produjo estirpes de células de tipo cardiomiocito. Esta es una estrategia de selección positiva que usa patrones de expresión de genes del tipo de tejido deseado para permitir la supervivencia preferente de tejido diferenciado.

Es una hipótesis de esta invención que algunas de las poblaciones de células diferenciadas producidas usando cultivo adaptativo y métodos de selección positivos serán subóptimas para uso en tratamiento humano. En algunas circunstancias, las células no diferenciadas en la población pueden debilitar el injerto o la función de las células in vivo. Las células no diferenciadas también pueden incrementar la posibilidad de un tumor maligno u otro tumor que se forme en el sitio del implante terapéutico o por migración de células trasplantadas.

Esta invención se refiere a una estrategia en que las células no diferenciadas que quedan en dichas poblaciones de células diferenciadas se pueden agotar. Esto se efectúa por modificación genética de las células, de manera que un gen que es letal para una célula en que se expresa o la hace susceptible de un efecto letal de un agente externo, se pone bajo control transcripcional de un elemento genético que hace que se exprese preferentemente en cualquier célula no diferenciada en la población. Esta es una estrategia de selección negativa, diseñada para minimizar la proporción de células no diferenciadas. Es posible combinar esta técnica con técnicas de selección positiva de diversas clases, para obtener poblaciones relativamente puras del tipo de tejido deseado que estén sustancialmente exentas de células no diferenciadas.

Como una validación no limitante de la invención, las células madre embrionarias humanas (hES) han sido transducidas con un vector de adenovirus (T_{PAC}) en que se pone un gen de la timidina cinasa de virus del herpes bajo control de una secuencia activadora para telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). Las células hES expresan de manera constitutiva hTERT, pero esta capacidad se pierde en la diferenciación. El Ejemplo 10 de referencia (Figuras 6-8) muestra que la transducción de células hES con vector T_{PAC} hace las células no diferenciadas susceptibles de letalidad por el profármaco ganciclovir, un sustrato para timidina cinasa, a una concentración de $\sim 20 \mu M$. El Ejemplo 11 de referencia (Figura 9) muestra que cuando se transducen células hES con vector T_{PAC} y después se diferencian con DMSO, no hay células supervivientes con expresión detectable de OCT-4 (un fenotipo de células no diferenciadas).

Las técnicas descritas en la presente memoria se diseñan en parte para proporcionar poblaciones de células con características mejoradas para tratamiento humano. Después de agotar las células no diferenciadas, se espera que la población diferenciada posea mejores características funcionales y de injerto y presente un riesgo reducido de crear arquitectura de tejido no deseada y tumores malignos en el individuo tratado. Además, las poblaciones de células con células no diferenciadas agotadas son más homogéneas, lo que proporciona una ventaja distinta para aplicaciones no terapéuticas, tales como producir anticuerpo, bibliotecas de ADNc e investigar candidatos de fármacos.

Definiciones

Las "Células Madre Pluripotentes de primate" de prototipo (células pPS) son células pluripotentes procedentes de tejido preembrionario, embrionario o fetal en cualquier momento después de la fertilización y presentan la característica de ser capaces en las condiciones apropiadas de producir progenie de varios tipos de células diferentes que son derivados de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), según un ensayo aceptado en la técnica clásica, tal como la capacidad para formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas.

Se incluyen en la definición de células pPS células embrionarias de varios tipos, ejemplificados por células madre embrionarias humanas (hES), descritas por Thomson et al. (*Science* 282: 1.145, 1.998); células madre embrionarias de otros primates, tales como células madre de Rhesus (Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7.844, 1.995), células madre de tití (Thomson et al., *Biol. Reprod.* 55: 254, 1.996) y células germinales embrionarias humanas (hEG) (Shamblott et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13.726, 1.998). Otros tipos de células pluripotentes también se incluyen en el término. Se incluyen todas las células de origen primate que sean capaces de producir progenie que sean derivadas de las tres capas germinales, sin tener en cuenta si proceden de tejido embrionario, tejido fetal u otras fuentes. Esta especificación se refiere a células pPS que no procedan de una fuente maligna. Es deseable (pero no siempre necesario) que las células sean cariotípicamente normales.

Se describen cultivos de células pPS como "no diferenciados" cuando una proporción sustancial de células madre y sus derivadas en la población presentan características morfológicas de células no diferenciadas, distinguiéndose claramente de células diferenciadas de origen embrión o de adulto. Las células pPS no diferenciadas se reconocen fácilmente por los expertos en la materia y aparecen típicamente en las dos dimensiones de una vista microscópica

en colonias de células con altas relaciones nuclear/citoplasmática y nucleolos prominentes. Se entiende que las colonias de células no diferenciadas dentro de la población con frecuencia estarán rodeadas por células vecinas que sean diferenciadas. Sin embargo, las colonias no diferenciadas persisten cuando se cultiva la población o se hacen pases en las condiciones apropiadas y las células no diferenciadas individuales constituyen una proporción sustancial de la población celular. Los cultivos que están sustancialmente no diferenciados contienen al menos 20% de células pPS no diferenciadas y pueden contener al menos 40%, 60% u 80% en orden de preferencia creciente. Siempre que se refiera un cultivo o población celular en esta descripción como proliferación "sin diferenciación", lo que se quiere decir es que después de proliferación, la composición es sustancialmente no diferenciada de acuerdo con la definición precedente.

"Células alimentadoras" o "alimentadores" son términos usados para describir células de un tipo que se cultivan conjuntamente con células de otro tipo, para proporcionar un entorno en el que las células del segundo tipo puedan crecer. Las células alimentadoras son opcionalmente de una especie diferente que las células que están soportando. Por ejemplo, ciertos tipos de células pPS se pueden soportar por fibroblastos embrionarios de ratón primarios, fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados o células de tipo fibroblasto humano diferenciadas de células hES, como se describe más adelante en esta descripción. Se dice que las poblaciones de células pPS están "esencialmente exentas" de células alimentadoras si las células han sido cultivadas a través de al menos un ciclo después de la división en que no se añaden células alimentadoras frescas para soportar el crecimiento de la pPS. Los cultivos esencialmente exentos de células alimentadoras contienen menos de aproximadamente 5% de células alimentadoras. Siempre que un cultivo o una población celular se refiera en esta descripción como "exento de alimentador", lo que se quiere decir es que la composición está esencialmente exenta de células alimentadoras de acuerdo con la definición precedente, sujeta sólo a restricciones adicionales requeridas de manera explícita.

El término "cuerpos embrioides" es un término de sinónimo de la técnica con "cuerpos agregados". Los términos se refieren a agregados de células diferenciadas y no diferenciadas que aparecen cuando se multiplican células pPS en cultivos monocapa o se mantienen en cultivos en suspensión. Los cuerpos embrioides son una mezcla de diferentes tipos de células, típicamente de varias capas germinativas, distinguibles por criterios morfológicos.

Los términos "células precursoras comprometidas", "células precursoras de linaje restringido" y "células de linaje de desarrollo restringido" se refieren todos a células que son capaces de proliferar y diferenciarse en diversos tipos de células diferentes, con un intervalo que es típicamente más limitado que las células madre pluripotentes de origen embrionario capaces de dar lugar a progenie de las tres capas germinativas. Ejemplos no limitantes de células precursoras comprometidas incluyen células hematopoyéticas, que son pluripotentes para varias células sanguíneas; progenitores de hepatocitos que son pluripotentes para células epiteliales de las vías biliares y hepatocitos y células madres mesenquimales. Otro ejemplo son células neurales restringidas, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos y precursores neuronales que progresan a neuronas.

Para los fines de esta descripción, el término "célula madre" puede referirse a una célula madre pluripotente o una célula precursora comprometida, ambas como se definió anteriormente. Mínimamente, una célula madre presenta la capacidad para proliferar y formar células de más de un fenotipo diferente y también es capaz de auto-renovación - como parte del mismo cultivo o cuando se cultiva en diferentes condiciones. Las células madre embrionarias se pueden identificar como positivas para la enzima telomerasa.

Como se usa en esta descripción, "diferenciada" y "no diferenciada" son términos relativos dependiendo del contexto en que se usen. Específicamente, en referencia a un tipo particular de célula madre auto-renovadora, el término "no diferenciada" se refiere de nuevo a la misma célula madre auto-renovadora, mientras el término "diferenciada" se refiere a uno o más de los fenotipos relativamente maduros que puede generar la célula madre - como es apreciable por criterios morfológicos, marcadores antigénicos y transcripciones génicas que producen. Las células pPS no diferenciadas presentan la capacidad para diferenciarse en tres capas germinativas. Las células diferenciadas de ellas no y se pueden reconocer fácilmente por un experto en la materia por criterios morfológicos.

Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Se incluyen genes y fragmentos de genes, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN y ARN aislados, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Como se usa en esta descripción, el término polinucleótidos se refiere de manera intercambiable a moléculas bicatenarias y monocatenarias. A menos que se especifique o se requiera de otro modo, cualquier realización de la invención que sea un polinucleótido incluye tanto una forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o previstas para constituir la forma bicatenaria. Se incluyen análogos de ácidos nucleicos tales como fosporamidatos y tiofosforamidatos.

Se dice que una célula es "modificada genéticamente", "transinfectada" o "genéticamente transformada" cuando un polinucleótido ha sido transferido a la célula por cualquier medio adecuado de manipulación artificial o en el caso de que la célula sea una progenie de la célula modificada originalmente que haya heredado el polinucleótido. El polinucleótido con frecuencia comprenderá una secuencia que se pueda transcribir que codifique una proteína de

interés, que permita que la célula exprese la proteína a un nivel elevado. Se dice que la modificación genética es "heredable" si la progenie de la célula modificada tiene la misma modificación.

Un "elemento de control" o una "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, tal como replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción o degradación del polinucleótido. Los elementos de control transcripcionales incluyen activadores, potenciadores y represores.

Las secuencias de genes particulares referidas como activadores, como el "activador de TERT" o el "activador de OCT-4", son secuencias de polinucleótidos derivadas del gen referido que activa la transcripción de un producto de expresión génica unido de manera operable. Se reconoce que varias porciones de la secuencia génica no traducida aguas arriba y de intrones puede contribuir en algunos casos a aumentar la actividad y que todas o cualquier subconjunto de estas porciones puede estar presente en la construcción lograda genéticamente referida. El activador puede estar basado en la secuencia génica de cualquier especie que tenga el gen, a menos que se restrinja de manera explícita y puede incorporar cualquier adición, sustitución o supresión deseable, en tanto que la capacidad para activar la transcripción en el tejido objetivo. Las construcciones genéticas diseñadas para tratamiento de seres humanos comprenden típicamente un segmento que es al menos 90% idéntico a una secuencia activadora de un gen humano. Se puede ensayar en una secuencia particular su actividad y especificidad, por ejemplo, por unión de manera operativa a un gen indicador (Ejemplo 9).

Se dice que los elementos genéticos están "unidos de manera operable" si están en una relación estructural que les permita operar de una manera de acuerdo con su función esperada. Por ejemplo, si un activador ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificadora, la secuencia codificadora se puede referir como unida de manera operativa a (o bajo control de) el activador. Puede haber secuencia de intervención entre el activador y la región codificadora siempre que se mantenga esta relación funcional.

En el contexto de secuencias codificadoras, activadores y otros elementos genéticos, el término "heterólogo" indica que el elemento procede de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un activador o gen introducido por técnicas de ingeniería genética en un animal de una especie diferente se dice que es un polinucleótido heterólogo. Un elemento genético "endógeno" es un elemento que está en el mismo sitio en el cromosoma donde se encuentra en la naturaleza, aunque otros elementos se pueden introducir de manera artificial en una posición vecina.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera indistinta en esta descripción para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados, puede ser lineal o ramificado y puede ser interrumpido por no aminoácidos.

Técnicas generales

Para elaboración adicional de técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el profesional habilitado puede referirse a libros de texto clásicos y revisiones en biología celular, cultivo de tejidos y embriología. Se incluyen Teratocarcinomas y células madre embrionarias: A practical approach (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1.987); Guide to Techniques in Mouse Development (P. M. Wasserman et al., eds., Academic Press 1.993); Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro (M. V. Wiles, Met. Enzymol. 225: 900, 1.993); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (P. D. Rathjen et al., Reprod. Fertil. Dev. 10: 31, 1.998). La diferenciación de células madre se revisa en Robertson, Met. Cell Biol. 75: 173, 1.997 y Pedersen, Reprod. Fertil. Dev. 10: 31, 1.998.

Los métodos en genética molecular e ingeniería genética se describen en general en las ediciones actuales de Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook et al.); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed.); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller & Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición, (F. M. Ausubel et al., eds.) y Recombinant ADN Methodology (R. Wu ed., Academic Press). Los reactivos, vectores de clonación y estuches para manipulación genética referidos en esta descripción están disponibles de vendedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y ClonTech.

Las técnicas generales en cultivo celular y colección de medios se indican en líneas generales en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8: 148, 1.997); Serum-free Media (K. Kitano, Biotechnology 17: 73, 1.991); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2: 375, 1.991) y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19: 251, 1.990). Otras observaciones acerca de los medios y su impacto sobre el entorno de cultivo se han hecho por Marshall McLuhan y Fred Allen.

Fuentes de células madre

Esta invención se puede poner en práctica usando células madre de diversos tipos, que pueden incluir los siguientes ejemplos no limitantes.

La Patente de EE.UU. 5.851.832 indica células madre neurales multipotentes obtenidas de tejido cerebral. La Patente de EE.UU. 5.766.948 indica producir neuroblastos de los hemisferios cerebrales de neonato. Las Patentes de EE.UU. 5.654.183 y 5.849.553 indican el uso de células madre de cresta neural de mamífero. La Patente de EE.UU. 6.040.180 indica generación *in vitro* de neuronas diferenciadas de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamífero. Las patentes internacionales WO 98/50526 y WO 99/01159 indican generación y aislamiento de células madre neuroepiteliales, precursores de oligodendrocito-astrocito y precursores neuronales de linaje restringido. La Patente de EE.UU. 5.968.829 indica células madre neurales obtenidas de preencéfalo embrionario y cultivadas con un medio que comprende glucosa, transferrina, insulina, selenio, progesterona y otros diversos factores de crecimiento.

Se pueden obtener cultivos celulares hepáticos primarios a partir de biopsia humana o tejido estirpado quirúrgicamente por perfusión con una combinación apropiada de collagenasa e hialuronidasa. Alternativamente, la patente europea EP 0 953 633 A1 indica aislar células hepáticas por preparación de tejido hepático humano picado, resuspender las células de tejido concentradas en un medio de crecimiento y extender las células en el cultivo. El medio de crecimiento comprende glucosa, insulina, transferrina, T₃, FCS y varios extractos de tejido que permiten crecer a los hepatocitos sin transformación maligna. Se piensa que las células en el hígado contienen células especializadas incluyendo células parenquimales hepáticas, células de Kupffer, endotelio sinusoidal y epitelio de las vías biliares y también células precursoras (referidas como "hepatoblastos" o "células ovales") que tienen la capacidad de diferenciarse en ambos hepatocitos maduros o células epiteliales biliares (L. E. Rogler, Am. J. Pathol. 150: 591, 1.997; M. Alison, Current Opin. Cell Biol. 10: 710, 1.998; Lazaro et al., Cancer Res. 58: 514, 1.998).

La Patente de EE.UU. 5.192.553 indica métodos para aislar células madre o células progenitoras hematopoyéticas neonatales o fetales humanas. La Patente de EE.UU. 5.716.827 indica células hematopoyéticas humanas que son progenitores positivos de Thy-1 y medios de cultivo apropiados para regenerarlas *in vitro*. La Patente de EE.UU. 5.635.387 indica un método y dispositivo para cultivar células hematopoyéticas humanas y sus precursores. La Patente de EE.UU. 6.015.554 describe un método para reconstituir células linfoides y dendríticas humanas.

La Patente de EE.UU. 5.486.359 indica poblaciones homogéneas de células madre mesenquimales humanas que se pueden diferenciar en células de más de un tipo de tejido conectivo, tal como hueso, cartílago, tendón, ligamento y dermis. Se obtienen de médula ósea o periostio. También se indican condiciones de cultivo usadas para extender células madre mesenquimales. La patente internacional WO 99/01145 indica células madre mesenquimales humanas aisladas de sangre periférica de individuos tratados con factores de crecimiento tales como G-CSF o GM-CSF. La patente internacional WO 00/53795 indica células madre derivadas de tejido adiposo y redes, sustancialmente exentas de adipocitos y glóbulos rojos. Estas células supuestamente se pueden extender y cultivar para producir hormonas y medios de cultivo condicionados.

Se puede poner en práctica la invención usando células madre de cualquier especie vertebrada. Se incluyen células madre de seres humanos; así como primates no humanos, animales domésticos, ganado y otros mamíferos no humanos.

Entre las células madre adecuadas están las células madre pluripotentes de primate (pPS) derivadas de tejido formado después de la gestación, tal como un blastocito o tejido fetal o embrionario tomado en cualquier momento durante la gestación. Son ejemplos no limitantes cultivos primarios o estirpes establecidas de células madre embrionarias.

Medios y células alimentadoras.

Los medios para aislar y propagar células pPS pueden presentar cualquiera de diversas fórmulas diferentes, siempre que las células obtenidas presenten las características deseadas y se puedan propagar adicionalmente. Las fuentes adecuadas son como sigue: medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM), Gibco # 11965-092; medio Eagles modificado de Knockout Dulbecco (KO DMEM), Gibco # 10829-018; L-glutamina 200 mM, Gibco # 15039-027; disolución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; β-mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF), Gibco # 13256-029. Se prepara medio ES que contiene suero ejemplar con DMEM al 80% (típicamente KO DMEM), suero fetal bovino (FBS) definido al 20% no inactivado por calor, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 1 mM y β-mercaptoetanol 0,1 mM. Se filtra el medio y se almacena a 4°C durante no más de 2 semanas. Se prepara medio ES sin suero con KO DMEM al 80%, sustituto de suero al 20%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 1 mM y β-mercaptoetanol 0,1 mM. Un sustituto de suero eficaz es Gibco # 10828-028. Se filtra el medio y se almacena a 4°C durante no más de 2 semanas. Justo antes de uso, se añade bFGF humano a una concentración final de 4 ng/ml (Bodnar et al., Geron Corp, Publicación de Patente Internacional WO 99/20741).

Se propagan células alimentadoras (en el caso de que se usen) en medio mEF, que contiene DMEM al 90% (Gibco # 11965-092), FBS al 10% (Hyclone # 30071-03) y glutamina 2 mM. Se propagan los mEF en matraces T150 (Corning # 430825), dividiendo las células 1:2 cada dos días con tripsina, manteniendo las células subconfluentes. Para preparar la capa de células alimentadoras, se irradiaron las células a una dosis para inhibir la proliferación pero

permitir la síntesis de factores importantes que soporten las células hES (-4.000 rads de irradiación gamma). Se recubrieron placas de cultivo de seis pozos (tal como Falcon # 304) por incubación a 37°C con 1 ml de gelatina al 0,5% por pozo durante la noche y se pusieron en placas con los mEF irradiados 375.000 por pozo. Se usaron típicamente capas de células alimentadoras 5 h a 4 días después de ponerlas en placas. El medio es reemplazado con medio hES fresco justo antes de sembrar las células pPS.

Las condiciones para cultivar otras células madre son conocidas y se pueden optimizar apropiadamente de acuerdo con el tipo de células. Los medios y las técnicas de cultivo para los tipos de células particulares referidos en la sección previa se proporcionan en las referencias citadas.

Células madres embrionarias.

Se pueden aislar células madre embrionarias de blastocitos de miembros de la especie primate (Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7.844, 1.995). Se pueden preparar células madre embrionarias humanas (hES) a partir de células de blastocitos humanos usando las técnicas descritas por Thomson et al. (Patente de EE.UU. 5.843.780; Science 282: 1.145, 1.998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1.998) y Reubinoff et al, Nature Biotech. 18: 399, 2.000,

En pocas palabras, se obtienen blastocitos humanos de embriones de preimplantación in vivo humanos. Alternativamente, se pueden usar embriones fertilizados in vitro (IVF, por sus siglas en inglés) o se pueden extender embriones humanos de una célula a la fase de blastocito (Bongso et al., Hum Reprod 4: 706, 1.989). Se cultivan embriones humanos a la fase de blastocito en medio G1.2 y G2.2 (Gardner et al., Fertil. Steril. 69: 84, 1.998). Los blastocitos que desarrollan se seleccionan para aislamiento de células ES. Se retira la zona pelúcida de los blastocitos por breve exposición a pronasa (Sigma). Se aíslan las masas de células internas por inmunocirugía, en que se exponen los blastocitos a una dilución 1:50 de antisuero de células de bazo anti-humano de conejo durante 30 minutos, después se lavan durante 5 minutos tres veces en DMEM y se exponen a una dilución 1:5 de complemento de conejillo de indias (Gibco) durante 3 minutos (véase Solter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 5.099, 1.975). Después de dos lavados más en DMEM, se retiran las células de trofotodermo lisadas de la masa de células internas intacta (ICM, por sus siglas en inglés) por pipeteado suave y se pusieron en placas de ICM sobre capas alimentadoras de mEF.

Después de 9 a 15 días, se disocian los resultados derivados de masa celular interna en pequeños agregados por exposición a disolución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio y magnesio con AEDT 1 mM, por exposición a dispasa o tripsina, o por disociación mecánica con una micropipeta y después se vuelven a poner en placas sobre mEF en medio fresco. Se vuelven a poner en placas las células disociadas sobre capas alimentadoras de mEF en medio ES fresco y se observó formación de colonias. Las colonias que demostraron morfología no diferenciada se seleccionan individualmente por micropipeta, se disocian mecánicamente en pequeños agregados y se vuelven a poner en placas. La morfología de tipo ES se caracteriza como colonias compactas con aparentemente alta relación núcleo a citoplasma y nucleolos prominentes. Las células ES resultantes se dividen de manera rutinaria después cada 1-2 semanas por breve tripsinización, exposición a PBS de Dulbecco (sin calcio o magnesio y con AEDT 2 mM), exposición a collagenasa de tipo IV (-200 U/ml; Gibco) o por selección de colonias individuales por micropipeta. Los tamaños de los pequeños agregados de aproximadamente 50 a 100 células son óptimos.

Células germinales embrionarias

Se pueden preparar células Germinales Embrionarias Humanas (hEG) de células germinales primordiales presentes en material fetal humano tomado aproximadamente 8-11 semanas después del último periodo menstrual. Se describen métodos de preparación adecuados en Shamblo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13.726, 1.998 y la Patente de EE.UU. 6.090.622.

En pocas palabras, se enjuagan crestas genitales con tampón isotónico, después se ponen en 0,1 ml de disolución de tripsina al 0,05% /AEDT sódico 0,53 mM (BRL) y se cortan en trozos de <1 mm³. Se pipetea después el tejido a través de una punta de 100 µl para disgregar además las células. Se incuba a 37°C durante -5 min, después se añaden ~3,5 ml de medio de crecimiento EG. El medio de crecimiento EG es DMEM, 4.500 mg/l de D-glucosa, 2.200 mg/l de bicarbonato de sodio mM; suero fetal bovino calificado ES al 15% (BRL); glutamina 2 mM (BRL); piruvato de sodio 1 mM (BRL); 1.000-2.000 U/ml de factor inhibidor de leucemia recombinante humana (LIF, Genzyme); 1-2 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF, Genzyme) y forskolina 10 µM (en DMSO al 10%). En una propuesta alternativa, se aíslan células EG usando hialuronidasa/collagenasa/DNasa. Los precursores (*anlagen*) gonadales o crestas genitales con mesenterios se disectan de material fetal, las crestas genitales se enjuagan en PBS, después se ponen en disolución de digestión HCD 0,1 ml (hialuronidasa tipo V al 0,01 %, DNasa I al 0,002%, collagenasa tipo IV al 0,1%, todos de Sigma preparados en medio de crecimiento EG). Se pica el tejido y se incuba 1 h o durante la noche a 37°C, se vuelve a suspender en 1-3 ml de medio de crecimiento EG y se pone en una capa alimentadora.

Se preparan placas de cultivo de tejido de noventa y seis pozos con una capa subconfluente de células alimentadoras cultivadas durante 3 días en medio de crecimiento EG modificado exento de LIF, bFGF o forskolina,

inactivadas con 5.000 rad de irradiación γ . Son alimentadores adecuados las células STO (ATCC Acceso N° CRL 1.503). Se añaden -0,2 ml de suspensión de células germinales primarias (PGC) a cada uno de los pozos. El primer pase se realiza después de 7-10 días en medio de crecimiento EG, transfiriéndose cada pozo a un pozo de una placa de cultivo de 24 pozos preparada previamente con fibroblastos de ratón STO irradiados. Se cultivan las células reemplazando a diario el medio hasta que se observa morfología celular consistente con células EG, típicamente después de 7-30 días o 1-4 pases.

Propagación de células pPS en un estado no diferenciado.

Se pueden propagar células pPS de manera continua en cultivo, usando una combinación de condiciones de cultivo que activen la proliferación sin activar diferenciación.

Tradicionalmente, se cultivan células pPS sobre una capa de células alimentadoras, típicamente células de tipo fibroblasto, con frecuencia derivadas de tejido embrionario o fetal. Las estirpes celulares se pusieron en placas a cerca de confluencia, normalmente irradiadas para prevenir la proliferación y después usadas para soportar cultivos de células pPS.

En una ilustración, las células pPS se derivan primero y se soportan sobre fibroblastos embrionarios primarios. Se pueden obtener fibroblastos embrionarios de ratón (mEF) de ratones CF1 no consanguíneos (SASCO) u otras razas adecuadas. Se limpia con hisopo el abdomen de un ratón de 13 días de embarazo con etanol al 70% y se retira la decidua en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se recogen embriones; se retiran placenta, membranas y tejidos blandos y se lavan las carcasas dos veces en PBS. Después se transfieren a placas bacterianas de 10 cm frescas que contienen 2 ml de tripsina/AEDT y se pican finamente. Después de incubar 5 minutos a 37°C, se inactiva la tripsina con 5 ml de DMEM conteniendo suero bovino al 10% (FBS) y se transfiere la mezcla a un tubo cónico de 15 ml y se disocia. Se deja que sedimenten las partículas durante 2 minutos, se completa el sobrenadante a un volumen final de 10 ml y se pone en placas sobre una placa de cultivo de tejidos de 10 cm o matraz T75. Se incuba el matraz sin perturbaciones durante 24 horas, después de lo cual se reemplaza el medio. Cuando los matraces confluyen (-2-3 d), se dividen 1:2 en nuevos matraces.

Científicos en Geron han descubierto que las células hPS se pueden mantener en un estado no diferenciado incluso sin células alimentadoras. El entorno para cultivos exentos de alimentador incluye un sustrato de cultivo adecuado, en particular una matriz extracelular, tal como puede ser derivado de membrana basal o que puede formar parte de acoplamientos de receptor de molécula de adhesión-ligando. Está disponible una preparación adecuada de Becton Dickinson con el nombre Matrigel®. Otros componentes de matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como una alternativa. Dependiendo del tipo de célula que esté proliferando, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y similares, solos o en diversas combinaciones. Las lamininas son los componentes mayoritarios de todas las láminas basales en los vertebrados, que interactúan con heterodímeros de integrina tales como $\alpha 6 \beta 1$ y $\alpha 6 \beta 4$ (específico para lamininas) y otros heterodímeros (que experimentan reacción cruzada con otras matrices).

