



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614470-5 A2**

(22) Data de Depósito: 01/08/2006
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/09

(54) Título: **PRODUÇÃO DE CELULAS
REPROGAMADAS COM POTENCIAL RESTAURADO**

(30) Prioridade Unionista: 01/08/2005 US 60/704,465

(73) Titular(es): Nupotential, Inc

(72) Inventor(es): KENNETH J. EILERTSEN

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006029944 de 01/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/016566de 08/02/2007

(57) Resumo: PRODUÇÃO DE CELULAS REPROGAMADAS COM POTENCIAL RESTAURADO. A presente invenção refere-se a um método para o tratamento de células e/ou unidades de transferência nuclear e/ou células-tronco em cultura com tais compostos, individualmente ou em combinações. O método resulta em um genoma globalmente hipometilado e uma restauração de diferenciação de células e/ou potencial de desenvolvimento ou potencialmente. Além disso é descrito um método para a produção in vitro de células reprogramadas que tiveram o potencial de diferenciação (totipotencial, pluripotencial, ou multipotencial) restauradas através de desmetilação do genoma.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PRODUÇÃO DE CELULAS REPROGRAMADAS COM POTENCIAL RESTAURADO**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Aqui, neste pedido de patente é reivindicada prioridade com relação ao pedido de patente Provisório Série N°. 60/704.465, depositado em 1 de agosto de 2005, que fica incorporado aqui, neste pedido de patente por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção está relacionada em geral aos campos da biologia celular, células-tronco, diferenciação de células, transferência nuclear de células somáticas e produtos terapêuticos com base em células. Mais especificamente, esta invenção está direcionada a métodos e produtos para a reprogramação de células e produtos terapêuticos com base em células. Métodos de isolamento e cultura, bem como os usos terapêuticos com relação às células isoladas também são providos.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA PRECEDENTE

Estudos dietéticos recentes descreveram uma interação entre o estado de doador de metila, metabolismo único de carbono e metilação de DNA [1-12]. A metilação do DNA está associada com o estado de desenvolvimento e potencial de diferenciação [13-19]. Além disso, uma exigência clara para a reprogramação induzida de transferência nuclear de célula somática (SCNT) e a reprogramação associada com a fertilização normal é a desmetilação do DNA [20]. É dentro desse contexto que o material da técnica precedente que se segue é revisto.

Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, células e tecidos diferentes adquirem programas de expressão de gene diferentes. Esses padrões distintos de expressão de gene parecem ser substancialmente regulados através de modificações epigenéticas tais como a metilação do DNA, modificações de histona e várias proteínas de ligação da cromatina [21,22]. Desse modo, cada tipo de célula no interior de um organismo multicelular tem uma assinatura epigenética única, que é imaginada como se tornando "fixa" uma vez que as células se diferenciem ou saiam do ciclo da célula.

No entanto, algumas células são submetidas a uma “reprogramação” epigenética importante durante o desenvolvimento normal ou em determinadas situações de doença. A reprogramação envolve a remoção das marcas epigênicas no núcleo, seguida pelo estabelecimento de um conjunto diferente de marcas [22. 23]. Por exemplo, na ocasião da fertilização as marcas epigenéticas do gameta são apagadas e substituídas com as marcas embrionárias necessárias para a totipotência e o desenvolvimento embrionário. A reprogramação também ocorre em células do germe primordial nas quais as impressões de origem são apagadas para a restauração da totipotência. As células de câncer e as células que se trans-diferenciam também são imaginadas como sendo submetidas à reprogramação. Finalmente a reprogramação drástica é exigida em seguida a SCNT com a finalidade da clonagem de reprodução e da terapia com células-tronco [26-33]

Recentemente, novas compreensões têm sido obtidas dentro da reprogramação epigênica no desenvolvimento normal e no SCNT. Embora as compreensões dentro dos mecanismos de reprogramação e os fatores envolvidos ainda sejam rudimentares, o conhecimento fundamental está agora atingindo um estágio no qual conceitos mais detalhados podem ser desenvolvidos e novas abordagens experimentais podem ser imaginadas para o exame dos aspectos mecânicos que irão prover novas oportunidades comerciais. Um resumo breve da induzido *in vivo* (fertilização e embriogênese) e a reprogramação SCNT induzida *in vitro*, é o que se segue.

Reprogramação e Desenvolvimento Epigenéticos

Reprogramação - Fertilização *in vivo*:

Metilação do DNA. Nos camundongos, na fertilização, os genomas parentais estão em etapas diferentes do ciclo da célula com marcas epigenéticas distintas e organização da cromatina. O genoma paterno suprimido pelo esperma adulto é empacotado densamente com protaminas. O genoma materno é preso na metáfase II e o seu genoma de duas cópias é empacotado em histonas. Na fertilização, as protaminas são substituídas com as histonas e o genoma materno completa a meiose. Depois da aquisição da histona, o genoma paterno sofre uma perda de metilação do DNA na ampli-

tude do genoma como detectada por imunofluorescência indireta [34] e seqüenciamento de bissulfito [35]. A desmetilação é completada antes que a replicação do DNA se inicie nos pró-núcleos paternos. Deve ser observado, no entanto, que nem todas as regiões do genoma dão desmetiladas nessa etapa. É imaginado que o citoplasma do oócito contém fatores de desmetilação que objetivam especificamente ou excluem determinadas classes de seqüências na cromatina do esperma.

Modificação da histona: A cromatina materna é organizada de tal forma que a metilação do DNA e as modificações na cromatina são abundantes na fertilização. Essas modificações incluem ambas as modificações da nucleohistona e as proteínas associadas com a cromatina com estados ativos e repressivos. Por exemplo, as modificações na histona tipicamente associadas com um estado ativo tal como a lisina acetilada e H3K4me são encontradas no pró-núcleo feminino [34,36,37]. As modificações na heterocromatina tais como H3K9me_{2/3}, H3K27me₁ e H4K20me₃, largamente associadas com um estado repressivo da cromatina, também estão presentes.

As histonas associadas com o pró-núcleo masculino são altamente acetiladas [34,36]; no entanto, imediatamente na ocasião da incorporação da histona, H3K4me₁, H3K9me₁ e H3K27me₁ podem ser detectáveis [37-39]. Isso ocorre quando a metilação do DNA está ainda presente no pró-núcleo masculino. As modificações progressivas da histona que ocorrem ao genoma paterno levam presumivelmente a um estado da cromatina equivalente aquele do genoma materno.

Desenvolvimento da Pré-implantação.

Desmetilação passiva: A partir de uma célula para o estado de blastócito no camundongo, existem outras mudanças na metilação do DNA global. A metilação do DNA é reduzida de forma progressiva com cada divisão da clivagem e essa perda é dependente da replicação do DNA [40,41]. A Dnmt1o, uma proteína DNMT1 herdada a partir do oócito é excluída durante as três primeiras divisões da clivagem [42,43], sendo responsáveis pela perda de metilação através de um mecanismo passivo.

Modificação na histona: O grau no qual as modificações da his-

tona são programadas durante a desmetilação passiva do DNA não é claro até o presente.

Assimetria epigenética e compromisso com a linhagem.

Metilação: O primeiro evento da alocação da linhagem na embriogênese de mamíferos ocorre no estágio da mórula e resulta na formação da Inner Cell Mass (ICM) (Massa de Célula Interna) e as linhagens da trofoectoderma (TE) nos blastócitos. O mecanismo para a decisão do destino da célula não é conhecido. De forma interessante, os blastômeros de duas células são ainda totipotentes porém na etapa de quatro células (em camundongos) o viés de linhagem está presente com base no totipotencial diminuído [44]. As diferenças globais na metilação do DNA entre as linhagens extra embrionárias e embrionárias tem sido detectadas e as diferenças podem ser detectadas tão cedo quanto no estágio de blastócito no qual as combinações da desmetilação ativa e passiva resultaram em um estado mais baixo de metilação na TE. Em contraste, O ICM tem um nível aumentado de metilação global devido à de novo metilação possivelmente causada por DNMT3b, uma de novo metiltransferase de DNA, que pode ser detectável em ICM de blastócitos, porém não na TE [34].

Modificação da histona: Nos camundongos, as marcas heterocromáticas da histona H3K9me3 se focalizam no ICM e as H3K27me1, me2 e me3 são mais abundantes no ICM do que na TE [38]. O cromossomo X inativo e determinadas regiões impressas estão marcadas na TE por H3K27me e H3K9me. Em geral, tal como com a metilação do DNA, níveis mais altos das marcas de metilação repressiva da histona também são encontradas em ICM quando comparado com TE. Dessa forma, a assimetria epigenética é exigida para o desenvolvimento.

Transferência Nuclear de Célula Somática: Um método para a alteração das marcas epigenéticas, de forma experimental, é por SCNT ou clonagem. O SCNT exige que o núcleo de uma célula somática diferenciada seja reprogramado em um estado de totipotência em um ambiente do oócito no qual o material de DNA nuclear tenha sido removido (quase sempre referido como "enucleação"). Todas as marcas epigenéticas que foram exami-

nadas em embriões clonados e em adultos a partir de múltiplas espécies exibem anormalidades e a maioria dos embriões SCNT também são diferentes um do outro no perfil epigenético preciso que eles possuem, indicando que a reprogramação epigenética induzida por SCNT é um processo acidental e estocástico [30-33, 45]

Além disso, o desenvolvimento dos embriões SCNT é altamente variável com uma vasta maioria de mortes em todas as etapas do desenvolvimento, e os sobreviventes tendo uma variedade de anormalidades. Entre aqueles que se desenvolveram até as últimas etapas da gestação ou até o nascimento, muitos tinham anormalidades na placenta e uma proporção significativa de mortes pré-natais a partir da fraca adaptação a vida extra-uterina. Devido a que a descendência de animais clonados parece normal, a maioria dos problemas com relação ao desenvolvimento de clones é provavelmente causada por defeitos epigenéticos. Ambos o desenvolvimento e as anormalidades epigenéticas dos embriões SCNT tendem a ser mais graves quanto mais cedo eles forem examinados, com menos clones anormais sobrevivendo até as etapas finais [46]

Os defeitos epigenéticos descritos na descendência clonada e nos embriões SCNT incluem erros na inativação de X [47,48], marcação [49-51], metilação do DNA (ambas global e em locais específicos) [36,47,52,53], acetilação da histona [43], metilação [43], e alteração na expressão do gene [54] incluindo a insuficiência em reativar *Oc14*, um gene de pluripotência e importante para o desenvolvimento [55,57].

A reprogramação induzida por SCNT por esse motivo parece ter pelo menos duas exigências importantes; remoção das proteínas nucleares e a desmetilação do DNA das células somáticas, esta última sendo aparentemente a mais importante. Por exemplo, Somonsson & Gurdon observaram um retardamento considerável quando os núcleos somáticos metilados dessas células do timo dos camundongos foram injetados dentro dos oócitos *Xenopus* [20]. O retardamento declinou quando os núcleos foram desproteïnados antes da transferência nuclear. No entanto quando o DNA não metilado, por exemplo, um plasmídeo bacteriano, foi injetado, não houve retarda-

mento detectável. Isso indicou que quando todas as proteínas repressivas foram removidas dos núcleos, um retardamento substancial ainda ocorre e que o DNA tem que ser desmetilado antes que a transcrição possa começar. Além disso, usando um alelo hipomórfico de Dnmt1, Blueloch et al demonstraram que a desmetilação de células somáticas doadoras aumentou a eficácia da clonagem e da produção das células-tronco embrionárias in vitro indicando que a restauração do potencial de diferenciação e de desenvolvimento de uma célula diferenciada é capacitada pela metilação reduzida do DNA [336].

Mecanismo para a Remoção da Metilação do DNA Não Entendido: O mecanismo para a remoção da metilação do DNA (ou no que diz respeito, as histonas) não é entendido mecanicamente. A perda de metilação do DNA do genoma paterno no zigoto é provável de ser uma desmetilação ativa catalisada por enzima. Um oócito também pode desmetilar ativamente um núcleo somático transferido, o que sugere que a atividade está presente. Vários trajetos bioquímicos candidatos tem sido sugeridos que poderão tanto remover o grupo de metila na posição C5 do anel da citidina diretamente (desmetilação direta) como a base da citidina (desmetilação indireta). Até agora, os métodos diretos para a remoção do grupo metila ainda não foram descritos ou ainda não foram validados.

Trajetos indiretos para a desmetilação envolve o reparo do DNA: Por exemplo, as glicosilases do DNA tais como a glicosilase do DNA timidina e a proteína 4 de ligação com o domínio de metila, geralmente reparam a ausência de coincidência de T:C o que é imaginado como resultando a partir da desaminação espontânea de 5meC. Mais recentemente, foi mostrado que as citidina desaminase e Apobec1, citidina desaminases induzidas por ativação podem desaminar 5meC para resultar em T e que essas enzimas são expressas em oócitos e em células de germe. Essa atividade da citidina desaminase acoplada com o reparo da excisão da base pode resultar na desmetilação sem a replicação do DNA, porém ainda irá necessitar de um extenso reparo da excisão da base no zigoto prematuro.

Fatores ambientais: Um corpo de evidências em crescimento sugere que fatores ambientais que podem ser modificados tais como a dieta

podem influenciar a metilação do DNA. Por exemplo a alimentação pré-natal de uma dieta suplementada com metila pode aumentar o nível de metilação do DNA e a expressão fenotípica de genes na descendência. A pelagem de cor nos camundongos é determinado pela expressão do gene *agouti*. Isso é determinado através do estado da metilação do DNA na repetição do terminal longo do gene *agouti* no folículo de cabelo. Se esta região for hipermetilada, o camundongo é *agouti* em cor, enquanto que se o camundongo for hipometilado o camundongo fica amarelo. Quando os camundongos fêmeas prenhas foram alimentadas com uma dieta suplementada com metila enriquecida em zinco, metionina, betaína, colina, folato e vitamina B₁₂ aconteceu uma alteração no estado da metilação da repetição do terminal longo do gene *agouti*, e nenhum dos filhotes tiveram uma pelagem amarela [58]. Desse modo, a exposição *in utero* a um nutriente pode levar a modificações epigenéticas do genoma na descendência.

15 O Papel do Folato na Metilação do DNA: O folato, uma vitamina B solúvel em água, tem um papel significativo e modulador no estado da metilação do DNA. A única função biológica do folato é mediar a transferência de partes de carbono único [59-61] e desse modo tem um papel central no metabolismo de carbono único. Estudos animais mostraram ainda que a deficiência de folato ocasiona hipometilação genômica e específica do gene em fígado de rato e o grau parece depender da gravidade e da duração da depleção do folato [62.63]. A hipometilação do DNA também tem sido identificada em linfócitos e em seres humanos em uma baixa dieta de folato e pode ser revertida através da reposição do folato [64]. O efeito da deficiência do folato com relação a metilação do DNA, no entanto, é altamente complexo. Por exemplo, a deficiência do folato com ou sem as reduções em DNMT1, não afeta os níveis gerais de metilação genômica do DNA ou os níveis de metilação em dois genes candidatos E-cadherin e p53, em tecido normal ou neoplásico.

30 Metabolismo de carbono único

A Importância das Proporções SAM-SAH e o Papel dos Nutrientes na Regulação da Metilação do DNA: A disponibilidade de nutriente pode

atuar em um papel importante na regulação da metilação do DNA. Além do mais, os fatores envolvidos no metabolismo do carbono único também provavelmente atuam em um papel importante no estado da metilação devido a que ele influencia o suprimento de grupos metila e por esse motivo os trajetos bioquímicos dos processos de metilação. Os grupos metila supridos a partir da dieta, na forma de colina e de metionina, ou a partir do conjunto de carbono único dependente do folato, tem que ser ativados para S-adenosilmetionina (SAM) para servir como substratos nas reações de transmetilação. Devido a que a adenosilhomocisteína (SAH) é um produto das reações de transmetilação e um potente inibidor das metiltransferases dependentes de SAM, a proporção de SAM-SAH é um índice importante do potencial de transmetilação [65,66]. Quando a proporção é alta, o potencial de metilação é alto. Quando a proporção é baixa o potencial de metilação é baixo. É bastante conhecido que a depleção do folato por si própria é uma força perturbadora suficiente para a diminuição dos conjuntos de SAM. Isso leva a um aumento nos níveis celulares da SAH devido a que o equilíbrio da inter-conversão da SAH-homocisteína na realidade favorece a síntese da SAH. Por essa razão quando o metabolismo da homocisteína é inibido, como na deficiência de folato, os níveis celulares de SAH serão aumentados. A SAH aumentada inibe a atividade da metiltransferase e por conseqüência as reações de metilação do DNA.

A Glicina-N-metil transferase (GNMT) Otimiza as Reações de Transmetilação: A enzima citosólica GNMT funciona para otimizar as reações de transmetilação através da regulação da proporção de SAM:SAH. Quando os grupos metila são abundantes e os níveis de SAM são elevados, a GNMT descarta o excesso de grupos metila através da transformação da sarcosina a partir da glicina, A SAM também reduz o suprimento de grupos metila que se originam a partir do conjunto de carbono único através da inibição da 5,10-metiltetraidrofolato redutase (MTHFR) [67,68], a enzima responsável pela síntese de 5-metiltetraidrofolato (5-metil-THF). A 5-Metil-THF é a coenzima do folato de doa o seu grupo de metila para a homocisteína para a formação da metionina. Devido a que a 5-metil-THF também se liga a

GNMT e inibe a atividade da mesma [69,70], uma redução nos níveis de 5-metil-THF devido a inibição da MTHFR pela SAM resulta em um aumento da atividade da GNMT. Os fatores que ativam a GNMT, levam a regulação para baixo das metiltransferases, incluindo a as metiltransferases do DNA.

5 Até agora, não houve nenhuma referência em que a cultura resulta na redução da metilação do DNA. No entanto, algumas referências têm descrito a manipulação dietética da GNMT em roedores [71,72]. Por exemplo, as dietas suplementadas com vitamina A e derivados da Vitamina A, como por exemplo o ácido todo trans-retinóico (ATRA), resultaram em um
10 aumento da atividade da GNMT e de DNA hipometilado em hepatócitos de rato, enquanto que as reduções de folato, colina, betaína e das vitaminas B₆ & 12 na dieta também resultaram na redução da metilação do DNA em tecidos específicos. Dessa forma, a manipulação dos componentes do ciclo da metionina e o ajuste da disponibilidade de doadores de metila no nutriente representam possíveis abordagens *in vitro* para desmetilação e a restauração do
15 potencial do DNA. Até o presente, nenhuma tentativa anterior para a reprogramação ou a alteração da eficiência da reprogramação através dos componentes envolvidos no metabolismo do carbono único, alterando a disponibilidade do nutriente e/ou alterando a GNMT foi reportada.

20 Métodos Correntes para Induzir a Reprogramação de Células: Os métodos atuais para a indução da reprogramação de células em mamíferos dependem primariamente da SCNT, envolvendo a reprogramação nuclear e em um grau menor a exposição de extratos de células, fusão de tipos de células, e remoção das proteínas nucleares. Nenhum desses métodos, no
25 entanto, superaram a etapa primária de limitar a proporção da redução dos níveis de metilação do DNA requerido para uma reprogramação efetiva.

Reprogramação Nuclear Ineficiente: A reprogramação nuclear é dependente do estado da cromatina e especificamente da desmetilação do DNA, que é tipicamente ineficiente ou vagarosa. Como um exemplo, a clonagem de SCNT exige uma reprogramação eficiente da expressão do gene
30 para silenciar a expressão do gene na célula doadora e ativar um padrão embrionário de expressão de gene. Observações recentes indicam que a re-

programação pode ser iniciada através de eventos prematuros que ocorrem logo depois da SCNT, porém em seguida continuam como progressos de desenvolvimento através da clivagem de provável gastrulação. Devido ao fato de a reprogramação ser lenta e progressiva, as unidades NT têm as suas características drasticamente alteradas quando comparados com os embriões fertilizados.