Se ponen en placas las células madre pluripotentes sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que activa la supervivencia celular, la propagación y la retención de las características deseables. Se ha encontrado que las densidades de puesta en placa de al menos -15.000 células cm^{-2} (típicamente 90.000 cm^{-2} a 170.000 cm^{-2}) activan la supervivencia y limitan la diferenciación. El pase de células pPS en ausencia de alimentadores se beneficia de preparar las células pPS en pequeños grupos. Típicamente, la digestión enzimática se detiene antes de que las células lleguen a dispersarse completamente (digamos, ~5 min con colagenasa IV). Los pequeños agregados de -10-2.000 células se ponen en placas después directamente sobre el sustrato sin dispersión adicional. Alternativamente, las células PS de primate se pueden traspasar entre cultivos exentos de alimentador como una suspensión de células más fina, siempre que se elija una enzima y medio apropiados y la densidad de la puesta en placa sea suficientemente alta. Como ilustración, las células madre embrionarias humanas confluentes cultivadas en ausencia de alimentadores se retiran de las placas por incubación con una disolución de tripsina al 0,05% (peso/vol) (Gibco) y AEDT 0,053 mM durante 5-15 min a 37°C. Con el uso de pipeta, se retiran las células restantes en la placa y se trituran las células con la pipeta hasta que se dispersan las células en una suspensión que comprende células únicas y algunos pequeños grupos. Se ponen en placas después las células a densidades de 50.000-200.000 células cm^{-2} para activar la supervivencia y limitar la diferenciación. El fenotipo de células ES traspasado por esta técnica es similar a lo que se observa cuando las células se recogen como grupos por digestión de colágeno. Como otra opción, se pueden recoger las células sin enzimas antes de que la placa alcance la confluencia. Se incuban las células -5 min en una disolución de AEDT 0,5 mM solas en PBS, se lava del recipiente de cultivo y después se ponen en placas en un nuevo cultivo sin dispersión adicional.

Las células pPS puestas en placa en ausencia de células alimentadoras frescas se benefician de que se cultiven en un medio de nutriente. El medio contendrá en general los componentes normales para mejorar la supervivencia celular, incluyendo tampón isotónico, minerales esenciales y suero o un sustituto de suero de alguna clase. Se puede preparar medio condicionado cultivando fibroblastos embrionarios de ratón primarios irradiados (u otra preparación de células adecuada) a una densidad de $\sim 5-6 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ en un medio exento de suero tal como KO

DMEM enriquecido con sustituto de suero al 20% y 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Se recoge el sobrenadante del cultivo después de -1 día a 37°C.

Como una alternativa a cultivos de fibroblastos de ratón primarios, se puede preparar medio condicionado de una estirpe celular de fibroblastos embrionarios ensayada por su capacidad para acondicionar medio de manera apropiada. Dichas estirpes se pueden transinfectar opcionalmente con telomerasa transcriptasa inversa para aumentar su capacidad replicativa. Otra posible fuente son células pPS diferenciadas con las características morfológicas de fibroblastos. Se cultivan en suspensión células pPS como agregados en medio de diferenciación usando placas de cultivo de células no adherentes (-2×10^6 células /9,6 cm²). Después de 2 días los agregados se transfieren a placas recubiertas con gelatina y aparecen células de tipo fibroblasto en grupos de 100-1.000 células en la población mixta después de -11 días. Después de breve tratamiento con collagenasa, se pueden recoger las células de tipo fibroblasto bajo microscopio, se traspasan en medio mEF y se ensaya su capacidad para condicionar medio ES.

El medio que ha sido condicionado durante 1-2 días se usa típicamente para soportar cultivo de células pPS durante 1-2 días y después se cambia. Si se desea, el medio condicionado se puede enriquecer antes de su uso con factores de crecimiento adicionales que benefician el cultivo de células pPS. Para hES, se puede usar un factor de crecimiento tipo bFGF o FGF-4. Para hEG, se puede enriquecer medio de cultivo con un factor de crecimiento tipo bFGF, un inductor de gp130 tal como LIF u Oncostatina-M y quizá un factor que eleve los niveles de AMP cíclico, tal como forskolina.

Características de células pPS no diferenciadas.

En las dos dimensiones de una imagen microscópica clásica, las células hES tienen relaciones nuclear/citoplásmica altas en el plano de la imagen, nucleolos prominentes y formación de colonias compacta con uniones celulares discernibles deficientemente. Las estirpes celulares pueden ser cariotipadas usando una técnica de banda-G clásica (disponible en muchos laboratorios de diagnóstico clínico que proporcionan servicios de cariotipado de rutina, tal como el Laboratorio de Citogenética en Oakland CA) y se comparan con cariotipos humanos publicados.

También se pueden caracterizar células hES y hEG por marcadores celulares expresados. En general, los marcadores específicos del tejido discutidos en esta descripción se pueden detectar usando una técnica inmunológica adecuada - tal como citometría de flujo para marcadores ligados a membrana, inmunohistoquímica para marcadores intracelulares e inmunoensayos ligados a enzima para marcadores segregados en el medio. También se puede detectar la expresión de marcadores de proteínas en el nivel de ARNm por transcriptasa inversa-PCR usando cebadores específicos del marcador. Véase la Patente de EE.UU. 5.843.780 para más detalles.

Los antígenos embrionarios específicos de la fase (SSEA, por sus siglas en inglés) son característicos de ciertos tipos de células embrionarias. Los anticuerpos para marcadores SSEA están disponibles en los Estudios de Desarrollo del Banco de Hibridomas (Bethesda MD). Otros marcadores útiles son detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Andrews et al., Cell Lines from Human Germ Cell Tumors, en E. J. Robertson, 1.987, *supra*). Las células hES son típicamente SSEA-1 negativas y SSEA-4 positivas. Las células hEG son típicamente SSEA-1 positivas. La diferenciación de células pPS in vitro da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81 y expresión aumentada de SSEA-1. Las células pPS también se pueden caracterizar por la presencia de actividad de fosfatasa alcalina, que se puede detectar fijando las células con paraformaldehído al 4% y desarrollando después con Vector Rojo como sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame CA).

Las células madre embrionarias también son típicamente telomerasa positiva y OCT-4 positiva. La actividad de la telomerasa se puede determinar usando ensayo de actividad TRAP (Kim et al., Science 266: 2.011, 1.997), usando un estuche comercialmente disponible (Estuche de Detección de Telomerasa XK TRAPeze®, Cat. s7707; Intergen Co., Purchase NY; o TeloTAGGG™ Telomerase PCR ELISApplus, Cat. 2.013.89; Roche Diagnostics, Indianapolis). También se puede evaluar la expresión de hTERT al nivel de ARNm por RT-PCR. El estuche de cuantificación de hTERT LightCycler TeloTAGGG™ (Cat. 3.012.344; Roche Diagnostics) está disponible comercialmente para fines de investigación.

Diferenciación de células pPS.

La diferenciación de la pPS se puede iniciar formando primero cuerpos embrioides. Los principios generales en el cultivo de cuerpos embrioides se indican en O'Shea, Anat. Rec. (New Anat. 257: 323, 1.999). Se cultivan células pPS de una manera que permite que se formen agregados, para lo cual están disponibles muchas opciones: por ejemplo, por crecimiento excesivo de un cultivo de células pPS donadoras, o por cultivo de células pPS en recipientes de cultivo con un sustrato con propiedades de adhesión baja que permite la formación de EB. Los cuerpos embrioides también se pueden preparar en cultivo en suspensión. Se recogen células pPS por breve digestión de collagenasa, se disocian en grupos y se ponen en placas de cultivo de células no adherentes. Los agregados se alimentan cada unos pocos días y después se recogen después de un periodo adecuado, típicamente 4-8 días. Las células también se pueden cultivar en un medio y/o sobre un sustrato que active el

enriquecimiento de células de un linaje particular. El sustrato puede comprender componentes de matriz tales como Matrigel® (Becton Dickenson), laminina, colágeno, gelatina o matriz producida por primer cultivo de una estirpe celular productora de matriz (tal como un fibroblasto o estirpe celular endotelial) y lisando después y lavando de tal manera que la matriz permanezca unida a la superficie del recipiente. Los cuerpos embrioides comprenden una población celular heterogénea, que tiene potencialmente un endodermo exterior y un mesodermo y ectodermo interior.

Los científicos en Geron Corporation han descubierto que las células pPS se pueden diferenciar en células precursoras comprometidas o células terminalmente diferenciadas sin que se formen cuerpos embrioides o agregados como una etapa intermedia. En pocas palabras, se prepara una suspensión de células pPS no diferenciadas y después se ponen en placas sobre una superficie sólida que activa la diferenciación. Los sustratos adecuados incluyen superficies de vidrio o plástico que son adherentes. Por ejemplo, se pueden recubrir cubreobjetos de vidrio con una sustancia policatiónica, tal como una poliamina tipo poli-lisina, poli-ornitina u otros polipéptidos homogéneos o mezclados u otros polímeros con una carga positiva predominante. Las células se cultivan después en un medio nutriente adecuado que se adapta para activar la diferenciación hacia el linaje celular deseado.

En algunas circunstancias, la diferenciación se activa además por retirada de suero o sustituto de suero del medio de cultivo. Esto se puede conseguir por sustitución de un medio desprovisto de suero y sustituto de suero, por ejemplo, al tiempo de volverlo a poner en placas. En algunas realizaciones de la invención, la diferenciación se activa por retirada de uno o más componentes del medio que activan el crecimiento de células no diferenciadas o actúa o actúan como un inhibidor de la diferenciación. Ejemplos de dichos componentes (por sus siglas en inglés) incluyen algunos factores de crecimiento, mitógenos, factor inhibidor de leucocitos (LIF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). La diferenciación también se puede activar por adición de un componente del medio que active la diferenciación hacia el linaje celular deseado o inhiba el crecimiento de células con características no deseadas. Por ejemplo, para generar células comprometidas a linajes neurales o gliales, el medio puede incluir cualquiera de los siguientes factores o constituyentes del medio en una combinación eficaz: Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neutrotrofina-3 (NT-3), NT-4, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento nervioso (NGF), ácido retinoico (AR), sonic hedgehog, FGF-8, ácido ascórbico, forskolina, suero fetal bovino (FBS) y proteínas morfogénicas óseas (las BMP).

Los principios generales para obtener células de tejido de células madre pluripotentes se revisan en Pedersen (Reprod. Fertil. Dev. 6: 543, 1.994) y la Patente de EE.UU. 6.090.622. Otras publicaciones de interés incluyen lo siguiente: Para progenitores neurales, células restrictivas neurales y precursores de células gliales, véase Bain et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 1.252, 1.994; Trojanowski et al., Exp. Neurol. 144: 92, 1.997; Wojcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1.305-130 y las Patentes de EE.UU. 5.851.832, 5.928.947, 5.766.948 y 5.849.553. Para músculo cardíaco y cardiomiocitos véase Chen et al., Dev. Dynamics 197: 217, 1.993 y Wobus et al., Differentiation 48: 173, 1.991. Para progenitores hematopoyéticos, véase Burkert et al., New Biol. 3: 698, 1.991 y Biesecker et al., Exp. Hematol. 21: 774, 1.993. La Patente de EE.UU. 5.773.255 se refiere a estirpes celulares beta pancreáticas segregadoras de insulina responsables de la glucosa. La Patente de EE.UU. 5.789.246 se refiere a células precursoras de hepatocitos. Otros progenitores de interés incluyen pero no se limitan a, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales del pigmento retinal, fibroblastos, células de la piel tales como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales de los túbulos renales, células de músculos lisos y esqueléticos, progenitores testiculares y células endoteliales vasculares.

Los científicos en Geron Corporation han descubierto que cultivar células pPS o células de cuerpos embrioides en presencia de ligandos que unen receptores de factor de crecimiento activa el enriquecimiento para células precursoras neurales. El entorno de crecimiento puede contener una matriz extracelular favorable a células neurales, tal como fibronectina. Los factores de crecimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, EGF, bFGF, PDGF, IGF-1 y anticuerpos para receptores para estos ligandos. Las células cultivadas se pueden separar después opcionalmente si expresan un marcador tal como A2B5. En las circunstancias apropiadas, las poblaciones de células enriquecidas para expresión del marcador A2B5 pueden presentar la capacidad para generar tanto células neuronales (incluyendo neuronas maduras) como células gliales (incluyendo astrocitos y oligodendrocitos). Opcionalmente, las poblaciones celulares se diferencian además, por ejemplo, por cultivo en un medio que contiene un activador de cAMP.

Los científicos en Geron Corporation han descubierto que cultivar células pPS o células de cuerpos embrioides en presencia de un agente de diferenciación de hepatocitos activa el enriquecimiento de células de tipo hepatocito. El entorno de crecimiento puede contener una matriz extracelular favorable a los hepatocitos, tal como colágeno o Matrigel®. Los agentes de diferenciación adecuados incluyen diversos isómeros de butirato y sus análogos, ejemplificados por n-butilato. Las células cultivadas se cultivan opcionalmente de manera simultánea o de manera secuencial con un factor de maduración de hepatocitos, tal como un disolvente orgánico tipo dimetilsulfóxido (DMSO); un cofactor de maduración tal como ácido retinoico o una citocina u hormona tal como un glucocorticoide, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), heparina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-1, IL-6, IGF-1, IGF-II y HBGF-1.

Los científicos en Geron Corporation han descubierto que también es posible diferenciar células pPS en una población altamente enriquecida comprendiendo cardiomiocitos o precursores de cardiomiocitos. Las células del linaje de cardiomiocito se pueden obtener, por ejemplo, por diferenciación de células hES en un entorno de crecimiento que comprende un factor cardiotrófico que afecte a la metilación de ADN, ejemplificada por 5-azacitidina. Las células que se contraen de manera espontánea se puede separar después de otras células en la población, por ejemplo, por centrifugación por densidad. Etapas del procedimiento adicionales pueden incluir cultivar las células en un medio que contiene creatina, carnitina o taurina. Alternativamente, es posible diferenciar células hPS en una población altamente enriquecida comprendiendo osteoprogenitores u osteoblastos que expresan osteocalcina y colágeno-1. Las células se pueden obtener tomando células mesenquimales derivadas de pPS y diferenciándolas en un medio que contenga una proteína morfogénica ósea (en particular BMP-4), un ligando para un receptor TGF- β humano o un ligando para un receptor de vitamina D humana.

Características de células diferenciadas.

Las células se pueden caracterizar de acuerdo con una serie de criterios fenotípicos. Los criterios incluyen, pero no se limitan a, caracterización de características morfológicas, detección o cuantificación de marcadores celulares expresados y actividad enzimática y determinación de las propiedades funcionales de las células in vivo.

Los marcadores de interés para células neuronales incluyen (por sus siglas en inglés): β -tubulina III o neurofilamento, característico de neuronas; proteína ácida fibrilar glial (GFAP), presente en astrocitos; galactocerebrósido (GalC) o proteína básica de mielina (MBP); característica de oligodendrocitos; OCT-4, característico de células hES no diferenciadas; nestina, característica de precursores neurales y otras células. A2B5 y NCAM son característicos de progenitores gliales y progenitores neurales, respectivamente. También se puede ensayar en las células la secreción de sustancias biológicamente activas características. Por ejemplo, se pueden identificar neuronas que segregan GABA por producción de ácido glutámico descarboxilasa o GABA. Se pueden identificar neuronas dopaminérgicas por producción de dopa descarboxilasa, dopamina o tirosina hidroxilasa.

Marcadores de interés para células hepáticas incluyen: α -fetoproteína (progenitores hepáticos); albúmina, α_1 -antitripsina, glucose-6-fosfatasa, actividad del citocromo p450, transferrina, receptor de asialoglicoproteína y almacenamiento de glucógeno (hepatocitos); CK7, CK19 y γ -glutamyl transferasa (epitelio biliar). Se ha indicado que la diferenciación de hepatocitos requiere el factor de transcripción HNF-4 α (Li et al., Genes Dev. 14: 464, 2000). Marcadores independientes de la expresión de HNF-4 α incluyen α_1 -antitripsina, α -fetoproteína, apoE, glucocinasa, factores de crecimiento de insulina 1 y 2, receptor de IGF-1, receptor de insulina y leptina. Marcadores dependientes de la expresión de HNF-4 α incluyen: albúmina, apoAI, apoAII, apoB, apoCIII, apoCII, aldolasa B, fenilalanina hidroxilasa, proteína de unión de ácidos grasos tipo L, transferrina, proteína de unión de retinol y eritropoyetina (EPO).

Los tipos de células en poblaciones de células mixtas procedentes de células pPS se pueden reconocer por morfología característica y los marcadores que expresan. (Por sus siglas en inglés) Para músculo esquelético: myoD, miogenina y myf-5. Para células endoteliales: PECAM (molécula de adhesión celular plaqueta-endotelial), Flk-1, tie-1, tie-2, cadherina endotelial vascular (VE), MECA-32 y MEC-14.7. Para células de músculo liso: cadena pesada de miosina específica. Para cardiomiocitos: GATA-4, Nkx2.5, troponina cardíaca I, cadena pesada de miosina α y ANF. Para células pancreáticas, pdx y secreción de insulina. Para células hematopoyéticas y sus progenitores: GATA-1, CD34, AC133, β -globulina principal y gen β H1 de tipo β -globulina principal.

Algunos marcadores específicos del tejido enumerados en esta descripción o conocidos en la técnica se pueden detectar por técnicas inmunológicas - tales como inmunocitoquímica de flujo para marcadores de superficie celular, inmunohistoquímica (por ejemplo, de células o secciones de tejido fijados) para marcadores intracelulares o de superficie celular, análisis por el método Western de extractos celulares e inmunoensayos ligados a enzima, para extractos celulares o productos segregados en el medio. La expresión de productos génicos específicos del tejido también se puede detectar al nivel de ARNm por análisis por el método Northern, análisis por hibridación *dot-blot* o por reacción en cadena de la polimerasa iniciada por transcriptasa inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos de la secuencia en métodos de multiplicación clásicos. Los datos de las secuencias para los marcadores particulares enumerados en esta descripción se pueden obtener de bases de datos públicas tales como GenBank (URL www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez).

Preparación de poblaciones de células esencialmente exentas de células no diferenciadas.

Las poblaciones de células diferenciadas se reducen de células relativamente no diferenciadas por expresión de un gen que es letal para las células o las hace susceptibles de un efecto letal de un agente externo, bajo control de un elemento de control transcripcional que produce que el gen se exprese preferentemente en las células no diferenciadas.

Para realizar esto, las células se modifican genéticamente antes o después del procedimiento usado para diferenciar las células en el linaje deseado para tratamiento, de una manera que ponga un gen efector adecuado para la

selección negativa de células no diferenciadas, bajo control de un elemento de control transcripcional con las propiedades deseadas.

Elementos de control transcripcional para conducir la selección negativa.

El elemento de control se selecciona con vistas a los patrones de expresión de proteínas de las células no diferenciadas y diferenciadas en la población.

Los genes con patrones de expresión deseables se pueden identificar comparando la expresión en la transcripción, traducción o nivel funcional en dos poblaciones de células diferentes - una relativamente enriquecida para células diferenciadas, la otra relativamente enriquecida para células no diferenciadas. Los métodos adecuados de comparación incluyen la hibridación sustractiva de bibliotecas de ADNc y análisis de micromatriz de niveles de ARNm. Una vez que se identifica una transcripción con un patrón de expresión apropiado, el activador o potenciador del gen correspondiente se puede usar para la construcción del vector de selección negativo.

Se realiza un análisis de micromatriz adecuado usando un generador de matriz Genetic Microsystems y un escáner Axon GenePix™. Se preparan micromatrices por multiplicación de fragmentos de ADNc en un formato de 96 ó 384 pozos y después se manchan directamente sobre portaobjetos de vidrio. Para comparar las preparaciones de ARNm de dos poblaciones de células, se convierte una preparación en ADNc etiquetado con Cy3, mientras la otra se convierte en ADNc etiquetado con Cy5. Las dos preparaciones de ADNc se hibridan simultáneamente para la extensión de micromatriz y después se lavan para eliminar la unión no específica. Cualquier mancha determinada sobre la matriz unirá cada uno de los productos de ADNc en proporción a la abundancia de la transcripción en las dos preparaciones de ARNm originales. Se escanea después la extensión a longitudes de onda apropiadas para cada una de las etiquetas y se determina la abundancia relativa de ARNm. Preferiblemente, el nivel de expresión del gen efector será al menos 5 veces o incluso 25 veces mayor en las células no diferenciadas respecto a las células diferenciadas.

Para la reducción de células embrionarias pluripotentes, un elemento de control ejemplar es el activador para telomerasa transcriptasa inversa (TERT). La secuencia del gen de TERT humano (incluyendo secuencia del promotor aguas arriba) se proporciona a continuación. El lector también se refiere a la Patente Británica de UK GB 2321642 B (Cech et al., Geron Corporation y U. Colorado), Publicaciones de Patente Internacional WO 00/46355 (Morin et al., Geron Corporation), WO 99/33998 (Hagen et al., Bayer Aktiengesellschaft) y Horikawa, I., et al. (Cancer Res., 59: 826, 1.999). Se proporciona la secuencia del gen de TERT de ratón en la Patente Internacional WO 99/27113 (Morin et al., Geron Corporation). Un clon de fago lambda denominado λ GΦ5, que contiene -13.500 bases aguas arriba de la secuencia codificadora de hTERT está disponible en el ATCC con Acceso N° 98505. El Ejemplo 9 ilustra el ensayo y uso de secuencias de activador de TERT (SEC ID N° 1) en sistemas de expresión de vectores.

Otro elemento de control ejemplar es una secuencia activadora para factor de transcripción de unión de Octámero 4 (OCT-4), un miembro de la familia POU de factores de transcripción. Se activa la transcripción de OCT-4 entre la fase celular 4 y 80 en el embrión que se desarrolla y se expresa altamente en el blastocito que se extiende y después en las células pluripotentes del cilindro del huevo. La transcripción se regula hacia abajo a medida que el ectodermo primitivo se diferencia para formar mesodermo y se restringe por el día 8,5 post-coito a migración de células germinales primordiales. También se observa alto nivel de expresión de genes de OCT-4 en carcinoma de embrión pluripotente y estirpes de células madre embrionarias y se regula hacia abajo cuando se inducen estas células a diferenciarse. Se proporcionan secuencias activadoras de OCT-4 de cerdo, ratón y ser humano en la Publicación de Patente Internacional WO 9919469 (Biotransplant Inc.).

Se pueden obtener otros elementos de control adecuados para genes que producen expresión de marcadores característicos de células no diferenciadas en la población pero no de las células diferenciadas. Por ejemplo, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81 son característicos de diversos tipos de células madre embrionarias pluripotentes no diferenciadas. La enzima responsable de la síntesis de SSEA-4 puede presentar elementos de control transcripcionales con la especificidad de expresión deseable. Un ejemplo más reciente es el activador para proteína *Rex1*, una proteína de dedo de cinc regulada por ácido retanoico que se expresa en embriones de preimplantación. El activador de *Rex1* de ratón ha demostrado que actúa como un marcador de transcripción eficaz para células madre embrionarias no diferenciadas (Eiges et al., Current Biol. 11: 514, 2.001).

La idoneidad de elementos particulares se puede estimar por análisis de expresión de transcripción de genes, por ejemplo, por análisis de micromatriz. Las construcciones de indicador se pueden ensayar después en células diferenciadas y no diferenciadas para la especificidad apropiada, usando un activador o secuencia potenciadora del gen específico de la célula identificada para controlar la transcripción de un gen indicador, tal como proteína verde fluorescente, fosfatasa alcalina segregada, β -glucuronidasa o β -galactosidasa. El uso de construcciones de indicador para ensayar la especificidad del activador se ilustra a continuación en el Ejemplo 9.

Genes efectores para conseguir selección negativa.

Un elemento regulador transcripcional con especificidad apropiada se une de manera operativa a una región codificadora para un producto que proporcionará eliminación de células en las que se expresa - directamente o haciendo la célula susceptible de un agente externo inocuo de otro modo.

Los genes efectores adecuados incluyen los que codifican una toxina péptica - tales como ricina, abrina, difteria, gelonina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de *Crotalus durissus terrificus*, toxina de *Crotalus adamenteus*, toxina *Naja naja* y toxina *Naja mocambique*. Hughes et al., Hum. Exp. Toxicol. 15: 443, 1.996; Rosenblum et al., Cancer Immunol. Immunother. 42: 115, 1.996; Rodriguez et al., Prostate 34: 259, 1.998; Mauceri et al., Cancer Res. 56: 4.311; 1.996.

También son adecuados los genes que inducen o median la muerte celular programada - tales como la familia ICE de cisteína proteasas, la familia de proteínas Bcl-2, Bax, bclXs y caspasas (Favrot et al., Gene Ther. 5: 728, 1.998; McGill et al., Front. Biosci. 2: D353, 1.997; McDonnell et al., Semin. Cancer Biol. 6: 53, 1.995). Otro agente antitumor potencial es apoptina, una proteína que induce la muerte celular programada incluso en el caso de fallo de fármacos quimioterapéuticos pequeño (Pietersen et al., Adv. Exp. Med. Biol. 465: 153, 2.000). Koga et al. (Hu. Gene Ther. 11:1.397, 2.000) proponen un tratamiento génico específico de telomerasa usando el activador del gen de hTERT ligado al gen Caspasa-8 de muerte celular programada (FLICE). Gu et al. (Cancer Res. 60:5359, 2.000) indican un sistema adenovírico binario que induce la expresión de Bax vía el activador de hTERT. Encontraron que provocaba muerte celular programada específica del tumor in vitro y suprimía el crecimiento del tumor en ratones desnudos.

También son de interés las enzimas presentes en el paquete lítico que los linfocitos T citotóxicos o las células LAK suministran a sus objetivos. Perforina, una proteína formadora de poro y ligando Fas son las principales moléculas citolíticas en estas células (Brandau et al., Clin. Cancer Res. 6:3.729, 2.000; Cruz et al., Br. J. Cancer 81:881, 1.999). Los CTL también expresan una familia de al menos 11 serina proteasas denominadas granzimas, que presentan cuatro especificidades del sustrato primario (Kam et al., Biochim. Biophys. Acta 1.477:307, 2.000). Las bajas concentraciones de estreptolisina O y pneumolisina facilitan la muerte celular programada dependiente de granzima B (Browne et al., Mol. Cell Biol. 19:8.604, 1.999).

Otros efectores adecuados codifican polipéptidos con actividad que no es tóxica por sí misma para una célula, pero hace la célula sensible a un compuesto no tóxico de otro modo - modificando metabólicamente la célula o cambiando un profármaco no tóxico en un fármaco letal. La letalidad para la progenie con un fenotipo no diferenciado sólo tiene lugar cuando está presente el profármaco. Así, el profármaco se puede combinar con las células mientras se están diferenciando, extendiendo o manteniendo in vitro, para minimizar la proporción de células con fenotipo no diferenciado. El lector apreciará fácilmente que se puede proporcionar también el profármaco a un paciente que se esté tratando con las células, de manera simultánea con el tratamiento, o en un momento posterior, para minimizar la aparición de progenie con un fenotipo no diferenciado in vivo.

Los genes efectores ejemplares con esta propiedad codifican timidina cinasa (tc), tal como pueden proceder de un virus de herpes simple y variantes catalíticamente equivalentes. La tc del HSV convierte el agente antiherpético ganciclovir (GCV) en un producto tóxico que interfiere con la replicación de ADN en células proliferantes.

La Patente de EE.UU. 5.631.236 (Baylor College of Medicine) indica en líneas generales vectores adenovíricos que contienen un gen de tc de HSV ligado de manera operativa a un activador que expresa tc en células cancerígenas. La Patente de EE.UU. 5.997.859 y la Patente Europea EP 702084 B1 (Chiron) se refieren a retrovirus recombinante de replicación defectuosa, que soportan una construcción de vector que dirige la expresión del gen de la tc de HSV para convertir un compuesto inerte de otro modo en una forma citotóxica. Las patentes europeas EP 415731 A1, EP 657540 A1 y EP 657541 A1 (Pozosome Foundation) proponen vectores retrovíricos que codifican una enzima tal como tc de VZV, carboxipeptidasa G2, fosfatasa alcalina, penicilina-V amidasa y citosina desaminasa, para convertir un profármaco en un agente tóxico para una célula cancerígena. Las Publicaciones de Patente Internacional WO 98/14593 y WO 00/46355 (Geron Corporation) describen construcciones que comprenden tc de HSV bajo control de secuencias activadoras de hTERT.

La secuencia de genes de tc de HSV humano se proporciona a continuación (SEC. ID N° 2 y 3) junto con ilustraciones de su uso para células fijadas como objetivo que expresan TERT. Simultáneamente o siguiendo la expresión del gen en las células fijadas como objetivo, se añade un profármaco convertible tal como ganciclovir al entorno para efectuar el agotamiento de los objetivos.