Os métodos descritos acima com relação a transferência nuclear são em geral conhecidos na indústria, e tem sido ou estão sendo aplicados para aplicações para direcionar a diferenciação de células-tronco. No entanto, quase todas as aplicações dependem das tecnologias de transferência nuclear. Geron (Menlo Park CA) tem usado células-tronco embrionárias para a produção de células de nervo e células do músculo cardíaco e tem feito avanços na manipulação de células-tronco para a produção de outros tipos de tecido. A Infigen, Inc. (DeForest, WI) também recebeu muitas patentes com relação a transferência nuclear, primariamente direcionadas a aplicação em clonagem de gado.

Em outras tentativas para o aumento da eficiência da transferência nuclear, o Dr. Rudolph Jaenisch do MIT, Whitehead Institute usa microconjuntos de cDNA para estabelecer os critérios moleculares para a reprogramação nuclear especificamente na transferência nuclear. O foco primário do Dr. Jaenisch é com relação a doenças humanas tais como o câncer, e a reprogramação de cânceres e o projeto de estratégias para o aumento da reprogramação epigenética. Os seus esforços principais tem sido focalizados sobre a compreensão do mecanismo que estabelece a metilação do DNA e a reprogramação do genoma metilado. O Dr. Jaenisch está tentando o desenvolvimento de uma unidade gerada de transferência nuclear isenta da metilação através da derrubada da DNMT1 nas linhas de células doadoras e usando as linhas para a produção de unidades NT [136].

O Dr. Keith Latham da Temple University está examinando o quanto uma reprogramação ineficiente afeta os embriões clonados. A pesquisa do Dr. Latham está focalizada primariamente sobre os dados fisiológicos - examinando as mudanças nos fenótipos depois da clonagem [137, 139].

O Dr. Kevin Eggan, da Harvard University está avaliando como o destino do desenvolvimento de uma célula adulta pode ser restaurado (reprogramado), com a utilização da transferência nuclear como um modelo, fez manchetes em 2005 pela fusão de uma célula de pele humana com uma célula-tronco embrionária para criar um híbrido que parecia e atuava como a célula-tronco, potencialmente assentando uma fundação para a criação de células-tronco feitas de encomenda, geneticamente idênticas para pacientes [138].

Entre outros métodos sob investigação com relação a produção de células-tronco ou células do tipo de células-tronco estão as praticas de Uri Verlinsky, do Reproductive Genetics Institute (In Vitro Fertilization Clinic, Chicago, IL). Verlinsky emprega um método que usa um processo de fusão e células para a fusão de células somáticas com células-tronco, sob a teoria de que as moléculas das células somáticas irão direcionar a diferenciação das células-tronco dentro do mesmo tipo de célula como o das células somáticas. Verlinsky tem reportado a produção de 10 linhas de células-tronco embrionárias com a utilização de sua nova técnica StemBrid (tronco/híbrido), Não são usados embriões.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção está direcionado a um processo para a restauração do potencial de diferenciação de células através da redução da metilação global do DNA da célula.

Um outro objetivo da presente invenção está direcionado ao tratamento de células e/ou unidades de transferência nuclear (NT) e/ou células-tronco em culturas para a produção de um genoma globalmente hipermetilado e potencial restaurado da célula para diferenciação (como por exemplo, pluripotencial, multipotencial e/ou totipotencial), definido como a capacidade da célula para diferenciar novos tipos de célula.

A presente invenção é direcionada a um método para a reprogramação de uma célula eucariótica. o método compreendendo, como a etapa (a) diminuição da proporção de S-adenosilmetiona para S-adenosilhomocisteína (proporção SAM para SAH) na célula eucariótica. A proporção SAM para SAH pode ser reduzida para 0,1 ou menos, de prefe-

rência 0,6 ou menos, e de maior preferência de 1,00 ou menos. A etapa (a) pode incluir por em contato a célula com um siRNA selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS; 1 a 41. Ainda, a etapa (a) também pode incluir por a célula em contato com uma quantidade de um ácido retinóico efetiva para o aumento da expressão, atividade, ou ambas a expressão e a atividade glicina-N-metil transferase no interior da célula eucariótica. S etapa (a) também pode incluir por a célula em contato com uma quantidade de um ácido retinóico efetiva para o aumento da expressão, atividade, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase no interior da célula.

10 Além disso, o método inclui, como a etapa (b) a redução dos níveis de 5-metilcitosina no DNA no interior da célula eucariótica. Esta dentro do escopo da presente invenção o de realizar as etapas (a) e (b) simultaneamente. A etapa (b) também inclui especificamente a supressão da expressão, atividade, ou as expressão e da atividade das metiltransferases do DNA dentro da

15 célula eucariótica. A etapa (b), também pode compreender por em contato a célula com um inibidor da metiltransferase do DNA. Do mesmo modo, a etapa (b) pode compreender por a célula em contato com uma quantidade efetiva para a supressão de um ácido ribonucléico de pequena interferência (siRNA), dimensionado e configurado para a supressão da expressão das

20 metiltransferases do DNA.

A presente invenção também está direcionada a um método para a reprogramação de uma célula eucariótica, o método compreendendo, como a etapa (A), especificamente a supressão da expressão, atividade, ou a expressão e a atividade das metiltransferases do DNA no interior de uma

25 célula eucariótica; e ao mesmo tempo, como a etapa (b) aumentando a expressão, a atividade, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase no interior da célula eucariótica. A etapa (a) pode compreender por a célula em contato com uma quantidade efetiva para a supressão de um siRNA dimensionado e configurado para a supressão da expressão das

30 metiltransferases do DNA. A etapa (a) também pode compreender por a célula em contato com uma quantidade efetiva para a supressão de um siRNA dimensionado e configurado para a supressão até a redução das citosinas 5-

metiladas no DNA na célula por pelo menos cerca de 5%. A etapa (b) pode compreender por a célula em contato com uma quantidade efetiva de um ácido retinóico para o aumento da expressão, atividade, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase no interior da célula. A etapa

5 (b) também pode compreender por a célula em contato com um ácido todo trans-retinóico. Além disso, a etapa (b) pode incluir por a célula em contato com um composto que se ligue a um receptor do ácido retinóico. Além das etapas (a) e (b), o método pode incluir, como a etapa (c), a supressão específica no interior da célula da expressão, atividade, ou da expressão e da

10 atividade em uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em 5,10-metilenotetraidrofolato redutase e cistaciona beta-sintase. Está dentro do escopo da presente invenção o contato da célula com o siRNA selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ.ID. NOS: 1 a 41.

A presente invenção está ainda direcionada a um método para a

15 mudança do potencial de diferenciação na célula eucariótica, o método compreendendo por a célula eucariótica em contato *in vitro* com uma quantidade de siRNA, em que o siRNA esteja dimensionado e configurado para a supressão da expressão das metiltransferases do DNA, contanto que o siRNA não suprima a expressão da glicina-N-metil transferase, e em que a quanti-

20 dade seja efetiva para induzir uma desmetilação do DNA com amplitude do genoma, em que o potencial de diferenciação celular seja aumentado. As células eucarióticas são selecionadas a partir do grupo que consiste em células-tronco, células progenitoras, células somáticas, e células submetidas à transferência nuclear de célula somática (células NT). Este método compre-

25 ende por a célula em contato com um siRNA em que o siRNA esteja dimensionado e configurado para a supressão especificamente da expressão de uma metiltransferase do DNA selecionada a partir do grupo que consiste na metiltransferase 1 do DNA (Dnmt 1), metiltransferase 3a do DNA (Dnmt 3a), e metiltransferase 3b do DNA (Dnmt 3b). O método ainda compreende por a

30 célula em contato com uma quantidade efetiva de um composto para o aumento da expressão da, da atividade da, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase, tal como o ácido retinóico ou o ácido todo

trans-retinóico. As células também podem ser postas em contato com uma composição que compreenda, em combinação, o siRNA e o ácido todo trans-retinóico.

A presente invenção está ainda direcionada a um método para o aumento do potencial de diferenciação de uma célula diferenciada, o método compreendendo uma célula diferenciada em contato in vitro, com uma composição compreendendo, em combinação, como a etapa (i) uma quantidade efetiva de derrubada de um ácido ribonucléico de pequena interferência (siRNA), em que o siRNA é dimensionado e configurado para a supressão da expressão de metiltransferases de DNA, especificamente; (ii) quantidade efetiva de derrubada de um siRNA dimensionada e configurada para a supressão da expressão de uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em 5,10-metilenotetraidrofolato redutase e cistaciona beta-sintase; e (iii) um composto eficaz para o aumento da expressão da, da atividade de, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase, em que a célula é posta em contato com a composição durante um período de tempo eficaz para a indução da desmetilação do DNA em amplitude do genoma no interior da célula, por meio do que o potencial de diferenciação celular é aumentado. O método compreende por a célula em contato com uma composição compreendendo siRNA, que é dimensionada e configurada para suprimir especificamente a expressão de uma metiltransferase de DNA, selecionada a partir do grupo que consiste em metiltransferase 1 do DNA (Dnmt 1), metiltransferase 3a do DNA (Dnmt 3a), e metiltransferase 3b do DNA (Dnmt 3b). A composição efetiva para o aumento da expressão da, atividade da, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase, é o ácido retinóico ou o ácido todo trans-retinóico. As células são postas em contato com um siRNA selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ.ID.NOS: 1 a 41.

A presente invenção também está direcionada a um método para a determinação do potencial de desenvolvimento de uma célula, o método compreendendo a determinação da proporção de SAM para SAH na célula, em que uma proporção de SAM para SAH de menos do que 1,0 indica um aumento no potencial de desenvolvimento da célula. O método compreende

a medição da metilação de resíduos de citosina presentes no DNA da célula, em que a metilação de menos do que cerca de 10% indica um potencial de desenvolvimento aumentado da célula.

A presente invenção também compreende um método para o controle do potencial de diferenciação em uma célula, o método compreendendo, como a etapa (a) a manutenção da proporção de SAM para SAH na célula para menos do que cerca de 1,0; e (b) mantendo a metilação dos resíduos da citosina no DNA da célula para menos do que cerca de 40%. O método da reivindicação 34, compreendendo como a etapa (a) a manutenção da proporção de SAM para SAH na célula para menos do que cerca de 0,5; e como a etapa (b) mantendo a metilação dos resíduos da citosina no DNA da célula para menos do que cerca de 20%.

A presente invenção também é direcionada a um meio de cultura de células para o aumento do potencial de diferenciação em uma célula diferenciada disposta dentro do meio de cultura, o meio de cultura compreendendo um meio de base suficiente para a manutenção da viabilidade da célula, em combinação com um fator que reduza a atividade dos doadores de metila presentes no meio de cultura de células. O fator é selecionado a partir do grupo que consiste em homocisteína e ácido todo trans-retinóico. Alternativamente, o fator de uma quantidade efetiva para a supressão de um siRNA dimensionado para suprimir a expressão das metiltransferases do DNA.

A presente invenção também está direcionada um método para a identificação de compostos que afetam a diferenciação de células, o método compreendendo, como a etapa (a) a redução da percentagem das citosinas no DNA de uma célula são metiladas por pelo menos cerca de 5%, em que a célula tem um primeiro fenótipo antes da redução; e como a etapa (b), a redução da proporção de SAM:SAH na célula para menos do que cerca de 1,0; e como a etapa (c) por a célula em contato com um composto suspeito de afetar a diferenciação de células; e como a etapa (d) comparando o primeiro fenótipo da célula ao fenótipo da célula depois da etapa (c), em que o aparecimento depois da etapa (c) de um fenótipo diferente a partir do primeiro fenótipo indica que o composto tem um efeito sobre a diferenciação de

célula. A etapa (a) pode incluir a redução da percentagem de citosinas no DNA de uma célula que são metiladas por pelo menos 5%. A etapa (a) também pode incluir a redução da percentagem de citosinas no DNA da célula que são metiladas por pelo menos cerca de 10%. A célula pode incluir um sistema de aviso para a monitoração das mudanças na transcrição, o qual mede a presença de uma atividade de enzima selecionada a partir do grupo que consiste na atividade de luciferase, atividade da beta-lactamase, e a atividade da beta-galactosidase.

A presente invenção está direcionada a um método para a restauração do potencial de diferenciação de célula compreendendo:

(a) reduzir a metilação do DNA nos núcleos de células somáticas, células, e ou partes específicas de células através da redução dos doadores de metila *in vitro*;

(b) aumentar a expressão do gene GNMT e/ou da atividade da enzima que resulta na diminuição da proporção SAM:SAH e níveis decrescidos da metilação do DNA;

(c) reduzir a proporção de SAM:SAH através da redução da expressão e/ou da atividade de enzimas específicas tais como a MTHFR e/ou as cistaciona-beta-sintase (Cbs);

(d) reduzir a atividade das metiltransferases do DNA incluindo as Dnmt 1, 3a, e/ou 3b;

(e) aumentar os níveis da homocisteína e/ou SAH *in vitro*, glucagonas, ou fatores relacionados ao abaixamento da proporção de SAM:SAH (a SAM:SAH reduzida irá abaixar a metilação);

(f) exaurir os níveis da glutaciona para a redução da proporção SAM:SAH;

(g) desenvolver meios definidos que incorporam um ou mais dos fatores acima para a redução da metilação (meios deficientes em doadores de metila, meios com homocisteína adicional, etc.);

(h) desenvolver uma nova análise com base na utilização do gene de informação beta-lactamase e/ou outros genes de informação viáveis (luciferase, beta-glucosidase, ou outros), para identificar os fatores que indu-

zem a y transcrição do gene GNMT, ou que identificam outros fatores ou atividades que simulam a atividade do GNMR; e

(i) desenvolvendo uma nova análise baseada na utilização de um gene de informação de beta-lactamase e/ou outros genes de informação viáveis (luciferase, beta-glucosidase, ou outros), para a identificação dos fatores que redizem a transcrição dos genes da metiltransferase do DNA, ou que identificam outros fatores ou atividades que reduzem a atividade das metiltransferases do DNA.

A invenção inclui porém não está limitada a:

10 (a) novas ferramentas de pesquisa incluindo meios especializados e culturas de células que permitem a produção in vitro de células reprogramadas com o potencial de diferenciação restaurado (totipotencial, pluripotencial, multipotencial) através da desmetilação do genoma;

15 (b) novas células do tipo de célula-tronco produzidas por esses meios e culturas, que podem ser usadas para aplicações em pesquisa ou em terapia;

(c) um novo sistema de análise para a monitoração da expressão do GNMT usando um gene de informação beta-lactamase. e/ou outros genes de informação relevantes, para a avaliação do impacto da expressão do GNMT ou outra atividade na restauração do potencial de diferenciação da célula;

25 (d) um novo sistema de análise para a monitoração da expressão da metiltransferase do DNA com a utilização de um gene de informação de beta-lactamase, luciferase, beta-galactosidase, e/ou outro gene de informação relevante, para a avaliação do impacto da expressão da metiltransferase do DNA ou outra atividade sobre a restauração do potencial de diferenciação da célula;

(e) aumentar a eficiência da transferência nuclear de células somáticas;

30 (f) aumentar a derivação de células-tronco embrionárias a partir de embriões SCNT reconstruídos (ou unidades).

As modalidades incluem:

(a) tratamento dos meios comerciais ou de outros meios existentes com ATRA, que aumenta a transcrição e atividade do GNMT, abaixa a proporção SAM:SAH e diminui o potencial de metilação de células e restaura a diferenciação e/ou o potencial de desenvolvimento;

5 (b) modificação dos meios comerciais e de outros meios existentes para permitir a derrubada das metiltransferases 1, 3a e 3b com a utilização de tecnologia de interferência do RNA resultando em níveis reduzidos de metilação do DNA;

10 (c) modificação dos meios comerciais e de outros meios existentes para permitir a derrubada das MTHFR e/ou Cbs usando a tecnologia de interferência do RNA, anti-sentido, ou outras tecnologias de derrubada resultando em uma diminuição da proporção de SAM:SAH e na metilação do DNA;

15 (d) modificação dos meios comerciais e de outros meios existentes para o aumento da transcrição, expressão de proteína e atividade do GNMT resultando em uma proporção SA:SAH diminuída e na metilação do DNA;

(e) modificação dos meios comerciais e de outros meios existentes para a diminuição da proporção SAM:SAH através da alteração dos níveis dos doadores de metila e/ou homocisteína e/ou SAH.

20 Sem desejar estar ligado a uma explanação com relação ao fundamento lógico por traz da presente invenção, acredita-se que os grupos de metila providos através da dieta, meio de cultura ou o conjunto de carbono único dependente do folato são essenciais para a função normal. A deficiência do grupo de metila leva à regulação para baixo das reações de transmetilação. Os grupos de metila supridos a partir da dieta (ou meio de cultura), na
25 forma de colina e metionina ou a partir do conjunto de carbono único dependente do folato, tem que ser ativado à SAM para servir como substratos nas numerosas reações de transmetilação. Devido a que a SAH é um produto das reações de transmetilação e um potente inibidor da maioria das metiltransferases dependentes de SAM, a proporção de SAM/SAH é um índice
30 importante do potencial de transmetilação. Por esse motivo, um suprimento intracelular de SAM é importante para a transmetilação, porém a regulação dessa proporção também é importante.

A enzima citosólica GNMT funciona para a otimização das reações de transmetilação pela regulação da proporção SAM/SAH. Quando os grupos metila são abundantes e os níveis de SAM elevados, a GNMT dispõe do excesso de grupos de metila através da formação do metabólito essencialmente inativo sarcosina a partir da glicina. A SAM também reduz o suprimento de grupos de metila que se originam a partir do conjunto de carbono único através da inibição da MTHFR, a enzima responsável pela síntese da 5-metil-THF, a coenzima folato que doa o seu grupo metila para a homocisteína para a formação da metionina. Devido a que a 5-metil-THF também se liga à GNMT e inibe a sua atividade, uma diminuição nos níveis de 5-metil-THF devido a inibição da MTHFR pela SAM resulta em um aumento na atividade da GNMT. De modo inverso, sob condições de diminuição de grupos metila e de SAM, a inibição da MTHFR é removida, levando a um aumento nas concentrações de 5-metil-THF e a subsequente inibição da GNMT. Isso assegura que os grupos metila sejam conservados para reações de transmetilação importantes quando a disponibilidade dos grupos metila está comprometida. Por essa razão os fatores de ativação de forma não apropriada a GNMT podem levar a uma regulação rara baixo de numerosas metiltransferases que são importantes para a manutenção de um estado de metilação apropriado.

A presente invenção foi acionada pela necessidade de acelerar o desenvolvimento de métodos novos mais eficazes e eficientes para a reprogramação de células. Esses métodos impactam a descoberta e o desenvolvimento de células terapeuticamente valiosas, incluindo as células-tronco, novas ferramentas de pesquisa para acelerar a pesquisa de terapias com base em células-tronco e outras células, propagação de animais valiosos e ou em perigo, e a produção de animais geneticamente manipulados de alto valor.

A invenção está direcionada para a resolução de problemas com os métodos correntes com relação a diferenciação de células, e a rediferenciação das mesmas em novas células. Especificamente, os métodos atuais, baseados primariamente em SCNT, são altamente ineficientes, e produzem resultados não confiáveis. A nova invenção evita o uso de transferência nuclear, e as limitações a ela associadas.

As unidades SCNT exibem defeitos na regulação da metilação do DNA, que incluem deficiências na desmetilação global, o que contribui para uma reprogramação ineficiente da célula. A presente invenção supera esse problema específico.

5 A presente invenção também irá permitir e melhorar a eficiência da SCNT com relação a produção de animais em perigo, gado de valor adicionado e derivação de células ES através de processos de melhoria da diferenciação (desmetilação global) necessários depois da reconstrução.

10 A invenção também irá permitir o desenvolvimento de novas terapêuticas com base em células que superam os problemas críticos de rejeição por imunidade e fonte limitada de material associada com o uso de células-tronco embrionárias. Por permitir o uso das células somáticas do próprio paciente para a "dediferenciação" e rediferenciação em novos tipos de células, a invenção irá prover uma fonte de células compatíveis com a imunidade, a partir de uma ampla variedade de tipos iniciais de células.

15 Além do mais, o campo da pesquisa de células-tronco é altamente limitado no tempo atual pelas culturas de células e meios não adequados para a manutenção de células em estados dediferenciados, ou para direcionar células para serem diferenciadas ao longo de linhagens específicas. Os trajetos, proteínas, e moléculas relacionadas associadas com a nova invenção irão permitir o desenvolvimento de novas culturas e meios que irão superar essas limitações. Similarmente, a presente invenção irá prover novos marcadores de diferenciação e de rediferenciação, e a capacidade para produzir novas linhas de células diferenciadas que irão acelerar a descoberta de fármacos pela provisão e aperfeiçoamento de novas abordagens para escolha de fármacos candidatos na medicina regenerativa.

25 O campo da terapêutica com base em células é altamente limitado nos tempos atuais devido as fontes limitadas de material de partida e métodos dispendiosos de isolamento e expansão sob as normas GMP/GML. Por exemplo, no caso de novas aplicações da terapia com células que envolvem o transplante de células de ilhota para a produção de insulina em pacientes diabéticos, os métodos atuais exigem pelo menos dois cadáveres

de doadores para prover células suficientes para somente um paciente. A presente invenção está direcionada a superação dessas dificuldades através do aumento significativo da quantidade de material de partida e produto desejado a ser usado. Além do mais, essas células contêm um risco inerente da indução de rejeição por imunização adversa no recebedor. A presente invenção é direcionada a superar este problema através do oferecimento da oportunidade de utilizar as próprias células de um paciente como a fonte do material de partida.

A presente invenção está direcionada à métodos que podem acelerar o progresso da reprogramação através da regulação da metilação do DNA. Os métodos direcionados a alteração da expressão e/ou da atividade das metiltransferases do DNA podem ter efeitos significativos no aumento da eficiência da reprogramação através da alteração da proporção SAM:SAH. Uma abordagem é a de alterar a regulação do metabolismo do grupo metila por alterar especificamente a expressão de enzimas-chave com a utilização de compostos tais como o ácido retinóico (RA) e de retinóides, A administração de ATRA e de outros compostos retinóides induz e ativa a GNMT, comprometendo as reações de transmetilação dependentes da SAM, incluindo a metilação do DNA resultando na hipometilação do DNA genômico. Outros têm usado inibidores da metilação tais como a 5-azacitidina e 5-aza-2'-doxicitidina para a redução dos níveis de metilação do DNA e prover efeitos antitumor [82].

Outro método é o de expressar em excesso uma demetilase em células somáticas em cultura. Até agora, uma demetilase ativa não foi ainda validada.

As vantagens-chave da presente invenção sobre os métodos anteriores incluem:

a invenção não envolve a utilização de transferência nuclear, evitando dessa forma o alto nível de ineficiência na reprogramação nuclear e no desenvolvimento real da célula;

a invenção não se apóia sobre a utilização de células-tronco embrionárias como os materiais de partida para a diferenciação de células.

Desse modo, ela supera uma barreira crítica de limitação na disponibilidade do material de partida;

5 a invenção pode ser usada para melhorar os sistemas de cultura de células-tronco embrionárias e adultas para minimizar a diferenciação espontânea;

a invenção não se apóia sobre células-tronco embrionárias ou outros materiais estranhos para o desenvolvimento de novas terapias regenerativas com células, e desse modo minimiza o potencial com relação a rejeição por imunização pelo paciente;

10 a invenção explora os processos metabólicos naturais através de uma abordagem nutricional simples, reduzindo desse modo o número de fatores de complicação que podem contribuir para falhas, tais como os efeitos citotóxicos induzidos através de compostos tais como a 5'-azacitidina e azacitidina (também conhecidas como Aza C e fabricada sob a marca comercial de VIDAZA pela Pharmion of Boulder, CO), ou necessitando de uma
15 alteração genética tal como a expressão em excesso de uma demetilase ativa com a utilização de um sistema transgene.

A invenção pode ser usada para melhorar a SCNT.

20 A invenção pode ser usada para melhorar de forma mais efetiva a derivação das células ES a partir de embriões gerados pela SCNT (unidades).

Os objetivos e as vantagens da invenção irão aparecer mais totalmente a partir da descrição detalhada que se segue das modalidades de preferência da invenção feitas em conjunto com os desenhos que a acompanham.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DOS DESENHOS

A figura 1 é um gráfico que representa os níveis relativos da metilação da citosina em células somáticas bovinas doadoras em transferência nuclear em série depois do crescimento da confluência só no meio de crescimento (COM), meio de crescimento tratado com DMSA (DMSO), e meio de
30 crescimento tratado com ácido todo trans-retinóico (ATRA). Ver o Exemplo 1.

A figura 2 é um gráfico ilustrando o nível de expressão do gene GNMT (como medido por PCR em tempo real) em células somáticas bovinas

doadoras em transferência nuclear em série depois do crescimento da confluência só no meio de crescimento (COM), meio de crescimento tratado com DMSA (DMSO), e meio de crescimento tratado com ácido todo trans-retinóico (ATRA). Ver o Exemplo 1.

5 As figuras 3A e 3B são fotografias ilustrando células bovinas tratadas como descrito no Exemplo 2. A figura 3A mostra a célula depois do tratamento com ATRA. A figura 3B mostra as células depois da marcação positiva com oil-red-O (um marcador comum para lipídios) em seguida ao tratamento com ATRA. Ver o Exemplo 2.

10 As figuras 4A e 4B são fotografias que mostram células 3T3 L1 murinas tratadas com ATRA seguida pelo meio de indução osteogênico. Como descrito no Exemplo 4. A figura 4A mostra células que testaram como positivas com relação a células do tipo de osteoblasto com marcação de fosfatase alcalina. A figura 4B mostra células que exibem mineralização do fosfato de cálcio com marcação por alizarina.

15 A figura 5 é uma fotografia de um gel ilustrando a expressão de gene (através de RT-PCR) para osteocalcina e cbfa1, marcadores específicos para osteoblasto, em células 3T3 L1 murinas tratadas com ATRA seguida pelo meio de indução osteogênica. Ver o exemplo 4.

20 As figuras 6A e 6B são fotografias de géis ilustrando a derrubada de gene Dnmt1 pelo siRNA, como descrito no Exemplo 5. A figura 6A mostra a derrubada específica de lamin com a utilização de um siRNA de lamin.

25 A figura 6C é uma fotografia de um gel mostrando que a derrubada do Dnmt1 como mostrada na Fog, 6A persistiu através de pelo menos dois estágios de célula. Ver o Exemplo 5.

30 As figuras 7A e 7B são gráficos que ilustram os efeitos da transfecção por siRNA de metiltransferase 3b do DNA na metilação de células somáticas murinas NIH3T3, como descrita no Exemplo 5.1. A figura 7A mostra os resultados do PCR em tempo real exibindo uma redução de 79% nos níveis de Dnmt 3b no mRNA quando comparados com os controles. A figura 7B representa os resultados de HPLC exibindo uma redução relativa de 52% em citosina metilada nas células.

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A não ser que descritas aqui, neste pedido de patente de outra forma, as definições e as abreviaturas que se seguem serão aplicada durante toda esta descrição:

5 ATRA significa ácido todo trans-retinóico.

Sbs significa cistaciona-beta-sintase

Reprogramação de célula significa o processo através do qual uma células terminalmente diferenciada pode ser restaurada para um estado no qual ela tem o potencial de se diferencias dentro de um novo tipo de célula.

10 Meio de Cultura ou Meio de Crescimento significam um meio adequado capaz de sustentar o desenvolvimento de células.

Meio de Cultura de Desmetilação ou Meio de Crescimento de Desmetilação significam um meio adequado capaz de sustentar o desenvolvimento de células de uma maneira que induza a desmetilação do DNA.

15 Diferenciação significa o processo através do qual a célula se torna estruturalmente e funcionalmente especializada durante o desenvolvimento embriônico.

DMSO significa sulfóxido de dimetila

DNA significa ácido desoxirribonucléico.

20 Metilação do DNA significa a ligação de um grupo metila (um grupo a-CH₃) a uma citosina (uma das bases nitrogenosas encontradas no DNA) em DNA eucariótico. Isso é feito rotineiramente, como uma maneira de auto proteção do DNA contra enzimas e produtos químicos produzidos para a destruição de DNA estranho, e como uma maneira de regular a transcrição de genes no DNA.

DNMT significa metiltransferase do DNA.

30 Epigenéticos se refere ao estado do DNA com relação a mudanças que podem ser herdadas em função sem uma mudança na seqüência do nucleotídeo. As mudanças epigenéticas pode ser ocasionadas através da modificação do DNA, tal como pela metilação e desmetilação, sem qualquer mudança na seqüência do nucleotídeo do DNA.

FRET significa transferência de energia por ressonância de fluo-

rescência.

GAPDH significa gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

GNMT significa glicina-N-metil transferase

H3K4me significa a metilação da histona H3 em Lys4.

- 5 H3K9me2/3 significa a di/trimetilação de resíduos específicos de lisina tais como a lisina 9 na histona H3.

Histona significa uma classe de moléculas de proteína encontradas nos cromossomos responsáveis pela compactação do DNA de tal forma que ele possa se ajustar dentro de um núcleo. As procarióticas não tem histonas, o DNA do gênero *Thermoplasma* (um membro do domínio Archaea sem parede de célula) é envolvido por uma proteína de ligação com o DNA altamente básica que se parece fortemente com a histona eucariótica.

IBMX significa isobutilmetilxantina.

ICM significa massa interna da célula.

- 15 "Knock down" (derrubada) significa suprimir a expressão de um gene de uma maneira específica para o gene. Uma célula que tem um ou mais genes derrubados, é referida como um organismo "knock down" ou simplesmente "knock down".

MDS significa síndrome mielodisplásica.

- 20 MTHFR significa 5,10-metilenotetraidrofolato redutase.

Oócito significa uma célula reprodutiva feminina em desenvolvimento que se divide através de meiose em quatro células haplóides, formando um óvulo que pode ser fertilizado por uma célula de esperma.

- 25 Pluripotente significa meios capazes de diferenciação dentro de tipos de células de 3 camadas de germes ou de tipos de tecidos primários.

RA significa ácido retinóico.

- 30 Reprogramando significa a remoção das marcas epigenéticas no núcleo, seguida pelo estabelecimento de um conjunto diferente de marcas epigenéticas. Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, células e tecidos diferentes adquirem programas diferentes de expressão de genes. Esse padrão distinto de expressão de gene parece ser regulado substancialmente por modificações epigenéticas tais como a metilação do

DNA, modificações na histona e outras proteínas de ligação com a cromatina [22,23]. Desse modo cada tipo de célula no interior de um organismo multicelular tem uma assinatura epigenética única que é convencionalmente considerada como se tornando “fixa” e imutável uma vez que as células se diferenciam ou saiam do ciclo da célula. No entanto, algumas células são submetidas a mais “reprogramação” epigenética durante o desenvolvimento normal ou em determinadas situações de doença.

RNA significa ácido ribonucléico.

RT-PCR significa reação em cadeia de polimerase transcrita reversa.

SAH significa S-adenosilhomocisteína.

SAM significa S-adenosilmetionina.

SCNT significa transferência nuclear de célula somática.

siRNA significa um RNA de pequena interferência, também conhecido como um RNA de interferência curta ou RNA silenciador.

Célula somática significa qualquer uma das células de um organismo que tem diferenciação dentro de tecidos, órgãos, etc. do corpo (como o oposto a célula de germe - qualquer das diversas células, especialmente uma célula de ovo ou esperma, a partir da qual um novo organismo pode se desenvolver).

TE significa trofoectoderma.

Totipotente significa capaz de se desenvolver em um embrião completo ou órgão.

TZD significa Tiazolidinediona.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção envolve a indução da desmetilação de células-tronco de um paciente adulto ou de células somáticas totalmente diferenciadas de uma maneira que restaure o potencial de diferenciação e que possa ser usada como uma fonte “autóloga” de células terapêuticas; ou usando as células desmetiladas para aumentar a eficácia da SCNT e gerais de forma mais eficiente células ES específicas para o paciente para serem usadas para finalidades terapêuticas.

A presente invenção está especificamente direcionada a linhas de células especializadas e a uma cultura de células especializada. Os métodos para serem alcançados ambos os objetivos são importantes com relação a invenção. No seu sentido básico, os métodos envolvem as etapas de desmetilação de produz linhas de células reprogramadas. Os fatores que permitem a desmetilação estão incluídos no meio de cultura da célula, que é usado para a produção de células que pode ser diferenciadas em novos tipos de células.

A presente invenção é direcionada a um meio de cultura de células ao qual ATRA e/ou siRNA pode ser adicionado, ou os componentes ajustados de suficientemente, para a redução dos níveis de metilação do DNA em um tal grau de modo a restaurar a diferenciação e/ou o potencial de desenvolvimento tanto pela indução com fatores de diferenciação específicos tais como, porém não limitados a citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição e/ou utilizando as células desmetiladas para SCNT.

A invenção está direcionada a produção *in vitro* de células reprogramadas que tenham potencial de diferenciação (totipotencial, pluripotencial, multipotencial) restaurado através da desmetilação do genoma. As modalidades incluem:

- 20 (a) tratando com ATRA, siRNA, e/ou moléculas similares ou relacionadas;
- (b) derrubando as metiltransferases 1, 3a e/ou 3b do DNA com a utilização de tecnologia interferente de RNA, anti-sentido, ou outro mecanismo para a inibição;
- 25 (c) derrubando MTHFE e/ou Cbs com a utilização de tecnologia de RNA de interferência;
- (d) aumentando a transcrição, expressão de proteína e atividade da GNMT;
- (e) aumentando os níveis de homocisteína *in vivo*;
- 30 (f) aumentando os níveis de SAM;
- (g) diminuindo os níveis de SAH;
- (h) diminuindo os níveis de doadores de metila tais como, porém

não limitados a, folato, metionina, colina, vitamina B6 e B12;

(i) usando as células para o aumento de SNCT; e

(j) usando as células para a derivação mais efetiva das células ES a partir das unidades de SCNT reconstruídas (embriões).

5 Célula: para as finalidades da presente invenção, o termo "célula" ou "células" a não ser que especificamente limitado ao contrário, inclui qualquer célula somática, célula-tronco embrionária (ES), células-tronco adultas, unidades de transferência nuclear (NT), e células do tipo de tronco. Uma fonte promissora de órgãos e de tecidos para transplantes está no desenvolvimento da tecnologia das células-tronco. Teoricamente, as células-tronco podem ser submetidas a divisão de célula auto-renovatória para dar lugar à filhas idênticas fenotipicamente e genotipicamente em um tempo indefinido e por último podem se diferenciar em pelo menos um tipo final de célula. Através da geração de tecidos ou órgãos a partir de uma célula do próprio paciente, os tecidos para transplante podem ser gerados para prover as vantagens associadas com o xenotransplante, sem os riscos associados de infecção ou de rejeição de tecido.

10 As células-tronco também proporcionam uma promessa para o aumento do resultado da terapia de gene. Uma célula-tronco do próprio paciente pode ser geneticamente alterada *in vitro*, em seguida reintroduzida *in vivo* para a produção do produto de gene desejado. Essas células-tronco alteradas de forma genética poderão ter o potencial de serem induzidas a se diferenciarem para formar uma pluralidade de tipos de células para serem implantadas em locais específicos no corpo, ou para a aplicação sistêmica. Alternativamente, as células-tronco heterólogas poderão ser geneticamente alteradas para expressar o complexo de antígeno principal de histocompatibilidade (MHCC) do receptor, ou não MHC, para permitir o transplante daquelas células a partir do doador para o receptor sem o risco associado de rejeição.

25 As células-tronco são definidas como possuindo um extenso e indefinido potencial de proliferação que se diferencia em diversas linhas de células, e que podem repovoar tecidos quando dos transplantes. A quintessência das células-tronco é a célula-tronco embrionária (ES) na medida em

que ela tem uma auto-renovação ilimitada e um potencial de diferenciação pluripotencial. Essas células são derivadas a partir da massa interna da célula do blastocisto, ou pode ser derivada a partir das células do germe primordial a partir da pós-implantação do embrião (células de germe embrionárias ou células EG). As células ES e EG tem sido derivadas a partir de camundongo e mais recentemente também de primatas não-humanos e de seres humanos. Quando introduzidas dentro de blastócistos de camundongo ou blastocistos de outros animais, as células ES podem contribuir para todos os tecidos do camundongo (animal). Quando transplantadas em animais pós-natais, as células ES e EG geram o tetratoma, o que de novo demonstra a pluripotência das mesmas. As células ES e EG podem ser identificadas através de marcação positiva com os anticorpos SSEA1 e SSEA4.

No nível molecular as células ES e EG expressam uma quantidade de fatores de transcrição altamente específicos para essas células não-diferenciadas. Esses fatores incluem OCT-4 e Rex-1. Também são encontrados o LIF-2 e os fatores de transcrição Sox-2 e Rox-1, embora esses dois últimos sejam expressos em células que não as ES. O Oct-4 é um fator de transcrição expresso na pré-gastrulação do embrião, embrião no estado de clivagem prematura, células da massa interna de células do blastocisto, e em células(EC) de carcinoma do embrião. O Oct-4 é regulado para baixo quando as células são induzidas para se diferenciarem *in vitro* e no animal adulto o oct-4 é somente encontrado nas células do germe. Vários estudos têm mostrado que o OCT-4 é necessário para a manutenção do fenótipo não diferenciado das células ES, e tem um papel principal na determinação das etapas iniciais na embriogênese e diferenciação. O Oct-4, em combinação com o Rox-1, ocasiona a ativação da transcrição da proteína Rex-1 do peso do Zn, e também é necessário para a manutenção das ES em um estado diferenciado. Da mesma forma, o Sox-2 é necessário, em conjunto com o Oct-4 para a retenção do estado não diferenciado das células EC/EG e para manter as células ES murinas (e não as humanas). As células primordiais de germe humanas ou murinas exigem a presença de LIF. Outra marca da autenticidade das células ES é a presença de telome-

rare, que proporciona essas células com um potencial de auto-renovação ilimitado *in vitro*.

As células-tronco tem sido identificadas em muitos órgãos e tecidos. É melhor caracterizada é a célula-tronco hematopoiética. Esta é uma
5 célula derivada do mesoderma que tem sido purificada com base nos marcadores da superfície da célula e características funcionais. A célula-tronco hematopoiética, isolada da medula óssea, sangue, cordão umbilical, fígado fetal e saco da gema, é a célula progenitora que reinicia a hematopoiese a partir da vida de um receptor e gera múltiplas linhagens hematopoiéticas
10 [93 a 100]. Quando transplantada em animais ou seres humanos letalmente irradiados, as células-tronco hematopoiéticas podem repovoar o conjunto de células eritroide, neutrófilo-macrófago, megacariócica e linfóide hemopoiética. *In vitro*, as células-tronco hemopoiéticas podem ser induzidas para serem submetidas a pelo menos divisões de célula de auto-renovação e pode
15 ser induzida a se diferenciar nas mesmas linhagens como observadas *in vivo*. Por esse motivo, esta célula preenche os critérios de uma célula-tronco. As células-tronco que se diferenciam somente para a formação de células da linhagem hematopoiética, no entanto, são incapazes de prover uma fonte de células para o reparo de outros tecidos danificados, por exem-
20 plo, coração ou pulmão danificados através de altas doses de agentes quimioterapêuticos.