Otro tipo de efector que hace la célula susceptible a un agente no tóxico de otro modo es un gen que produce la presentación de un antígeno extraño sobre la membrana celular. La sustancia presentada puede ser un aloantígeno, un xenoantígeno o un antígeno de una especie no mamífero para la que está fácilmente disponible anticuerpo específico. La expresión del gen conduce a presentación del antígeno sobre células no diferenciadas, que después se puede usar para efectuar el agotamiento mediante una separación inmunológica adecuada - tal como inmunoafinidad (por ej., *panning*), clasificación de células activadas por fluorescencia o lisis mediada por complemento.

Quando el agente de transducción es un vector vírico, el efector puede ser un gen vírico requerido para replicación del virus. Los genes esenciales para replicación de adenovirus incluyen las regiones E4, E1a, E1b y E2. Los genes esenciales para replicación de HSV-1 incluyen ICP6 e ICP4. Estos genes se ponen bajo control del activador específico y se usan para transducir células en la población de células diferenciadas. Los virus se replican después específicamente en cualquier célula no diferenciada presente, causándoles la rotura. Véase la Publicación de Patente Internacional WO 00/46355 (Morin et al., Geron Corporation) para una descripción de vectores líticos que se replican en células que expresan TERT.

Otro tipo de secuencia efectora codifica una proteína de membrana que contiene el epítipo reconocido por el anticuerpo específico. La proteína de membrana puede ser una proteína expresada en la misma especie sobre otros tipos de células, pero más típicamente se obtiene de otras especies o es una secuencia artificial. En este caso, el antígeno será extraño para la especie de la que derivan las células madre y los anticuerpos preparados en la misma especie no experimentarán reacción cruzada con otros antígenos sobre la célula.

Alternativamente, el antígeno fijado como objetivo puede ser un carbohidrato o componente lipídico de la superficie celular. En este caso, la secuencia efectora codificará una enzima implicada en la síntesis de antígeno. Son de particular interés glicosil transferasas de origen mamífero o no mamífero que sintetizan antígeno de diferenciación de carbohidratos, aloantígeno, xenoantígeno o nuevos determinantes detectables por anticuerpo. Los ejemplos incluyen el marcador SSEA-1, para el cual la secuencia efectora codifica la correspondiente flucosiltransferasa; la unión Gala(1,3)Gal presente en tejido endotelial de la mayoría de los mamíferos excepto los seres humanos y los catarrinos, formados por una $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa ($\alpha 1,3$ GT) y los antígenos del grupo histo-sanguíneo ABO presentes en la mayoría de las células humanas, para los cuales la secuencia codificadora es la correspondiente ABO transferasa. Véase GenBank Acceso N° S71333, J05175 y AF134414. Los determinantes de Gala(1,3)Gal y ABO son todos susceptibles de lisis mediada por anticuerpos que se encuentran en la naturaleza en individuos que no presentan los determinantes como un autoantígeno.

Otra posible secuencia efectora se basa en tecnología de interferencia de ARN (ARNi). El ARN bicatenario u horquilla que corresponde a una porción de ARN maduro en una célula (tal como una transcripción génica) hace que se destruya el ARNm objetivo (Sharp et al., Genes Dev. 13:139, 1.999; Wianny et al., Nat. Cell Biol. 2:70, 2.000). Por ejemplo, se ha usado un plásmido que contiene un activador que conduce la expresión de un ARN de horquilla (una transcripción que consiste en repeticiones invertidas tomadas de la región codificadora de un gen celular, separadas por una secuencia ligadora corta, generando así un ARN sintético que contiene una región bicatenaria) para inducir efectos de ARNi estables y heredables en *C. elegans* (Tavernarakis et al.; Nat. Genet. 24:180, 2.000).

En algunas realizaciones de esta invención, un elemento de control que conduce la transcripción en una célula no diferenciada (o una célula que expresa TERT) se liga de manera operativa a una secuencia codificadora para ARNi horquilla que fija como objetivo una transcripción génica particular. El gen fijado como objetivo se elige que sea esencial para la viabilidad celular: por ejemplo, un factor de transcripción o traducción básico, un gen de ARNt, una subunidad de ARN ribosomal o ADN o ARN polimerasa. En una ilustración, el activador de hTERT conduce ARNi que inactiva un gen en la ruta de recuperación de purinas. En presencia de fármacos tales como aminopterina, se evita la síntesis de novo de purinas, debido a que se inhibe la actividad de las enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT, por sus siglas en inglés) y timidina cinasa (TC). Las células que poseen HGPRT y TC sobreviven en presencia de aminopterina, siempre que el medio esté enriquecido con hipoxantina y timidina (medio HAT). Las células no diferenciadas residuales se pueden retirar de la población por incubación con medio HAT. Las transcripciones de genes esenciales tales como HGPRT y TC también se pueden fijar como objetivo usando otros tipos de secuencias efectoras - por ejemplo, polinucleótidos antisentido, ribozimas o secuencias codificadoras para análogos negativos dominantes que carecen de un dominio catalítico funcional.

La región efectora usada en los vectores de esta invención se puede construir de manera que se controle de manera funcional por un interruptor molecular. Las fusiones entre el dominio de unión del ligando de receptores da como resultado moléculas en las que la función normal de la proteína natural está inhibida en ausencia de la hormona reconocida por el dominio de unión del ligando. Una proteína de fusión se construye comprendiendo un dominio de unión de molécula de interrupción acoplado a un dominio efector, de tal manera que la unión de un ligando (tal como una molécula pequeña hapteno) al dominio de unión desenmascara o activa el dominio efector. Los dominios de unión del ligando adecuados se pueden tomar de un receptor (tal como receptor de estrógenos) o un anticuerpo. El dominio efector puede ser cualquiera de las proteínas ya enumeradas que sean letales para la célula, tales como toxinas específicas, endonucleasas (meganucleasas tales como I-Sce -1 o versiones humanizadas de endonucleasas de restricción clásicas) o mediadores de muerte celular programada. La función letal del gen efector es quiescente, a menos que esté presente el ligando. Esto proporciona otro sistema en el que el gen efector hace la célula susceptible a efectos tóxicos de un agente externo (en este caso el ligando), que se puede administrar a voluntad para controlar el agotamiento de células no diferenciadas, en cultivo o in vivo.

Las construcciones de vector para uso en esta invención también pueden contener un marcador de selección positivo, tal como un gen de resistencia a los antibióticos, que está también bajo control del activador específico. Es ejemplar un vector que tiene la configuración activador de hTERT-gen de la tc -IRES-neo. Esto se designa de manera que tanto el efector suicida como el gen de resistencia a fármacos se expresen bajo control del activador de

TERT. La secuencia del sitio de entrada de ribosomas interno (IRES, por sus siglas en inglés) permite que tanto el gen de la tc como el gen neo estén bajo control transcripcional del activador de hTERT. Un sitio de escisión postraducciona, tal como las secuencias 2A (Felipe et al., Gene Ther. 6:198, 1.999) se puede usar para un efecto similar. La generación y selección de estirpes hES que hayan integrado establemente dicha construcción se facilita por la actividad del gen de resistencia a fármacos en las células no diferenciadas. Esto presenta una ventaja sobre los métodos de co-transfección usando un gen de resistencia a fármacos bajo control de un activador diferente, debido a que el gen de resistencia a fármacos no se expresará en células diferenciadas. Esto debería evitar una respuesta inmunológica no deseada por el huésped contra el producto génico en células trasplantadas.

Técnicas de selección para eliminar células no diferenciadas.

Para agotar las poblaciones de células diferenciadas de células no diferenciadas, el gen efector se expresa de manera selectiva en las células no diferenciadas.

Esto se puede realizar de diversas maneras. En una realización, la población se modifica genéticamente usando un vector en el que un elemento de control de la transcripción de la especificidad apropiada se une de manera operativa al gen efector. La modificación genética puede ser transitoria (por ejemplo, usando un vector de adenovirus), que significa que el nivel de expresión disminuye a medida que las células se dividen. Esto es conveniente para generar poblaciones de células diferenciadas que estén exentas de genes heterólogos en el momento de tratamiento. La modificación genética también puede ser permanente (por ejemplo, usando un vector retroviral), que significa que la modificación es heredable por la progenie de la célula modificada inicialmente. Esto es adecuado para generar poblaciones de células diferenciadas que presenten una función correctora constante a medida que proliferen in vitro o in vivo, para eliminar cualquier célula no diferenciada o desdiferenciada que surja en la población.

Se puede usar cualquier vector de expresión adecuado. Los sistemas de vectores víricos adecuados para producir células madre modificadas de acuerdo con esta invención se pueden preparar usando componentes de virus comercialmente disponibles. Los vectores víricos que comprenden genes efectores se describen en general en las publicaciones referidas en la última sección. Alternativamente, se pueden introducir plásmidos vectores en células por electroporación o usando complejos lipido/ADN, tal como los descritos en las Patentes de EE.UU. N° 5.578.475; 5.627.175; 5.705.308; 5.744.335; 5.976.567; 6.020.202 y 6.051.429. Es ejemplar la formulación Lipofectamine 2000™, disponible en Gibco/Life Technologies. Otro reactivo ejemplar es el reactivo de Transfección 6 de FuGENE™, una mezcla de lípidos en forma no liposomal y otros compuestos en etanol al 80%, obtenible en Roche Diagnostics Corporation.

En otra realización, el gen efector se pone bajo control de un elemento de control transcripcional endógeno, tal como el activador de hTERT u OCT-4. Esto se puede efectuar, por ejemplo, por recombinación homóloga, usando un vector que comprende la secuencia codificadora efectora, flanqueada en un lado por el elemento de control transcripcional y otra secuencia genómica aguas arriba y flanqueado en el otro lado por una secuencia genómica aguas abajo para el gen fijado como objetivo. Las Patentes de EE.UU. N° 5.464.764 y 5.631.153 describen una estrategia de selección doble, en la que dos secuencias homólogas para el objetivo génico flanquean un marcador de selección positivo y se une un marcador de selección negativo al término 3' de la segunda región de flaqueo. La Patente de EE.UU. 5.789.215 indica el uso de vectores que fijan como objetivo recombinación homóloga para modificar el genoma celular de células madre embrionarias de ratón. Otra información de interés para fijar como objetivo recombinación homóloga se puede encontrar en las Patentes de EE.UU. 5.589.369, 5.776.774 y 5.789.215.

Si el gen efector produce directamente lisis celular o muerte celular programada, entonces la población se agotará de células no diferenciadas en el cultivo de las células en condiciones en que se espera que el elemento de control produzca la transcripción del gen. Sin embargo, si el gen efector no es directamente letal, sino que hace la célula susceptible de los efectos letales de un agente externo, entonces el agotamiento se pospondrá hasta que se proporcione el agente externo. Por ejemplo, en el caso de que el gen sea una enzima convertidora de profármaco, entonces el agotamiento se efectúa en la colocación de las células en un entorno que contenga el profármaco. En el caso de que el gen sea un objetivo anticuerpo, entonces el agotamiento se efectúa poniendo las células en un entorno que contenga anticuerpo específico, más complemento. El entorno puede ser un recipiente de cultivo, en cuyo caso el agente se puede añadir justo al medio de cultivo a la concentración requerida. Alternativamente o además, se puede realizar agotamiento in vivo, por administración de la población celular a un individuo, y de manera simultánea o de manera secuencial administrando el agente, si no está ya presente.

Las poblaciones de células en las que la mayoría de las células se diferencian se pueden modificar genéticamente de acuerdo con estos procedimientos para agotar células no diferenciadas. Alternativamente, se puede modificar genéticamente una población precursora de células relativamente no diferenciadas de acuerdo con estos procedimientos y diferenciarse después. En esta situación, es más típico usar un gen efector que no destruya las células inmediatamente en la expresión, sino que haga las células susceptibles del efecto letal de algún agente externo. En una ilustración, las células pPS no diferenciadas cultivadas en cultivo se transducen con un vector de retrovirus en el que el gen de la timidina cinasa de herpes está bajo control del activador de hTERT. Las células se seleccionan opcionalmente para transducción positiva, por incorporación de un marcador seleccionable en la construcción o por medición de la expresión del gen transducido, y proliferan en cultivo. Cuando se desean las

células diferenciadas, se lleva la población por un procedimiento de diferenciación (por ejemplo, para preparar precursores de hepatocito o neurona, como se describió anteriormente). Se cultivan entonces en condiciones que permiten la expresión del gen de la tc en presencia de ganciclovir.

Como una ilustración en que ARNi es la secuencia efectora, se transfectan de manera estable células hES (por ejemplo, por lipofección) con una construcción que consiste en 2 casetes: una en la que el activador de PGK conduce el gen de la neomicina fosfotransferasa (dando como resultado resistencia a análogos de neomicina tóxicos tales como geneticina); la otra en la que el activador de hTERT conduce una región codificadora para ARNi que contiene regiones bicatenarias de HGPRT o TC. Se aíslan los clones modificados de manera estable en un medio que contiene geneticina y azaguanina o 6-mercaptopurina (para seleccionar para HGPRT células negativas) o en medio que contiene tanto geneticina como 5-bromodesoxiuridina (para seleccionar para TC células negativas). Alternativamente, la transfección se podía realizar con sólo el estuche de ARNi, en cuyo caso se omite geneticina del medio. Después de aislamiento de los clones supervivientes, estas estirpes son inducidas a diferenciarse al tipo de célula deseado y se exponen a medio HAT para destruir las células madre residuales.

Se pueden obtener poblaciones celulares usando estas técnicas que están "agotadas" de células no diferenciadas, que indica cualquier reducción significativa en la proporción de células no diferenciadas presente. Después de que se efectúa el procedimiento, la proporción de células no diferenciadas puede ser disminuido por 50% o incluso 90%. Dependiendo del elemento de control y el efector elegido, puede ser posible conseguir poblaciones de células diferenciadas que estén "esencialmente exentas" de células no diferenciadas. Esto significa que la población en total contiene menos de 1% de células con el fenotipo no diferenciado. Las poblaciones que contienen menos de 0,2%, 0,05%, 0,01%, 20 ppm o 5 ppm de células no diferenciadas son cada vez más preferidas. Para células pPS, la presencia de células no diferenciadas se puede determinar por recuento de células que expresan SSEA-4 por análisis FACS o por recuento de células que expresan TERT u OCT-4 por hibridación fluorescente in situ.

Uso de células diferenciadas.

Las células preparadas usando un ácido nucleico de esta invención se pueden usar para una variedad de fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos, comercialmente importantes.

Debido a que se agotan las poblaciones celulares de células no diferenciadas, se pueden usar para preparar anticuerpos y bibliotecas de ADNc que sean específicas para el fenotipo diferenciado. Las técnicas generales usadas en anticuerpos de aumento, purificación y modificación, y su uso en inmunoanálisis y métodos de inmunoaislamiento se describen en Handbook of Experimental Immunology (Weir & Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds.) y Methods of Immunological Analysis (Masseyeff et al., eds., Weinheim: VCH Verlags GmbH). Se describen técnicas generales implicadas en la preparación de bibliotecas de ARNm y ADNc en RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization (R. E. Farrell, Academic Press, 1.998); cDNA Library Protocols (Cowell & Austin, eds., Humana Press) y Functional Genomics (Hunt & Livesey, eds., 2.000).

Las poblaciones de células relativamente homogéneas son adecuadas en particular para uso en investigación de fármacos y aplicaciones terapéuticas.

Investigación de fármacos.

Se pueden usar células pPS diferenciadas para investigar factores (tales como disolventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos, polinucleótidos y similares) o condiciones medioambientales (tales como condiciones o manipulación de cultivos) que afectan a las características de las células diferenciadas.

En algunas aplicaciones, se usan células diferenciadas para investigar factores que fomentan la maduración o fomentan la proliferación y mantenimiento de dichas células en cultivo a largo plazo. Por ejemplo, los factores de maduración candidatos o factores de crecimiento candidatos se ensayan adicionándolos a células pPS en diferentes pozos y después determinando cualquier cambio fenotípico que resulte, de acuerdo con los criterios deseables para más cultivo y uso de las células.

Las aplicaciones de investigación particulares se refieren al ensayo de compuestos farmacéuticos en investigación de fármacos. El lector se refiere en general al libro de texto clásico "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1.997 y la Patente de EE.UU. 5.030.015). La valoración de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos implica en general combinar las células diferenciadas con el compuesto candidato, determinar cualquier cambio en la morfología, fenotipo del marcador o actividad metabólica de las células que sea atribuible al compuesto (comparado con células no tratadas o células tratadas con un compuesto inerte) y después correlacionar el efecto del compuesto con el cambio observado.

La investigación se puede realizar, por ejemplo debido que el compuesto se diseña para presentar un efecto farmacológico sobre ciertos tipos de célula o debido a que un compuesto se diseña para presentar efectos en otra parte pero presentan efectos secundarios no deseados. Se pueden ensayar dos o más fármacos en asociación (por

combinación con las células de manera simultánea o de manera secuencial), para detectar posibles efectos de integración fármaco-fármaco. En algunas aplicaciones, se investigan compuestos inicialmente por su potencial toxicidad (Castell et al., págs. 375-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1.997). Se puede determinar la citotoxicidad en primera instancia por el efecto sobre la viabilidad, supervivencia, morfología celulares y expresión o liberación de ciertos marcadores, receptores u enzimas. Los efectos de un fármaco sobre el ADN cromosómico se pueden determinar por medición de la síntesis o reparación de ADN. La incorporación de [³H] timidina o BrdU, especialmente en momentos no programados en el ciclo celular o por encima del nivel requerido para la replicación celular, es consistente con un efecto de fármaco. Los efectos no deseados también pueden incluir velocidades inusuales de intercambio de cromática hermana, determinado por extensión de metafase. El lector es referido a A. Vickers (Págs 375-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1.997) para más elaboración.

Uso terapéutico.

También se pueden usar células diferenciadas para reconstitución o regeneración de tejido en un paciente humano con necesidad del mismo. Las células se administran de una manera que les permita injertarse en el sitio del tejido deseado y reconstituir o regenerar el área funcionalmente deficiente.

En un ejemplo, las células madre neurales se trasplantan directamente a sitios parenquimales o intratecales del sistema nervioso central, de acuerdo con la enfermedad que se esté tratando. Los injertos se realizan usando suspensión de células única o agregados pequeños a una densidad de 25.000-500.000 células por µl (Patente de EE.UU. 5.968.829). La eficacia de los trasplantes de células neurales se pueden valorar en un modelo de rata para médula espinal lesionada gravemente como se describe por McDonald et al. (Nat. Med. 5:1.410, 1.999). Un trasplante exitoso mostrará células derivadas del trasplante presentes en la lesión 2-5 semanas más tarde, diferenciadas en astrocitos, oligodendrocitos y/o neuronas y migrando junto con la médula desde el extremo lesionado y una mejora en la entrada, coordinación y soporte del peso.

Algunas células progenitoras neurales incorporadas se diseñan para tratamiento de daño agudo o crónico al sistema nervioso. Por ejemplo, la excitotoxicidad se ha implicado en una variedad de enfermedades incluyendo epilepsia, apoplejía, isquemia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Algunas células diferenciadas también pueden ser apropiadas para tratar trastornos desmielinizantes, tales como enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, esclerosis múltiple, leucodistrofias, neuritis y neuropatías. Son apropiados para estos fines los cultivos celulares enriquecidos en oligodendrocitos o precursores de oligodendrocito para activar la remielinización.

Se puede evaluar en los hepatocitos y los precursores de hepatocito en modelos animales su capacidad para reparar daño hepático. Un ejemplo es el daño producido por inyección intraperitoneal de D-galactosamina (Dabeva et al., Am. J. Pathol. 143:1.606, 1.993). La eficacia de tratamiento se puede determinar por tinción inmunohistoquímica para marcadores de células hepáticas, determinación microscópica de si se forman estructuras canaliculares en tejido en desarrollo y la capacidad del tratamiento para restaurar la síntesis de proteínas específicas del hígado. Las células hepáticas se pueden usar en el tratamiento por administración directa o como parte de un dispositivo de bioasistencia que proporcione función hepática temporal mientras el tejido hepático del individuo se regenera él mismo después de fallo hepático fulminante.

La eficacia de los cardiomiocitos se puede valorar en modelos animales para criolesión cardíaca, que produce que el 55% del tejido de la pared ventricular izquierda se convierta en tejido cicatrizado sin tratamiento (Li et al., Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1.996; Sakai et al., Ann. Thorac. Surg. 8:2.074, 1.999, Sakai et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1.999). El tratamiento exitoso reducirá el área de la cicatriz, limitará la expansión de la cicatriz y mejorará la función cardíaca cuando se determina por presión sistólica, diastólica y desarrollada. La lesión cardíaca también puede ser modelada usando una espiral de embolización en la porción distal de la arteria descendente anterior izquierda (Watanabe et al., Cell Transplant. 7:239, 1.998) y se puede evaluar la eficacia de tratamiento por histología y función cardíaca. Se pueden usar preparaciones de cardiomiocitos en el tratamiento para regenerar músculo cardíaco y tratar función cardíaca insuficiente (Patente de EE.UU. 5.919.449 y Patente Internacional WO 99/03973).

Los ejemplos que siguen se proporcionan como ilustración adicional y no significa que impliquen ninguna limitación en la práctica de la invención reivindicada.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1: Pase sin alimentador de células hES.

En este experimento, se recogieron células hES no diferenciadas que se habían mantenido en células de alimentador embrionarias de ratón primario y después se mantuvieron en ausencia de alimentadores. Se recubrieron los pozos de cultivo con Matrigel® y se cultivaron las células en presencia de medio nutriente condicionado obtenido de un cultivo de fibroblastos primarios irradiados.

Preparación de medio condicionado (MC) de fibroblastos embrionarios de ratón primarios (mEF):

Se recogieron fibroblastos de frascos T150 por lavado una vez con PBS exento de $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ e incubación en 1,5-2 ml de tripsina/AEDT (Gibco) durante aproximadamente 5 minutos. Después se desprendieron los fibroblastos del matraz, se recogieron en medio mEF (DMEM + FBS al 10%). Se irradiaron las células a 4.000 rad (508 s a 140 kV; autoajuste 6 en un generador Torrex™), se realizó recuento y se sembraron a aproximadamente 55.000 células cm^{-2} en medio mEF (525.000 células/pozo de una placa de 6 pozos). Después de al menos 4 horas se cambiaron los medios con SR que contenía medio ES (que contenía bFGF), usando 3-4 ml por pozo de 9,6 cm^2 de una placa de 6 pozos. Se recogió medio condicionado a diario para alimentación de cultivos de hES. Alternativamente, se preparó medio usando mEF puesto en placas en matraces de cultivo, intercambiando medio a diario a 0,3-0,4 ml cm^{-2} . Antes de adición a los cultivos de hES, se enriqueció el medio condicionado con 4 ng/ml de bFGF humano (Gibco). Se usaron cultivos de fibroblastos en este sistema durante aproximadamente 1 semana, antes de reponerlo con células recién preparadas.

Recubrimiento de Matrigel®:

Se descongelaron Matrigel® Reducido de Factor de Crecimiento o Matrigel® regular (Becton-Dickinson, Bedford MA) a 4°C. El Matrigel® se diluyó 1:10 a 1:500 (típicamente 1:30) en KO DMEM frío. Se añadieron 0,75-1,0 ml de disolución a cada pozo de 9,6 cm^2 y se incubó a temp amb durante 1 h. Se lavaron los pozos recubiertos una vez con KO DMEM frío antes de añadir las células. Se usaron las placas en 2 h después de recubrimiento o se almacenaron en DMEM a 4°C y se usaron en ~1 semana.

Cultivo de ES humano:

Se recogieron colonias de hES no diferenciadas de cultivos de hES sobre alimentadores como sigue. Se incubaron los cultivos en -200 U/ml de collagenasa IV durante aproximadamente 5 minutos a 37 °C. Se recogieron las colonias recogiendo colonias individuales con una punta de pipeta de 20 μl en un microscopio o por raspado y disociación en grupos pequeños en medio condicionado (MC). Después se sembraron estas células sobre Matrigel® en medio condicionado a 15 colonias para cada pozo de 9,6 cm^2 (si 1 colonia es -10.000 células, entonces la densidad de puesta en placa es -15.000 células cm^{-2}).

El día después de la siembra sobre Matrigel®, las células hES fueron visibles como pequeñas colonias (~100-2.000 células) y hubo células solas entre las colonias que parecían estar diferenciándose o muriendo. A medida que las células hES proliferaban, las colonias se hicieron bastante grandes y muy compactas, representando la mayoría de la superficie de la placa de cultivo. Las células hES en las colonias presentaban una alta relación núcleo a citoplasma y presentaban nucleolos prominentes, similar a las células hES mantenidas sobre células de alimentador. En la confluencia, las células diferenciadas entre las colonias representaron menos del 10% de las células en el cultivo.

Seis días después de siembra, los cultivos llegaron a ser casi confluentes. Los cultivos se dividieron por incubación con 1 ml de disolución de ~200 U/ml de collagenasa IV en KO DMEM durante ~5 minutos a 37 °C. Se aspiró la disolución de collagenasa, se añadieron 2 ml de medio hES por pozo y se rasparon las células hES de la placa con una pipeta. Se transfirió la suspensión de células a un tubo cónico de 15 ml, se llevó hasta un volumen de 6 ml y se trituró con cuidado para disociar las células en pequeños grupos de 10-2.000 células. Después se volvieron a sembrar las células sobre placas recubiertas con Matrigel® en MC, como anteriormente. Se sembraron las células a una relación 1:3 ó 1:6, aproximadamente 90.000 a 170.000 células cm^{-2} , completando el volumen en cada pozo a 3 ml. Se cambió el medio a diario y se dividieron las células y se hicieron pases de nuevo el día 13 y de nuevo el día 19 después de la siembra inicial.

El día 19 después de la siembra inicial, se recogieron las células y se evaluó la expresión del marcador superficial por citometría de células inmunofluorescentes, usando anticuerpos etiquetados específicos para marcadores de superficie celular. Para las células hES mantenidas en ausencia de alimentadores, un alto porcentaje expresó SSEA-4, Tra-1-60 o Tra-1-81. Estos 3 marcadores se expresan sobre células ES humanas no diferenciadas que se mantienen sobre alimentadores (Thomson et al., 1998). Además, hay muy poca expresión de SSEA-1, un glucolípidio que no se expresa (o se expresa a niveles bajos) sobre células ES no diferenciadas. La evaluación inmunohistoquímica de SSEA-4, Tra-1-60 o Tra-1-81 indica que la expresión de estos marcadores está localizada para las colonias de ES, no las células diferenciadas entre las colonias.

Los cultivos de células hES han sido cultivados en ausencia de células alimentadoras durante más de 180 días después de siembra inicial, sin cambio aparente en la capacidad proliferativa o fenotipo. Las células ES humanas mantenidas sobre Matrigel® en medio condicionado mEF presentan un tiempo de duplicado de aproximadamente 31-33 horas, similar a la velocidad de proliferación para células hES cultivadas sobre células alimentadoras mEF. Las células H1 después de 64 días de cultivo exento de alimentador mostraron un cariotipo normal.

Ejemplos de referencia 2: Marcadores fenotípicos de células hES en cultivo exento de alimentador.

Las células hES no diferenciadas expresaron SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, OCT-4 y hTERT. La expresión de estos marcadores disminuye con la diferenciación. Para valorar si las células mantenidas en condiciones exentas de alimentador retenían estos marcadores, se evaluaron las células por inmunotinción, multiplicación PCR de transcriptasa inversa y ensayo para actividad de telomerasa.

Para análisis por recuento de células activado por fluorescencia (FACS), las células hES se disociaron en AEDT 0,5 mM en PBS y se volvieron a suspender a aproximadamente 5×10^5 células en 50 µl de diluyente que contenía BSA al 0,1% en PBS. Para analizar la expresión del marcador de superficie, se incubaron células en los anticuerpos primarios, incluyendo control de isotipo IgG (0,5 µg/ensayo), control de isotipo IgM (1:10), SSEA-1 (1:10), SSEA-4 (1:20), Tra-1-60 (1:40) y Tra-1-81 (1:80), diluido en el diluyente a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavado con el diluyente, se incubaron las células con anticuerpos de cadena kappa anti-ratón de rata conjugados con PE (Becton Dickinson, San Jose, CA) a 4 °C durante 30 minutos. Se lavaron las células y se analizaron en Citómetro de Flujo FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) usando el programa informático de CellQuest™.