Uma segunda célula-tronco que tem sido estudada extensivamente é a célula-tronco do sistema nervoso [101-103]. As células-tronco do sistema nervoso foram inicialmente identificadas na zona subventricular e no
25 bulbo olfativo do cérebro fetal. Até recentemente, se imaginava que o cérebro adulto já não continha as células com o potencial de célula-tronco. No entanto, diversos estudos em roedores, e mais recentemente também em primatas não-humanos, mostraram que as células-tronco continuam a estar presentes no cérebro adulto. Essas células-tronco podem proliferar *in vivo* e
30 regenerar continuamente pelo menos algumas células neurônicas *in vivo*. Quando cultivadas *ex vivo*, as células-tronco neurônicas podem ser induzidas a proliferar, com como a de diferenciar em tipos diferentes de neurônios e células

“gliais”. Quando transplantadas para dentro do cérebro, as células-tronco neurônias podem se enxertar e gerar células neurônicas e células gliais. Por esse motivo, esta célula preenche a definição de uma célula-tronco.

Uma terceira célula específica de tecido que tem sido denominada como uma célula-tronco é a célula-tronco mesenquimal (MSC) inicialmente descrita por Friedenshtein [104]. As células-tronco mesenquimais, originariamente derivadas do mesoderma embrionário e isoladas a partir da medula óssea adulta, podem se diferenciar para a formação de músculo, osso, cartilagem, gordura, estroma da medula, e tendão. Durante a embriogênese, o mesoderma se desenvolve em mesoderma “lim-bud”, tecido que gera osso, cartilagem, gordura, músculos esqueléticos e possivelmente o endotélio. O mesoderma também se diferencia para o mesoderma visceral, que pode dar lugar ao aparecimento do músculo cardíaco, musculatura lisa, e ilhotas do sangue que consiste em endotélio e células progenitoras hematopoiéticas.

As células-tronco mesodérmicas e mesenquimais primitivas, por esse motivo, podem prover uma fonte para uma quantidade de tipos de células e tecidos. Uma quantidade de células-tronco do mesênquima tem sido isoladas [105-117]. Entre as muitas células-tronco mesenquimais que tem sido descritas, todas tem demonstrado uma diferenciação limitada para a formação de somente aquelas células diferenciadas consideradas em geral como sendo de origem mesenquimal. Até agora, a célula-tronco mesenquimal mais multipotente reportada é a célula isolada por Pittenger, et al. [118], que expressa o fenótipo SH2.sup.+ SH4.sup.+ CD29.sup.+ CD44.sup.+ CD71.sup.+ CD90.sup.+ CD106.sup.+ CD120a.sup.+ CD124.sup.+ CD14.sup.- CD34.sup.- CD45.sup.-. Essa célula é capaz de formar uma quantidade de tipos de célula de origem mesenquimal, porém está aparentemente limitada no potencial de diferenciação com relação a células da linhagem mesenquimal, na medida em que a equipe que isolou a mesma observaram que as células hematopoiéticas nunca foram identificadas nas culturas expandidas.

Outras células-tronco têm sido identificadas, incluindo células-

tronco gastrointestinais, e células-tronco hepáticas e células de óvulo no termo [119-121]. A maioria dessas células não é bem-caracterizada.

Comparadas com as células ES, as células-tronco específicas para tecido têm uma capacidade de menos auto-renovação, e embora elas se diferenciem em múltiplas linhagens, elas não são pluripotentes. Nenhum estudo foi direcionado a se as células específicas para tecido expressam os marcadores das células ES descritos acima, o grau de atividade de telomerase em células-tronco específicas para o tecido ainda não foi totalmente explorado, em parte devido a que grandes números de populações altamente enriquecidas dessas células são difíceis de serem obtidas.

Até recentemente, foi imaginado que células-tronco especificam para o órgão poderiam somente se diferenciar em células do mesmo tecido. Uma quantidade de publicações recentes tem sugerido que células-tronco específicas para órgão podem ser capazes de se diferenciar em células de tecidos diferentes. Uma quantidade de estudos mostrou que células transplantadas na ocasião de transplante de medula óssea podem se diferenciar em músculos esqueléticos [122-123]. Isso pode ser considerado dentro do domínio de potencial de diferenciação possível de células do mesênquima que estão presentes na medula. Jackson publicou que células satélites de músculo pode se diferenciar em células hemopoiética, de novo uma mudança de fenótipo dentro do esplâncnico do mesoderma [124]. Outros estudos mostraram que as células-tronco a partir da camada embrionária (por exemplo do esplâncnico do mesoderma) podem se diferenciar em tecidos considerados como sendo derivados durante a embriogênese a partir de uma camada embrionária diferente. Por exemplo, as células endoteliais ou seus precursores detectadas em seres humanos ou em animais que foram submetidos a transplante de medula são em parte derivadas a partir da medula do doador [125-126]. Desse modo, o mesoderma visceral e não o esplâncnico do mesoderma, tal como as progênie derivada de MSC são transferidas com a infusão da medula. Ainda mais surpreendente são os relatos que demonstram ambos em roedores e em seres humanos que as células epiteliais hepáticas e células epiteliais do duto biliar são derivadas a partir da medula

do doador [127-129]. Da mesma forma, três grupos tem demonstrado que as células-tronco neurônicas podem se diferenciar em células hemopoiéticas. Finalmente, Clarke et al., relataram que células-tronco neurônicas injetadas em blastócitos podem contribuir para todos os tecidos do camundongo quimérico [130].

O transplante de tecidos e de órgãos gerados a partir de células-tronco embrionárias heterólogas requerem tanto que as células sejam ainda geneticamente modificadas para a inibição da expressão de determinados marcadores da superfície da célula, como o uso contínuo de supressores de imunização quimioterapêuticos com a finalidade de proteger contra a rejeição do transplante. Desse modo, embora a pesquisa de células-tronco embrionárias proporcione uma solução alternativa promissora para a solução do problema do suprimento limitado de órgãos para transplante, os problemas e os riscos associados com a necessidade de supressão da imunização para sustentar o transplante de células ou tecidos heterólogos poderá permanecer. Um cálculo de 20 linhas imunologicamente diferentes de células-tronco embrionárias seriam necessárias ser estabelecidas com a finalidade de prover células compatíveis com a imunização para terapias direcionadas a maioria da população [132].

Utilizando células a partir do indivíduo desenvolvido, em vez de um embrião, como uma fonte de células-tronco autólogas ou alogênicas poderá ser superado o problema de incompatibilidade do tecido associado com o uso de células-tronco embrionárias transplantadas, bem como resolver o dilema ético associado com a pesquisa de células-tronco embrionárias. A maior desvantagem associada com o uso de células-tronco autólogas com relação ao transplante de tecidos até agora fica no limitado potencial de diferenciação das mesmas. Uma quantidade de células-tronco tem sido isoladas a partir de organismos totalmente desenvolvidos, especificamente seres humanos, porém essas células, embora relatadas como sendo multipotentes, tem demonstrado um potencial limitado para se diferenciar em múltiplos tipos de células.

Muito embora células-tronco com potencial múltiplo de diferenci-

ação tenham sido isoladas anteriormente por outros, uma célula desmetilada com o potencial de se diferenciar em uma ampla variedade de tipos de células de linhagens diferentes, incluindo fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, adipócitos, músculo esqueléticos, endotélio, estroma, músculo liso, músculo cardíaco, células neurais e células hemopoiéticas, ainda não foi descrita. Se o transplante de células e de tecido e a terapia de genes irão prover os avanços terapêuticos esperados, uma célula desmetilada com potencial de diferenciação e/ou de desenvolvimento expandido é necessária, tanto como uma fonte de células terapêuticas específicas para o paciente, ou como uma célula doadora mais eficiente para SCNT, ou como o objeto para a varredura de fatores de diferenciação ou compostos que possam ser usados para auxiliar na indução da diferenciação ao longo de linhagens específicas.

Meio de Cultura de Célula: A presente invenção utiliza meios de cultura de células, fatores de crescimento, e métodos para a indução da desmetilação do DNA de células e culturas de crescimento e de manutenção de células desmetiladas. Os meios proporcionam o crescimento e a manutenção de células e podem ser usados para a triagem com relação a fatores adicionais e combinações úteis de fatores. A capacidade de cultivar células em um estado substancialmente não diferenciado com a utilização de meios de cultura de células, fatores de crescimento e os métodos providos aqui, neste pedido de patente, proporcionam importantes vantagens incluindo a capacidade da produção de linhas de células que tenham modificações genéticas múltiplas (como na aplicação de terapia de genes), com aplicações terapêuticas importantes.

O meio de cultura de células pode incluir um meio de crescimento que é eficaz para sustentar o crescimento de células desmetiladas; um soro nutriente eficaz para sustentar o crescimento de células desmetiladas; aminoácidos não-essenciais e essenciais, e um sal de piruvato. Opcionalmente, os meios de cultura de células podem incluir um agente de redução.

Outro exemplo não-limitativo de um meio de cultura adequado útil na prática da presente invenção inclui uma variedade de meios de crescimento preparados com uma base de meios mínimos essenciais de Dul-

belcco (DMEM). O DMEM pode ser suplementado com uma variedade de suplementos incluindo o soro fetal bovino, glutamina e/ou piruvato de sódio. De preferência, o DNEM inclui 15% de soro fetal de novilho, 2 mM de glutamina e 1 mM de piruvato de sódio.

5 Outro exemplo de um meio de cultura adequado é o meio de fluido tubário humano modificado isento de glicose e de fosfato (HTF) suplementado com 15% de soro fetal de novilho, 0,2 mM de glutamina, 0,5 mM de taurina, e 0,01 mM de cada um dos aminoácidos seguintes: asparagina, glicina, ácido glutâmico, cisteína, lisina, prolina, serina, histidina e ácido aspártico.

10 Fator de Crescimento: O meio de crescimento pode incluir qualquer soro ou solução com base em soro que supra nutrientes eficazes para a manutenção do crescimento e viabilidade das células desmetiladas. Os exemplos de tais soros incluem, sem limitação, soro fetal bovino (FBS) e soro fetal de novilho (FCS). Por exemplo, o FBS pode ser provido em uma
15 concentração de entre cerca de 1% e cerca de 25%. De forma específica, o FBS pode ser provido em uma concentração de entre cerca de 2,5% e cerca de 20%. Em uma modalidade, as células desmetiladas são cultivadas em 10% de FBS.

20 Um fator de crescimento também pode ser provido para auxiliar na derivação e na manutenção da cultura de células desmetiladas em um estado substancialmente não diferenciado. As identidades e as concentrações efetivas de tais fatores de crescimento podem ser determinadas com a utilização de métodos como os descritos aqui, neste pedido de patente ou com a utilização de técnicas conhecidas daquelas pessoas versadas na técnica de cultura de células. Por exemplo, um ou mais dos fatores que se se-
25 guem podem ser usados na concentração final determinada: forskolin ([3R-(3 α , 4 α β , 5B, 6B, 6a α ., 10 α ., 10a β , 10 α)]-5-(acetilóxi)-3-etenildodecaídrido-6, 10, 10b-triidroxi-3, 4a, 7, 7, 10a-pentametil-1H-nafto[2,1-b]piran-1-one) a 10 μ M, toxina da colera à 10 μ M, isobutilmetilxantina (IBMX) à 0,1 mM, mono-
30 fosfato cíclico de dibutirladenosina (dbcAMP) à 1 mM. Em outra modalidade, o fator de crescimento é o fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), mais especificamente o fator de crescimento básico de fibroblasto recombi-

nante humano (bFGF), na faixa de cerca de 1 a 10 ng/ml.

Outro fator é os meios de crescimento colhidos a partir de culturas de células de carcinoma embrionário humano (EC). Em um exemplo específico, as células EC NTERA-2 humanas (número de acesso ATCC CRL 5 1973) são cultivadas até a confluência em DMEM suplementado com 10% de soro fetal de novilho ou células ES de camundongo cultivadas até a confluência em DMEM suplementado com 15% de soro fetal de novilho, 2 mM de glutamina, 1000 U/ml de FIF. O meio de crescimento é colhido diariamente durante vários dias, passado através de um filtro de 0,22 microm e conge- 10 lado a -80°C. Esse meio condicionado” de EC humano ou de EC de camundongo é adicionado ao meio de crescimento desmetilado em quantidades determinadas de forma empírica, como julgadas através do efeito sobre o crescimento e a viabilidade de células desmetiladas.

Em outra modalidade, o meio de crescimento inclui ligantes para 15 receptores que ativam o sinal de transdução gp 130, tanto pela ligação a um receptor que se associa com o gp 130 ou que se liga diretamente a, e ativando o gp 130. Por exemplo, o fator de inibição da leucemia humana (LIF) a cerca de 1000 U/ml até 2000 U/ml ou o oncostatina-M à 10 U/ml, podem ser usados.

20 Antibióticos de Cultura de Tecido: Tipicamente, o meio de germe embrionário (EG), também contém antibióticos de cultura de tecido comumente usados, tais como a penicilina e estreptomicina. Uma quantidade efetiva dos fatores é então adicionada diariamente a cada uma dessas soluções de base para a preparação de meios de crescimento de EG humano da presente invenção. A expressão “quantidade efetiva” significa a quantidade 25 de tal fator descrito de modo a permitir um efeito benéfico sobre o crescimento e a viabilidade EG humano de células EG humanas com a utilização do julgamento comum aquelas pessoas de habilitação na técnica de cultura de células e através das informações supridas aqui, neste pedido de patente.

30 Tipicamente, o meio de cultura de desmetilação também contém antibióticos de cultura de tecido comumente usados, tais como a penicilina e estreptomicina. Uma quantidade efetiva dos fatores é então adicionada dia-

riamente a cada uma dessas soluções de base para a preparação de meios de crescimento de desmetilação da presente invenção. A expressão "quantidade efetiva" significa a quantidade de tal fator descrito de modo a permitir um efeito benéfico sobre o crescimento e a viabilidade EG humano de células EG humanas com a utilização do julgamento comum aquelas pessoas versadas na técnica de cultura de células e através das informações supridas aqui neste pedido de patente.

Faixas: A Tabela 1 proporciona as faixas som relação aos ingredientes úteis no meio de cultura de células da presente invenção.

10

Tabela 1

Meio	Mais preferência	Preferência	Aceitável
Faixa trabalho pH	7,0 - 7,4	7,0 - 7,4	7,0 - 7,4
Componente	mg/l	mg/l	mg/l
CaCl (anidr,)	200,00	50-350	1-500
15 Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,10	0,01-0,2	0,001-1,0
KCl	400,00	100-600	1-1000
MgSO ₄ (anidr,)	97,67	10-250	1-500
NaCl	6400,00	5000-8000	1000-10000
NaHCO ₃	3700,00	2000-6000	500-10000
20 NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125,00	50-250	1-500
D-Glicose	1000,00	1000-5000	1-10000
Fenol Red	15,00	15,00	15,00
Piruvato de sódio	110,00	10-200—	1-1000
L-Arginina-HCl	84,00	50-150	10-500
25 L-Glutamina	584,00	300-600	100-900
Glicina	30,00	10-60	1-100
L-Histadina-HCl-H ₂ O	42,00	10-100	1-1000
L-Isoleucin	105,00	10-250	1-500
L-Leucina	105,00	10-250	1-500
30 L-Lisina-HCl	146,00	10-250	1-500
L-Metionina	30,00	10-100	1-500
L-Fenilalanina	66,00	10-100	1-500

	L-Serina	42,00	10-100	1-500
	L-Treonina	95,00	50-250	1-500
	L-Triptofano	16,00	5-50	1-100
	L-Tirosina-2Na-2H ₂ O	104,00	10-500	1-900
5	L-Valina	94,00	50-150	10-500
	D-Ca pantotenato	4,00	1-10	0,1-50
	Cloreto de cloro	4,00	1-10	0,1-50
	Ácido fólico	4,00	1-10	0,1-50
	i-Inositol	7,20	1-10	0,1-50
10	Niacinamida	4,00	1-10	0,1-50
	Piridoxal-HCl	4,00	1-10	0,1-50
	Riboflavina	0,40	1-10	0,1-50
	Tiamina-HCl	4,00	1-10	0,1-50

15 Como um exemplo de um meio de cultura de células que pode ser usado na presente invenção é o alfa-MEM ((Chemicon International, Tecmecla CA) como descrito na Tabela 2 que se segue:

Tabela 2

Faixa de trabalho pH	7,0 - 7,4
Componente	mg/ml
Sais inorgânicos	
CaCl ₂ (anidro)	---
KCl	400,00
KH ₂ PO ₄	---
MgCl ₂ (anidro)	94,70
MgSO ₄ (anidro)	---
NaCl	6500,00
NaHCO ₃	2000,00
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	1154,00
NaH ₂ PO ₄ (anidro)	---
Outros componentes	
D-Glicose	2000,00
HEPES	---
Ácido lipóico	---
Fenol Red	10,00
Piruvato de sódio	---
Aminoácidos	
L-alanina	---

L-arginina- HCl	126,00
L-asparagina- H ₂ O	---
L-Ácido aspártico	---
L-Cistina- H ₂ O	32,40
L-Cistina- HCl- H ₂ O	---
L-Ácido glutâmico	---
L-Glutamina	292,00
Glicina	---
L-Histidina	32,00
L-Histidina - HCL - H ₂ O	42,00
L-Isoleucina	52,00
L-Leucina	52,00
L-Lisina	58,00
L-Lisina - HCl	---
L-Metionina	15,00
L-Fenilalanina	32,00
L-Prolina	---
L-Serina	---
L-Treonina	48,00
L-Triptofano	10,00
L-Tirosina-2-Na-2H ₂ O	52,00
L-Valina	46,00
Vitaminas	
L-Ácido ascórbico	---
Biotina	---
D-Ca pantotenato	1,00
Cloreto de cloro	1,00
Ácido fólico	1,00
I-inositol	2,00
Niacinamida	1,00
Piridoxal HCl	1,00
Riboflavina	0,10
Tiamina - HCl	1,00
Vitamina B12	---
Desoxirribonucleosídeos	
2' desoxiadenosina	---
2' desoxitidina - HCl	---
2' desoxiguanosina	---
Timidina	---
Ribonucleosídeos	
Adenosina	---
Citidina	---
Guanosina	---
Uridina	---

TECNICAS GERAIS PARA CULTURA

Os métodos gerais para a genética molecular e para a engenharia genética estão descritos nas edições atuais de Sambrook et al. [84], Miller & Calos eds. [85], e F. M. Ausubel et al. eds. [86]. Biologia da célula, química das proteínas e técnicas de anticorpos podem ser encontradas em J. E. Colligan et al. eds. [87], J. S. Bonifacino et al., [88], and J. E. Colligan et al. eds. [89]. Reagentes, vetores para clonagem, e kits para manipulação genética referidos aqui nesta descrição estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais tais como Gibco/BRL (Gaithersburg, MD), Nalgene-Nunc International (Rochester, NY), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), Hyclone (Logan, UT), Chemicon International (Temecula, CA) e ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA).

Os métodos de cultura celular são geralmente descritos em Freshney ed.. [90], N.A. Harison & I.F. Ral [91], e K. Turksen ed. [92]. Culturas celulares que suprem e reagem estão disponíveis em comerciantes tais como Gibco/BRL (Gaithersburg, MD), Nalgene-Nunc International (Rochester, NY), sigma Chemical CO. (ST. Louis, MO), Hyclone (Logan, UT), Chemicon Internacional (Temecula, CA) e ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA).

As células desmetiladas podem ser cultivadas no placa além das células alimentadoras. De forma alternativa, as células alimentadoras podem ser primeiro cultivadas até a confluência e em seguida inativadas de forma mitiótica (como por exemplo, por irradiação) para impedir o crescimento adicional. Alternativamente, as células desmetiladas podem ser cultivadas sem a camada de células alimentadoras. Essa abordagem tem a vantagem de simplificar o gerenciamento da cultura de células na medida em que o crescimento de somente um conjunto de células, as células desmetiladas, necessita ser monitorado.

Cultivando as Células Desmetiladas Estabelecidas: Uma vez estabelecidas, as células desmetiladas podem ser cultivadas sob o meio condicionado acima descritas com a utilização de uma variedade de técnicas. Em um exemplo, um recipiente mantém células alimentadoras em um meio não condicionado. Uma matriz de células de alimentação lisadas é

preparada com a utilização de métodos padronizados. As células desmetiladas a serem cultivadas são em seguida adicionadas por cima da matriz em conjunto com o meio condicionado. Alternativamente, as células desmetiladas podem ser cultivadas sobre células alimentadoras vivas com a utilização de métodos conhecidos na técnica. O cultivo das células desmetiladas é em seguida monitorado para a determinação do grau no qual as células cultivadas se tornaram diferenciadas. Um marcador para a fosfatase alcalina pode ser usado para confirmar quais as células que foram diferenciadas. Quando uma quantidade suficiente de células tenham sido diferenciadas, ou quando a cultura cresceu até a confluência, pelo menos uma parte das células não-diferenciadas pode ser passada para a determinação para a passagem das células e as técnicas para conseguir essa passagem podem ser realizadas com a utilização de técnicas padronizadas bem conhecidas na técnica.

Diferenciando células Somáticas na Cultura: As células são cultivadas em meio de crescimento projetado de encomenda deficiente em um ou mais doadores de metila ou co-enzimas (folato, betaína, colina, Vitamina B6, Vitamina B12 e metionina), ou que contenha quantidades crescentes de homocisteína ou de SAH. As formulações são baseadas nos meios recomendados pela Chemicon International Specialty Media (Phillipsburg, NJ) ou American Type Culture Collection (ATCC).

As deficiências ou os suplementos na fórmula estão mostrados na Tabela 3 como se segue:

Tabela 3

Meio	Mais preferência	De preferência [M]	Aceitável
Folato	0	$0-2,26 \times 10^{-5}$	$0-4,53 \times 10^{-4}$
Betaína	0	$0-8,53 \times 10^{-5}$	$0-1,71 \times 10^{-3}$
Colina	0	$0-3,38 \times 10^{-5}$	$0-6,76 \times 10^{-4}$
Vitamina B ₆	0	$0-8,10 \times 10^{-9}$	$0-1,62 \times 10^{-7}$
Vitamina B ₁₂	0	$0-1,23 \times 10^{-9}$	$2,46 \times 10^{-8}$
Metionina	0	$0-3,35 \times 10^{-4}$	$6,67 \times 10^{-3}$
Homocisteína	0,0005	0,0001-0,001	0,00001-0,002

SAH 0,0005 0,0001-0,001 0,00001-0,002

Como um exemplo, o meio de cultura pode ser suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e 0,1% de fungizona. O soro fetal bovino dialisado (Invitrogen) é adicionado ao meio deficiente de folato para a eliminação do ácido fólico no soro. As células são mantidas a 36°C em 95% de umidade e 5% de CO₂. Os meios são trocados a cada 3 a 4 dias, e as células são passadas a uma confluência de ~ 90% repetidamente durante até 6 semanas. Os pontos finais incluem os níveis de metilação da citosina reduzidos, proporções de SAM:SAH reduzidas, e aumento na expressão de GNMT, abundância de atividade e de proteína.

Para a inibição da atividade de Dnmt e a metilação da citosina, as células são cultivadas no meio que se segue:

(a) meios tratados com siRNA Dnmt 1, 2, 3a e/ou 3b (Dharmacon, Inc.);

(b) meios tratados com RG 108 (Analytical Systems Laboratory, LSU School of Veterinary Medicine);

(c) meios tratados com 5-AzadCyd (Sigma)

Uma descrição resumida da transfecção com siRNA de acordo com o protocolo do fabricante é provida abaixo.

Para estimular a síntese e a atividade da GNMT, as células são cultivadas em meio tratado com ATRA (Sigma). Para proteger o ATRA da exposição à luz, os procedimentos são executados em luz baixa e os frascos de tratamento foram envolvidos em folha de alumínio.

Para a inibição da desacetilação da histona e induzir a desmetilação, as células são cultivadas em meios tratados com TSA e/ou VPA (Sigma). As concentrações de tratamento estão relacionadas, porém não são limitadas as condições ilustradas na Tabela 4 como se segue:

Tabela 4

Meio	Mais preferência	Preferência	Aceitável
		[µM]	
Dnmt siRNA ^a	0,05	0,01-0,1	0,001-0,2
RGI 08 ^b	20	10-100	1-200

AzadCyd ⁰	0,25	0,1-0,5	0,01-1,0
ATRA ^d	0,05	0,01-0,1	0,01- 200
TSA ^e	0,30	0,1-3,0	0,01-300
VPA ^f	20 x 10 ³	1-40 x 10 ³	0,1- 200 x 10 ³

5 ^a Recomendações do fabricante de [100 nM] para 75% de derrubada de gene; 20 a 40% CpG desmetilação de ilha com [40 nM] siRNA Dnmt1 e/ou 3b [133]; 79% de derrubada de gene e ~ 50% de desmetilação genômica global com [200 nM] siRNA Dnmt 3b em estudos preliminares da NuPotential.

^b 20% desmetilação com [100 µM] RGI 08 [134]

10 ^c 40% desmetilação com [0,5 µM] AzadCyd [134].

^d ~ 25% desmetilação com [100 nM] ATRA em nossos estudos preliminares

^e 5% desmetilação com [0,2 µM] TSA [135].

^f 4.8% desmetilação com [20 mM] VPA [135].

15 As células são mantidas à 37°C em 95% de umidade e 5% de CO₂. Os meios são trocados a cada 3 a 4 dias, e as células são passadas a uma confluência de ~ 90% repetidamente durante até 6 semanas; ver os métodos de transfecção de siRNA Dnmt abaixo com relação a exceção. A viabilidade e citotoxicidade e taxas de crescimento são determinadas através da contagem relativa de células. Os pontos finais incluem os níveis de metilação da citosina reduzidos, proporções de SAM:SAH reduzidas, e aumento
20 na expressão de GNMT, abundância de atividade e de proteína e expressão de Dnmt diminuída.

Transfecção de Dnmt com siRNA: À aproximadamente 70 a 80% de confluência, as células são transfectadas em meio de crescimento que
25 contém o reagente de transfecção DharmaFECT (Dharmacon, Inc.), siRNA de Dnmt 1, 2, 3a e/ou 3b (Dharmacon, Inc.), ciclofilina b siRNA (controle positivo de siRNA), ou siRNA de drosófila não objetivado (controle negativo de siRNA); o Dnmt 2 não foi determinado para ser funcional e pode servir como um controle adicional. A transfecção é executada de acordo com o protocolo
30 do fabricante. As células são incubadas em meio de transfecção durante 48 horas. Obedecendo as recomendações do fabricante, se for observada toxicidade nas células depois de 24 horas, o meio de transfecção é substituído com

meio de crescimento e a incubação é continuada durante um adicional de 24 horas; as cavidades que exibem 80% de viabilidade depois de 48 horas de incubação são usadas para diferenciação.

MODALIDADES ALTERNATIVAS

5 A invenção também está direcionada ao desenvolvimento de uma nova análise com base no uso de genes de informação tais como a beta-galactosidase, luciferase, beta glucosidase e outros que proporcionem a capacidade de monitorar o impacto da expressão e/ou atividade da GNMT sobre a desmetilação e a restauração do potencial de diferenciação de células.

10 A invenção também está direcionada ao desenvolvimento de um novo método de SCNT com a utilização de células doadoras "dediferenciadas".

A invenção também está direcionada ao desenvolvimento de um novo método para derivar células-tronco embrionárias a partir de unidades de SCNT reconstruídas (embriões).

15 EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem estão incluídos somente para auxiliar em um entendimento mais completo da presente invenção. Os exemplos não limitam de nenhum modo o escopo da invenção descrita aqui, neste pedido de patente.

20 EXEMPLO 1: Efeitos do RA sobre Metilação de Células Somáticas Bovinas:

Células somáticas bovinas seriais doadoras de transferência nuclear (uma linha de células que nunca produziu com sucesso um animal vivo e que é caracterizada por baixas taxas de desenvolvimento de blastócitos (< 10%, $P < 0,001$) e baixas taxas de iniciação de prenhez (< 1%, $P < 0,05$))
 25 foram cultivadas em frascos T-75 até confluentes em meio de crescimento (COM), ou meio de crescimento tratado com DMSO, ou ATRA (veículo DMSO); foram usadas concentrações de ATRA de 10 nM, 50 nM, e 100 nM. Em seguida ao tratamento com ATRA, as células foram colhidas e o DNA das células foi isolado. O DNA foi em seguida completamente digerido em nucle-
 30 otídeos simples para HPLC de fase reversa. A HPLC de fase reversa foi realizada como descrita por Cezar et al. [76] para a medição dos níveis relativos de resíduos de citosina metilados.

Como ilustrado na figura 1, a HPLC revelou uma redução de 25% na citosina metilada relativa naquelas células cultivadas em meio tratado com 100 nM de ATRA com relação a CON.

5 Aquelas tratadas com DMSO ou de 10 a 50 nM de ATRA exibiram uma redução de 8 a 19% em citosina metilada quando comparada a CON. Esses resultados indicam que o ATRA pode reduzir o estado da metilação, *in vitro*, mesmo em células resistentes a reprogramação, tais como aquelas obtidas através de transferência nuclear serial.

10 Como ilustrado na figura 2, a análise de RT-PCR em tempo real demonstrou a regulação para cima da glicina-N-metil transferase codificando o gene (GNMT), a enzima-chave que regula a proporção SAM:SAH e o potencial de metilação celular. (Os resultados estão mostrados como a proporção de GNMT para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD)). O nível de expressão da GAPD é usado para a normalização da expressão da
15 GNMT com relação a um marcador conhecido. Note que a regulação para cima da GNMT como mostrada na Figura 2 acontece simultaneamente com a metilação decrescida do DNA mostrada na figura 1. Além do mais, a RT-PCR confirmou a regulação para cima e a forte expressão do Oct4, o maior marcador diagnóstico de pluripotência de célula-tronco de mamífero, bem
20 como de Sox2 e nanog (dados não mostrados). Os experimentos RT-PCR foram executados com a utilização de um kit comercialmente disponível e seguindo as instruções do fabricante (TAQMAN-brand RT-PCR assays, Applied Biosystems, Foster City, CA). Outros demonstraram que a desmetilação de Oct4 é uma exigência para a reprogramação eficiente de núcleos somáticos de camundongos [20].
25

Esses dados indicam que a exposição ao ATRA aumenta a expressão da GNMT e provavelmente a atividade da enzima GNMT, resultando da desmetilação global (incluindo a desmetilação do promotor Oct4 e a subsequente expressão). A metilação diminuída do DNA é consistente com a dediferenciação, enquanto que a expressão aumentada do Oct4 seja consistente com a restauração do potencial de diferenciação. Conhece-se até
30 aqui, esta é a primeira demonstração de um marcador de célula-tronco sen-

do induzido em uma célula somática de mamífero através da alteração do metabolismo do carbono único. Os resultados são significativos devido a que eles mostram que uma célula de mamífero pode ser induzida a expressar um marcador normalmente encontrado somente em células-tronco não-diferenciadas, indicando desse modo que a célula pode ser reprogramada para se diferenciar em um tipo de célula separado.

EXEMPLO 2 - Efeitos de RA e do Coquetel de Indução Adipogênica sobre Células Somáticas Bovinas:

Para determinar se o potencial de diferenciação foi restaurado, células somáticas bovinas foram cultivadas em frascos T-75 até a confluência em meio CON, DMSO, ou ATRA (Mesmo RA como no Exemplo 1). Em seguida ao tratamento com o ATRA, as células foram coletadas para o isolamento do RNA ou transferidas para placas de 6 cavidades e cultivadas em um coquetel de indução adipogênica que incluiu DMEM, FBS, insulina, IBMX e dexametasona. O IBMX foi removido e TZD foi adicionado 48 horas mais tarde. As células permaneceram no meio de indução durante de 11 a 12 dias, em seguida ou foram marcadas com óleo red-O (Aldrich, Milwaukee, WI) para verificar a presença de gotículas de lipídio, ou foram coletadas para o isolamento do RNA. O RNA foi transcrito de forma reversa para cDNA para RT-PCR com relação marcadores de células-tronco (Oct 4, Sox2, Nanog, AP) e marcadores adipogênicos (PPAR γ , LPL, FAS) ou usadas diretamente em uma RT-PCR quantitativa de uma etapa em tempo real com relação a GNMT. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi usado como um gene de normalização/ governança.

Como ilustrado na figura 3A, durante a exposição ao ATRA, foram observadas trocas morfológicas significativas, incluindo o desenvolvimento de estruturas que eram similares de forma marcante aos corpos do tipo de embrião. Como ilustrado na figura 3B pela seta, a marcação positiva com o óleo red-O também foi observada depois da indução, indicando a presença de lipídio. As análises de expressão de genes por PCR revelaram a indução do PPAR γ , um marcador de conhecido da diferenciação de adipócitos (dados não mostrados). Esses resultados são significativos devido a que

eles sugerem que as células somáticas podem ser induzidas para se rediferenciarem em outros tipos de células.

EXEMPLO 3 - Efeitos de RA e do Coquetel de Indução Adipogênica sobre Hepatócitos Primários:

5 Os hepatócitos primários de rato foram cultivados em meio tratado com de 50 a 200 nM de STRA. Em seguida ao tratamento, as células foram cultivadas sob as mesmas condições comparativas como as descritas acima com relação as células somáticas bovinas, exceto que um coquetel de indução adipogênica (como descrito no Exemplo 2) foi adicionado aos frascos T-75. As mudanças morfológicas foram observadas durante o tratamento com ATRA, e dentro de 48 horas depois da exposição inicial ao meio de indução, essas mudanças morfológicas foram acompanhadas pelo início do desenvolvimento de corpo esferóide e proliferação separada de células como evidencia da confluência, um estado não alcançado pelas células de controle. Essas observações sugerem que esses hepatócitos primários que são terminalmente diferentes reingressaram no ciclo da célula em seguida ao tratamento com o ATRA e a exposição ao meio de indução adipogênico em cultura e proliferaram de forma significativa em seguida aos tratamentos.

15 EXEMPLO 4 - Efeitos de RA e de Coquetel de Indução Osteogênica sobre Células Somáticas Murinas:

20 Células 3T3 L1 foram cultivadas em meio tratado com de 50 a 200 nM de ATRA. Em seguida ao tratamento com o ATRA, as células foram transferidas para placas de 6 cavidades e expostas ao meio de indução osteogênica que continha DMEM, DFB, 2-fosfato do ácido ascórbico, dexametasona, beta glicerofosfato e Vitamina₂D durante 21 dias. Como ilustrado na figura 4A e na figura 4B, e, seguida a indução osteogênica, a marcação positiva de células do tipo de osteoblasto (figura 4A) e mineralização do fosfato de cálcio (figura 4B) foi observada com a marcação com fosfatase alcalina e alizarina, respectivamente. Como ilustrado na figura 5, a RT-PCR revelou a indução da osteocalcina e cbfa1, marcadores conhecidos de diferenciação específica de osteoblasto.

30 EXEMPLO 5 - Produção de Linhas de Células e Produção de Culturas de

Células que Produzem Células com o Potencial de Diferenciação Restaurado Através da Derrubada das Metiltransferases 1, 3A, e/ou 3B do DNA com a Utilização de Tecnologia de Interferência de RNA:

A derrubada das metiltransferases 1, 3A, e/ou 3B do DNA com a
5 utilização de tecnologia de interferência de RNA resulta em níveis reduzidos de metilação do DNA. Através da modificação do meio de cultura para a incorporação da tecnologia de siRNA, a supressão seletiva da expressão do gene pode ser conseguida. A metodologia para ser alcançado esse impacto - incluindo o meio de fundação, tratamentos específicos e modificação para
10 aquele meio, e métodos para a confirmação do potencial de derrubada estão descritos abaixo.

A alteração do metabolismo de carbono único e/ou a inibição da atividade de DNMT induz a desmetilação global do DNA que pode restaurar o potencial de diferenciação. As linhas de células dediferenciadas capazes
15 de se rediferenciarem em múltiplas linhagens podem ser produzidas através da reprogramação epigênica global. Estudos preliminares projetados para a análise do impacto da derrubada do gene DNMT com a utilização de tecnologia de siRNA sobre a desmetilação global do DNA em uma linha de células doadoras bovinas com relação ao SCNT e uma linha de células de fibroblas-
20 to murino demonstraram como isso é conseguido.

EXEMPLO 5.1 - Efeitos da Transfecção de siRNA sobre a Metiltransferase 1 do DNA sobre a Metilação e Potencial de Desenvolvimento de Células Somaticas Bovinas Doadoras:

Oócitos bovinos aspirados a partir de ovários de abatedouro foram
25 maturados de um dia para o outro em meio de maturação (meio 199, Biowhittaker) suplementado com hormônio luteinizante (10 IU/ml; Sigma), estradiol (1 mg/ml; Sigma), e FBS (10%; Hyclone, Logan, UT) à 38,5°C em um incubador umidificado a 5% de CO₂. A transferência nuclear bovina foi realizada como descrita por Forsberg et al. [131]. Um siRNA para Dnmt1
30 humano usado por Robert et al. [140] foi encomendado da Dharmacon RNA Technologies (Lafayette, CO). A seqüência foi como se segue: AAGCAU-GAGCACCGUUCUCC.dT.dT. (SEQ. ID. NO: 1). Esta foi duplexada e des-

salgada seguindo as instruções do fabricante. A transfecção do siRNA ocorreu de acordo com o protocolo do fabricante da LIPOFECTIN. Em resumo, 2 μ M de siRNA em tampão Universal IX foram misturados com o reagente de transfecção LIPOFECTIN (Invitrogen) com meio de crescimento isento de soro (Opti-MEM; Invitrogen) e Rpbert et al. [140]. Antes da transfecção, o meio de cultura foi removido das células que foram ~ 40 a 60% confluentes e 3ml de solução do reagente de transfecção foram adicionados, com concentrações finais de transfecção de 200 nM de siRNA e 0,6% do reagente de transfecção LIPOFECTIN.

10 As células foram incubadas durante 24 horas à 37°C e lavadas com meio da marca AmnioMax contendo soro (invitrogen). As células foram transfectadas duas vezes antes da análise. As amostras de Controle e de Teste foram geradas ao mesmo tempo e incluem:

1. Células tratadas somente com o meio.
- 15 2. Células tratadas somente com o reagente de transfecção (LIPOFECTIN).
3. Células tratadas com siRNA de controle (Lamin A/C; Dharmacon).
4. Células tratadas com o siRNA de teste (Dnmt1 ; Dharmacon).

20 As figuras e legendas que se seguem resumem esses estudos. A figura 6A e a figura 6B ilustram a derrubada da DNMT1 pelo siRNA. A Dnmt1 foi derrubada de forma eficiente depois do tratamento com o siRNA das células doadoras bovinas para SCNT (figura 6A, faixa D) enquanto a expressão da actina não foi afetada (figura 6A, Faixas G e I). Em contraste, a exposição de lamin ao siRNA derrubou a expressão de lamin (figura 6B, faixa C) porém não da Dnmt1 (figura 6A, faixa C). A análise através de H-PLC confirmou uma redução de aproximadamente 40% nos níveis de metilação global nas células tratadas com siRNA de Dnmt1, e as células foram em seguida usadas para SCNT. A figura 6C ilustra que a derrubada da Dnmt1 persistiu através de pelo menos duas etapas de célula (faixas c-f) quando comparada com os controles (faixas A e B), e a taxa de desenvolvimento de blastócitos foram significativamente mais altas quando compara-

das como s do controle (50% vs 21%, $p < 0,05$).