Similar a las células hES sobre alimentadores, las células sobre Matrigel®, laminina, fibronectina o colágeno IV expresaron SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Hubo muy poca expresión de SSEA-1, un glucolípido que no es expresado por células hES no diferenciadas.

Para análisis por inmunocitoquímica, se incubaron células con anticuerpos primarios, incluyendo SSEA-1 (1:10), SSEA-4 (1:20), Tra-1-60 (1:40) y Tra-1-81 (1:80), diluido en *knockout* DMEM a 37°C durante 30 min. Se lavaron las células después con *knockout* DMEM caliente y se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 15 minutos. Después de lavado con PBS, se incubaron las células con suero de cabra al 5% en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por incubación con los anticuerpos anti-ratón de cabra conjugado - FITC (1: 125) (Sigma) a temp amb durante 30 min. Se lavaron las células, se tiñeron con DAPI y se montaron. La tinción se realizó típicamente ~2 días después de pase. También se examinaron las células por expresión de fosfatasa alcalina, un marcador para células ES no diferenciadas. Esto se realizó cultivando las células en portaobjetos para cámara, fijando con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y lavando después con PBS. Después se incubaron las células con sustrato de fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 h. Se enjuagaron los portaobjetos durante 2-5 minutos en etanol al 100% antes de montaje.

Los resultados mostraron que SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81 y fosfatasa alcalina se expresaron por las colonias de hES sobre Matrigel® o laminina, como se observa para las células sobre alimentadores - pero no por las células diferenciadas entre las colonias.

La Figura 1 muestra la expresión de OCT-4 y hTERT de células H1 sobre alimentadores y fuera de alimentadores, cuando se detecta por multiplicación PCR de transcriptasa inversa. Para cuantificación relativa radioactiva de productos génicos individuales, se emplearon cebadores Alternate18S Interno Estándar de QuantumRNAT™ (Ambion, Austin TX, USA) según las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, se determinó el intervalo lineal de multiplicación de un par cebador particular, después se multiplicó conjuntamente con la mezcla apropiada de cebadores alternate18S:competímeros para producir productos PCR con intervalos lineales coincidentes. Antes de adición de AmpliTaq™ (Roche) para reacciones PCR, se pre-incubó la enzima con el anticuerpo TaqStart™ (ProMega) según las instrucciones del fabricante. Se analizaron reacciones PCR radioactivas sobre geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 5%, se secaron y se expusieron a pantallas de fotoimagen (Molecular Dynamics) durante 1 hora. Se escanearon las pantallas con un Molecular Dynamics Storm 860 y se cuantificaron las intensidades de banda usando el programa informático ImageQuant™. Los resultados se expresaron como la relación de radiactividad incorporada en la banda de hTERT u OCT-4, estandarizada a la radiactividad incorporada en la banda 18s.

Los cebadores y las condiciones de multiplicación para marcadores particulares son como sigue. OCT-4: Hebra transcrita (SEC ID N° 4) 5'-CTTGCTGCAG AAGTGGGTGG AG GAA-3' Hebra complementaria (SEC ID N° 5) 5'-CTGCAGTGTG GGTTCGGGC A-3'; alternate18:competímeros 1:4; 19 ciclos (94° 30 s; 60° 30 s; 72° 30 s). hTERT: Hebra transcrita (SEC ID N° 6) 5'-CGGAAGAGTG TCTGGAGCAA-3' Hebra complementaria (SEC ID N° 7) 5'-GGATGAAGCG GAGTCTGGA-3'; alternate18:competímeros 1:12; 34 ciclos (94° 30 s; 60° 30 s; 72° 30 s).

Se observó la expresión de hTERT y OCT-4 en todas las condiciones de cultivo excepto Matrigel® y medio regular. Además, después de exposición de las células a ácido retinoico (AR) o dimetilsulfóxido (DMSO), los factores que activan la diferenciación celular, disminuyó fuertemente la expresión de hTERT.

La Figura 2 muestra actividad de la telomerasa medida por ensayo de actividad TRAP (Kim et al., Science 266:2.011, 1.997; Weinrich et al., Nature Genetics 17:498, 1.997). Todas las condiciones de cultivo mostraron actividad de telomerasa positiva después de 40 días sobre Matrigel®, laminina, fibronectina o colágeno IV en medio condicionado mEF.

Ejemplo de referencia 3: Diferenciación de células hES.

En este experimento, se comparó la diferenciación usando métodos clásicos de formación de agregados con una técnica de diferenciación directa.

Por la técnica de diferenciación de agregados, se recogieron cultivos monocapa de estirpes de ES de rhesus y humanas por incubación en Colagenasa IV durante 5-20 min y se rasparon las células de la placa. Después se disociaron las células y se pusieron en placas de cultivo de células no adherentes en medio que contenía FBS. Se pusieron las placas en una incubadora a 37°C, y en algunos casos, se usó un balancín para facilitar que se mantuvieran los agregados en suspensión. Después de 4-8 días en suspensión, se formaron cuerpos agregados y se pusieron en placas sobre un sustrato para permitir más diferenciación.

Para la técnica de diferenciación directa, se prepararon suspensiones de células ES de rhesus y ser humano de una manera similar. Después se disociaron las células por trituración a grupos de ~50-100 células y se pusieron en placas sobre cubreobjetos de vidrio tratados con poliornitina. Se mantuvieron las células en medio que contenía suero o medio definido durante 7-10 días antes de análisis.

Las células de ambas preparaciones se fijaron y se ensayaron por inmunorreactividad para β -tubulina III y MAP-2, que es característico de neuronas y proteína ácida fibrilar filial (GFAP), que es característica de astrocitos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1: Comparación de métodos de diferenciación de hPS.

Estirpe celular ES usada para diferenciación		Diferenciación vía Cuerpos Agregados		Diferenciación Directa	
		Neuronas	Astrocitos	Neuronas	Astrocitos
R366.4	(Estirpe de Rhesus)	+	+	+	+
R278.5	(Estirpe de Rhesus)	+	+	+	+
R456	(Estirpe de Rhesus)	+	+	+	+
H9	(Estirpe humana)	+	+	+	+
H9.1	(Clon de H9)	(No Realizado)	(No Realizado)	+	+
H9.2	(Clon de H9)	+	+	+	+

Las estirpes ES de Rhesus y humana se diferenciaron en células que soportaban marcadores para neuronas y astrocitos, usando el agregado o la técnica de diferenciación directa. En los cultivos de rhesus, el porcentaje de agregados que contenían neuronas osciló de 49% a 93%. En las estirpes humanas examinadas, el porcentaje de agregados que contenía neuronas osciló de 60% a 80%. El doble etiquetado para GABA y β -tubulina indicó que una subpoblación de las neuronas expresaba el neurotransmisor inhibidor GABA. Además, se identificaron astrocitos y oligodendrocitos con inmunorreactividad GFAP e inmunorreactividad GalC, respectivamente. Por lo tanto, las células ES humanas y de rhesus tienen la capacidad para formar los tres fenotipos celulares principales en el sistema nervioso central.

Se examinó el efecto de diversos miembros de la familia de factor de crecimiento de neurotrofina. Se diferenciaron células hES por cosecha con colagenasa, disociación y siembra de nuevo sobre cubreobjetos recubiertos de poliornitina. Se pusieron en placas las células en DMEM/F12 + N2 + FBS al 10% durante la noche. Al día siguiente, se retiró el suero del medio y se sustituyó con 10 ng/ml de bFGF humano y el factor de crecimiento que se estaba ensayando. Después de 24 horas, se retiró bFGF del medio. Estos cultivos se alimentaron cada dos días. Se fijaron después de 7 días de diferenciación y se inmunotifaron para análisis. Se evaluó el número de neuronas por recuento de células positivo para β -tubulina. Los cultivos mantenidos en presencia de 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) formaron aproximadamente 3 veces más neuronas que los cultivos de control. Los cultivos mantenidos en neurotrofina-3 (1 ng/ml) formaron aproximadamente 2 veces más neuronas que los cultivos de control.

En un experimento posterior, se prepararon suspensiones de células ES humanas a partir de estirpe H9 parenteral y dos estirpes subclonadas. Se recogieron las células usando colagenasa IV y después se volvieron a poner en placas sobre portaobjetos de vidrio recubiertos de poliornitina en medio que contenía FBS al 20%. Después se alimentaron los cultivos cada dos días durante 7-10 días, después se fijaron para inmunotinción. De cada una de estas estirpes, una serie de células diferenciadas se tiñó de manera positiva para actina específica del músculo (anticuerpo de Dako) pero fueron negativas para troponina cardíaca I. Varias placas de células tiñeron de manera positiva para α -fetoproteína, indicando la presencia de células de endospermo.

Ejemplo de referencia 4: Comparación de diferenciación directa con diferenciación por cuerpos embrioides.

Para inducir diferenciación directa, se recogieron células hES no diferenciadas y se volvieron a poner en placas directamente en condiciones de diferenciación. Una muerte celular considerable fue evidente en la puesta en placa, pero muchas células se adhirieron y empezaron a proliferar y/o diferenciarse. En los cultivos diferenciados usando condiciones que contenían suero, los cultivos continuaron proliferando y alcanzaron confluencia en 5-10 días. En este punto, los cultivos contenían una población heterogénea que mostró muchas morfologías diferentes. La inmunocitoquímica reveló linajes de ectodermo, mesodermo y endodermo usando anticuerpos contra β -tubulina III, actina específica del músculo y α -fetoproteína, respectivamente. La tinción positiva para todos estos tipos de células apareció en placas que a veces eran bastante densas, por lo tanto era difícil cuantificar con precisión los porcentajes de cada tipo de célula.

Para aumentar el porcentaje de neuronas, se pusieron en placas células hES sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poliornitina y cultivos en medio definido. Aunque estos datos indican que las células de las tres capas germinativas se pueden derivar sin la producción de los EB, no se identificaron cardiomiocitos.

Como comparación, se indujeron células hES a diferenciarse por generación de cuerpos embrioides (los EB, por sus siglas en inglés). En estos experimentos, se recogieron células ES y se volvieron a poner en placas en cultivos de suspensión. Aunque inicialmente se observó una cantidad destacable de muerte celular, después de 2-3 días las células restantes formaron agregados. Los EB se mantuvieron durante tanto como 16 días en cultivo y fueron aún viables y formaron muchas estructuras después de la puesta en placa posterior. Los EB humanos de fase más tardía con frecuencia mostraron una morfología cística y a veces dieron lugar a EB pulsantes.

Para valorar la formación de cardiomiocitos, se transfirieron los EB a placas recubiertas de gelatina o portaobjetos para cámara después de 4 días en los cultivos de suspensión. Los EB unidos a la superficie después de siembra, proliferaron y se diferenciaron en diferentes tipos de células. Se observaron células que se contraen de manera espontánea en diversas regiones del cultivo el día 8 de diferenciación y el número de regiones pulsantes aumentó hasta aproximadamente el día 10. En algunos casos, más del 75% de los EB presentaba regiones de contracción. Las células pulsantes fueron morfológicamente similares a cardiomiocitos pulsantes derivados de células ES de ratón. Además, la expresión de la troponina cardíaca I de marcador específico cardíaco se examinó el día 15 de diferenciación usando inmunocitoquímica. Los focos de contracción individuales en los cultivos diferenciados fueron fotografiados para registrar el área de contracción antes de que se fijara el cultivo. Se evaluó después el cultivo por expresión de cTnI cardíaca y se equiparó a las fotografías originales para determinar el porcentaje de áreas de contracción que fueron positivas para tinción de cTnI. Como control, también se examinaron células adyacentes a los focos de contracción por tinción de cTnI. En estos cultivos, el 100% de las áreas de contracción mostró inmunorreactividad positiva, mientras se observó mínima inmunorreactividad en las células no pulsantes.

Se sometieron los cultivos de los EB diferenciados a análisis por método Western usando anticuerpo monoclonal contra cTnI. Este ensayo proporcionó una fuerte señal proteínica de 31 kDa, que corresponde al tamaño de la TnI cardíaca humana natural purificada. Se detectó cTnI en células ES humanas diferenciadas que contenían células que se contraen pero no en células ES no diferenciadas o cultivos diferenciados sin signos de células que se contraen, que sugiere la detección específica de cardiomiocitos. Como control se volvió a sondear la mancha con anticuerpo específico de β -actina, confirmando la presencia de cantidades similares de proteínas en todas las muestras.

En otros experimentos, se cultivaron los EB durante 8 ó 16 días y se mantuvieron como cultivos adherentes durante unos 10 días adicionales. Se preparó ARN a partir de las células ES humanas diferenciadas y se realizó RT-PCR semicuantitativo para detectar la expresión relativa de los productos específicos de endodermo α_1 -anti-tripsina, AFP y albúmina. Los bajos niveles de α_1 -anti-tripsina y AFP se detectaron en los cultivos no diferenciados; se detectó poca o ninguna albúmina en los mismos cultivos. Los 3 marcadores se detectaron a niveles significativamente superiores después de diferenciación. La expresión de los 3 marcadores de endodermo fue superior en cultivos derivados de cuerpos embrioides del día 8 que de los cuerpos embrioides del día 16.

Ejemplo de referencia 5: Transinfección y transducción de células hES mantenidas en capas alimentadoras de mEF primarias.

Los cultivos de hES se mantuvieron en un medio de crecimiento constituido por KO DMEM al 80% (Gibco) y Sustituto de Suero al 20% (Gibco) enriquecido con aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina 1 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM y 4 ng/ml de hbFGF (Gibco). Se recubrieron las placas con una disolución de gelatina al 0,5% (Sigma) a 37° durante la noche antes de adición de células. Se cultivaron los mEF primarios en medio mEF estándar y se dividieron 1:2 cada 2 días durante hasta 5 divisiones. Se desprendieron cultivos subconfluentes de los mEF con tripsina, se volvió a suspender en 10 ml de medio y se irradió con una dosis cumulativa de 3.500-4.000 rads con un generador de rayos X Torrex™ 150D. Se aglomeraron las células irradiadas a 400 x g durante 5 min y se volvieron a suspender a $1,25 \times 10^5$ células por ml en medio mEF estándar. Se sembraron pozos individuales de una placa de 6 pozos con $3,75 \times 10^5$ mEF irradiados por pozo; se sembraron pozos individuales de una placa de 24 pozos con 75.000 mEF irradiados por pozo.

Se realizó transinfección como sigue. Se eliminaron las células hES puestas en placa en placas de 6 pozos de la capa alimentadora con colagenasa (~200 unidades/ml) a 37° durante 7-10 min. Cuando las colonias empezaron a

desprenderse, se aspiró la colagenasa de cada pozo y se reemplazó con 2 ml de medio de crecimiento de hES estándar/pozo. Las células hES se retiraron por raspado de la superficie de un único pozo con una pipeta de 5 ml y se transfirió a un tubo cónico de 50 ml. Se añadió medio de crecimiento de hES adicional a un volumen final de 10 ml. Se trituró la suspensión de células 10 -12 veces con una pipeta de 10 ml y se añadieron unos 8 ml adicionales de medio de crecimiento de hES estándar. Se añadieron tres ml de la suspensión de células a cada pozo de placas de 6 pozos que se recubrieron previamente con gelatina y capas alimentadoras de mEF como se describió anteriormente (es decir, 1 pozo de una placa de 6 pozos fue suficiente para sembrar 6 pozos de una nueva placa).

Se ensayaron células hES puestas en placa de nuevo con una serie de sistemas de transfección diferentes para determinar si la modificación genética de las células hES se podía conseguir sin producir diferenciación. Se ensayaron sistemas incluido lo siguiente: Estuche de Transfección de Mamíferos (reactivos CaPO₄ y DEAE), Stratagene cat # 200285; TransIT-LT1 Mirus™ (Panvera), cat # MIR 2310; Polybrene (Sigma); Poli-L-Lisina (Sigma); Superfect™ (Qiagen); Effectene™ (Qiagen); Lipofectin™ (Life Technologies); Lipofectamina (difiere de Lipofectamine 2000™) (Life Technologies); Cellfectin™ (Life Technologies); DMRIE-C (Life Technologies); Lipofectamine 2000 (Life Technologies) y electroporación usando pulsador Gene BioRad™.

En las condiciones usadas, Lipofectamine 2000™ (Gibco Life Technologies cat # 11668019, pendiente de patente) y FuGENE™ (marca registrada de Fugent L.L.C.; una mezcla patentada de lípidos y otros componentes, adquiridos en Roche Diagnostic Corporation cat # 1 814 443), ambos dieron como resultado buena eficacia de transfección. La eficacia fue generalmente la mejor si se ponían en contacto estos reactivos con células hES puestas en placa de nuevo -48 h después de puesta en placa de nuevo.

La transfección usando Lipofectamine 2000™ se realizó como sigue: El ADN de plásmido (3-5 µg de pEGFP-C1, ClonTech cat. # 6084-1) se diluyó en agua a un volumen final de 100 µl. En experimentos piloto, se diluyeron 5 a 30 µl de Lipofectamine 2000™ (Gibco, cat # 11668-019) en OptiMEM™ (Gibco, cat # 11-58-021) a un volumen final de 100 µl. La disolución de ADN se añadió después lentamente a la disolución de Lipofectamine2000™ y se mezcló cuidadosamente. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 20-30 min antes de que se enriqueciera con 800 µl de OptiMEM™. Se lavaron las células con 3 ml de OptiMEM™ pre-calentado y se incubó en 0,5-1 ml de la disolución de mezcla de ADN/lípido a 37°C durante 4 h, por pozo (9,6 cm²). En algunos experimentos, a 4 h se eliminó el complejo antes de adición de 4 ml de medio condicionado mEF; en otros se añadió medio condicionado mEF suficiente a los pozos para alcanzar un volumen final de 3,5 ml y se dejó la mezcla sobre las células durante la noche. En otros experimentos se añadió la mezcla de ADN/lípido a pozos que contenían suficiente medio condicionado mEF de manera que el volumen final fuera 3,5 ml y se incubaron las células en esta mezcla durante la noche.

La transfección usando FuGENE™ se realizó como sigue. Cada pozo se transfectó con 10 µg de ADN usando FuGENE™ 6 (Roche Diagnostics Corp.), a una relación de reactivo FuGENE™ a ADN 3:2 como se describe por las direcciones del fabricante. Se usó medio sin suero OptiMEM™ en las transfecciones. En el "antiguo protocolo", 4 h después de la adición de FuGENE™- complejo de ADN, se añadieron 2,5 ml de medio de crecimiento de hES estándar a cada pozo transfectado. En el protocolo revisado ("3:2 I"), no se volvieron a alimentar los pozos transfectados con medio de crecimiento de hES estándar. Veintidós horas después de transfección, se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo.

Cuarenta y ocho horas antes de transfección, se sembraron células hES en placas de 6 pozos que se habían recubierto con gelatina y capas alimentadoras de mEF como se describió anteriormente. Se transfectaron células hES usando FuGENE™ 6 (Roche) o Lipofectamine 2000™ (Gibco) según las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de transfección, se valoró en las células la expresión de GFP por inspección bajo un microscopio de fluorescencia o citometría de flujo. En el experimento mostrado en la Fig. 1, se compararon tres métodos: el protocolo de Lipofectamine 2000™ clásico, el protocolo de FuGENE™ clásico y un protocolo de FuGENE™ variante en que se dejó la mezcla de ADN /lípido sobre las células durante la noche. Los resultados demostraron que mientras Lipofectamine 2000™ proporcionaba de manera consistente un porcentaje superior de células que expresan GFP, el protocolo FuGENE™ variante dio como resultado células que expresan GFP con una intensidad de fluorescencia media mayor.

Las transducciones transitorias usando vectores adenoviricos se realizaron como sigue. El vector Ad5CMV5-GFP (referido aquí como Ad5GFP) contiene la región codificadora de proteína verde fluorescente bajo control del activador de CMV y se adquirió en Quantum Biotechnologies, cat # ADV0030. Setenta y dos horas antes de transducción, se sembraron células hES sobre placas de 24 pozos que se habían recubierto con gelatina y capas alimentadoras de mEF como se describió anteriormente. Antes de transducción, se desprendieron 3 pozos de células hES con una disolución de tripsina al 0,05%/AEDT 5 mM (Sigma) a 37°, se volvieron a suspender en 500 µl de medio de crecimiento de mEF estándar y se hizo recuento con un hemocitómetro (las 75.000 células alimentadoras de mEF se sustrajeron de cada pozo) para establecer el número de células antes de transfección. La reserva de adenovirus se descongeló sobre hielo inmediatamente antes de su uso.

Para infección con Ad5GFP, se aspiró medio de crecimiento de los pozos conteniendo células hES y se reemplazaron con 1 ml de medio de crecimiento de hES más 9 µl de reserva de GFP Ad5 (MOI de 40). Dos horas

más tarde, se reemplazó el medio que contenía virus con 1 ml de medio de crecimiento de hES por pozo. Cada pozo transducido fue alimentado de nuevo con 1 ml de medio de crecimiento de hES fresco cada 24 horas. Se valoró la expresión de GFP por citometría de flujo. Los resultados de un experimento típico indicaron que la expresión era la mayor a las 24 h después de transducción pero persistía durante al menos 8 días a niveles bajos (por los instantes de tiempo posteriores, había tenido lugar extensa diferenciación debido a sobrecrecimiento de las células hES).

Ejemplo de referencia 6: Preparación de la estirpe celular alimentadora inmortalizada NH190.

En este ejemplo, se estableció que una estirpe celular de ratón permanente era adecuada para medio de condicionamiento para el cultivo de células madre pluripotentes (pPS) de primate. La estirpe NHG190 es una estirpe celular de fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados con telomerasa que es triple resistente a fármacos y expresa proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés).

Se obtuvieron dos cepas de ratón de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) que presentaban un transgen para resistencia a los antibióticos neomicina o higromicina. Los ratones C57BL/6J TgN(pPGKneobpA)3Ems y los ratones C57BL/6J-TgN(pPWL512hyg)1Ems de Jackson Labs se cruzaron. Se diseccionaron embriones que eran resistentes tanto a neomicina como a higromicina el día 13,5 postconcepción según protocolos clásicos para preparar fibroblastos embrionarios de ratón (mEF) para capas alimentadoras (E. J. Robertson, págs. 71-112 en *Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cell Lines*, ed. E. J. Robertson, Oxford: IRL Press, 1.987). Las células mEF derivadas se almacenaron congeladas.

Los mEF se congelaron en medio de crecimiento que contenía suero fetal bovino al 20% (HyClone), L-glutamina 2 mM (Gibco/BRL), DMEM al 80% (Gibco/BRL). Se extendieron las células usando relaciones de división 1:2 para 4 pases. Se alimentaron dos matraces que habían alcanzado ~75% de confluencia con medio fresco 4 h antes de electroporación. Se retiraron las células de los matraces con tripsina al 0,5% /AEDT 500 mM (Gibco/BRL), se granuló a 400 × g durante 5 min a temperatura ambiente y se volvió a suspender en el medio de crecimiento a una concentración de 4 × 10⁶ células /ml.

Se dividió la suspensión celular en dos alícuotas de 500 µl y se transfirieron a dos cubetas de electroporación de 0,4 cm de hueco (BioRad). Una cubeta recibió 5 µg de plásmido de control (pBS212; gen de resistencia a puromicina conducido por el potenciador/activador temprano SV40); la otra recibió 5 µg de pGRN190, comprendiendo la región codificadora de telomerasa transcriptasa inversa de murina (mTERT) conducida por activador de MPSV mas gen de resistencia a puromicina conducido por el activador/potenciador temprano SV40. Se mezclaron a mano las células y el ADN y se sometieron a electroporación usando un Pulsador de genes BioRad con un extendedor de capacitancia BioRad a un ajuste de 300 V, 960 µF.

Se transfirió cada alícuota de células a una placa de 150 cm individual que contenía 25 ml de medio de crecimiento. Se cambió el medio en las placas al día siguiente, y al día siguiente, se reemplazó medio de crecimiento por medio de crecimiento más 0,5 µg/ml de puromicina. El medio en las placas se cambió por medio que contenía puromicina fresca cada 48 horas hasta 29 días después de electroporación. En este momento, fueron evidentes grandes colonias individuales de células resistentes a puromicina en las placas sometidas a electroporación tanto de pBS212 como pGRN190. Se aislaron diez colonias de la placa de control y 12 de la placa electroporada de pGRN190 con cilindros de clonación y se transfirió cada colonia a 1 pozo de una placa de 48 pozos (1 pozo por colonia).

Una semana más tarde, todas las colonias supervivientes que se habían extendido para conseguir confluencia en la placa de 48 pozos (tres colonias de control, 1 colonia electroporada pGRN190) se transfirieron de manera individual a pozos de una placa de 24 pozos. Seis días más tarde, la única colonia que había continuado extendiéndose se derivó de la placa electroporada de pGRN190 y con posterioridad se denominó NH190. Se mantuvieron las células en medio de crecimiento más 0,5 µg/ml de puromicina. El análisis por actividad de la telomerasa por ensayo TRAP (Kim et al., *Nucleic Acids Res.* 25:2.595, 1.997) demostró que las células NH190 expresan actividad de la telomerasa funcional.

Para facilitar el seguimiento de las células en poblaciones de cultivo mixtas e in vivo, se infectaron además células NH190 con una construcción retroviral que confería expresión de proteína verde fluorescente (GFP). La secuencia GFP mejorada de plásmido pEGFP-1 es uno de los vectores de proteína fluorescente Living Colors™, disponible en ClonTech. Contiene una región codificadora de GFP potenciada, con cambios que modifican los sitios de escisión de nucleasas de restricción y desplazan las longitudes de onda de excitación y de emisión de la proteína codificada. Se clonó la secuencia de EGFP-1 en el vector pMSCV.neo, ClonTech cat # K1062-1. Se transdujeron células NH190 con el vector logrado y se separaron células positivas de GFP por clasificación FACS. La estirpe celular que expresa GFP se denominó NHG190. Estas células se han soportado en cultivo durante más de 3 meses.

Ejemplos de Referencia 7: Modificación genética de células hES mantenidas en células alimentadoras NHG190.

Se cultivaron células NHG190 en DMEM (Gibco) más suero fetal bovino al 20% (HyClone) y glutamina 5 mM. Se dividieron las células 1:10 cada 3 d. Se desprendieron cultivos subconfluentes con tripsina, se suspendieron en 10 ml de medio y se irradiaron con una dosis cumulativa de 3.500 rads con un generador de rayos X Torrex™ 150D. Se

granularon las células irradiadas a $400 \times g$ durante 5 min y se volvieron a suspender a $1,25 \times 10^5$ células por ml en medio NHG190 o medio hES estándar.

Se preparó medio condicionado poniendo en placas células NHG190 a $4,08 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ sobre placas recubiertas de gelatina. A 18-24 h después de puesta en placa, se cambió el medio por medio hES estándar con 4 ng/ml de bFGF añadido. Se condicionó el medio por las células durante 18-24 h, se recogió y se añadieron unos 4 ng/ml de bFGF adicionales. Se usó el medio para soportar cultivos de células hES el mismo día que se recogió. Las células NHG190 irradiadas se pudieron usar para preparar medio condicionado durante 7-10 días.

Se transfectaron células hES como sigue. Se retiraron las células de la capa alimentadora usando collagenasa ($\sim 200 \text{ U/ml}$) a 37°C durante 7-10 min y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml. Se añadió medio de cultivo hES a un volumen final de 10 ml; se trituró la suspensión 10-12 veces con una pipeta de 10 ml y se añadieron otros 8 ml de medio hES. Se añadieron tres ml de una suspensión celular a cada pozo en una placa de 6 pozos pre-recubierta con Matrigel® y células alimentadoras NHG190.

Cuarenta y ocho horas después de la siembra, se transfectaron las hES con 10 μg de ADN por pozo usando FuGENE™ 6 (Roche) según el protocolo del fabricante en medio exento de suero OptiMEM™. El ADN era un plásmido que contenía el activador de PGK que conduce neo^r. Cuatro h más tarde, se añadieron 3 ml de medio condicionado de NHG190 a cada pozo transfectado. Se volvieron a alimentar a diario las células con 3 ml de medio condicionado. Cuarenta y ocho h después de transfección, se lavaron las células con medio condicionado de NHG190 que contenía 200 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina añadida (Sigma), que se reemplazó a diario después. Después de 3 días de selección, se añadieron a células alimentadoras NHG190 irradiadas adicionales ($1,25 \times 10^5$ células /pozo en medio hES). Veinticuatro h más tarde, se reemplazó de nuevo el medio con medio condicionado de NHG190 que contenía 200 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina, reemplazado a diario.

Se aislaron colonias individuales y se extendieron por otro ciclo de selección. Después de unos 5 días adicionales, se identificaron las colonias individuales por microscopio y se marcaron en el exterior de la placa. Se retiró el medio y se reemplazó con collagenasa ($\sim 200 \text{ U/ml}$). Se recogieron colonias individuales usando una punta de pipetea p20 y se transfirieron a tubos individuales que contenían 2 ml de medio condicionado de NHG190 (sin geneticina). Se trituró la suspensión 5 veces para disgregar las colonias y se transfirieron los contenidos de cada tubo a un pozo de una placa de 12 pozos recubierta con gelatina y células NHG190 irradiadas ($1,875 \times 10^5$ células /pozo). Se alimentaron las células 24 h más tarde con 2 ml de medio condicionado fresco. Dos días después de la siembra, se lavaron las células con 2 ml de medio condicionado que contenía 200 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina, se reemplazó a diario durante 5 días. A medida que cada pozo llegaba a ser confluyente 50-75%, se desprendieron las células con collagenasa, se transfirieron a 6 ml de medio condicionado y se trituraron 10-12 veces. Se añadieron 3 ml de suspensión celular a cada uno de 2 pozos de una placa de 6 pozos recubierta con gelatina y células NHG190 irradiadas ($3,75 \times 10^5$ células /pozo); se vuelven a alimentar las células con 3 ml de medio condicionado a 24 h. Después se seleccionaron las células durante 5 días usando 3 ml de medio condicionado que contenía geneticina y se dividieron 1:6 como antes.

Se realizó transducción estable usando retrovirus como sigue. Se construyó vector retroviral denominado GRN354 en Geron Corp. usando vector PMSCVneo adquirido en ClonTech (cat # K1062-1). Se insertó la región codificadora de eGFP aguas abajo del LTR de MSCV. El LTR conduce la expresión de GFP y el vector también contiene el gen neo^r conducido por el activador de PGK de murina. Se recubrieron las placas con gelatina al 0,5% y células alimentadoras NHG190 ($7,5 \times 10^4$ en 1 ml de medio NHG190 para placas de 24 pozos; $3,75 \times 10^5$ en 3 ml de medio para placas de 6 pozos). La estirpe H7 de hES se sembró en una placa preparada de 24 pozos en medio hES (1 ml/pozo). Cuarenta y ocho h más tarde, se desprendieron 3 pozos de células hES usando tripsina al 0,05% /AEDT 5 mM (Sigma) a 37°C , se volvió a suspender en 500 μl de medio NHG190 y se contaron. Se descongeló la reserva de construcción de retrovirus pGRN354 sobre hielo inmediatamente antes de su uso. Se aspiró medio de crecimiento de los pozos y se reemplazó con 400 μl de medio hES más 8 μl de retrovirus (MOI de 10) y 4 μl de 8 mg/ml de disolución de polybrene (Sigma). Dos h más tarde, se añadieron 800 μl de medio de crecimiento de hES por pozo. Cada pozo transducido se volvió a alimentar con 1 ml de medio de hES fresco cada 24 h.

Cuatro días después de transducción, se reemplazó medio con 1 ml de medio de crecimiento de hES que contenía 200 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina. Después de 3 días de selección de geneticina, se desprendieron las células con collagenasa, se trituraron, se volvió a suspender en 3 ml de medio de hES, se volvió a sembrar en un pozo de una placa de 6 pozos recubierta con gelatina y alimentadores de NHG190 y se volvieron a alimentar con medio de hES después de 24 h. El medio se reemplazó de nuevo después con medio de hES que contenía geneticina y se volvió a alimentar cada 24 h. Las colonias no diferenciadas sobrevivieron a la selección y se mantuvieron durante más de 3 meses. El análisis FACS mostró que 50-65% de las células seleccionadas expresan GFP, aunque a bajos niveles. El cariotipo de las células fue normal.

La Figura 3 muestra la expresión de GFP de células hES transducidas con retrovirus y después diferenciadas. La estirpe celular H7 de hES se puso en placas sobre capas alimentadoras resistentes a fármacos (NHG190), se infectaron con GRN354 y se seleccionaron para resistencia al fármaco G418. Se extendieron las células transducidas y se mantuvieron bajo selección de G418 por múltiples pases. Se transfirieron las células a cultivo de

suspensión para formar cuerpos embrioides, se dejó que se diferenciaron durante 4 días y después se pusieron en placas en medio FBS al 20% durante 1 semana. Después de que tuviera lugar diferenciación extensa, se fijaron los cultivos en paraformaldehído al 4% y se fotografiaron bajo fluorescencia para expresión de GFP. Muchas de las células diferenciadas expresan mayores niveles de GFP que la estirpe de hES transfectada no diferenciada, consistente con la activación diferencial del MESV-LTR en diferentes tipos de células.

Ejemplo de referencia 8: Transfección de células hES exentas de alimentador.

En este ejemplo, se modificaron genéticamente células hES mantenidas en cultivo exento de alimentador sobre laminina en medio condicionado por transfección con un plásmido que soportaba proteína verde fluorescente (GFP) conducida por el activador CMV.

Se preparó medio condicionado de mEF como se describió anteriormente. Se irradiaron los mEF y se sembraron a aproximadamente $5,7 \times 10^4$ células /cm². Después de al menos 16 horas se cambió el medio con medio hES incluyendo 4 ng/ml de hbFGF añadido. Se recogió el medio condicionado a diario para alimentación de cultivos de hES. Antes de adición a los cultivos de hES, se enriqueció este medio con unos 4 ng/ml adicionales de hbFGF. En el caso de que fuera necesaria la selección de transfectantes estables, se enriqueció el medio condicionado de mEF con 200 µg/ml de geneticina (Sigma cat. # G5013).

Se recogieron células hES de H9 mantenidas en capas alimentadoras de mEF de cultivos por incubación con ~200 unidades/ml de colagenasa IV a 37°C durante 10 min. Se disociaron las células y se volvieron a suspender en medio de cultivo hES regular o medio condicionado de mEF. Se volvieron a sembrar después las células en el medio regular sobre capas alimentadoras de mEF y se pusieron en placas las células en el medio condicionado de mEF sobre Matrigel® o laminina. La densidad de siembra para todos los cultivos fue aproximadamente 4×10^4 células /cm². Se mantuvieron las células sobre capas alimentadoras en medio regular mientras las células sobre matrices se mantenían en medio condicionado de mEF durante 1 ó 2 días antes de la transfección. Se reemplazó el medio condicionado cada 24 h.

Los cultivos de células hES se transfectaron con Lipofectamine 2000™ como se describió anteriormente. El análisis FACS de expresión de GFP se realizó como sigue. Se recogieron células hES usando AEDT 0,5 mM en PBS y se volvieron a suspender a aproximadamente 1×10^6 células /ensayo. Se lavaron las células en una disolución que contenía PBS más FBS al 2%, azida de sodio al 0,1% y AEDT 2 mM. Se realizó tinción de SSEA-4 en el mismo tampón usando anticuerpo obtenido del Banco de Hibridoma de Estudios de Desarrollo (Universidad de Iowa, Iowa City) a dilución 1:15. Se obtuvieron controles igualados de isotipo de Sigma, (St. Louis MO, USA). Se incubaron células con anticuerpos en un volumen final de 100 µl durante 30 min a 4°C, se lavaron y se incubaron con anticuerpos de cadena κ anti-ratón de rata con PE (Becton Dickinson, San Jose, CA) a 4°C durante 30 min. Se lavaron las muestras como anteriormente y se analizaron por GFP y expresión de SSEA-4 en citómetro de flujo FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) usando el programa informático CellQuest™.

Las células hES de la estirpe H9 mantenidas sobre laminina en medio condicionado mEF se transfectaron con un plásmido que soportaba GFP conducido por el activador CMV a 24 ó 48 h después de puesta en placa. Los experimentos iniciales usaron una mezcla de 5 µg de plásmido y 12 µl de Lipofectamine 2000™. Las células recibieron 1 ml de complejo de ADN /lípidos y se incubaron durante 4 h a 37° antes de adición de 3 ml de medio condicionado de mEF y después se vigiló para expresión de GFP 24 h después de transfección.

La Figura 4 muestra los resultados de este experimento. Panel A: morfología de células H9 mantenidas sobre laminina. Panel B: células positivas de GFP observadas en la misma colonia mostrada en A. Panel C: análisis FACS de % células positivas de GFP en alta población de SSEA-4 (células no diferenciadas). Las células se transfectaron 24 (barra 1 y 2) o 48 h (barra 3 y 4) después de la siembra y se analizaron 24 (barra 1 y 3) o 48 h (barra 2 y 4) después de la transfección. Se observaron células verde brillante en áreas compactas de colonias ES no diferenciadas sobre laminina 24 h después de transfección (Paneles A y B). La transfección a 48 h después de siembra inicial proporcionó la más alta eficacia: 38% de las células fueron positivas de GFP cuando se determina por análisis FACS 24 h después de la transfección (Panel C).

El siguiente experimento comparó la eficacia de transfección de las células H9 mantenidas sobre Matrigel® o placas recubiertas de laminina en medio condicionado de mEF con células mantenidas sobre alimentadores de mEF. Las células sobre capas alimentadoras mantenidas en medio regular se usaron como control. Las diferencias morfológicas entre células sobre alimentadores y células fuera de alimentadores se observaron 1 ó 2 días después de la siembra. Las colonias sobre alimentadores fueron más compactas que las células mantenidas fuera de capas alimentadoras; las células hES individuales en cultivos exentos de alimentador fueron menos compactas y más planas. No hubo diferencia significativa en la morfología de células o colonias entre células sobre laminina y células sobre Matrigel. Estas células se transfectaron con un plásmido que expresaba GFP conducido por el activador CMV 2 días después de la siembra. Veinticuatro horas después de la transfección, se examinaron las células para expresión de GFP bajo un microscopio de fluorescencia.

Se mantuvieron las células sobre alimentadores de mEF en medio regular (mEF/MR), sobre laminina en medio condicionado por mEF (Laminina/MC) o sobre Matrigel® en el medio condicionado (Matrigel/MC). Se observaron células verde brillante en colonias de hES no diferenciadas de cultivos exentos de alimentador. Por el contrario, se encontraron muy pocas células verdes en las colonias sobre alimentadores. El análisis FACS mostró que el 16% de las células sobre Matrigel® y 14% de las células sobre laminina fueron positivos de GFP en alta población de SSEA-4 mientras que sólo el 5% de las células sobre alimentadores fueron positivas. Estos resultados indican que la eficacia de transfección aumenta significativamente usando condiciones exentas de alimentador.

Los siguientes experimentos evaluaron los efectos de 1) la relación de ADN:lipido; 2) adición del complejo ADN /lipido a células 4 h previas a la adición de medio condicionado mEF frente a la adición del complejo a células en presencia de medio condicionado mEF y 3) uso de Lipofectamine 2000™ frente a FuGENE™.

La transfección usando Lipofectamine2000™ se describió anteriormente. La transfección con FuGENE™ se realizó como sigue. El ADN de plásmido (5-10 µg de pEGFP-C1, ClonTech cat. # 6084-1) se diluyó en agua a un volumen final de 100 µl. En experimentos piloto, se añadieron 5-30 µl de FuGENE™ a suficiente OptiMEM™ para conseguir un volumen final de 100 µl. La disolución de ADN se añadió después lentamente a la disolución de FuGENE™ y se mezcló cuidadosamente. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min antes de que se enriqueciera con 800 µl de OptiMEM™. Se lavaron las células con 3 ml de OptiMEM™ pre-calentado y se incubó en 1 ml de la disolución de mezcla de ADN/lipido a 37°C durante 4 h. En algunos experimentos, a 4 h los pozos recibieron unos 2 ml adicionales de medio condicionado mEF; en otros se añadió la mezcla de ADN /lipido a pozos que contenían 2 ml de medio condicionado mEF y se incubaron las células en esta mezcla durante la noche.

Se obtuvieron las eficacias mayores en las siguientes condiciones: Barra 1 = una mezcla de 5 µg de plásmido más 12 µl de Lipofectamine 2000™, añadiendo 1 ml de la mezcla ADN /lipido a pozos que contenían 2,5 ml de medio condicionado de mEF e incubando las células en esta mezcla durante la noche. Barras 2 y 3 = una mezcla de 10 µg de plásmido más 15 µl de FuGENE™ e incubando las células en 1 ml de la mezcla ADN /lipido durante 4 h antes de añadir 2,5 ml de medio condicionado de mEF. L=Lipofectamine2000™; F=FuGENE™.

Para investigar si las células hES exentas de alimentador experimentaban modificación genética estable, se cotransfectaron células hES de H1 mantenidas sobre Matrigel® con una mezcla de 7,5 µg de plásmido soportando β-galactosidasa conducida por el activador de EF1a y 2,5 µg de plásmido soportando el activador de PGK que conduce el gen de neofosfotransferasa. Las células se transfectaron 48 h después de ponerlas en placas sobre Matrigel® en medio condicionado de mEF. Se incubaron 10 µg de plásmido más 15 µl de FuGENE™ con las células en 1 ml durante 4 h antes de añadir 2,5 ml de medio condicionado de mEF. Después de 48 h, se cambió el medio por medio condicionado de mEF enriquecido con 200 µg/ml de genética. Los cultivos se mantuvieron en este medio que contiene genética con cambio diario de medio durante más de 21 días. Todos los cultivos de transfección simulada (es decir, los que recibieron FuGENE™ mezclado con agua en vez de plásmido) murieron en 48-72 h. Surgieron colonias resistentes a fármacos en los pozos transfectados con tanto FuGENE™ como plásmido a una frecuencia de aproximadamente 1 en a 10⁵ células originalmente transfectadas. Se mantuvieron las colonias en medio condicionado de mEF que contenía genética y se extendieron.

Ejemplo 9: Preparación de vectores en los que un gen de la timidina cinasa está bajo control de una secuencia activadora de hTERT.

El clon lambda denominado λGΦ5 que contenía el activador de hTERT es depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), 10801 Universidad Blvd., Manassas, VI 20110 U.S.A., con Acceso N° 98505. λGΦ5 contiene un inserto de 15,3 kbp incluyendo aproximadamente 13.500 bases aguas arriba de la secuencia codificadora de hTERT.

Un fragmento Not1 que contenía las secuencias activadoras de hTERT se subclonó en el sitio de Not1 de plásmido derivado de pUC, que fue denominado pGRN142. Un subclón (plásmido "pGRN140") que contenía un fragmento de NcoI 9 de kb (con secuencia génica de hTERT y aproximadamente 4 a 5 kb de secuencia de vector lambda) se secuenció parcialmente para determinar la orientación del inserto. Se digirió pGRN140 usando Sall para retirar secuencias de vector lambda, el plásmido resultante (con secuencias lambda retiradas) se denominó pGRN144. El inserto pGRN144 se secuenció después.

La SEC ID N° 1 es un listado de los datos de las secuencias obtenidos. Los nucleótidos 1-43 y 15.376-15.418 son secuencias de plásmidos. Así, el inserto genómico empieza en el resto 44 y termina en el resto 15.375. El comienzo del fragmento de ADNc clonado corresponde al resto 13.490. Hay elementos de la secuencia Alu situados -1.700 pares de bases aguas arriba. La secuencia del inserto hTERT de pGRN142 se puede obtener ahora a partir de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con Acceso PGRN142.INS AF121948. La numeración de los restos de hTERT para plásmidos en la siguiente descripción empieza desde el codón de iniciación de la traducción, según la práctica clásica en el campo. El codón de ATG de hTERT (el sitio de iniciación de traducción) empieza en el resto 13.545 de la SEC ID N° 1. Así, la posición -1, el primer resto aguas arriba, corresponde al nucleótido 13.544 en la SEC ID N° 1.

Se realizaron estudios de expresión con construcciones indicadoras que comprendían diversos hTERT aguas arriba y secuencias de intrón. Un fragmento de BgIII-Eco47III de pGRN144 (descrito anteriormente) se digirió y se clonó en el sitio BgIII-NruI de pSEAP2Basic (ClonTech, San Diego, CA) para producir plásmido denominado pGRN148. Se realizó un segundo plásmido pGRN150, indicador - activador, insertando el fragmento BgIII-FspI de pGRN144 en los sitios BgIII-NruI de pSEAP2. Se construyó plásmido pGRN173 usando el fragmento EcoRV-StuI (de +445 a -2.482) de pGRN144. Esto hace un plásmido indicador activador que contiene la región activadora de hTERT de aproximadamente 2,5 kb aguas arriba del comienzo del marco de lectura abierto de hTERT a justo después del primer intrón en la región codificadora, con el codón Met de iniciación del marco de lectura abierto de hTERT cambiado a Leu. El plásmido pGRN175 se hizo por digestión de APA1 (Klenow romo)-SRF1 y religadura de pGRN150 para suprimir la mayor parte de la secuencia genómica aguas arriba de hTERT. Esto hace un plásmido activador/indicador que usa 204 nucleótidos de secuencias de hTERT aguas arriba (desde la posición -36 a -117). El plásmido pGRN176 se hizo por religadura de PML1-SRF1 de pGRN150 para suprimir la mayor parte de las secuencias de hTERT aguas arriba. Esto hace un plásmido activador/informador que usa 204 nucleótidos de secuencias de hTERT aguas arriba (desde la posición -36 a -239).

Los niveles de actividad de fosfatasa alcalina de placenta segregada (SEAP, por sus siglas en inglés) se detectaron usando el sustrato quimioluminiscente CSPDTM (ClonTech). Se encontró que la actividad SEAP detectada en el medio de cultivo era directamente proporcional a los cambios en las concentraciones intracelulares de ARNm de SEAP. Los plásmidos pGRN148 y pGRN150 (activador-indicador hTERT) y el plásmido pSEAP2 (control positivo, que contenía el activador y potenciador temprano de SV40) se transfectaron en estirpes celulares de ensayo. Las construcciones pGRN148 y pGRN150 condujeron la expresión de SEAP tan eficazmente como el pSEAP2 en estirpes celulares (derivadas de tumor) inmortalizadas. Sólo el control de pSEAP2 proporcionó actividad detectable en células mortales.

La capacidad del activador de hTERT para conducir específicamente la expresión del gen de la timidina cinasa (*tc*) en células tumorales se ensayó usando una variedad de construcciones: Una construcción, denominada pGRN266, contiene un fragmento PCR de EcoRI-FseI con el gen de la *tc* clonado en los sitios EcoRI-FseI de pGRN263. pGRN263, que contenía aproximadamente 2,5 kb de secuencia activadora de hTERT, es similar a pGRN150, pero contiene un gen de neomicina como marcador de selección. pGRN267 contiene un fragmento PCR de EcoRI-FseI con el gen de la *tc* clonado en los sitios EcoRI-FseI de pGRN264. pGRN264, que contenía aproximadamente 210 pb de secuencia activadora de hTERT, es similar a pGRN176, pero contiene un gen de neomicina como marcador de selección. pGRN268 contiene un fragmento PCR de EcoRI-XbaI con el gen de la *tc* clonado en los sitios EcoRI-XbaI (no metilado) de pGRN265. pGRN265, que contenía aproximadamente 90 pb de secuencia activadora de hTERT, es similar a pGRN175, pero contiene un gen de neomicina como marcador de selección.

Estas construcciones activador/*tc* de hTERT, pGRN266, pGRN267 y pGRN268, se volvieron a introducir en células de mamífero y se seleccionaron clones estables de *tk*⁺ (y/o poblaciones de masa). El tratamiento con ganciclovir in vitro de las células *tk*⁺ dieron como resultado destrucción selectiva de todas las estirpes tumorales ensayadas, incluyendo 143B, 293, HT1080, Bxpc-3', DAOY y NIH3T3. El tratamiento con ganciclovir no presentó efecto sobre las células BJ normales.

La Figura 5 es un mapa del adenovector de T_{PAC} pGRN376. Se hizo por clonación del fragmento NOT1-BAMH1 de pGRN267 en los sitios NOT1-BGL2 de pAdBN (Quantum Biotech). El vector de 7185 pb comprende el gen de la timidina cinasa (TC) de herpes simple bajo control de la secuencia activadora de hTERT de longitud media.

Ejemplo de referencia 10: Transducción de células hES con una construcción de timidina cinasa.

Estos experimentos ensayan el efecto del vector pGRN376 descrito en el Ejemplo precedente sobre células hES. El vector contiene el gen de la timidina cinasa del virus del herpes bajo control del activador de la telomerasa transcriptasa inversa. La expresión del gen de la timidina cinasa en células las haría susceptibles de toxicidad del profármaco ganciclovir.

Las células H1 no diferenciadas se pusieron en placas de 24 pozos (1 pozo confluyente de una placa de 6 pozos se dividió en 24 pozos de una placa de 24 pozos). Después de 48 h, algunos pozos se infectaron con el vector de T_{PAC} a un MOI de 30 ó 100. Cuatro h después de adición del vector vírico, se cambió el medio por medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón nuevos (mEF-CM); algunos pozos recibieron medio enriquecido con ganciclovir 30 µM (GCV). Se volvieron a alimentar células expuestas a GCV con mEF-CM que contenía GCV 30 µM a diario durante 4 días. Los días 2, 3 y 4 después de la iniciación de tratamiento de GCV, se cosecharon los pozos y se analizaron por citometría de flujo para valorar cambios en 1) número total de células y 2) viabilidad celular (medido por exclusión PI).

La Figura 6 muestra los resultados de este experimento. No se detectó cambio en el número total de células a MOI de 30 en ausencia de GCV; pero hubo alguna disminución a MOI de 100 en ausencia de GCV empezando a 48 h. Se detectó evidencia de toxicidad de GCV solo: los pozos que recibieron GCV solo contenían aproximadamente 55% tantas células como los pozos de control el día 2, disminuyendo a 40% por el día 4. Los pozos que recibieron GRN376 a MOI de 30 ó 100 cultivados en presencia de GCV mostraron resultados idénticos: por el día 2, estos

pozos contenían 18% de las células contenidas en los pozos de control, mientras los días 3 y 4 estos pozos contenían 6% y 8% de las células en los pozos de control.

Se observó ligera toxicidad a MOI de 100 el día 4 en ausencia de GCV (50% células en entrada de ES frente a 83% para las células de control). Se observó algo de toxicidad de GCV sólo el d2, 75% de las células en la entrada de ES (frente a 85% de control); el día 3, 68% (frente a 82% de control); el día 4, 50% (frente a 65% control). Los pozos que recibieron GRN376 a MOI de 30 ó 100 cultivados en presencia de GCV mostraron resultados similares: por el día 2, estos pozos contenían 24-28% células en la entrada de ES, el día 3 contenían 19-22% de las células en la entrada de ES y el d4 estos pozos contenían 12% de las células en la entrada de ES. Así, GRN376 más GCV es eficaz en la destrucción de células hES no diferenciadas a un MOI tan bajo como 30.

Experimento de valoración

Se pusieron en placas células de H1 no diferenciadas en placas de 24 pozos (1 pozo confluyente de una placa de 6 pozos se dividió en 24 pozos de una placa de 24 pozos). Después de 48 h, algunos pozos se infectaron con pGRN376 a un MOI de 30. Cuatro h después de adición del vector vírico, se cambió el medio por nuevo mEF-CM; algunos pozos recibieron medio enriquecido con ganciclovir (GCV) 5, 10, 20, 30 ó 40 μ M. Se volvieron a alimentar las células expuestas a GCV con mEF-CM que contenía GCV a diario durante 2 días. El día 2 después de la iniciación de tratamiento de GCV, se cosecharon los pozos y se analizaron por citometría de flujo para valorar cambios en el número total de células y la viabilidad celular (medido por exclusión PI).

La Figura 7 muestra los resultados de este experimento. GCV -20 μ M fue óptimo en las condiciones ensayadas.

Comparación de diferentes estirpes de hES.

Se pusieron en placas hES no diferenciadas de estirpes denominadas células H1 y H7 en placas de 24 pozos (1 pozo confluyente de una placa de 6 pozos se dividió en 24 pozos de una placa de 24 pozos). Después de 48 h, algunos pozos se infectaron con pGRN376 a un MOI de 30. Cuatro h después de adición del vector vírico, se cambió el medio por nuevo mEF-CM; algunos pozos recibieron medio enriquecido con GCV 20 μ M. Se volvieron a alimentar células expuestas a GCV con mEF-CM que contenía GCV a diario durante 3 días. El día 4 después de la iniciación de tratamiento de GCV, se cosecharon los pozos y se analizaron por citometría de flujo para valorar cambios en el número total de células.

La Figura 8 muestra los resultados. El número total de células demostró disminuciones en el número de células para las dos estirpes después de tratamiento del vector T_{PAC}. H7 mostró menos toxicidad inducida por GCV sólo que lo mostró H1. Así, diferentes estirpes celulares de hES responden al vector T_{PAC}. En estudios posteriores, también se encontró que la estirpe celular H9 era altamente sensible a GCV después de tratamiento del vector T_{PAC}.

Ejemplo de referencia 11: Selección de células diferenciadas.

En este experimento, se trataran células hES con ácido retinoico (AR) o dimetilsulfóxido (DMSO) y después se analizó por expresión de hTERT y OCT-4 después de tratamiento con T_{PAC}.

Se pusieron en placas células de H1 no diferenciadas en placas de 24 pozos (1 pozo confluyente de una placa de 6 pozos dividido en 24 pozos de una placa de 24 pozos). 24 h más tarde, algunos pozos se volvieron a alimentar con mEF-CM que contenía AR 500 nM o DMSO al 0,5%; se volvieron a alimentar los pozos con medio enriquecido con AR o DMSO para el resto del experimento. Después de 7 días de tratamiento con AR o DMSO, se infectaron las células con GRN376 a un MOI de 30.

Cuatro h después de adición del vector vírico, se cambió el medio por nuevo mEF-CM (más AR o DMSO donde sea apropiado); algunos pozos también recibieron medio enriquecido con ganciclovir 20 μ M (GCV). Se volvieron a alimentar células expuestas a GCV con mEF-CM que contenía GCV a diario durante 3 días. El día 3 después de la iniciación de tratamiento de GCV, se cosecharon los pozos y se analizaron por citometría de flujo para valorar cambios en el número total de células. Se usaron pozos adicionales en un esfuerzo para cultivar cualquier célula madre no diferenciada restante; se cambió el medio de estos pozos a mEF-CM (sin AR, DMSO o GCV). Se volvieron a alimentar las células con mEF-CM cada día durante 7 días, después se recogieron para aislamiento de ARN. Se analizaron estas muestras por RT-PCR cuantitativo por la expresión de hTERT y OCT-4.

La Figura 9 muestra que el número total disminuyó después de tratamiento de T_{PAC}. Después de 7 días de pretratamiento de fármaco seguido por T_{PAC} más GCV, todos los pozos contenían similares números de células. Durante el intento para cultivar células madre supervivientes, los pozos llegaron a ser confluentes con células que parecían altamente diferenciadas; eran obvias las células hES no diferenciadas. Los pozos que contenían células que habían sido pre-tratadas con AR eran distintos en aspecto que las células pretratadas con mEF-CM no adulterado o tratadas con mEF-CM más DMSO. El análisis RT-PCR (Panel Inferior, no cuantitativo, 35 ciclos) mostró que las células supervivientes de los pozos tratados con mEF-CM o DMSO no presentaron expresión detectable de OCT-4, mientras 2 de cada 4 muestras pretratadas con AR presentaron productos PCR de OCT-4 muy débiles.