EXEMPLO 5.2 - Efeitos da Transfecção de siRNA sobre a Metiltransferase 3b do DNA sobre a Metilação de Células Somáticas murinas:

Células NIH3T3 foram transfectadas com 200 nM siRNA de
5 Dnmt3b murino(Dharmacon RNA Technologies, Lafayette, CO). As seqüên-
cias reunidas do siRNA são como se segue: GCAAUGAUCUCUCUAACGU
(SEQ. ID. NO: 2); GGAAUGCGCUGGGUACAGU (SEQ. ID. NO: 3); UAAU-
CUGGCUACCUUCAAU (SEQ. ID. NO: 4); GCAAAGGUUUUAUAUGAGGG
(SEQ. ID. NO: 5). O protocolo de transfecção foi otimizado em laboratório
10 essencialmente como descrito pelo fabricante. Em resumo, 2 μ M de siRNA
em tampão Universal IX foram misturados com o reagente de transfecção
DharmaFECT com meio isento de soro(DMEM; Hyclone, Logan, UT). . Antes
da transfecção, o meio de cultura foi removido a partir das células que esta-
vam ~ 70 a 80% confluentes e a solução do reagente de transfecção foi adi-
15 cionada para cobrir a superfície. As concentrações finais de transfecção fo-
ram de 200 nm siRNA e 0,6% do reagente de transfecção DharmaFECT em
um volume total de 2 ml por cavidade de placas de 6 cavidades.

As células foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante de 24
a 48 horas. Todos os experimentos incluíram as amostras de Teste e de
20 Controle em triplicata:

1. Células não-tratadas (somente o meio)
2. Falsa transfecção (nenhum siRNA; somente DharmaFECT.
3. Controle positivo siRNA (ciclofilina b)
4. Controle negativo siRNA (drosófila não objetivada)
- 25 5. siRNA de Teste (Dnmt 3b)

A expressão do mRNA foi determinada através de RT-PCR em
tempo real(com a utilização de um kit de RT-PCR da marca TAQMAN se-
guindo as instruções do fabricante). Os resultados estão mostrados na Figu-
ra7A; n = 2. Os níveis de metilação foram determinados através de HPLC.
30 Os resultados estão mostrados na figura 7B; n = 3.

Como ilustrado na figura 7a, a RT-PCR em tempo real revelou
uma redução de 79% nos níveis de Dnmt 3b do mRAM com relação a ciclofi-

lina b nas células transfectadas com siRNA Dnmt 3b quando comparadas com as células de controle. Como ilustrado na figura 7B, a HPLC revelou uma redução de 52% de citosina metilada nas células transfectadas com siRNA Dnmt 3b quando comparadas com as células do controle. Esses dados indicam que a derrubada do gene Dnmt 3b pode reduzir o estado de metilação, *in vitro*.

EXEMPLO 6 - Novos Meios para a Transfecção de siRNA da Metiltransferase de DNA em Células Humanas e Murinas:

SiRNA de Dnmt humano e murino adicionais foram adquiridas da Dharmacon (Lafayette, CO). As seqüências reunidas de siRNA são como se segue:

1. Dnmt1 Humano: GGAAGAAGAGUUACUAUAA (SEQ. ID. NO: 6); GAGCGGAGGUGUCCCAAUA (SEQ. ID. NO: 7); GGACGACCCUGACCUCAA (SEQ. ID. NO: 8); GAACGGUGCUCAUGCUUAC (SEQ. ID. NO: 9).
2. Dnmt3a humano: GCACAAGGGUACCUACGGG (SEQ. ID. NO: 10); CAAGAGAGCGGCUGGUGUA (SEQ. ID. NO: 11); GCACUGAAUGGAAAGGGU (SEQ. ID. NO: 12); GAACUGCUUUCUGGAGUGU (SEQ. ID. NO: 13).
3. Dnmt3b humano: GAAAGUACGUCGCUUCUGA (SEQ. ID. NO: 14); ACAAUUGGCUUCAGAUGUU (SEQ. ID. NO: 15); GCUCUUACCUUACCAUCGA (SEQ. ID. NO: 16); UUUACCACUGCUGAAUUA (SEQ. ID. NO: 17).
4. Dnmt1 Murino: 1- GGAAAGAGAUGGCUUAACA (SEQ. ID. NO: 18); GCUGGGAGAUGGCGUCAUA (SEQ. ID. NO: 19); GAUAAGAAACGCAGAGUUG (SEQ. ID. NO: 20); GGUAGAGAGUUACGACGAA (SEQ. ID. NO: 21).
5. Dnmt3a Murino: CGCGAUUUCUUGAGUCUAA (SEQ. ID. NO: 22); CGAAUUGUGUCUUGGUGGA (SEQ. ID. NO: 23); AAACAUCGAGGACAUUUGU (SEQ. ID. NO: 24); CAAGGGACUUUAUGAGGGU (SEQ. ID. NO: 25).

Todos os protocolos serão otimizados em nosso laboratório, co-

mo essencialmente descrito pelo fabricante. Em resumo, 2 μ M de siRNA em tampão Universal IX foram misturados com o reagente de transfecção DharmaFECT com meio isento de soro(DMEM; Hyclone, Logan, UT). Antes da transfecção, o meio de cultura foi removido a partir das células que estavam em ~ 70 a 80% confluentes e a solução do reagente de transfecção foi adicionada para cobrir a superfície. As concentrações finais de transfecção foram de 200 nm siRNA e 0,6% do reagente de transfecção DharmaFECT em um volume total de 2 ml por cavidade de placas de 6 cavidades. As células foram incubadas à 37°C durante de 24 a 48 horas. Todos os experimentos irão incluir as amostras que se seguem em triplicata: Células não-tratadas, falsa transfecção (nenhum siRNA; somente DharmaFECT, controle positivo siRNA (ciclofilina b); controle negativo siRNA (drosófila não objetivada); siRNA de Teste.

A RT-PCR em tempo real será usada para a confirmação da derrubada do gene. A HPLC será usada para a medição dos níveis relativos de metilação da citosina.

EXEMPLO 7 - Novos Meios que Derrubam MTHFR e/ou Cbs com a utilização de Tecnologia de Interferência de RNA.

A derrubada de MTHFR e/ou Cbs com a utilização de tecnologia de interferência de RNA resulta na diminuição da proporção SAM:SAH e na metilação do DNA. Os siRNA apropriados foram adquiridos comercialmente (Dharmacon RNA technologies, Lafayette, CO) e foram duplexados e desalgados de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências de siRNA humano e siRNA murino em conjunto são como se segue:

25 MTHFR humano: AGUGAGAGCUCCAAAGUA (SEQ. ID.NO: 26);
 GAAGUGAGUUUGGUGACUA (SEQ. ID. NO: 27);
 GACCAAAGAGUUACAUCUA (SEQ. ID. NO: 28);
 GCAAGUGUCUUUGAAGUCU (SEQ. ID. NO: 29).
 Cbs Humano: AGACGGAGCAGACAACCUA (SEQ. ID. NO: 30);
 30 CACCACCGCUGAUGAGAUC (SEQ. ID. NO: 31);
 GGACGGUGGUGGACAAGUG (SEQ. ID. NO: 32);
 GGAAGAAGUUCGGCCUGAA (SEQ. ID. NO: 33).

MTHFR murino: CGCCAUGGCUACAGAGUAA (SEQ. ID. NO: 34);
GCGGAAACCAGCCUGAUGA (SEQ. ID. NO: 35);
CAGAAGGCCUACCUCGAAU (SEQ. ID. NO: 36);
CAUACGAGCUGCGGGUCA (SEQ. ID. NO: 37).
5 Cbs murino: GCAAACAGCCU AUGAGGUG (SEQ. ID. NO: 38);
GCAAAGUCCUCUACAAGCA (SEQ. ID. NO: 39);
GAUCGAAGAUGCUGAGCGA (SEQ. ID. NO: 40);
CAACCCUUUGGCACACUA (SEQ. ID. NO: 41).

Os siRNA positivo e negativo são comprados da Dharmacon e
10 usados diretamente na transfecção.

Todos os protocolos são otimizados essencialmente como descrito pelo fabricante. Em resumo, 2 μ M de siRNA em tampão Universal IX foram misturados com o reagente de transfecção DharmaFECT com meio isento de soro (DMEM; Hyclone, Logan, UT). Antes da transfecção, o meio
15 de cultura foi removido a partir das células que estavam em ~ 70 a 80% confluentes e a solução do reagente de transfecção foi adicionada para cobrir a superfície. As concentrações finais de transfecção foram de 200 nm siRNA e 0,6% do reagente de transfecção DharmaFECT em um volume total de 2 ml por cavidade de placas de 6 cavidades.

20 As células foram incubadas à 37°C em 5% de CO₂ durante de 24 a 48 horas. Todos os experimentos irão incluir as amostras que se seguem em triplicata: Células não-tratadas, falsa transfecção (nenhum siRNA; somente DharmaFECT, controle positivo siRNA (ciclofilina b); controle negativo siRNA (drosófila não objetivada); siRNA de Teste.

25 A RT-PCR em tempo real será usada para a confirmação da derubada do gene. A HPLC será usada para a medição dos níveis relativos de metilação da citosina.

EXEMPLO 8 - Novos meios para aumentar a Transcrição, Expressão de Proteína e Atividade da GNMT.

30 O aumento da transcrição, expressão de proteína e atividade da GNMT resultam na redução da proporção de SAM:SAH e na metilação do DNA. Isso envolve a identificação de compostos, extratos, moléculas que

tenham um efeito similar como o ATRA tais como o aumento da atividade da GNMT, e/ou a redução da proporção SAM:SAH.

A depleção dos doadores de metila *in vitro* resulta na diminuição da proporção de SAM:SAH e na metilação do DNA. Os meios são projetados de encomenda e deficientes em um ou mais doadores de metila ou coenzimas (folato, betaína, colina, Vitamina B6, Vitamina B12 e metionina e/ou outros); ou tem quantidades aumentadas de homocisteína; ou combinações deficientes de doadores de metila/ coenzimas e/ou níveis aumentados de homocisteína. As formulações são baseadas no meio de HyClone 1640 (HyClone, Logan, UT) com modificações como mostradas na Tabela 5:

Tabela 5

	Meio experimental	Meio de controle
Componente:	g/L	g/L
Meio 1: Betaína	0	0,03
15 Meio 2: Colina	0	0,03
Meio 3 : Vitamina B ₆	0	0,000005
Meio 4: Vitamina B ₁₂	0	0,000005
Meio 5: Metionina	0	0,15
Meio 6: Folato	0	0,03

20 EXEMPLO 9 - Meios que aumentam o nível de homocisteína *in Vitro*.

Os níveis crescentes de homocisteína *in vitro* resultam em uma redução na proporção de SAM:SAH e na metilação do DNA. Os meios são projetados por encomenda para conter quantidades crescentes de homocisteína; ou combinações de doadores de metila/coenzimas deficientes e/ou níveis aumentados de homocisteína. As formulações são baseadas em meio HyClone 1640 com as modificações como mostradas na Tabela 6:

Tabela 6

	Meio Experimental	Meio de controle
Componente:	g/L	g/L
30 Meio 6: Homocisteína	0,0625	0
Meio 7: Folato	0	0,03
Homocisteína	0,0625	0

	Meio 8: Betaína	0	0,03
	Homocisteína	0,0625	0
	Meio 9: Colina	0	0,03
	Homocisteína	0,0625	0
5	Meio 10: Vitamina B ₆	0	0,03
	Homocisteína	0,0625	0
	Meio 11 :Vitamina B 12	0	0,03
	Homocisteína	0,0625	0

10 A cultura de células em meios definidos que tem níveis reduzidos ou exauridos de um doador específico de metila, ou de doadores múltiplos de metila, ou que contenha níveis aumentados de homocisteína, ou níveis aumentados de homocisteína em combinação com níveis reduzidos ou exauridos de um doador de metila específico, resulta em uma proporção SAM:SAH diminuída e na metilação do DNA.

15 EXEMPLO 10 - Análise de Alto Rendimento com a utilização do promotor GNMT:

Os fatores que aumentam a expressão de/ e/ou ativam a GNMT, são prováveis de regular para baixo as metiltransferases do DNA e reduzir os níveis de metilação global. Uma análise com base em β -lactamase (e/ou
20 outras análises descritas abaixo) foram desenvolvidas para identificar os indutores (e os supressores) da expressão da GNMT através da indução da transcrição de GNMT.

A análise de β -lactamase (Invitrogen) é usada para o desenvolvimento de análises com base em células que podem ser usados para identificar fármacos, moléculas e extratos que induzem a desmetilação do DNA
25 através do caminho, do metabolismo do carbono único, e para identificar fármacos, moléculas e extratos que induzem a rediferenciação de linhas de células pluri- e multipotentes restauradas in vitro. O objetivo inicial é o de desenvolver uma análise com base em células que possa ser usada para a
30 triagem com relação a fármacos, moléculas e extratos que induzam a expressão de GNMT.

A base dessa análise será a tecnologia GRNRBLAZER (Invitro-

gen) um sistema de gene de informação com base em um substrato com base em um substrato (CCF2-AM) com base em uma membrana permeável de transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET) que proporciona uma marcação visível de célula, compatibilidade com escolha de célula
5 la ativada por fluorescência, leitura radiométrica e plataforma otimizada para varredura de alto rendimento. A Excitação da CCF2 à 405 nm resulta em uma emissão azul esverdeada devido a ausência de FRET, respectivamente na molécula do substrato CCF2. A CCF2 permeável à célula consiste em 2 fluoróforos, 7-hidroxycumarina e fluoresceína, ligados através de um núcleo
10 de cefalosporina.

A excitação da cumarina à 405 nm resulta em FRET para a parte fluorescente que emite luz de fluorescência verde a 530 nm. A β -lactamase cliva a parte de β -lactamo no interior do núcleo da cefalosporina da molécula do substrato CCF2 em dois fluoróforos separados, resultando no rompimento
15 do FRET.

A excitação das células a 405 nm resulta na emissão de uma fluorescência azul através da cumarina, detectada à 460 nm. A presença da β -lactamase nas células ocasiona uma mudança de células fluorescentes de verde azul. Desse modo, durante a análise de FACS as células com características de emissão diferentes podem ser colhidas.
20

Um fragmento de DNA de 1,8 kb que contenha a região 5' à montante da GNMT humana é amplificada por PCR a partir do DNA genômico. Os iniciadores usados são:

Pr4564: 5'-GGGGTACCAGCATCTT-S' (SEQ. ID. NO: 42) e
25 Pr6391 : 5'-GCGAGATCTCCTGCGCCGCGCCTGGCT-S' (SEQ. ID. NO: 43).

As condições da PCR são como se segue: 1,5 mM MgCl₂, 200 nm de iniciadores, 35 ciclos consistindo em uma etapa de t \acute{e} mpera a 60°C durante um minuto, extensão para 72°C durante 2 minutos e 35 ciclos.
30

Depois da amplificação são adicionados SDS e EDTA à 0,1% e 5 mM respectivamente. O DNA é precipitado com 2,5 M de acetato de amônio e 70% de etanol. O fragmento é digerido com KpnI e BglII e o fragmento

é isolado através de decantação a partir de agarose depois de eletroforese em gel. O fragmento é ligado dentro do vetor p7-blaM que contém a seqüência do gene de codificação da beta-lactamase M (blaM). O construto é transfectado em células CHO-K1 com a utilização do reagente da marca Lipofectamine 2000 (invitrogen) como o reagente da transfecção. O vetor sem o inserto é transfectado como um controle negativo. As células estáveis são selecionadas através da resistência a Zeocina. As células são cultivadas em meio MEM- α isento de fenol vermelho com 10% de soro tratado com carvão vegetal, "pen/strep" e 10 mM de tampão HEPES.

Os clones com baixa expressão de β -lactamase são selecionados por análise FACS. As células são tripsinizadas e lavadas duas vezes com tampão FACS [solução salina tamponada com fosfato (PBS), 5% de FBS tratado com carvão vegetal] e carregadas em uma concentração de 1×10^6 células/ml com a tecnologia GENEBLAZER apropriada, substrato com base em FRET permeável à célula (CCF_s-AM) no escuro com agitação suave durante 1 hora.

As células são colhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão FACS na mesma concentração de células. As células são escolhidas com a utilização de um escolhedor de células Becton-Dickenson FACStarplus (Franklin Lakes, NJ). Um laser de UV de argônio é usado para a excitação das células carregadas com o substrato. Os clones com a fluorescência verde respondendo são coletados em placas de 96 cavidades contendo meio de crescimento com 200 g/ml de Zeocina e cultivados até uma população final de células de 6×10^6 . As células estáveis são testadas com relação a capacidade de indução através do tratamento com o ATRA.

Experimentos precedentes tem demonstrado uma dose de resposta de transcrição de GNMT com relação ao ATRA. Essa resposta é usada como critérios para análises com sucesso. Especificamente, uma análise é considerada como de sucesso quando uma indução de três vezes é detectada através do tratamento com 100 nM de ATRA e confirmada por PCR em tempo real. Os clones com uma expressão de β -lactamase indizível pelo ATRA são identificados e usados para desenvolvimento posterior.

Também está dentro do escopo da presente invenção a utilização de análises com aplicações similares usando outros genes de informação tais como a luciferase, beta-galactosidase e outros.

5 Fica entendido que esta invenção não está confinada a construção e aos arranjos específicos de partes ilustradas e descritas aqui, neste pedido de patente, porém engloba essas formas modificadas da mesma como venham dentro do escopo das reivindicações que se segue a Bibliografia.

BIBLIOGRAFIA

1. Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochim Biophys Res Commun.* 1993;193:1184-1190.
2. Alonso-Aperte E, Varela-Morcuera G. Brain folate and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate. *Int J Vitamin Nutr Res.* 1996;66:232-236.
3. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr.* 1998;128:1204-1212.
4. Rampersaud GC, Kauwell GP, Huston AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:998-1003.
5. Pufulete M, Al-Ghaniem R, Leather AJ, et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, a risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology.* 2003;124:1240-1248.
6. Fowler BM, Giulano AR, Piyathilake C, Nour M, Hatch K. Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:901-906.
7. Fang JY, Xiao SD, Zhu SS, Yuan JM, Qiu DK, Jiang SJ. Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *J Gastroenterol.* 1997;32:171-175.
8. Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through and interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:5606-5611.
9. Cravo M, Fidalgo P, Pereira AD et al. DNA methylation as an intermediate in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation.
10. Kim YI, Baik HW, Fawaz K, et al. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, randomized trial. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:184-195.

11. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinemia in patients with uraemia. *Lancet*. 2003;361:1693-1699.
12. Duthie SJ, Narayanan S, Slum S, Pirie L, Brand GM. Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr Cancer*. 2000;37:245-251.
13. Carlson LL, Page AW, Bestor TH. Properties and localization of DNA methyltransferase in pre-implantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev*. 1992;6:2536-2541.
14. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang J, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5594-5604.
15. Lei H, Oh SP, Okano M, Jutterman R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*. 1996;122:3195-3205.
16. Mayer W, Niveleau A, Walter R, Funke R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000;403:501-502.
17. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1991;99:247-257.
18. Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*. 1996;10:1991-2002.
19. Jackson M, Krassowska A, Gilbert N et al. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2004;25:8862-8871.
20. Somonsson S, Gurdon J. DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Bio*. 2004;6:984-990.
21. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
22. Li, E. Chromatin modification and epigenetic programming in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2002;3:662-673.

23. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293:1089-1093.
24. Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*. 2001;293:1093-1098.
25. Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*. 2001;414:122-128.
26. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:143-153.
27. Goodell MA. Stem cell plasticity: befuddled by the muddle. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:208-213.
28. Pomerantz J, Blau HM. Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol*. 2004;6:810-816.
29. Haich J, Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14:461-469.
30. Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic programming in early mammalian development and following SCNT. *Semin Cell Dev Biol*. 2003;14:93-100.
31. Jouneau A, Renard JP. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13:486-491.
32. Kang YK, Lee KK, Han YM. Reprogramming DNA methylation in the preimplantation stage: peeping with Dolly's eyes. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:290-295.
33. Hochedlinger K, Rideout WM, Kyba M et al., Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. *Hematol J. S3*. 2004;S114-S117.
34. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 2002;241:172-182.
35. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, Reik W. Resistance of IAP to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*. 2003;35:88-93.
36. Adenot, PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*. 1997;124:4625-4625.