Así, sobrevivieron células no diferenciadas no detectables a tratamiento T_{PAC} seguido por cultivo posterior de los pozos cultivados en mEF-CM o mEF-CM más DMSO. El pretratamiento con AR conduce a la detección de niveles bajos de OCT-4 en las células supervivientes. No está claro si esto refleja persistencia de células madre no diferenciadas o inducción de otro tipo de célula que expresa OCT-4.

Ejemplo de referencia 12: Estirpes de células madre estables que contienen la construcción T_{PAC}:

Para facilitar la creación de estirpes celulares estables modificadas genéticamente con la construcción de activador/timidina cinasa de hTERT, se modificó plásmido pGRN376 (Ejemplo 9) para suprimir la mayor parte de la secuencia de adenovirus. El plásmido se digirió con StuI y Not I, seguido por debilitamiento y religadura. El vector restante contenía la construcción de activador/timidina cinasa de hTERT, precedido por la secuencia de bloqueo de la transcripción para evitar la activación de expresión del gen de la tc por secuencias activadoras aguas arriba del sitio de integración en el genoma. El vector modificado se denominó pGRN376mod.

pGRN376 - vector T _{PAC} adenovírico				
Ad5	TRM	pTERT 216 pb	TC HSV	poliA SV40
pGRN376mod - vector plásmido T _{PAC}				
	TRM	pTERT 216 pb	TC HSV	poliA SV40

Se dividieron los cultivos de la estirpe celular hES de H9 1:4 usando PBS que contenía AEDT 0,5 mM, como se describió anteriormente y se pusieron en placas en cultivos exentos de alimentador en placas de 6 pozos. Veinticuatro h después de puestas en placas, se cotransfectaron células con 2 µg GRN376mod más 0,5 µg de un plásmido que codifica neomicina fosfotransferasa, usando FuGENE™-6 como se describió anteriormente. Se añadió medio que contenía 200 µg/ml de geneticina 48 h después de transfección para seleccionar las células transfectadas. Después de 7-10 días en medio que contenía geneticina, se recogieron 103 colonias individuales de los pozos y se pusieron en placas de manera individual en placas de 24 pozos, que se extendieron después por cultivo durante -7 días. Se investigó la sensibilidad al profármaco ganciclovir, en noventa clones individuales, a una concentración de 30 µM. Se identificaron diez clones en los cuales murieron esencialmente todas las células no diferenciadas en 1-3 días de cultivo con ganciclovir, dejando sólo células en vestigios que se habían diferenciado fuera de la colonia principal.

En otro experimento, la estirpe H1 de células hES (pase 59) se dividió 1:6 en placas de 24 pozos recubiertas de Matrigel® en medio celular hES clásico (día 0; 1 ml/pozo, medio condicionado MEF con 4 ng/ml de bFGF). Se cambió el medio con nuevo medio estándar al día siguiente. El día 3, se retiró el medio y se reemplazó con 200 µl/pozo de medio estándar (transfección simulada), o virus pGRN376 a MOI 100, diluido en 200 µl/pozo de medio hES estándar. Después de 4 h, se retiró el medio de todos los pozos y se reemplazó con 1 mg/ml de medio hES estándar con o sin ganciclovir 30 µM. Se cambiaron los pozos con medio fresco (con o sin ganciclovir 30 µM) en cada uno de los tres días siguientes.

La Figura 10 es una micrografía de las células el día 6. En los pozos transducidos con vector de control (Panel A), las colonias hES formaron colonias con características normales. En los pozos transducidos con virus de pGRN376 y después tratados con ganciclovir (Panel B), la mayoría o todas las colonias de células ES desaparecieron y sólo quedaron células diferenciadas. Los pozos tratados con T_{PAC} contenían 8 veces menos células que los pozos de control.

Ejemplo de referencia 13: Caracterización adicional de estirpes de células madre embrionarias de T_{PAC} estables.

Se derivaron clones estables de T_{PAC} por cotransfección de plásmidos pGRN376mod y pGK-neo en la estirpe celular H9 de hES en medio condicionado de mEF con FGF básico sobre placas recubiertas con Matrigel® de factor de crecimiento reducido.

En un experimento la estirpe H9 (p 80) se traspasó 6 veces usando AEDT 0,5 mM previamente a transfección. Se usaron 2 µg de plásmido pGRN376m y 0,5 µg de plásmido pGK-neo para transfección de cada pozo de una placa de 6 pozos de células ES, usando una relación 3:2 de Fugene™ (un facilitador de transfección a base de lípido) a ADN. Las células se transfectaron 24 horas después de la siembra y se inició la selección de G418 24 h post-transfección. Se recogieron 101 colonias resistentes a G418 usando colagenasa. Se aislaron los clones de las células transfectadas sólo con pGK-neo como controles para cotransfección.

Se extendieron las colonias individuales usando AEDT 0,5 mM para detección de GCV primaria y secundaria. La detección primaria con GCV 30 µM (semanas 1 y 2) identificó 10 clones sensibles a GCV y 20 clones parcialmente sensibles a GCV. La investigación secundaria con GCV 30 µM (semanas 3 y 4) confirmó 9 clones sensibles a GCV, incluyendo los denominados H9-376m-18, H9-376m-77 y H9-376m-62. Después de identificación secundaria de

GCV, se extendieron las células usando AEDT 0,5 mM en cultivos mayores y después se traspasaron usando colagenasa.

En un segundo experimento, se pasó inicialmente de nuevo la estirpe H9 (p 24) usando AEDT 0,5 mM y después se transinfectó como antes. Se recogieron sesenta y dos colonias co-transinfectadas resistentes a G418 usando colagenasa el día 0. La identificación primaria con GCV 30 μ M (días 20, 22 y 26) identificó un clon sensible a GCV y cuatro clones parcialmente sensibles a GCV. Después de detección primaria de GCV, se extendieron las células usando AEDT 0,5 mM en cultivos más grandes y volvieron gradualmente a traspaso de colagenasa estándar. La detección secundaria con GCV 30 μ M (día 57) confirmó un clon sensible a GCV (denominado H9-376m-6).

Los clones sensibles a GCV de cada uno de estos experimentos se sometieron a selección adicional en cultivo con G418, para determinar su estabilidad. Los clones denominados H9-376m-18 y H9-376m-77 mostraron resistencia a G418 que no era estable. Los clones denominados H9-376m-62, H9-376m-6 y H9-pGK-neo-1 eran resistentes a G418.

La Figura 11 (parte superior) muestra sensibilidad de las estirpes T_{PAC} estables a ganciclovir (GCV). Cada estirpe celular se expuso a una cantidad decreciente de GCV para determinar la concentración más baja de GCV requerida para producir la destrucción completa de células ES no diferenciadas con la mínima cantidad de toxicidad. Se determinaron concentraciones tan bajas como 0,5 μ M para destruir las células ES no diferenciadas similar a 30 μ M, pero con una toxicidad significativamente menor.

La Figura 11 (fondo) muestra la sensibilidad de las estirpes de T_{PAC} a un profármaco diferente, (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU). Aunque se observó una disminución significativa sobre los recuentos de células con todas las concentraciones de BVDU ensayadas, en realidad no se observó destrucción de célula ES. El número de células presente incluso a altas concentraciones de BVDU no se reduce al nivel del control de la muestra para ensayo en blanco.

Para verificar la expresión de HSV-TC en estirpes celulares ES de T_{PAC} estables, se realizó RT PCR en células no diferenciadas de cultivos de H9-376m-6, H9-376m-62 y H9-pGK-neo-1 usando cebadores específicos de HSV-TC u OCT-4. La expresión de TC se detectó en muestras de H9-376m-6 y H9-376m-62 y no en muestras de H9-pGK-neo a altas concentraciones de ARN, mientras que se detectó la expresión de OCT-4 en todas las muestras.

Ejemplo de referencia 14: Especificidad del activador para células no diferenciadas.

Para determinar la especificidad del activador de hTERT en los clones de T_{PAC} estables, se determinó la sensibilidad de GCV después de diferenciación de cada clon de T_{PAC} y el clon de control pGK-neo.

Se sembraron células no diferenciadas en placas recubiertas de Matrigel® de factor de crecimiento reducido con KO DMEM más FBS Hyclone al 20% sin bFGF (condiciones de diferenciación). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de diferenciación durante 7 días, se traspasaron y se pusieron en las condiciones de diferenciación durante 4 días adicionales. Después de este tratamiento, los cultivos contenían pocas, si había, células no diferenciadas (valorado por morfología). En este punto, se añadió GCV 30 μ M a los cultivos diferenciados durante 4 días.

No se observó sensibilidad a GCV en cultivos diferenciados obtenidos a partir de las estirpes celulares de T_{PAC} H9-376m-6, H9-376m-62, H9-376m-18 o H9-376m-77 o de la estirpe de control de la transinfección H9-pGKneo. Así, el activador de hTERT en la construcción integrada presenta la especificidad apropiada para activar el gen efector de TC sólo en células no diferenciadas.

Ejemplo de referencia 15: Expresión del marcador ES en estirpes celulares de T_{PAC} no diferenciadas.

La expresión de marcadores de ES en estirpes celulares ES de T_{PAC} estables se determinó por citometría de flujo. Se recogieron células de cultivos confluentes usando AEDT 0,5 mM y se incubó con anticuerpos monoclonales contra SSEA-4, SSEA-1, Tra-1-60, Tra-1-81, CD9, AC133 humano y anticuerpos secundarios conjugados de fluorocromo apropiados. Se determinó el nivel de expresión usando FACSCalibur™. Se usaron controles negativos igualados de isotipo apropiados y valoración de viabilidad para determinar el nivel de unión no específica.

Tabla 2: Marcadores sobre células hES parenterales y estirpes de T_{PAC} estables

Marcador fenotípico	H9 p 35	H9-376m-62 p 80+15	H9 p 25	H9-pGK-neo p 24+16	H9-376m-6 p 24+19	H9-376m-62 p 80+27
SSEA4 +	92*	100	64	37	91	98
SSEA1 +	1	0	0	0	0	0
Tra-1-60 +	98	99	89	89	86	90

Tabla 2: Marcadores sobre células hES parenterales y estirpes de T _{PAC} estables						
Marcador fenotípico	H9 p 35	H9-376m-62 p 80+15	H9 p 25	H9-pGK-neo p 24+16	H9-376m-6 p 24+19	H9-376m-62 p 80+27
Tra-1-81 +	96	99	82	88	77	97
CD9 +	88	95	81	98	91	99
AC133 +	90	81	72	78	68	70
*% de marcadores que expresan células vivas.						

Las estirpes celulares H9-376m-6, H9-376m-62 y H9-pGK-neo-1 presentan expresión de todos los marcadores de ES ensayados a los niveles comparables a los de la estirpe celular H9 no transfectada.

5 Ejemplo de referencia 16: Capacidad de las estirpes celulares T_{PAC} para experimentar diferenciación apropiada.

Se ensayó la capacidad de H9-376m-6, H9-376m-62, H9-376m-77, H9-376m-18 y H9-pGK-neo-1 para generar células de tres linajes germinativos embrionarios. Se establecieron cuerpos embrioides (los EB) de cada estirpe celular y se cultivaron en suspensión con KO DMEM y FBS Hyclone al 20 %. Después de cultivo de 4 días, se pusieron en placas los EB sobre portaobjetos para cámara recubiertos de gelatina y se dejó que crecieran durante 8-10 días adicionales. Se puntuaron los cultivos por la presencia de células pulsantes y se tiñeron para la presencia de β -tubulina, AFP, células positivas a actina específica del músculo y troponina cardíaca I.

La Figura 12 muestra micrografías de fluorescencia representativas de inmunocitoquímica. Los resultados fueron como sigue.

- H9-376m-18 p 80+20 podía generar cuerpos embrioides grandes (1 experimento). Se observaron áreas pulsantes (consistentes con células de linaje de cardiomiocito). Actina específica del músculo+++; α -fetoproteína +++; β -tubulina +++; troponina cardíaca I +.
- H9-376m-77 p 80+16 generó sólo pequeños cuerpos embrioides (1 experimento). No se observaron áreas pulsantes. Actina específica del músculo+; α -fetoproteína + β -tubulina - (ninguno detectado); troponina cardíaca I -.
- H9-376m-62 p 80+16, p 80+20, p 80+21, p 80+24 (4 experimentos) pudieron generar sólo pequeños cuerpos embrioides. No se observaron áreas pulsantes. Actina específica del músculo++; α -fetoproteína +; β -tubulina +; troponina cardíaca I -.
- H9-376m-6 p 24+12, p 24+13, p 24+21 (3 experimentos) pudieron generar grandes cuerpos embrioides. Se observaron muchas áreas pulsantes en todos los experimentos. Actina específica del músculo++; α -fetoproteína ++; β -tubulina ++++; troponina cardíaca I +.
- H9-pGK-neo-1 p 24+9, p 24+10, p 24+13 (3 experimentos) pudieron generar grandes cuerpos embrioides. Se observaron áreas pulsantes en 2 de cada 3 experimentos. β -tubulina +++; troponina cardíaca I +; Actina específica del músculo++++; α -fetoproteína ++.

Los resultados de los Ejemplos 13-16 muestran que al menos tres de las estirpes de células madre que contienen el gen de la timidina cinasa conducido por activador de telomerasa era capaz de diferenciarse en células de cada una de las tres capas germinativas. Las células diferenciadas de estas estirpes contienen un parche importante contra células no diferenciadas residuales o que vuelven a surgir. Ganciclovir a una concentración tan baja como 2,5 μ M destruye virtualmente todas las células ES no diferenciadas modificadas en -4 días.

Datos de secuencias

TABLA 3: Secuencias enumeradas en esta descripción		
SEC ID N°	Denominación	Referencia
1	clon Lambda denominado λ G ϕ 5 (ATCC Acceso N° 98505)	GenBank Acceso AF121948 Publicación de Patente Internacional WO 00/46355.
	Contiene inserto genómico de Telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) (restos 44-15375). El sitio de iniciación de la traducción de ATG empieza en el resto 13.545.	
2	Timidina cinasa de virus del herpes simple tipo 1 y secuencia de genes	GenBank Acceso J02224

TABLA 3: Secuencias enumeradas en esta descripción		
	3KBL	Véase también McKnight et al., Nucleic Acids Res. 8:5.949 (1.980);
		Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1.441 (1.981)
3	Timidina cinasa de virus del herpes simple tipo 1 y secuencia de aminoácidos 3KBL	(<i>supra</i>)
4 - 7	Sondas y Cebadores	(Secuencias artificiales)

Se reconocerá que las composiciones y los procedimientos proporcionados en la descripción se pueden modificar de manera eficaz por los expertos en la materia sin apartarse del espíritu de la invención contenido en las reivindicaciones que siguen.

5

Listado de secuencias

<110> Geron Corporation
 Gold, Joseph
 10 Lebkowski, Jane
 <120> Células diferenciadas adecuadas para tratamiento humano
 <130> 096/200
 <140> [para ser cedida]
 < 141> 26-11-2001
 15 <150> 09/783,203 <151> 13-02-2001
 <150> 60/253,443 <151> 27-11-2000
 <150> 60/253,357 <151> 27-11-2000
 <160> 7
 < 170> PatentIn version 3.0
 20 <210> 1
 <211> 15418
 <212> ADN
 < 213> Homo sapiens
 <400> 1

gcggccgcga	gctctaatac	gactcactat	agggcgctga	ctcgatcaat	ggaagatgag	60
gcattgccga	agaaaaagatt	aatggatttg	aacacacagc	aacagaaact	acatgaagtg	120
aaacacagga	aaaaaaagat	aaagaaacga	aaagaaaagg	gcatcagtga	gcttcagcag	180
aagttccatc	ggccttacat	atgtgtaagc	agaggccctg	taggagcaga	ggcaggggga	240
aaatacttta	agaaataatg	tctaaaagtt	tttcaaatat	gaggaaaaac	ataaaaccac	300
agatccaaga	agctcaacaa	aacaaaagcac	aagaaaacagg	aagaaattaa	aagttatatc	360
acagtcaaat	tgctgaaaac	cagcaacaaa	gagaatatct	taagagtatc	agaggaaaag	420
agattaatga	caggccaaga	aacaatgaaa	acaatacaga	tttcttgtag	gaaacacaag	480
acaaaagaca	ttttttaaaa	ccaaaaggaa	aaaaaatgct	acattaaaaat	gttttttacc	540
cactgaaagt	atatttcaaa	acatatatta	ggccaggcct	ggtggctcac	acctgtaatc	600
ccagcacttt	gggaggccaa	ggtgggtgga	tcgcttaagg	tcaggagtgc	gagaccagcc	660
tgccaatat	agcgaaccc	catctgtact	aaaaacacaa	aaattagctg	ggtgtggtga	720
cacatgcctg	taatcccagg	tactcaggag	gctaaggcag	gagaattgct	tgaactggga	780
ggcagaggtg	gtgagccaag	attgcaccag	tgactccag	ccttgggtgac	agagtgaac	840
tccatctcaa	aaacaaaaca	acaaaataca	tatacataaa	tatatatgca	catatatata	900
catatatataa	tatatataca	catatatataa	tctatatataca	tatatacata	tatacacata	960
tataaatcta	tatacatata	tatacatata	taatatatatt	acatatataa	atatatacat	1020
atataaatat	acatatataa	atacatatat	aaatatatac	atataaatat	acatatataa	1080
atatacatat	ataaatatat	acatatataa	atatacatat	ataaatatat	atacatatat	1140
aaatatataa	atatacaagt	atatacaaat	atatacatat	ataaatgtat	atacgtatat	1200
acatatatat	ataaatatat	aaaaaaactt	ttggctgggc	acctttccaa	atctcatggc	1260
acatataga	ctcatggtaa	cctcaataaa	aaaaacatat	aacagataca	ccaaaaataa	1320
aaaccaataa	attaaatcat	gccaccagaa	gaaattacct	tcactaaaag	gaacacagga	1380
aggaaagaaa	gaagggaag	aagaccatga	aacaaccaga	aaacaaacaa	caaaacagca	1440
ggagtaattc	ctgacttatc	aataataatg	ctgggtgtaa	atggactaaa	ctctccaatc	1500
aaaagacata	gagtggctga	atggacgaaa	aaaacaagac	tcaataatct	gttgcttaca	1560
agaatatact	tcacctataa	agggacacat	agactgaaaa	taaaagggaag	gaaaaatatt	1620
ctatgcaaat	ggaaaccaa	aaaagaacag	aactagctac	acttatatca	gacaaaaatg	1680
atttcaagac	aaaaagtaca	aaaagagaca	aagtaattat	ataataataa	agcaaaaaga	1740
tataacaatt	gtgaatttat	atgcgcccaa	cactgggaca	cccagatata	tacagcaaat	1800
attattagaa	ctaaggagag	agagagatcc	ccatacaata	atagctggag	acttcacccc	1860
gcttttagca	ttggacagat	catccagaca	gaaaatcaac	caaaaaattg	gacttaattc	1920
ataatataga	acaaatgtac	ctaattgatg	tttacaagac	atttcatcca	gtagtgtcag	1980
aatatgcatt	ttttcctcag	catatggatc	attctcaagg	atagaccata	tattaggcca	2040
cagaacaagc	cattaaaaat	tcaaaaaaat	tgagccaggc	atgatggcct	atgcttgtaa	2100
ttacagcact	ttggggaggg	tgaggtggga	ggatgtcttg	agtaCaggag	tttgagacca	2160
gcctgggcaa	aatagtgaga	ccctgtctct	acaaactttt	ttttttaatt	agccaggcat	2220
agtgtgtgtg	gcctgtagtc	ccagctactt	aggaggctga	agtgggagga	tcacttgagc	2280

ccaagagttc	aaggctacgg	tgagccatga	ttgcaacacc	acacaccagc	cttggtgaca	2340
gaatgagacc	ctgtctcaaa	aaaaaaaaaa	aaaattgaaa	taataataag	catcttctct	2400
ggccacagtg	gaacaaaacc	agaaatcaac	aacaagagga	attttgaaaa	ctatacaaac	2460
acatgaaat	taaacatat	acttctgaat	aaccagtgag	tcaatgaaga	aattaaaaag	2520
gaaattgaaa	aatttattta	agcaaatgat	aacggaaaac	taacctctca	aaacccacgg	2580
tatacagcaa	aagcagtgct	aagaaggaag	tttatagcta	taagcagcta	catcaaaaaa	2640
gtagaaaagc	caggcgagtg	ggctcatgcc	tgtaatccca	gcactttggg	aggccaaggc	2700
gggcagatcg	cctgaggtca	ggagttcgag	accagcctga	ccaacacaga	gaaaccttgt	2760
cgctactaaa	aatacaaaat	tagctgggca	tggtggcaca	tgctgtaat	cccagctact	2820
cggggaggctg	aggcaggata	accgcttgaa	cccaggaggt	ggaggttgcg	gtgagccggg	2880
attgcgcat	tggactccag	cctgggtaac	aagagtgaag	ccctgtctca	agaaaaaaa	2940
aaaagtagaa	aaacttaaaa	atacaaccta	atgatgcacc	ttaaagaact	agaaaagcaa	3000
gagcaacta	aacctaaaat	tggtaaaaga	aaagaaataa	taaagatcag	agcagaaata	3060
aatgaaactg	aaagataaca	atacaaaaga	tcaacaaaaa	taaaagtggg	ttttttgaaa	3120
agataaacaa	aattgacaaa	cctttgccca	gactaagaaa	aaaggaaaag	agacccataa	3180
aaataaagtc	agagatgaaa	aaagagacat	tacaactgat	accacagaaa	ttcaagggat	3240
cactagagggc	tactatgagc	aactgtacac	taataaattg	aaaaacctag	aaaaaataga	3300
taaatttccta	gatgcataca	acctaccaag	attgaacctat	gaagaaatcc	aaagcccaaa	3360
cagaccaata	acaataatgg	gattaaagcc	ataataaaaa	gtctcttagc	aaagagaagc	3420
ccaggaccaca	atggcttccc	tgctggattt	taccaatcat	ttaaagaaga	atgaattcca	3480
atctactacta	aactattctg	aaaaaatagag	gaaagaatac	ttccaaactc	attctacatg	3540
gccagtatta	ccctgattcc	aaaaccagac	aaaaacacat	caaaaacaaa	caaacaaaaa	3600
aacagaaaaga	aagaaaacta	caggccaata	tccctgatga	atactgatac	aaaaatcctc	3660
aacaaaacac	tagcaaacca	aattaaacaa	caccttcgaa	agatcattca	ttgtgatcaa	3720
gtgggatttta	ttccagggat	ggaaggatgg	ttcaacatat	gcaaatcaat	caatgtgata	3780
catcatccca	acaaaaatgaa	gtacaaaaac	tatatgatta	tttctactta	tgcagaaaaa	3840
gcattttgata	aaatttctgca	cccttcatga	taaaaacctc	caaaaaacca	ggtatataag	3900
aaacatacag	gccaggcaca	gtggctcaca	cctgcgatcc	cagcactctg	ggaggcccaag	3960
gtgggatgat	tgcttggggc	caggagtttg	agactagcct	gggcaacaaa	atgagacctg	4020
gtctacaaaa	aactttttta	aaaaatttagc	caggcatgat	ggcatatgcc	tgtagtccca	4080
gctagtctgg	aggctgaggt	gggagaatca	cttaagccta	ggaggctcag	gctgcagtga	4140
gccatgaaca	tgctactgta	ctccagccta	gacaacagaa	caagacccca	ctgaataaga	4200
agaaaggagaa	ggagaaaggga	gaaaggaggga	agaaaggagg	aggaaggagaa	ggaggagggtg	4260
gaggagaaagt	ggaagggggaa	ggggaaaggga	aagagggaaga	agaagaaaca	tatttcaaca	4320
taataaaaagc	cttatatgac	agaccgaggt	agtattatga	ggaaaaactg	aaagcctttc	4380
ctctaagatc	tggaaaatga	caagggccca	ctttcaccac	tgtgattcaa	catagtacta	4440
gaagtcttag	ctagagcaat	cagataagag	aaagaaataa	aaggcatcca	aactggaaaag	4500
gaagaaagtc	aattatcctg	tttgacagatg	atatgatctt	atatctggaa	aagacttaag	4560
acaccactaa	aaaactatta	gagctgaaat	ttggtacagc	aggatacaaa	atcaatgtac	4620
aaaaatcagt	agtatttcta	tattccaaca	gcaacaatc	tgaaaaagaa	acaaaaaag	4680
cagctacaaa	taaaattaaa	cagctaggaa	ttaaccaaaag	aagtgaagaa	tctctacaa	4740
gaaaactata	aatatttgat	aaaagaaatt	gaagagggca	caaaaaaaga	aaagatatcc	4800
catgttcata	gatttgaaga	ataaatactg	ttaaaaatgtc	catactaccc	aaagcaattt	4860
acaaattcaa	tgcaatccct	attaaaatac	taatgacgtt	cttcacagaa	atagaagaaa	4920
caatttctaag	atttgtacag	aaccacaaaa	gaccagaat	agccaaagct	atcctgacca	4980
aaaagaacaa	aacttgaagc	atcacattac	ctgacttcaa	attatactac	aaagctatag	5040
taaccccaaac	tacatgggtg	tggcataaaa	acagatgaga	catggaccag	aggaacagaa	5100
tagagaatcc	agaacaaaat	ccatgcatct	acagtgaact	catttttgac	aaaggtgcca	5160
agaacatact	ttggggaaaa	gataatctct	tcaataaatg	gtgctggagg	aactggatat	5220
ccatattgcaa	aataacaata	ctagaactct	gtctctcacc	atatacaaaa	gcaaatcaaa	5280
atggatgaaa	ggcttaaatc	taaaacctca	aactttgcaa	ctactaaaag	aaaacaccgg	5340
agaaactctc	caggacattg	gagtgggcaa	agacttcttg	agtaattccc	tcgaggcaca	5400
ggcaaccaaa	gcaaaaacag	acaaaatggga	tcatatcaag	ttaaaaagct	tctgcccagc	5460
aaagggaaca	atcaacaaag	agaagagaca	acccacagaa	tgggagaata	tatttgcaaa	5520
ctattcatct	aacaggaat	taataaccag	tatatataag	gagctcaaac	tactctataa	5580
gaaaaacacc	taataagctg	attttcaaaa	ataagcaaaa	gatctgggta	gacattttct	5640
aaaaataagtc	atacaaatgg	caaacaggga	tctgaaaatg	tgctcaaac	cactgatcat	5700
cagagaaatg	caaatcaaaa	ctactatgag	agatcatctc	acccagttta	aaatggcttt	5760
tattcaaaag	acaggcaata	acaaatggca	gtgaggatgt	ggataaaaag	aaaccccttg	5820
acactgttgg	tgggaatgga	aattgtctac	actatggaga	acagtttgaa	agttcctcaa	5880
aaaactaaaa	ataaagctac	catacagcaa	tcccattgct	aggatatata	tccaaaaaag	5940
ggaatcagtg	tatcaacaag	ctatctccac	tcccacattt	actgcagcac	tgttcatagc	6000
agccaagggt	tggaaagcaac	ctcagtgctc	atcaacagac	gaatggaaaa	agaaaatgtg	6060
gtgcacatac	acaatggag	actacgcagc	cataaaaaag	aatgagatcc	tgctcagttg	6120
aacagcatgg	ggggcactgg	tcagtatgtt	aagtgaataa	agccaggcac	agaaagacaa	6180
acttttcatg	ttctccctta	cttgtggggg	caaaaattaa	aacaattgac	atagaatatg	6240
aggagaatgg	tggttctaga	gggggtggggg	acagggtgac	tagagtcaac	aataatttat	6300
tgatatgttt	aaaaataacta	aaagagtata	attgggttgt	ttgtaacaca	aagaagggat	6360
aaatgtttga	aggtgacaga	taccccatct	accctgatgt	gattattaca	cattgtatgc	6420
ctgtatcaaa	atatctcatg	tatgctatag	atataaaccc	tactatatta	aaaatttaaa	6480
ttttaatggc	caggcacggg	ggctcatgtc	cataatccca	gcactttggg	aggccgaggc	6540
ggtggatcac	ctgaggtcag	gagtttgaaa	ccagcttggc	caccatgatg	aaacccctgtc	6600

tctactaaag	atacaaaaat	tagccaggcg	tgggtggcaca	tacctgtagt	cccaactact	6660
caggaggctg	agacaggaga	attgcttgaa	cctgggaggc	ggagggttga	gtgagccgag	6720
atcatgccac	tgcaatgcag	cctgggtgac	agagcaagac	tccatctcaa	aacaaaaaca	6780
aaaaaaagaa	gattaaaaat	gtaattttta	tgtaccgtat	aaatatatac	tctactatat	6840
tagaagttaa	aaattaaaac	aattataaaa	ggtaattaac	cacttaatct	aaaataagaa	6900
caatgtatgt	ggggtttcta	gcttctgaa	aagtaaaagt	tatggccacg	atggcagaaa	6960
tgtgaggagg	gaacagtggg	agtactgtt	gttagacgct	catactctct	gtaagtgaact	7020
taatttttaac	caaagacagg	ctgggagaag	ttaaagaggc	attctataag	ccctaaaaaca	7080
actgctaata	atgggtgaa	gtaattctcta	ttaattacca	ataattacag	atatctctaa	7140
aatcgagctg	cagaattggc	acgtctgac	acaccgtcct	ctcattcacg	gtgctttttt	7200
tcttgtgtgc	ttggagattt	tcgattgtgt	gttcgtgttt	ggttaaactt	aatctgtatg	7260
aatcctgaaa	cgaaaaatgg	tgggtatttc	ctccagaaga	attagagtac	ctggcaggaa	7320
gcagggtggct	ctgtggacct	gagccacttc	aatcttcaag	ggtctctggc	caagacccag	7380
gtgcaaggca	gaggcctgat	gacccgagga	caggaaaagt	cggatgggaa	ggggcgatga	7440
gaagcctgcc	tcgttgggta	gcagcgcatg	aagtgcctct	atttacgctt	tgcaaaagatt	7500
gctctggata	ccatctggaa	aaggcggcca	gcgggaatgc	aaggagtacg	aagcctcctg	7560
ctcaaaccca	ggccagcagc	tatggcgccc	acccggcggt	gtgcccagag	gagaggagtc	7620
aaggcacctc	gaagtatggc	ttaaactctt	ttttcacctg	aagcagtga	caagggtgat	7680
tctgagggaa	gcttgagtta	ggtgccttct	ttaaaacaga	aagtcatgga	agcacccttc	7740
tcaagggaaa	accagacgct	cgctctgagg	tcatttacct	ctttctctct	tccctctctt	7800
gccctcgagg	tttctgatcg	ggacagagtg	acccccgtgg	agcttctccg	agcccgctgc	7860
gaggaccctc	ttgcaaaagg	ctccacagac	ccccgcctcg	gagagaggag	tctgagcctg	7920
gcttaataac	aaactgggat	gtggctgggg	gcggacagcg	acggcgggat	tcaaagactt	7980
aatctcatga	gtaaattcaa	cccttccaca	tccgaatgga	tttggatttt	atcttaatat	8040
tttcttaaat	ttcatcaaat	aacattcagg	agtgacagaa	tccaaggcgg	taaaacagga	8100
actgagctat	gtttgccaag	gtccaaggac	ttaataacca	tggttcagag	gatttttctg	8160
cctaagtact	ttttatttgt	tttcataagg	tggcttaggg	tgcaagggaa	agracacgag	8220
gagaggactg	ggcggcagg	ctatgagcac	ggcaaggcca	ccggggagag	agtcctccgg	8280
ctgggaggct	gacagcagga	ccactgaccg	tcctccctgg	gagctgcac	attgggcaac	8340
gcgaaggcgg	ccacgctg	tgtgactcag	gaccccatat	cggtctcctg	ggccacacca	8400
actaaaccca	ggaagtcacg	gagctctgaa	cccgtggaaa	cgaaatgac	ccttgcctgc	8460
ctgcttccct	gggtgggtca	agggtaatga	agtgggtgtg	agggaaatgg	catgtaaatt	8520
acacgactct	gctgatgggg	accgttccct	ccatcattat	tcatcttcac	cccccaaggac	8580
tgaatgattc	cagcaacttc	ttcgggtgtg	acaagccatg	acaacactca	gtacaaacac	8640
cactcttcta	ctaggcccaa	agagcacggc	ccacacccct	gatataattaa	gagtcacagga	8700
gagatgaggc	tgctttcagc	caccaggctg	gggtgacaa	agcggctgaa	cagctctgtt	8760
ctctagacta	gtagaccctg	gcaggcactc	ccccagattc	tagggcctgg	tgtgtgcttc	8820
ccgaggggcg	catctgcctt	ggagactcag	cctgggggtg	cacactgagg	ccagccctgt	8880
ctccacaccc	tcgcctctca	ggcctcagct	tctccagcag	cttctctaac	cctgggtggg	8940
ccgtgttcca	gcgctactgt	ctcactgtgc	ccactgtgtc	ttgtctcagc	gacgtagtct	9000
gcacgggttc	tcctcacatc	gggtgtctgt	ctccttcccc	aacactcaca	tcgcttgaag	9060
ggaggagatt	ctgcgccttc	cagactggct	cctctgagcc	tgaacctggc	tcgtggccct	9120
cgatgcaggt	tcctggcgct	cggctgcacg	ctgacctcca	tttccaggcg	ctccccgtct	9180
cctgtcatct	gccggggcct	gccggtgtgt	tcttctgttt	ctgtgtctct	ttccacgtcc	9240
agctgcgtgt	gtctctgtcc	gctagggtct	cggggttttt	ataggcatag	gacggggcg	9300
tgggtggcca	gggcgtctct	gggaaatgca	acatttgggt	gtgaaagtag	gagtgctgtt	9360
ctccacctag	gtccacgggc	acaggcctgg	ggatggagcc	cccgccagg	acccgcctgt	9420
ctctgccccg	cacttttctg	ccccctccc	tctggaaacac	agagtggcag	tttccacaag	9480
actaagcat	cctcttccca	aaagaccag	cattggcacc	cctggacatt	tgccccacag	9540
ccctgggaat	tcacgtgact	acgcacatca	tgtacacact	cccgccacg	accgaccccc	9600
gctgttttat	tttaatatgt	acaaagcagg	gaaatccctg	ctaaaaatgc	ctttaacaaa	9660
ctgggttaac	aaacgggtcc	atccgcacgg	tggacagtcc	ctcacagtga	agaggaaact	9720
gccgtttata	aagcctgcag	gcattctcaag	ggaattacgc	tgagtcaaaa	ctgccacctc	9780
catgggatac	gtacgcaaca	tgtctaaaaa	gaaagaattt	caccccatgg	caggggagtg	9840
gttggggggt	taaggacggt	gggggcagca	gctgggggct	actgcacgca	ccttttacta	9900
aagccagttt	cctgggtctg	atgggtattg	ctcagttatg	ggagactaac	cataggggag	9960
tggggatggg	ggaaccggga	ggctgtgcca	tctttgccat	gcccagtggt	cctggggcag	10020
ataatgctct	agagatgcc	acgtctctgat	tcccccaaac	ctgtggacag	aaccgcctcg	10080
gccccagggc	ctttgcaggt	gtgatctccg	tgaggaccct	gaggtctggg	atccttcggg	10140
actacctgca	ggccccaaaa	gtaattccagg	ggttctggga	agaggcgggc	aggagggtca	10200
gaggggggca	gcctcaggac	gatggagcca	gtcagtctga	ggctgaaaag	ggaggagggg	10260
cctcgagccc	aggcctgcaa	gcgcctccag	aagctggaaa	aagcggggaa	gggacccctc	10320
accgagcctg	cagcaggaag	gcacggctgg	cccttagccc	accagggccc	atcgctggacc	10380
tccggcctcc	gtgccaatag	agggcactcg	cgctgccctt	ctagcatgaa	gtgtgtgggg	10440
atttgcagaa	gcaacaggaa	acccatgcac	tgtgaattcta	ggattatttc	aaaacaaaag	10500
tttacagaaa	catccaagga	cagggtcgaa	gtgcctccgg	gcaagggcag	ggcaggcagc	10560
agtgatttta	tttagctatt	ttattttatt	tacttacttt	ctgagacaga	gttatgtctt	10620
tgttgcagca	gctggagtg	agcggcatga	tcttggctca	ctgcaacctc	cgctctctgg	10680
gttcaagcaa	ttctcgtgcc	tcagcctccc	aagttagctgg	gatttcaggc	gtgcaccacc	10740
acaccgggct	aattttgtat	ttttagtaga	gatgggcttt	caccatgttg	gtcaggctga	10800
tctcaaaatc	ctgacctcag	gtgatccggc	cacctcagcc	tcccaaatgt	ctgggattac	10860
aggcatgagc	cactgcacct	ggcctattta	accattttaa	aacttccctg	ggctcaagtc	10920

acacccactg	gtaaggagtt	catggagttc	aattttccct	ttactcagga	gttaccctcc	10980
tttgatattt	tctgtaattc	ttcgtagact	ggggatacac	cgctctctga	catatttcaca	11040
gtttctgtga	ccacctgtta	tcccatggga	cccactgcag	gggcagctgg	gaggctgcag	11100
gcttcaggtc	ccagtggggt	tgccatctgc	cagtagaaac	ctgatgtaga	atcagggcgc	11160
gagtgtagac	actgtcctga	atctcaatgt	ctcagtggtg	gctgaaacat	gtagaaatta	11220
aagtccatcc	ctcctactct	actgggattg	agcccccttc	ctatcccccc	ccaggggcag	11280
aggagttcct	ctcactctcg	tgagggaagg	aatgataact	tgttatTTTT	cactgctggg	11340
actgaatcca	ctgtttcatt	tgttggtttg	tttgttttgt	tttgagaggc	ggtttcactc	11400
ttgttgctca	ggctggaggg	agtgcattgg	cgcatctctg	gcttactgca	gcctctgcct	11460
cccagggtta	agtgtatttc	ctgcttcgcg	ctcccatTTg	gctgggatta	caggcacccg	11520
ccaccatgcc	cagctaattt	tttgattttt	tagtagagac	gggggtgggg	gtgggggtta	11580
ccatgtttgc	caggctggtc	tcgaacttct	gacctcagat	gatccacctg	cctctgcctc	11640
ctaaagtgtc	gggattacag	gtgtgagcca	ccatgcccag	ctcagaattt	actctgttta	11700
gaaacatctg	ggtctgaggt	aggaagctca	ccccactcaa	gtgtgtgggt	gttttaagcc	11760
aatgatagaa	tttttttatt	gttggttagaa	cactcttgat	gttttacct	gtgatgacta	11820
agacatcatc	agcttttcaa	agacacacta	actgcacca	taatactggg	gtgtcttctg	11880
gggtatcagc	atcttctatt	aatgcccggg	ggcgtttctc	cgccatgcac	atgggtgtta	11940
ttactccagc	ataatcttct	gcttccattt	cttctcttcc	ctcttttaaa	attgtgtttt	12000
ctatgtttgc	ttctctgcag	agaaccagtg	taagctacaa	cttaactttt	gttggaacaa	12060
attttccaaa	ccgccccctt	gccctagttg	cagagacaat	tcacaaacac	agccccctta	12120
aaaggcttag	ggatcactaa	ggggatttct	agaagagcga	ccgtaatcc	taagtattta	12180
caagacgagg	ctaaccctca	gcgagcgtga	cagcccaggg	aggggtgcag	gctgtttcaa	12240
atgctagctc	cataaataaa	gcaatttctc	ccggcagttt	ctgaaagttag	gaaagggtac	12300
atttaagggt	gcgtttgtta	gcatttccagt	gtttgcccag	ctcagctaca	gcattcttgc	12360
aaggcctcgg	gagaccacga	agtttctcgc	cccttagatc	caaaatttag	caaccgggag	12420
tctggattcc	tggaagttcc	tcagctgtcc	tgcggtttgt	ccggggcccc	aggtctggag	12480
gggaccagtg	gccgtgtgct	ttctactgct	gggctggaa	tcgggctctc	tagctctgca	12540
gtccgaggct	tggaagccag	tgccctggacc	ccgaggctgc	ctccaccctc	gtgcggggcg	12600
gatgtgacca	gatgttggtc	tcattctgcca	gacagagtgc	cgggggccag	ggtcaaggcc	12660
gttgtagcgt	gtgtgagcgc	cccgtgtcgc	ggccagcagg	agcgcttggc	tccatttccc	12720
accctttctc	gacgggaccg	ccccgtggg	tgattaacag	atttgggggt	gtttgtctcat	12780
ggtggggacc	cctcgccgcc	tgagaacctg	caaagagaaa	tgacgggctc	gtgtcaaggga	12840
gccaagctcg	cgggggaagt	ttgcaggggg	gcactccggg	aggtcccgcg	tgcccgtcca	12900
gggagcaatg	cgctcctcgg	ttcgctccca	gccgcgtcta	cgccctcccg	tcctccccct	12960
cacgtccggc	attcgtgggt	cccggagccc	gacgccccgc	gtccggacct	ggagcagccc	13020
ctgggtctcc	ggatcaggcc	agcggccaaa	gggtcgccgc	acgcacctgt	tcacaggggc	13080
tccacatcat	ggccccctcc	tcgggttacc	ccacagccta	ggccgattcg	acctctctcc	13140
gctggggccc	tcgctggcgt	ccctgcaccc	tgggagccgc	agcggcgccg	ggcggggaaa	13200
gcgcggccca	gacccccggg	tcgcgccgga	gcagctgcgc	tgctggggcc	agggccgggt	13260
cccagtggtg	tcgcgggcac	agacgcccag	gaccgcgtct	cccacgtggc	ggaggggactg	13320
gggacccggg	caccgcctcc	gccccctcac	cttccagctc	gcctctctcc	gcgcgggacc	13380
cgccccgtcc	cgacccctcc	cgggtccccc	gcccagcccc	ctccgggccc	tcacagcccc	13440
tcccccttct	ttccgcggcc	ccgccccttc	ctcgcgccgc	gagtttcagg	cagcgctgcg	13500
tcctgctcgc	cacgtgggaa	gccctggccc	cgccaccccc	cgcgatgccg	cgccctcccc	13560
gctgcggagc	cgctgcgtcc	ctgctgcgca	gccactaccg	cgaggtgctg	ccgctggcca	13620
cgttcgtgcg	gcgcctgggg	ccccagggct	ggcggtctgt	gcagcgcggg	gacccgggcg	13680
ctttccgcgc	ctgtgtggcc	cagtgctctg	tgctgcgtgc	ctgggacgca	cgcccgcccc	13740
ccgcggcccc	ctccttccgc	caggtgggct	tcctcggggt	cgccgtccgc	ctgggggtga	13800
gggcggcccg	ggggaaccag	cgacatgcgg	agagcagcgc	aggcgactca	gggcgtcttc	13860
ccgcagggtg	tcctgcctga	aggagctggt	ggcccagagt	gtgcagaggc	tgctgcagcg	13920
cggcgcgaa	aacgtgtcgg	ccttcggctt	cgcgctgctg	gacggggccc	gcggggggccc	13980
ccccgaggcc	ttcaccacca	gcgtgcgcag	ctacctgccc	aacacggtga	ccgacgcact	14040
gcggggggag	ggggcggtgg	ggctgctgct	gcgcgcgcgt	ggcgacgacg	tgctggttca	14100
cctgctggca	cgctgcgcgc	ttttgtgtct	ggtggctccc	agctgcgcct	accaggtgtg	14160
cgggcggccg	ctgtaccagc	tcggcgctgc	cactcaggcc	cggccccccg	cacacgctag	14220
tggaacccga	aggcgctcgg	gatgcgaacg	ggcctggaac	catagcgtca	gggaggccgg	14280
ggtccccctg	ggcctgcagc	ccccgggtgc	gaggaggcgc	gggggcagtg	ccagccgaag	14340
tctgccttgg	cccaagaggc	ccaggcgtgc	cgctgcccc	gagccggagc	ggagcccgct	14400
tgggcagggg	tcctggggcc	accggggcag	gacgcgtgga	ccgagtggac	gtggtttctg	14460
tggtggttca	cctgccagac	ccgcggaaga	agccacctct	ttggagggtg	cgctctctgg	14520
cacgcgccac	tcacacccat	cggtggggcg	ccagcaccac	gcggggcccc	catccacatc	14580
gcggccacca	cgctccctgg	acacgccttg	tcctccgggt	tacgcccaga	ccaagcactt	14640
cctctactcc	tcaggcgaca	aggagcagct	gcggccccct	ttcctactca	gctctctgag	14700
gcccagcctg	actggcgctc	ggaggctcgt	ggagaccatc	tttctgggtt	ccaggccccgt	14760
gatgccaggg	actccccgca	ggttgccccg	cctgccccag	cgctactggc	aaatgcggcc	14820
cctgtttctg	gagctgtctg	ggaaccacgc	gcagtgcctc	tacgggggtg	tcctcaagac	14880
gcactgcccc	ctgcgagctg	cggtcacccc	agcagccggg	gtctgtgccc	gggagaagcc	14940
ccagggtcct	gtggcgggcc	ccgaggagga	ggacacagac	ccccgtcgcc	tggtgcagct	15000
gctccgccag	cacagcagcc	cctggcaggt	gtacggcttc	gtgcggggct	gcctgcgcgc	15060
gctgggtccc	ccaggcctct	ggggctccag	gcacaacgaa	cgccgcttcc	tcagggaacac	15120
caagaagttc	atctccctgg	ggaagcatgc	caagctctcg	ctgcaggagc	tgacgtggaa	15180
gatgagcgtg	cgggactcgc	cttggtcgtg	caggagccca	ggtgaggagg	tggtggcctg	15240
cgaggggcca	ggccccagag	ctgaatgcag	taggggctca	gaaaaggggg	caggcagagc	15300
cctggtctct	ctgtctccat	cgtcacgtgg	gcacacgtgg	ctttctgctc	aggacgtcga	15360
tgggacacgg	tgatcgagtc	gactcccttt	agtgagggtt	aattgagctc	gcggccgc	15418

<210> 2

<211> 2403

<212> ADN

< 213> Virus de herpes simple tipo 1

<400> 2

ES 2 544 942 T3

```

gggtcctagg cccatgagg accgtatacg tggacaggct ctggagcatc gcacgactgc 60
gtgatattac cggagacctt ctgaggacg agccgggtca cgcggtgac ggagcgtccg 120
ttgggagaca aacaccagga cggggcacag gtacactatc ttgtcaccgc gagcgcgagg 180
gactgcagga gcttcaggga gtggcgagc tgcttcaccc cgtgggcccg ttgctgcgt 240
ttgctggcgg tgccccggga agaaatata tggcatgtct ttagttctat gatgacacaa 300
accccgccca gcgtctgtc attggcgaat tcgaacacgc agatgcagtc ggggcggcgc 360
gggtccaggt ccacttcga tattaagggt acgctgtgtg cctcgaacac cgagcgaccc 420
tgacgcgacc cgtttaacag cgtcaacagc gtgcccagca tcttggtggc gtgaaactcc 480
cgcacctctt tggcaagcgc cttgtagaag cgcgtatggc ttcgtacccc tgcctcaac 540
acgcgtctgc gttcgaccag gctgcgcgtt ctgcgggcca tagcaaccga cgtacggcgt 600
tgccgacctc cggcagcaa gaagccacgg aagtccgctt ggagcagaaa atgcccacgc 660
tactcgggtt ttatatagac ggtcctcacg ggatggggaa aaccaccacc acgcaactgc 720
tgggtggcct ggggttcgcgc gacgatatcg tctacgtacc cgagccgatg acttactggc 780
agggtcctgg ggtctccgag acaatcgca acatctacac cacacaacac cgcctcgacc 840
aggggtgagat atcggccggg gacgcggcgg tggtaatgac aagcggccag ataacaatgg 900
gactgcctta tgccgtgacc gacgcggttc tggtcctca tgtcgggggg gaggtcggga 960
gttcacatgc cccgcccccg gccctcacc tcactcttga cggccatccc atcgccgcc 1020
tcctgtgcta cccggcccg cgatacctta tgggcagcat gacccccag gccgtgttg 1080
cgttcgtggc cctcatccc cgaccttgc cggcacaaa catcgtgtt ggggcccctc 1140
cggaggacag acacatcgac cgcctggcca aacgcagcg ccccgccgag cggcttgacc 1200
tggctatgct ggccgcgatt gcgcgcgtt acgggtgtct tgccaatacg gtgcggtatc 1260
tgcaaggcgg cgggtcgtg tgggaggatt ggggacagct ttcggggacg gccgtgccgc 1320
cccagggtgc cgagccccag agcaacgcgg gccacgacc ccataatcggg gacacgttat 1380
ttaccctgtt tcggggcccc gagggtgtg ccccaacgg cgacctgtat aacgtgtttg 1440
cctgggcctt ggagctctt gccaaacgcc tccgtcccat gcacgtcttt atcttgatt 1500
acgaccaatc gcccgccggc tgccgggacg ccctgtgca acttacctcc gggatggtcc 1560
agaccacgt caccaccca ggtcctacac cgacgatctg cgacctggcg cgcacgtttg 1620
cccgggagat gggggaggct aactgaaaca cggaaaggaga caataccgga aggaaccgcg 1680
gctatgacgg caataaaaag acagaataaa acgcacgggt gttgggtcgt ttgttcataa 1740
acgcggggtt cgttcccagg gctggcactc tgtcgatacc ccaccgagac cccattgggg 1800
ccaatacgcc cgcgtttctt cttttccccc accccaaccc ccaagtccgg gtgaaggccc 1860
agggctcgca gccaacgtcg gggcggaag cccgccatag ccacggggccc cgtgggttag 1920
ggagcgggtc ccccatgggg aatggtttat ggttcgtggg ggttattctt ttgggcgttg 1980
cgtgggggtc agtccacgac tggactgagc agacagacc atgggttttg gatggcctgg 2040
gcatggaccg catgtactgg cgcgacacga acaccggcg tctgtggctg ccaaacaccc 2100
ccgaccccca aaaaccacc cgcgatttc tggcgccgc ggacgaacta aacctgacta 2160
cggcatctct gcccttctt cgtgtgtacg agggcgctt ttgttttga ttggtcacca 2220
cggccgagtt tccgcccggc cccggccagc tgccttacat ctccaagacc tacctactcg 2280
gccggccccc gaacgcgagc ctgcccgc ccatcacgtt cgagccgacc gccagcctc 2340
ccccgcggt cggccccctt aagggtctct tgcacaatcc aaccgcctcc gtgttgctgc 2400
gtt 2403

```

<210> 3
 <211> 376
 <212> PRT
 < 213> Virus de herpes simple tipo 1
 <400> 3

ES 2 544 942 T3

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
1 5 10 15
Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
20 25 30
Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
35 40 45
Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
50 55 60
Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
65 70 75 80
Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
100 105 110
Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
115 120 125
Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
130 135 140
Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile
145 150 155 160
Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
165 170 175
Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala
180 185 190
Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu
195 200 205
Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly
210 215 220
Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly
225 230 235 240
Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly Ser Trp Trp
245 250 255
Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala
260 265 270
Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
275 280 285
Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu
290 295 300
Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg
305 310 315 320
Pro Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys
325 330 335
Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val
340 345 350
Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
355 360 365
Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
370 375

5 <210> 4
<211> 25
<212> ADN
< 213> Secuencia cebador PCR artificial
<400> 4
cttgctgcag aagtggtgg aggaa 25

10 <210> 5
< 211> 21
<212> ADN
< 213> Secuencia cebador PCR artificial
<400> 5
ctgcagtgtg gggttcgggc a 21

15 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
< 213> Secuencia cebador PCR artificial
<400> 6
cggaagagtg tctggagcaa 20

20 <210> 7
<211> 19
<212> ADN
< 213> Secuencia cebador PCR artificial
<400> 7
ggatgaagcg gagtctgga 19

25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende la estructura P-X, en la que:
- 5 X es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto que es letal para una célula en la que se expresa o hace una célula en la que se expresa susceptible de un efecto letal de un agente externo y P es un elemento de control transcripcional que produce que X se exprese preferiblemente en células madre pluripotentes de primate (pPS) no diferenciadas.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que X codifica una toxina o una proteína que induce o media muerte celular programada.
3. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que X codifica una enzima que convierte un profármaco en un compuesto que es letal para una célula en la que se expresa X.
- 15 4. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3, en la que X codifica una timidina cinasa.
5. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que P-X es una molécula heteróloga introducida.
- 20 6. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que P es un elemento de control transcripcional endógeno.
7. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que P es un activador de OCT-4 o un activador de telomerasa transcriptasa inversa (TERT).
- 25 8. La molécula de ácido nucleico según cualquier reivindicación precedente, en la que la célula o las células madre son células madre embrionarias humanas (hES).
- 30 9. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que el agente externo es ganciclovir.