37. Lepikhov K, Walter J. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol.* 2004;4:12-16.
38. Erhardt S, Su IH, Schnieder R, Barton S, et al. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development.* 2003;130:4235-4248.
39. Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean D. Dynamic chromatin modifications characterize the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol.* 2005;286:225-236.
40. Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development.* 1987;99:371-382.
41. Howlett SK, Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development.* 1991;113:119-127.
42. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2395-2402.
43. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell.* 2001;104:829-838.
44. Fujimori T, Kurotaki Y, Miyazaki J, Nabeshima Y. Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos. *Development.* 2003;130:5113-5122.
45. Santos F, Zakharchenko V, Stojkovic M et al., Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol.* 2003;13:2116-2111.
46. Zhang S, Kubot C, Yang L et al. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. *Biol Reprod.* 2004;71:1540-1544.
47. Eggen K, Akutsu H, Hochedlinger K et al. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science.* 2000;290:1578-1581.
48. Xue F, Tian XC, Du F, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet.* 2002;31:216-220.
49. Humphreys D, Eggen K, Akutsu H et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science.* 2001;293:95-97.
50. Inoue K, Kohda T, Lee J, et al. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science.* 2002;295:297-297.

51. Mann MR, Chung YG, Nolen LD, et al. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod.* 2003;69:902-914.
52. Bourhis D, Le Bourhis D, Patin D, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol.* 2001;11:1542-1546.
53. Kang YK, Koo DB, Park JS, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet.* 2001;28:173-177.
54. Humphreys D, Eggan K, Akutsu H, et al. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:12889-12894.
55. Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 2002;16:1209-1219.
56. Bortvin A, Egan K, Skaletsky H, et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development.* 2003;130:1673-1680.
57. Boiani M, Eckardt S, Leu NA, et al. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.* 2003;22:5304-5312.
58. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr.* 2002;132:2393S-2400S.
59. Choi SW, Mason JB. Folate Status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr.* 2002;132:2413S-2418S.
60. Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem.* 1999;10:66-88.
61. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Rev Canc.* 2003;3:601-614.
62. Kim YI, Pgribny IP, Basnakian AG, et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:46-62.
63. Balaghi M, Warner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Bioch Biophys Res Commun.* 1993;193:1184-1190.

64. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes in allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet*. 2003;361:1693-1699.
65. Cantoni GL, Chiang PK. The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. In: *Natural Sulfur Compounds*, pp67-80, Plenum Press, New York, NY. 1980.
66. Kerr SJ. Competing methyltransferase systems. *J Biol Chem*. 1972;247:4248-4252.
67. Wagner C, Briggs WT, Cook RJ. Inhibition of glycine N-methyltransferase by folate derivatives: implications for regulation of methyl group metabolism. *Biochem Biophys Res Comm*. 1985;127:746-752.
68. Wagner C, Decha-Umpai W, Corbin J. Phosphorylation modulates the activity of glycine N-methyltransferase, a folate binding protein. *J Biol Chem*. 1989;264:9638-9642.
69. Kutabach C, Stokstad ELR. Feedback inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase. *Biochem Biophys Acta*. 1967;250:459-477.
70. Jencks DA, Matthews RG. Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. *J Biol Chem*. 1987;262:2485-2493.
71. Rowling MJ, Schalinske KL. Retinoid compounds activate and induce hepatic glycine N-methyltransferase in rats. *J Nutr*. 2001;131:1914-1917.
72. McMullen MH, Rowling MJ, Ozias MK, Schalinske KL. Activation and induction of glycine N-methyltransferase by retinoids are tissue- and gender specific. *Arch Biochem Biophys*. 2002;401:73-80.
73. Rowling MJ, McMullen MH, Schalinske KL. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. *J Nutr*. 2002;132:365-369.
74. RESERVED
75. RESERVED
76. Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*. 2003;68:1009-1014.
77. RESERVED
78. RESERVED
79. RESERVED

80. RESERVED

81. RESERVED

82. J. Goffin and E. Eisenhauer *Annals of Oncology* 13:1699-1716, 2002
83. McKiernan et al., *Molecular Reproduction and Development* 42:188-199, 1995
84. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 2001
85. Miller & Calos, eds, *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Cold Spring Harbor, 1987
86. F. M. Ausubel et al. eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons,
87. J. E. Colligan et al. eds., *Current Protocols in Protein Science*, Wiley & Sons,
88. J. S. Bonifacino et al., *Current Protocols in Cell Biology*, Wiley & Sons,
89. J. E. Colligan et al. eds., *Current protocols in Immunology*, Wiley & Sons
90. R. I. Freshney ed., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Wiley & Sons, 2005
91. M. A. Harrison & I. F. Rae, *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge Univ. Press
92. K. Turksen ed., *Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols*, Humana Press, 2002
93. U.S. Pat. No. 5,635,387 to Fei, R., et al.
94. U.S. Pat. No. 5,460,964 to McGlave, et al.
95. U.S. Pat. No. 5,677,136 to Simmons, P., et al.
96. U.S. Pat. No. 5,750,397 to Tsukamoto, et al.
97. U.S. Pat. No. 759,793 to Schwartz, et al.
98. U.S. Pat. No. 5,681,599 to DiGuisto, et al.
99. U.S. Pat. No. 5,716,827 to Tsukamoto, et al.
100. Hill, B., et al., *Exp. Hematol.* (1996) 24 (8): 936-943.
101. Gage FH: *Science* 287:1433-1438, 2000
102. Svendsen C N et al, *Brain Path* 9:499-513, 1999
103. Okabe S et al, *Mech Dev* 59:89-102, 1996
104. Fridenshtein, *Arkh. Patol.*, 44:3-11, 1982
105. U.S. Pat. No. 5,486,359 to Caplan, A., et al.
106. U.S. Pat. No. 5,827,735 to Young, H., et al.
107. U.S. Pat. No. 5,811,094 to Caplan, A., et al.
108. U.S. Pat. No. 5,736,396 to Bruder, S., et al.

109. U.S. Pat. No. 5,837,539 to Caplan, A., et al.
110. U.S. Pat. No. 5,837,670 to Masinovsky, B.
111. U.S. Pat. No. 5,827,740 to Pittenger, M.
112. Jaiswal, N., et al., *J. Cell Biochem.* (1997) 64(2): 295-312
113. Cassiede P., et al., *J. Bone Miner. Res.* (1996) 11(9): 1264-1273;
114. Johnstone, B., et al., *Exp. Cell Res.* (1998) 238(1): 265-272
115. Yoo, et al., *J. Bone Joint Surg. Am.* (1998) 80(12): 1745-1757
116. Gronthos, S., *Blood* (1994) 84(12): 4164-4173
117. Makino, S., et al., *J. Clin. Invest.* (1999) 103(5): 697-705.
118. Pittenger, et al., *Science* (1999) 284: 143-147
119. Potten C, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-30, 1998
120. Watt F, *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:831, 1997
121. Alison M et al, *Hepatology* 29:678-83, 1998)
122. Ferrari, *Science* 279:528-30, 1998
123. Gussoni *Nature* 401:390-4, 1999
124. Jackson *PNAS USA* 96:14482-6, 1999
125. Takahashi, *Nat Med* 5:434-8, 1999
126. Lin, *Clin Invest* 105:71-7, 2000
127. Petersen, *Science* 284:1168-1170, 1999
128. Theise, *Hepatology* 31:235-40, 2000
129. Theise, *Hepatology* 32:11-6, 2000
130. Clarke, *Science* 288:1660-3, 2000
131. Forsberg, et al. *Biol. Reprod.* 2002 67:327-333
132. Wadman, M., *Nature* (1999) 398: 551
133. Leu et al., *Cancer Res.* (2003) 63:6110-6115
134. Stresmann et al., *Cancer Res.* (2006) 66:2794-2800
135. Detlich et al., *J. Biol. Chem.* (2003) 278:27586-27592
136. Blueloch, R, et al., *Stem Cells*, 2006 in press, Epub ahead of print May 18
137. Chung YG, et al, *Biol Reprod*, 2002 Apr; 66(4):1178-84
138. Cowan CA, et al., *Science*, 2005 Sep 9;122(5):653-4.
139. Gao S, et al., *Biol Reprod*, 2003 Jul;69(1):48-56.
140. Robert et al. (*Nat. Genet.* 2003 33:61-65)

Listagem de Sequência

<110> Eilertsen, Kenneth
 <120> PRODUÇÃO DE CELULAS REPROGAMADAS COM POTENCIAL RESTAURADO
 <130> 26969.007
 <140> xx/yyy,zzz
 <141> 2006-08-01
 <150> 60/704,465
 <151> 2005-08-01
 <160> 43
 <170> PatentIn versão 3.2
 <210> 1
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA para DNMT1 humano
 <220>
 <221> base _ modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> "n" na posição 21 é desoxitimidina (dT)
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(22)
 <223> n é a, c, g, ou u
 <220>
 <221> base _ modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> "n" na posição 22 é deoxitimidina (dT)
 <400> 1
 aagcaugagc accguucucc nn 22
 <210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA para Dnmt3b de murino
 <400> 2

gcaaugaucu cucuaacgu 19

<210> 3
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b de murino

<400> 3
 ggaaugcgcu ggguaacgu 19

<210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b de murino

<400> 4
 uaaucugcgu accuucuu 19

<210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b de murino

<400> 5
 gcaagguuu auaugagg 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para DNMT1 humano

<400> 6
 ggaagaagag uuacuuaa 19

<210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
<223> siRNA para DNMT1 humano

<400> 7
gagcggaggu gucccaua 19

<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para DNMT1 humano

<400> 8
ggacgaccu gaccucaa 19

<210> 9
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para DNMT1 humano

<400> 9
gaacggugcu caugcuac 19

<210> 10
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 10
gcacaaggu accuacggg 19

<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 11
caagagagcg gcugggua 19

<210> 12
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 12
 gcacugaaau ggaagggg 19

<210> 13
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 13
 gaacugcuu cuggagugu 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 14
 gaaaguacgu cgcucuga 19

<210> 15
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 15
 acaaauggcu ucagaugu 19

<210> 16
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 16
gcucuuaccu uaccaucga 19

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Dnmt3b humano

<400> 17
uuuaccaccu gcugaaua 19

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Dnmt1 de murino

<400> 18
ggaaaagau ggcuaaca 19

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Dnmt1 de murino

<400> 19
gcugggagau ggcgucaua 19

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Dnmt1 de murino

<400> 20
gauaagaac gcagaguug 19

<210> 21

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA para Dnmt1 de murino

 <400> 21
 gguagagagu uacgacgaa 19

<210> 22
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA para Dnmt3 de murino

 <400> 22
 cgcgauuucu ugagucuaa 19

<210> 23
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA para Dnmt3 de murino

 <400> 23
 cgaauugugu cuuggugga 19

<210> 24
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA para Dnmt3 de murino

 <400> 24
 aaacaucgag gacauuugu 19

<210> 25
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> siRNA para Dnmt3 de murino

<400> 25
caagggacuu uaugaggu 19

<210> 26
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para MTHFR humano

<400> 26
agugagagcu ccaaagaua 19

<210> 27
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para MTHFR humano

<400> 27
gaagugaguu uggugacua 19

<210> 28
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para MTHFR humano

<400> 28
gaccaaagag uuacauca 19

<210> 29
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA para MTHFR humano

<400> 29
gcaagugucu uugaagucu 19

<210> 30
<211> 19
<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs humano

<400> 30

agacggagca gacaaccua

19

<210> 31

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs humano

<400> 31

caccaccgcu gaugagauc

19

<210> 32

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs humano

<400> 32

ggaccgguggu ggacaagug

19

<210> 33

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs humano

<400> 33

ggaagaaguu cgccugaa

19

<210> 34

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para MTHFR de murino

<400> 34

cgccauggcu acagagaaa

19

<210> 35
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para MTHFR de murino

<400> 35
 gcggaacca gccugauga 19

<210> 36
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para MTHFR de murino

<400> 36
 cagaaggccu accucgaau 19

<210> 37
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para MTHFR de murino

<400> 37
 cauacgagcu gcgggucaa 19

<210> 38
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> siRNA para Cbs de murino

<400> 38
 gcaaacagcc uaugaggug 19

<210> 39
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs de murino

<400> 39

gcaaaguccu cuacaagca

19

<210> 40

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs de murino

<400> 40

gaucgaagau gcugagcga

19

<210> 41

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA para Cbs de murino

<400> 41

caacccuuug gcacacua

18

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR para a região 5' a montante de GNMT humano

<400> 42

gggtaccag catctt

16

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR para a região 5' a montante de GNMT humano

<400> 43

gcgagatctc ctgcgccg cctggct

27

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a reprogramação de uma célula eucariótica, o método compreendendo:
 - (a) diminuir a proporção de S-adenosilmetiona para S-adenosilhomocisteína (proporção de SAM para SAH) na célula eucariótica.
- 5 2. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda (b) reduzir os níveis de 5-metilcitosina no DNA no interior da célula eucariótica.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, no qual as etapas
- 10 (a) e (b) são executadas simultaneamente.
4. Método de acordo com a reivindicação 2, no qual a etapa (b) compreende especificamente a supressão da expressão, atividade ou da expressão e da atividade das metiltransferases do DNA no interior da célula eucariótica.
- 15 5. Método de acordo com a reivindicação 4, no qual a etapa (b) compreende por em contato a célula com um inibidor da metiltransferase do DNA.
6. Método de acordo com a reivindicação 4, no qual a etapa
- 20 (b) compreende por a célula em contato com uma quantidade efetiva de supressão de um ácido ribonucleico de pequena interferência (siRNA) dimensionada e configurada para suprimir a expressão das metiltransferases do DNA.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a etapa (a) compreende por em contato a célula com um siRNA selecionado a partir do
- 25 grupo que consiste nas SEQ. ID. NOS: 1 a 41.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a etapa (a) compreende aumentar a expressão, atividade ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase no interior da célula eucariótica.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, no qual a etapa (a)
- 30 compreende por em contato a célula com uma quantidade de um ácido retinóico efetiva para o aumento da expressão e da atividade da glicina-N-transferase no interior da célula.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a proporção de SAM para SAH é diminuída para 0,1 ou menos.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a proporção de SAM para SAH é diminuída para 0,5 ou menos.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a proporção de SAM para SAH é diminuída para 1,00 ou menos.

13. Método para a reprogramação de uma célula eucariótica, o método compreendendo:

(a) suprimir especificamente a expressão, atividade, ou a expressão e a atividade das metiltransferases de DNA no interior de uma célula eucariótica; e simultaneamente,

(b) aumentar a expressão, a atividade, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase no interior da célula eucariótica.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, no qual a etapa (a) compreende por em contato a célula com uma quantidade efetiva para a supressão de um siRNA dimensionada e configurada para suprimir a expressão das metiltransferases do DNA.

15 15. Método de acordo com a reivindicação 13, no qual a etapa (a) compreende por em contato a célula com uma quantidade efetiva para a supressão de um siRNA dimensionada e configurada para suprimir para reduzir as citosinas 5-metiladas no DNA na célula por cerca de 5%.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, no qual a etapa (b) compreende por em contato a célula com uma quantidade de um ácido retinóico efetiva para o aumento da expressão, atividade, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase no interior da célula.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, no qual a etapa (b) compreende por em contato a célula com o ácido todo trans-retinóico.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, no qual a etapa (b) compreende por a célula em contato com um composto que se liga a um receptor do ácido retinóico.

19. Método de acordo com a reivindicação 13, compreendendo ainda, simultaneamente com as etapas (a) e (b):

(c) suprimir especificamente no interior da célula a expressão, atividade, ou a expressão e a atividade de uma enzima selecionada a partir do grupo que compreende 5,10-metilenotetraidrofolato redutase e a cistaciona-beta-redutase.

5 20. Método de acordo com a reivindicação 13, compreendendo por em contato a célula com um siRNA selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID. NOS: 1 a 41.

10 21. Método para a mudança do potencial de diferenciação em uma célula eucariótica, o método compreendendo por em contato a célula eucariótica *in vitro* com uma quantidade de um siRNA, em que o siRNA é dimensionado e configurado para suprimir especificamente a expressão das metiltransferases do DNA, contanto que o siRNA não suprima a expressão da glicina-N-metil transferase, e em que a quantidade seja efetiva para a indução da desmetilação ampla do genoma do DNA, em que o potencial de
15 diferenciação celular é aumentado.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, no qual a célula eucariótica é selecionada a partir do grupo que consiste em células-tronco, células progenitores, células somáticas, e células submetidas à transferência nuclear de célula somática (células NT).

20 23. Método de acordo com a reivindicação 21, compreendendo por a célula em contato com um siRNA que é dimensionado e configurado para suprimir especificamente a expressão da metiltransferase de DNA, selecionada a partir do grupo que consiste em metiltransferase de DNA 1 (Dnmt 1), metiltransferase de DNA 3a (Dnmt 3a), e metiltransferase de DNA
25 3b (Dnmt-3b).

24. Método de acordo com a reivindicação 21, compreendendo ainda por a célula em contato com uma quantidade de um composto, eficaz para o aumento da expressão, da atividade, ou de ambas a expressão e a atividade as glicina-N-metil transferase.

30 25. Método de acordo com a reivindicação 24, compreendendo por a célula em contato com ácido retinóico.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, compreendendo

por a célula em contato com o ácido todo trans-retinóico.

27. Método de acordo com a reivindicação 24, compreendendo por a célula em contato com uma composição compreendendo, em combinação, o siRNA e o ácido todo trans-retinóico.

5 28. Método para o aumento do potencial de diferenciação em uma célula diferenciada, o método compreendendo por a célula diferenciada em contato, *in vitro*, com uma composição compreendendo, em combinação:

(i) uma quantidade efetiva de derrubada de um ácido ribonucléico de pequena interferência (siRNA), em que o siRNA é dimensionado e configurado para a supressão da expressão das metiltransferases do DNA especificamente; (ii) uma quantidade efetiva de derrubada de um siRNA dimensionada e configurada para a supressão da expressão de uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em 5,10-metilenotetraidrofolato redutase e a cistaciona-beta-redutase; e (iii) um composto eficaz para au-
10 mentar a expressão da, a atividade da, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase,
15

em que a célula é posta em contato com a composição durante um tempo eficaz para a indução da desmetilação ampla do genoma do DNA no interior da célula, por meio do que o potencial de diferenciação celular é
20 aumentado.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, compreendendo por a célula em contato com uma composição compreendendo um siRNA que seja dimensionado e configurado para a supressão especificamente da expressão da metiltransferase do DNA selecionada a partir do grupo que
25 consiste em metiltransferase de DNA 1 (Dnmt 1), metiltransferase de DNA 3a (Dnmt 3a), e metiltransferase de DNA 3b (Dnmt 3b).

30. Método de acordo com a reivindicação 28, no qual o composto eficaz para o aumento da expressão da, atividade da, ou ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase é o ácido retinóico.

30 31. Método de acordo com a reivindicação 28, no qual o composto eficaz para o aumento da expressão da, da atividade da, ou de ambas a expressão e a atividade da glicina-N-metil transferase é o ácido todo trans-

retinóico.

32. Método de acordo com a reivindicação 28, compreendendo por a célula em contato com um siRNA selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ.ID.NOS: 1 a 41.

5 33. Método para a determinação do potencial de desenvolvimento de uma célula, o método compreendendo a determinação da proporção SAM para SAH na célula, em que a proporção SAM para SAH de menos do que cerca de 1,0 indica um potencial de desenvolvimento aumentado da célula.

10 34. Método de acordo com a reivindicação 33, compreendendo ainda a medição dos resíduos da metilação da citosina no DNA da célula, em que a metilação de menos do que cerca de 10% indica um potencial de desenvolvimento aumentado da célula.

35. Método para controlar o potencial de diferenciação em uma célula, o método compreendendo:

15 (a) manter a proporção de SAM para SAH na célula em menos do que cerca de 1,0; e

(b) manter a metilação dos resíduos da citosina no DNA da célula em menos do que cerca de 40%.

36. Método de acordo com a reivindicação 34, compreendendo:

20 (a) manter a proporção de SAM para SAH na célula em menos do que cerca de 0,5; e

(b) manter a metilação dos resíduos da citosina no DNA da célula em menos do que cerca de 20%.

25 37. Meio de cultura de célula para o aumento do potencial de diferenciação em uma célula diferenciada disposta dentro do meio de cultura, o meio de cultura compreendendo um meio de base suficiente para manter a viabilidade da célula, em combinação com um fator que reduza a atividade dos doadores de metila presentes no meio de cultura da célula.

30 38. Meio de cultura de acordo com a reivindicação 37, no qual o fator é selecionado a partir do grupo que consiste em homocisteína e ácido todo trans-retinóico.

39. Meio de cultura de acordo com a reivindicação 37, no qual o

fator é uma quantidade efetiva de supressão de um siRNA, dimensionada e configurada para suprimir a expressão das metiltransferases do DNA.

40. Método para a identificação de compostos que afetam a diferenciação de células, o método compreendendo:

5 (a) reduzindo a percentagem de citosinas no DNA de uma célula que são metiladas por pelo menos cerca de 5%, em que a célula tem um primeiro fenótipo antes da redução;

(b) reduzindo a proporção de SAM para SAH na célula para menos do que cerca de 1,0; e em seguida

10 (c) contactando a célula com um componente suspeito de afetar a diferenciação de células; e

(d) comparando o primeiro fenótipo da célula ao fenótipo da célula depois da etapa (c), em que o aparecimento depois da etapa (c) de um fenótipo diferente do primeiro fenótipo indica que o composto tem um efeito
15 de diferenciação de células.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, no qual a etapa (a) compreende a redução à percentagem de citosinas no DNA das células que são metiladas por pelo menos cerca de 5%.

20 42. Método de acordo com a reivindicação 40, no qual a etapa (a) compreende a redução da percentagem de citosinas no DNA das células que são metiladas por pelo menos cerca de 10%.

43. Método de acordo com a reivindicação 40, no qual a célula inclui um sistema de reportes para monitorar as mudanças na transcrição.

25 44. Método de acordo com a reivindicação 43, no qual o sistema de reportes mede a presença de uma atividade de enzima selecionada a partir do grupo que consiste em atividade de luciferase, atividade de beta-lactamase e atividade de beta-galactosidase.

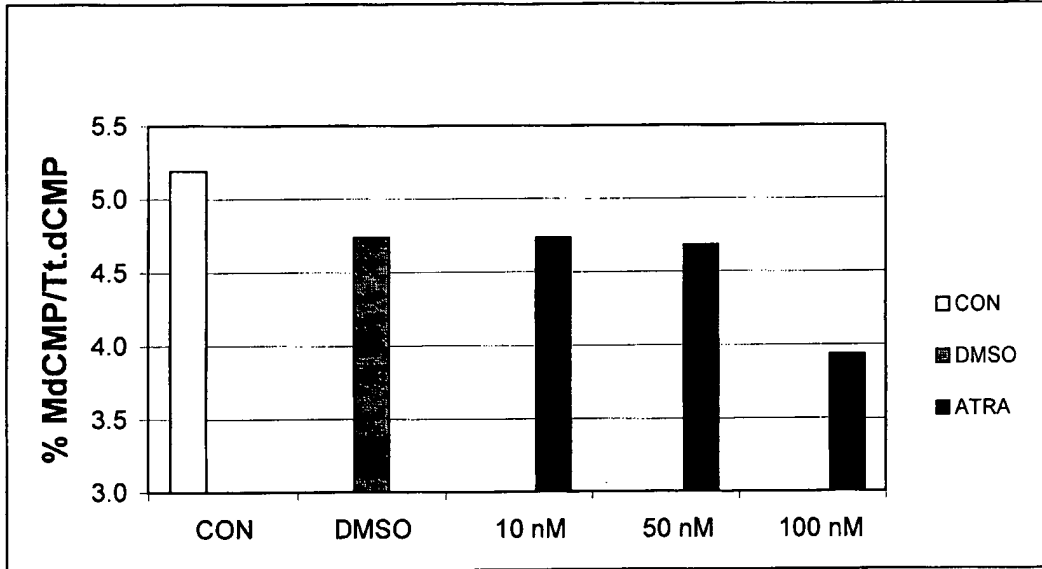


FIG. 1

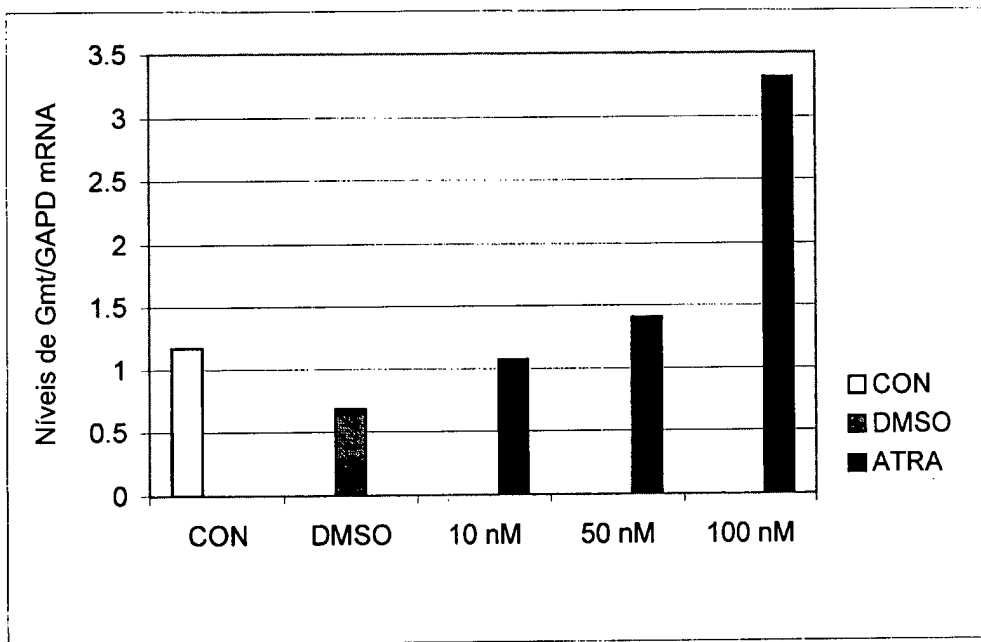


FIG. 2

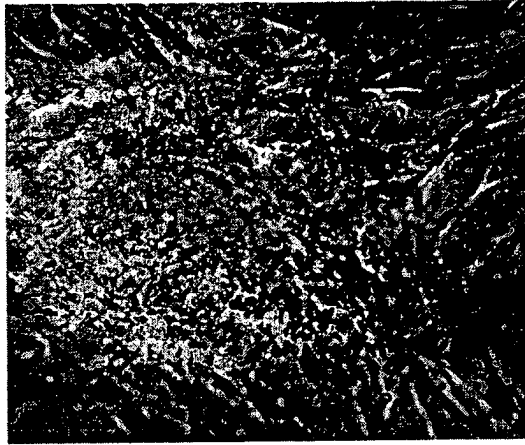


FIG. 3A

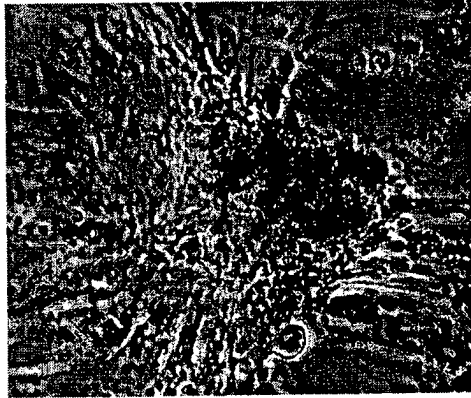


FIG. 3B

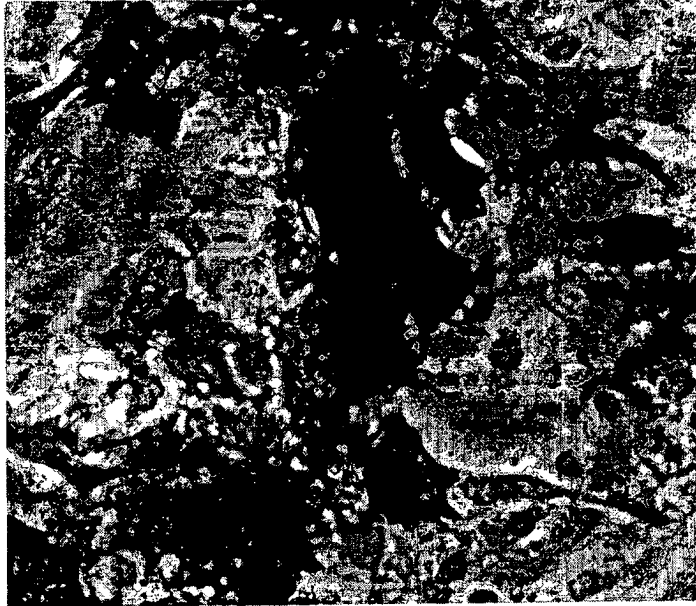


FIG. 4A

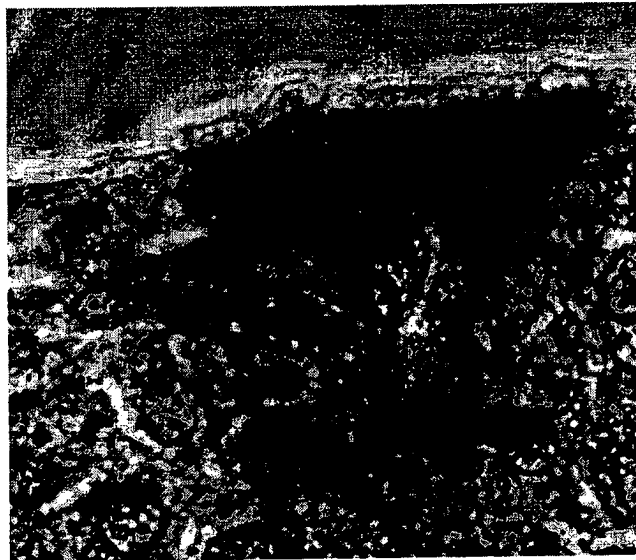


FIG. 4B

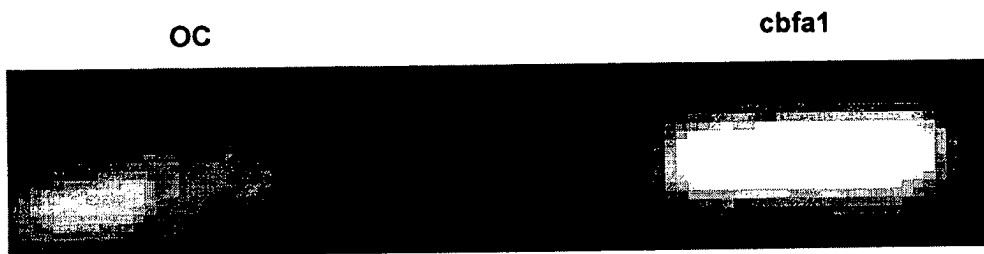


FIG. 5

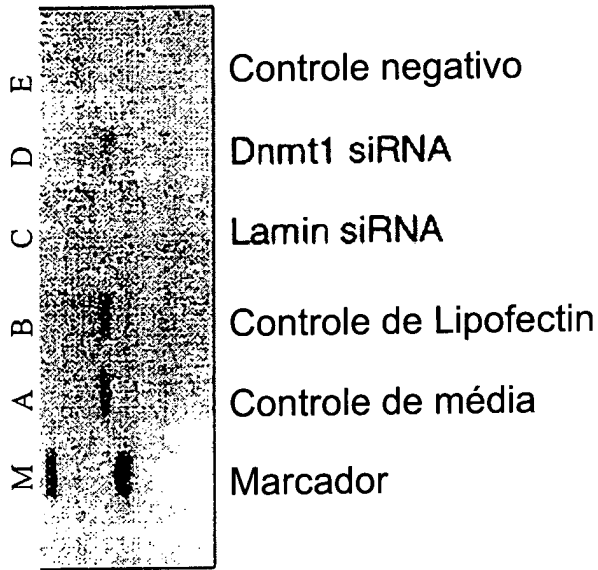


FIG. 6B

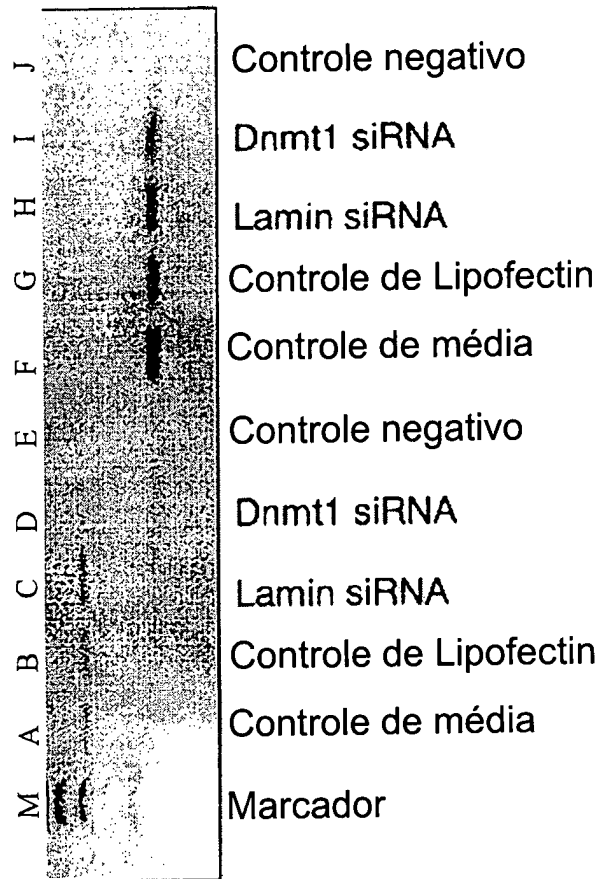


FIG. 6A

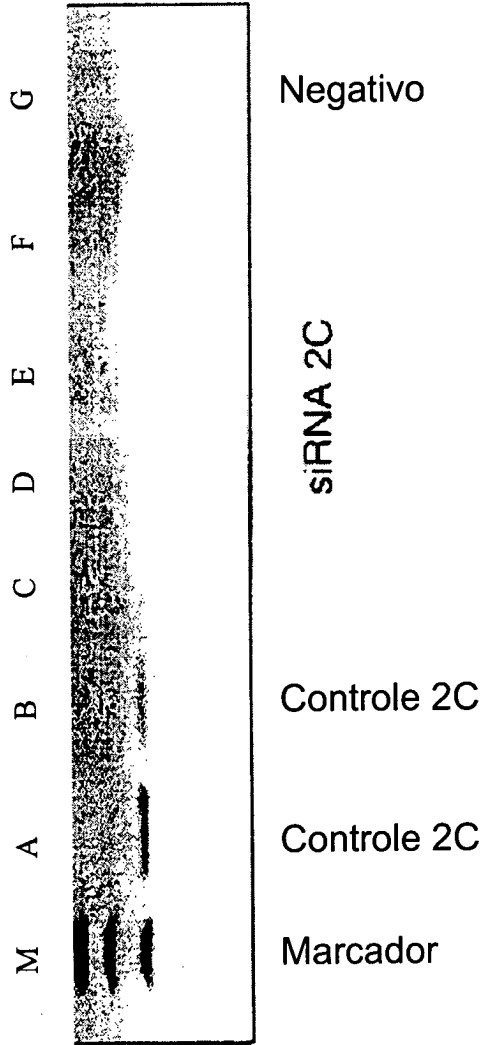


FIG. 6C

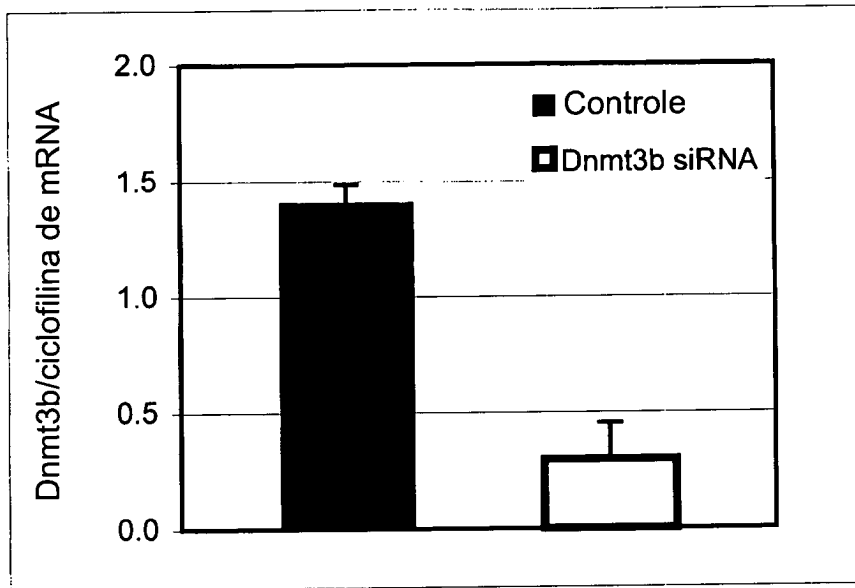


FIG. 7A

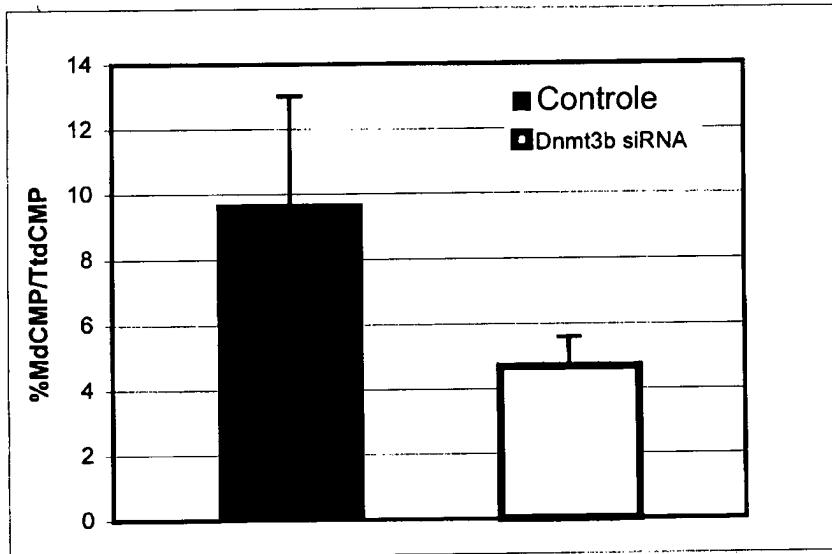


FIG. 7B

RESUMO

Patente de Invenção: **"PRODUÇÃO DE CELULAS REPROGAMADAS COM POTENCIAL RESTAURADO"**.

A presente invenção refere-se a um método para o tratamento
5 de células e/ou unidades de transferência nuclear e/ou células-tronco em
cultura com tais compostos, individualmente ou em combinações. O método
resulta em um genoma globalmente hipometilado e uma restauração de dife-
renciação de células e/ou potencial de desenvolvimento ou potencialmente.
Além disso é descrito um método para a produção in vitro de células repro-
10 gramadas que tiveram o potencial de diferenciação (totipotencial, pluripoten-
cial, ou multipotencial) restauradas através de desmetilação do genoma.