Figura 1

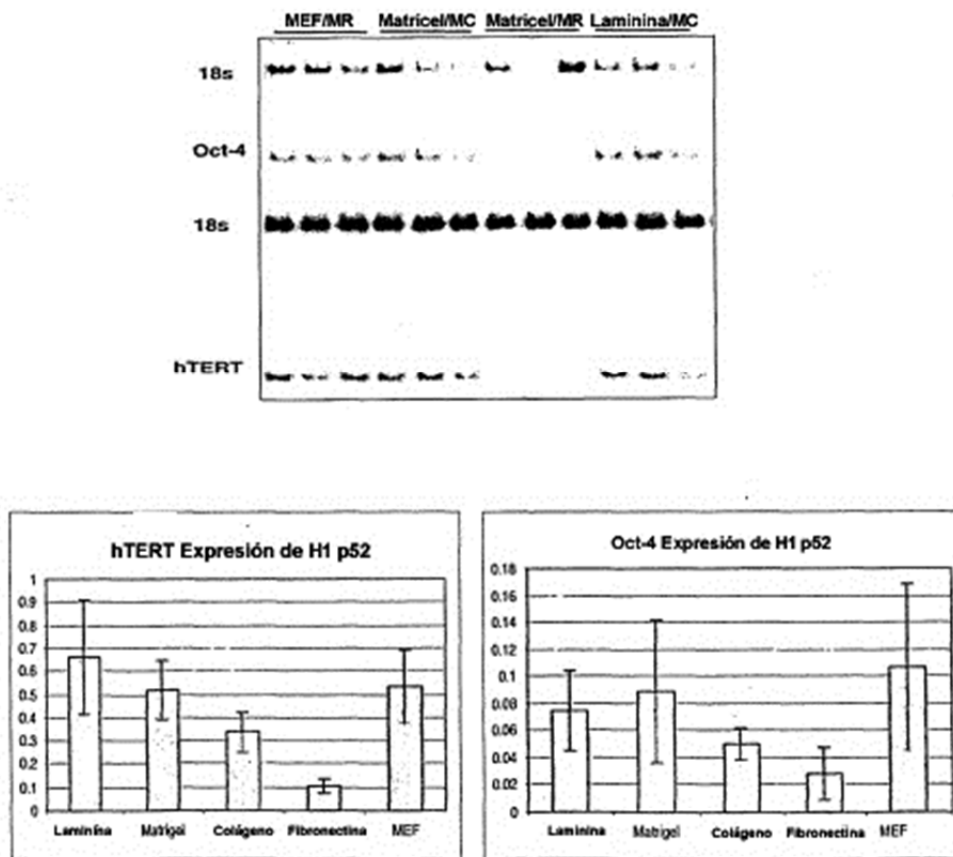


Figura 2

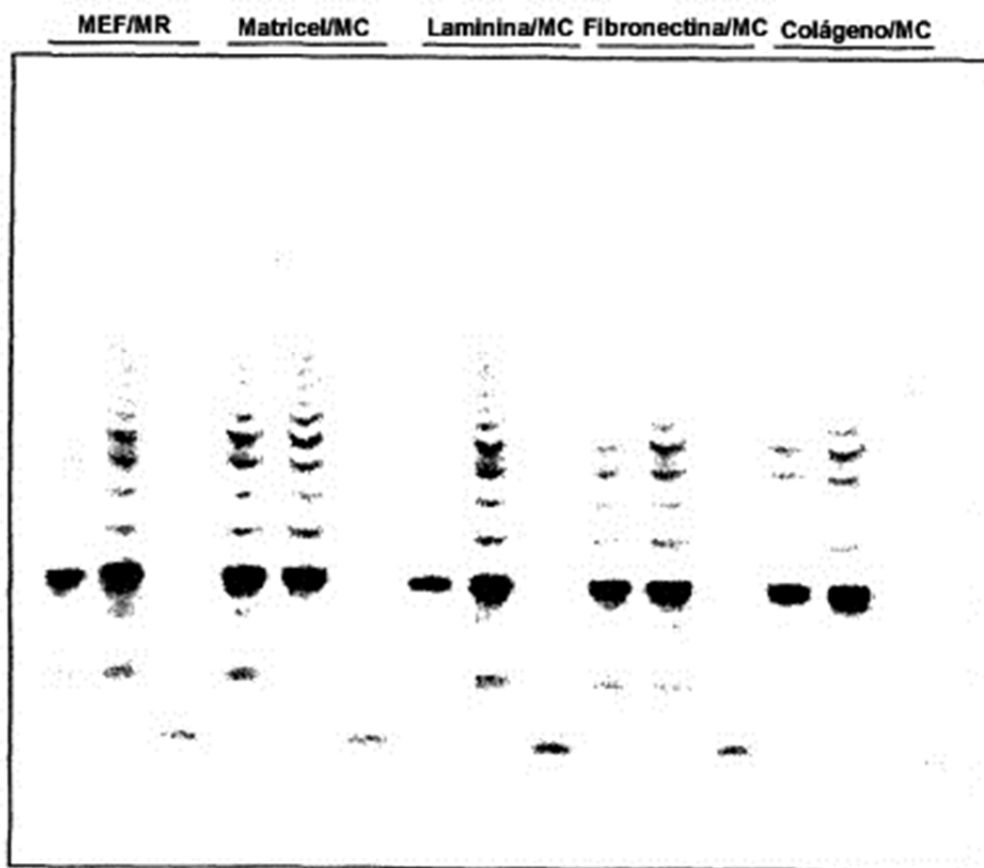


Figura 3

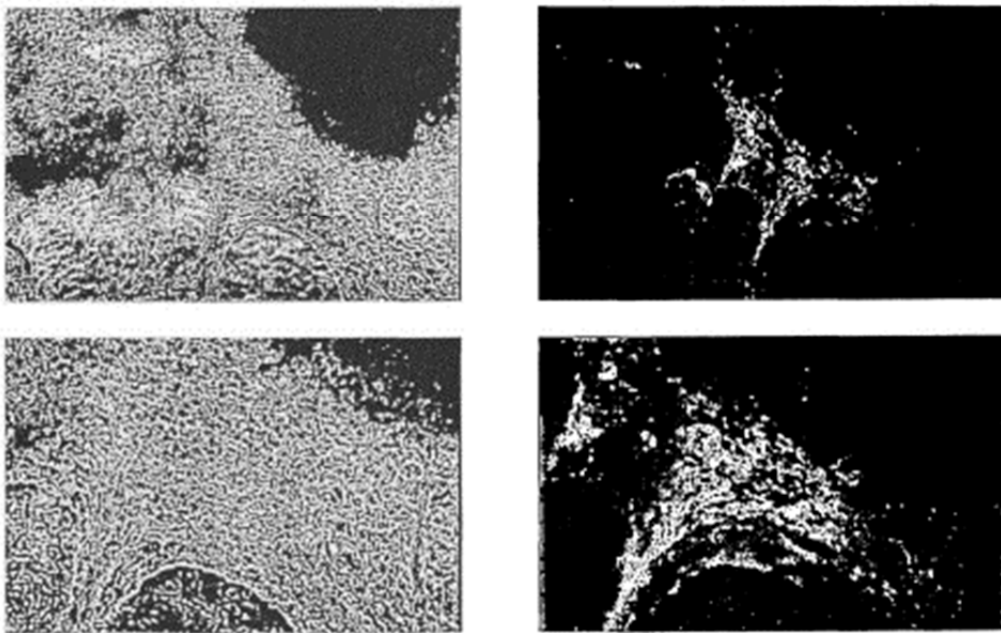


Figura 4

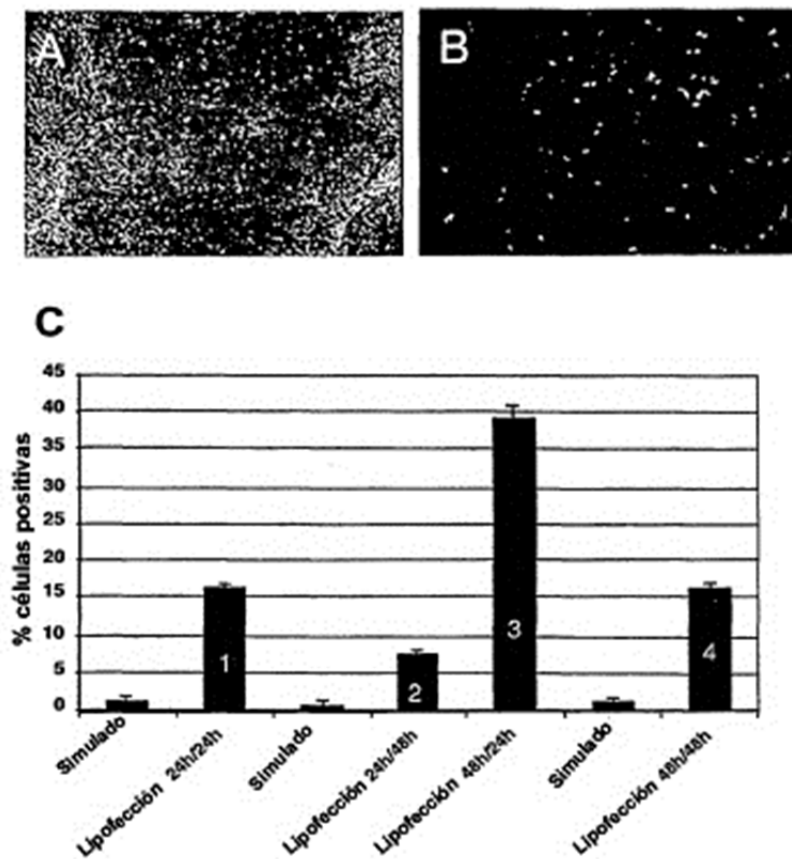
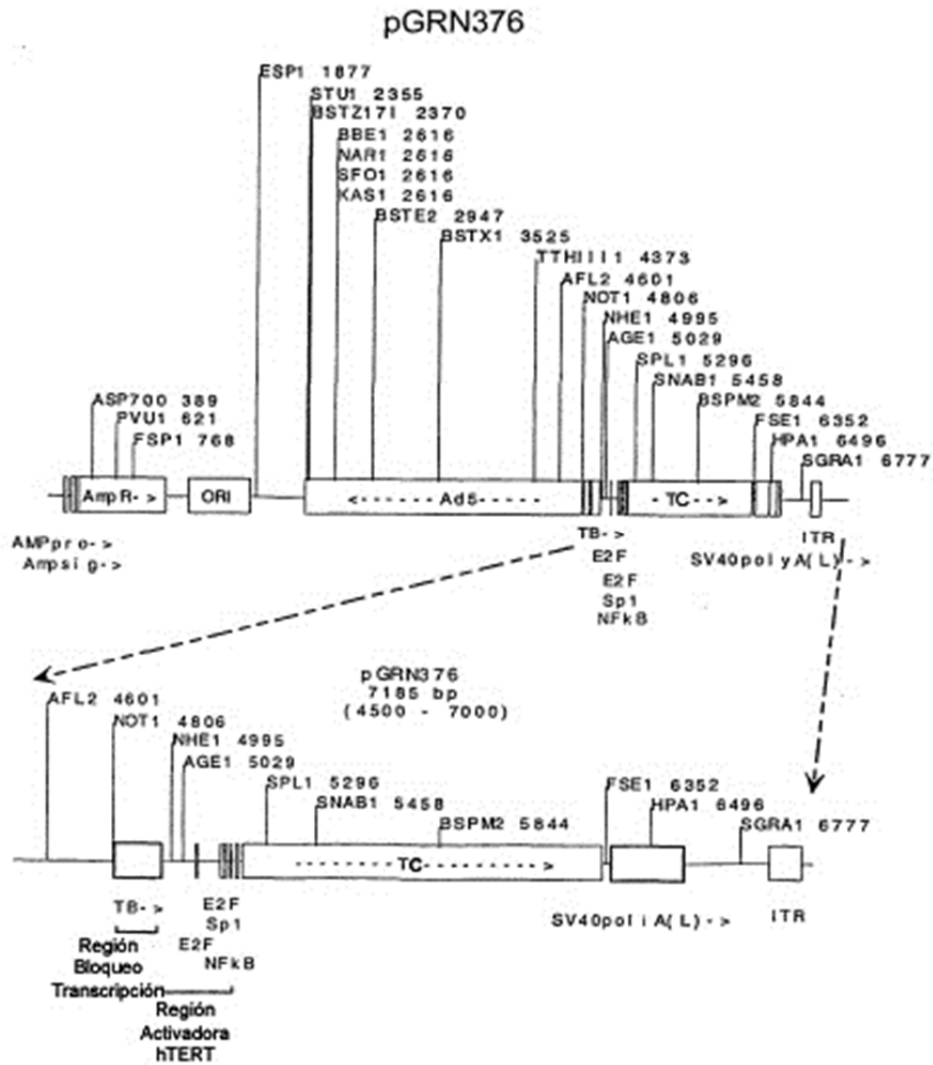


Figura 5



Casete de expresión de transgen para
activador hTERT/TC/Plásmido Adenovirus

Figura 6

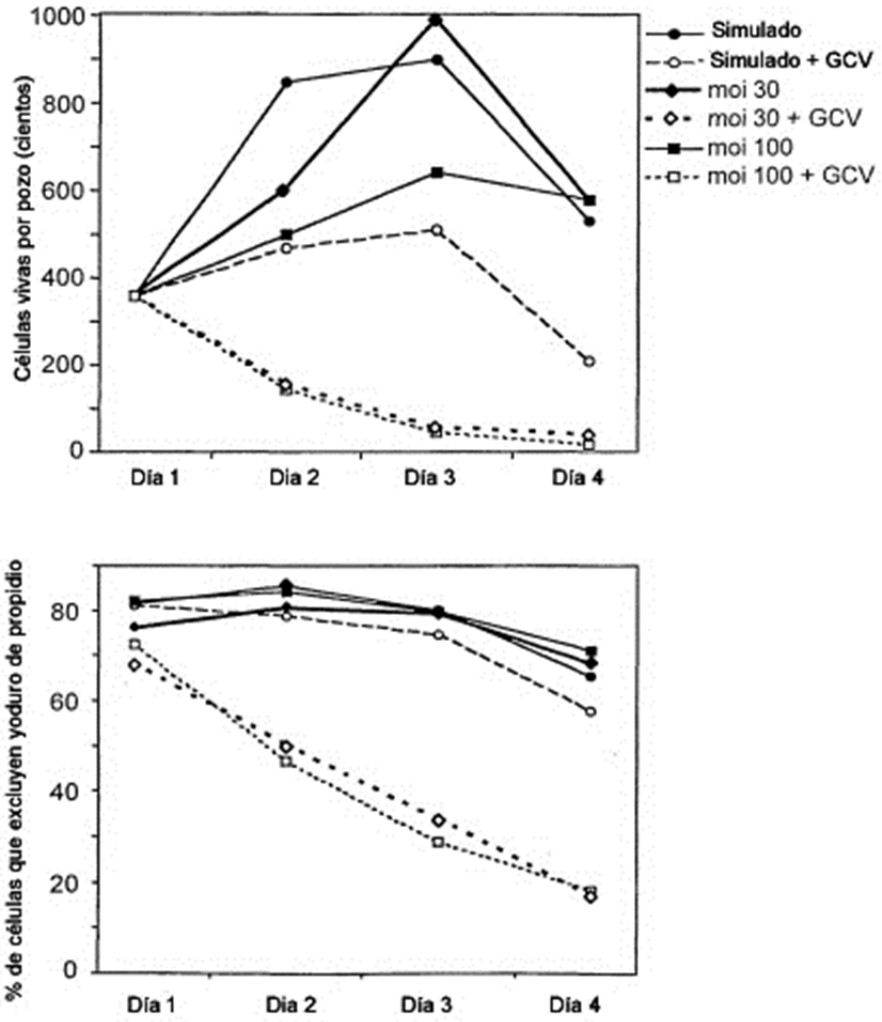


Figura 7

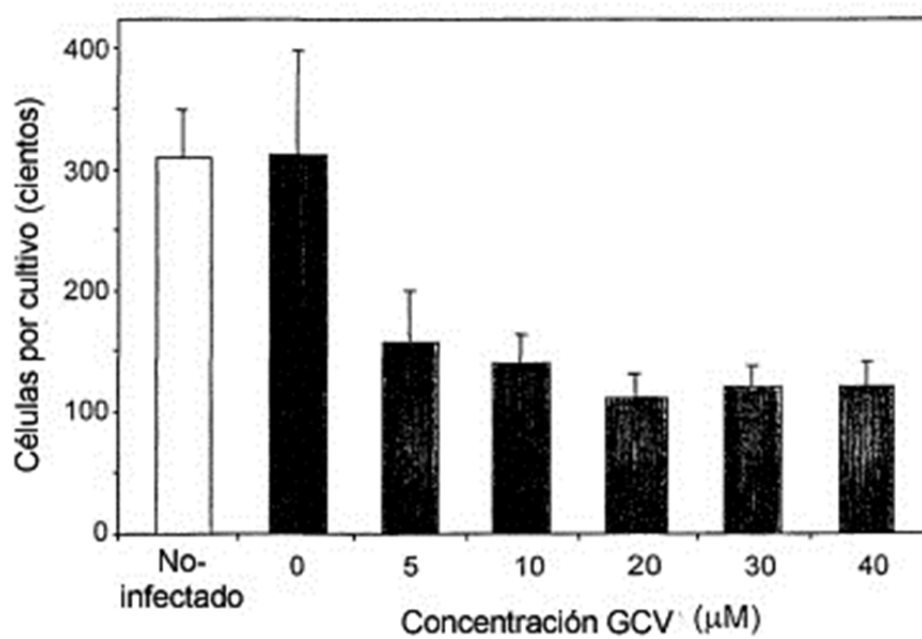


Figura 8

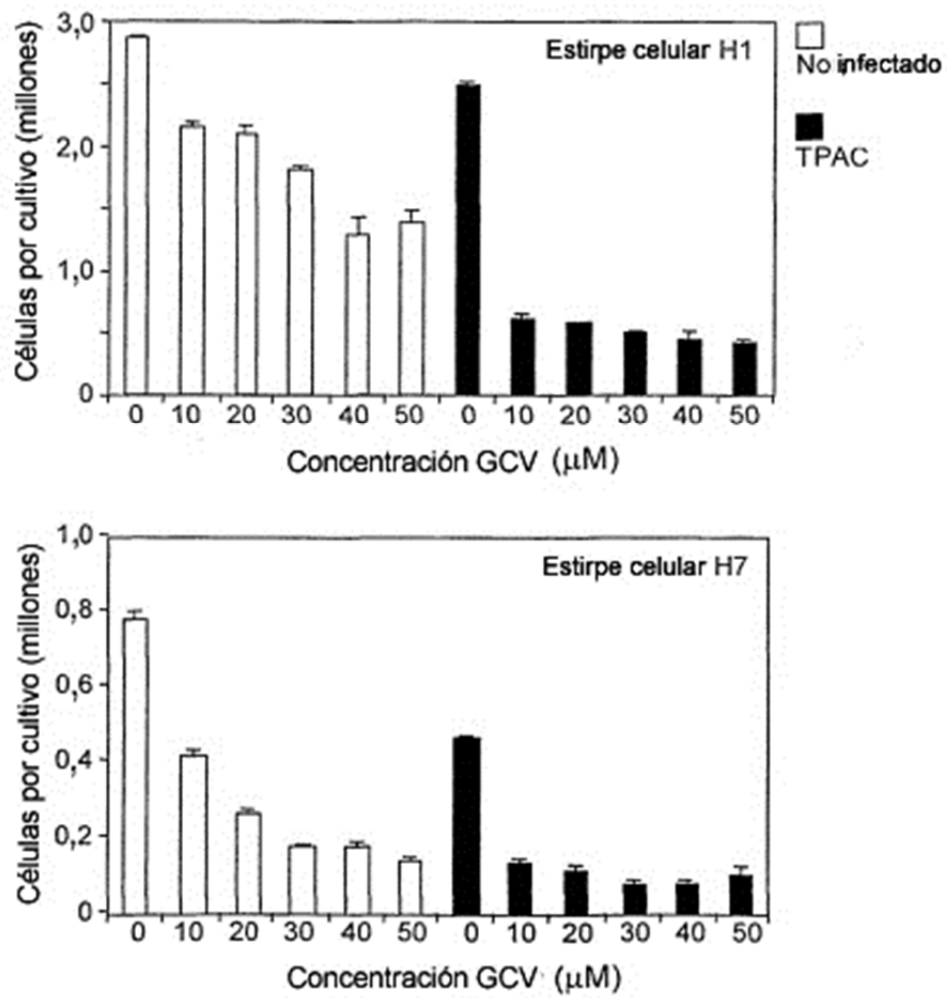


Figura 9

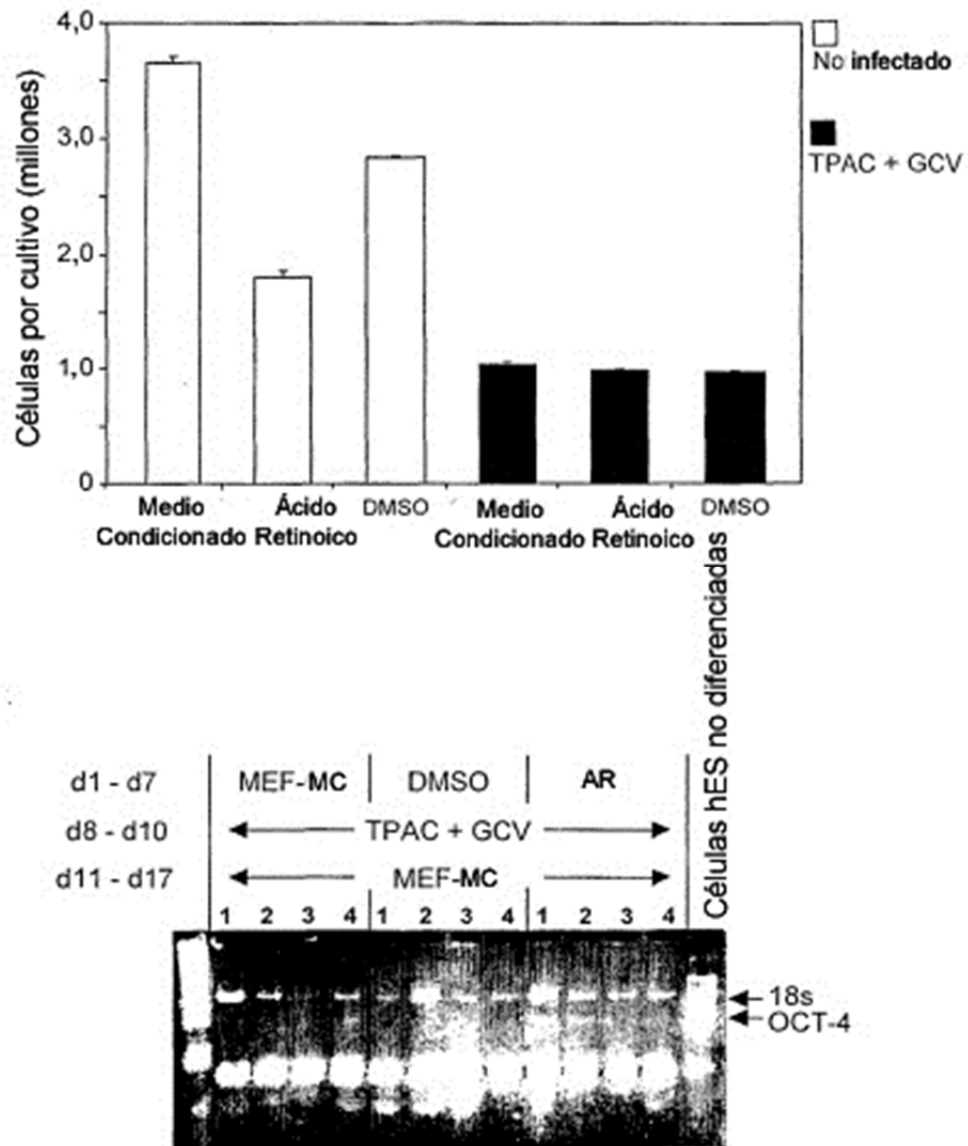


Figura 10

A.



B.

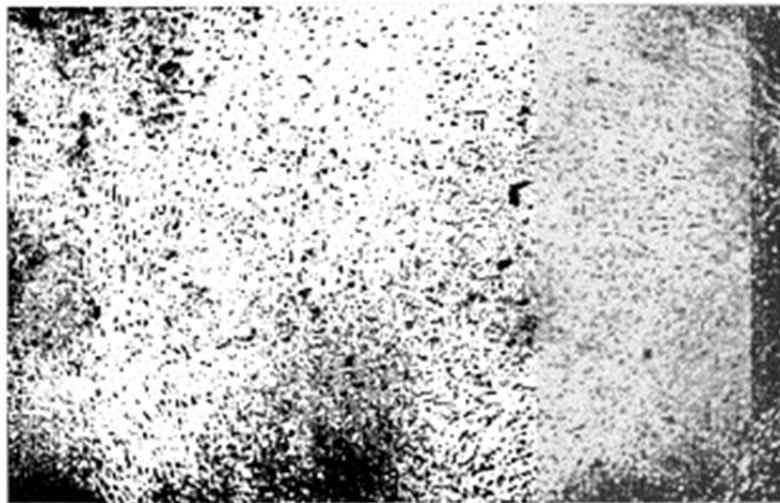


Figura 11

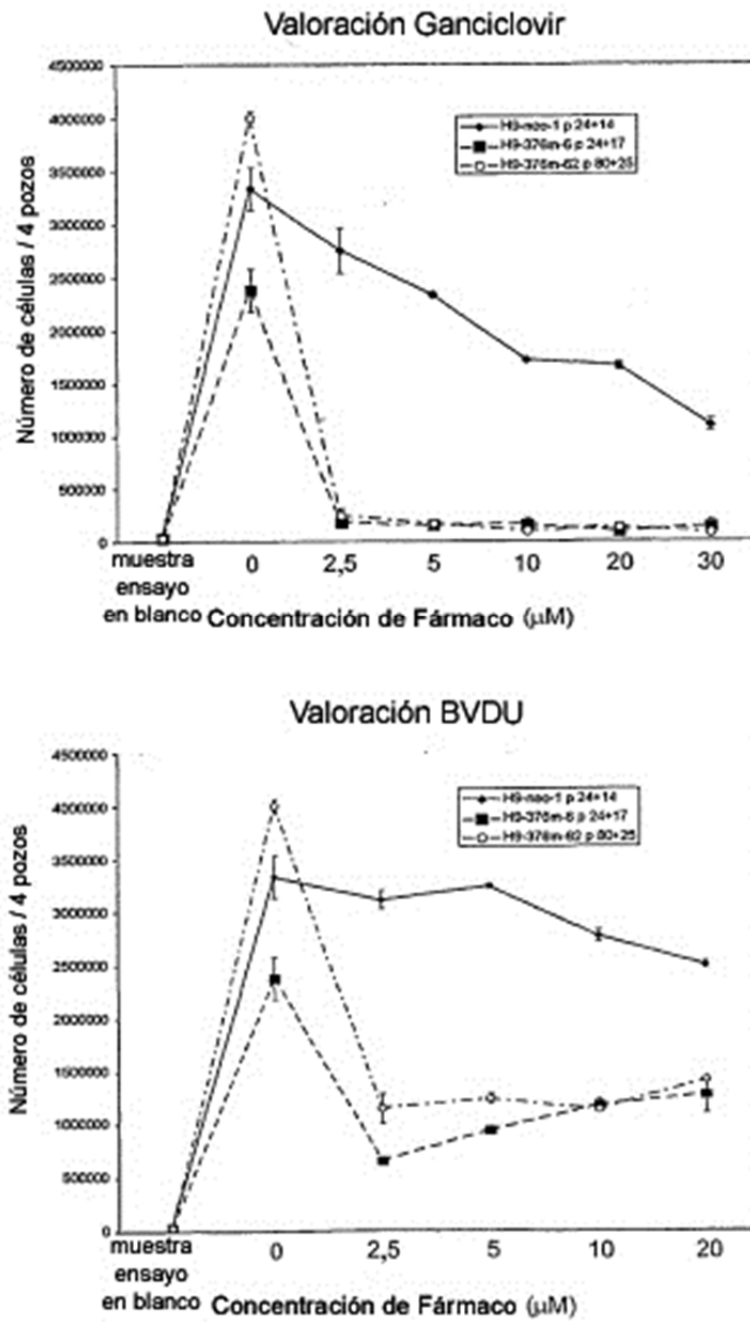


Figura 12A

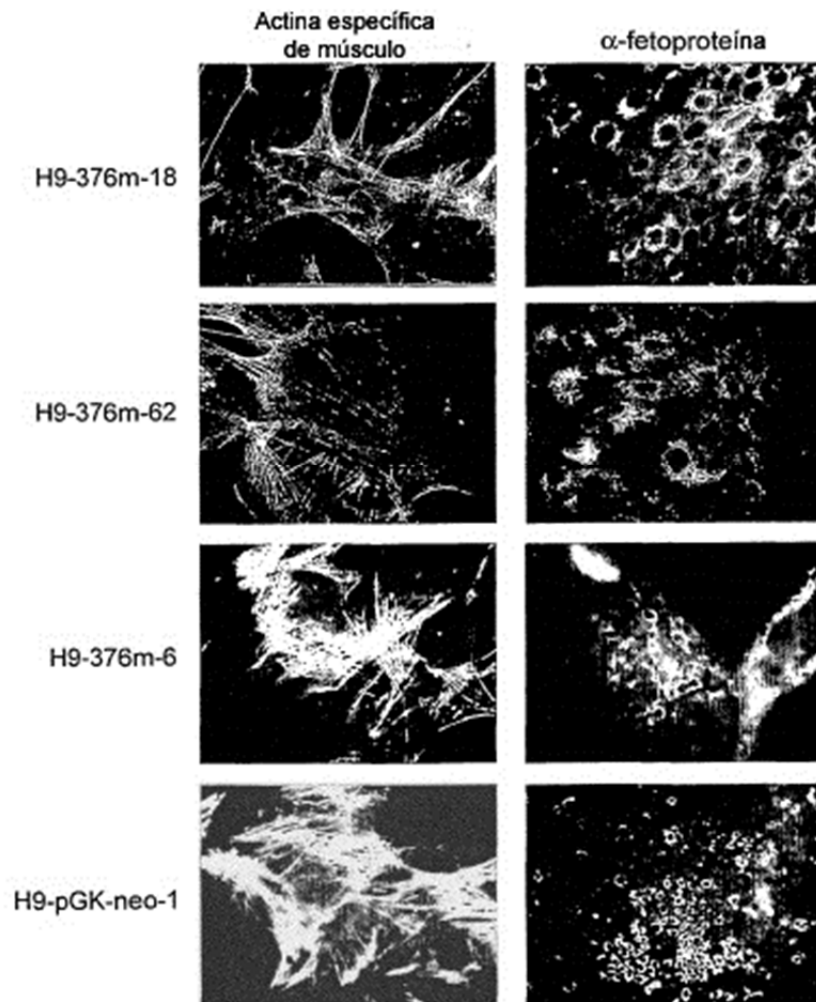


Figura 12B

