

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 487**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/33 (2015.01)
A61K 35/407 (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013** **E 18211100 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020** **EP 3483178**

54 Título: **Métodos para producir células HLA-G modificadas**

30 Prioridad:

31.07.2012 US 201261677739 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2021

73 Titular/es:

AGEX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
1010 Atlantic Ave, Suite 102
Alameda, CA 94501, US

72 Inventor/es:

HANTASH, BASIL, M.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 837 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para producir células HLA-G modificadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Número de serie 61/677,739, presentada el 31 de julio de 2012,

Antecedentes de la invención

- 10 La medicina regenerativa en la forma de trasplante de células es uno de los enfoques terapéuticos más prometedores para el tratamiento de afecciones médicas intratables tales como la diabetes, las enfermedades cardíacas, y las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, un obstáculo importante para implementar el trasplante de células en la clínica es el rechazo inmunitario de las células del donante, especialmente cuando estas se derivan de un huésped extraño. Si bien es posible abordar el rechazo inmunitario, en parte, mediante la administración de fármacos
- 15 inmunosupresores, estos conllevan efectos secundarios adversos graves. Rousseau et al. (2003) describe una línea celular de melanoma M8 que se transfectó con el alelo G*010102, la secuencia codificante de HLA-G nativa (> 95% de identidad con la SEQ ID NO: 2) y una 3'-UTR completa (> 85% de identidad con la SEQ ID NO: 3) pero con la inserción de 14 nucleótidos (SEQ ID NO: 4). Paul et al. (2000) describe la construcción de la línea celular de melanoma transfectada de manera estable de Rousseau et al., y describe que HLA-G es capaz de inhibir la citólisis de NK. El
- 20 documento WO 2007/091078 describe la secuencia de nucleótidos HLA-G humana (seq # 9, Fig. 11) > 92% de identidad con la codificación de SEQ 2 y una UTR con > 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3. También se describe allí expresión ectópica de HLA-G en células madre embrionarias humanas y células madre de teratocarcinoma y el uso de estas células para inducir tolerancia inmunitaria. Boyoun et al. (2001) describen el HLA-G mutante con K3334A+K335A y que esto mejora la retención en la superficie celular cuando se expresa en células transformadas.
- 25 El documento WO2008/121894 describe métodos y composiciones para la identificación y aislamiento de HLA-G+ MSC, HLA-E+ MSC o HLA-G4VHLA-E+ MSC de mamíferos. El documento US2007/036773 describe las células T universales y su uso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de linaje B (LLA-B) en particular y la malignidad en general. Por lo tanto, existe una necesidad continua de desarrollar tecnologías mejoradas para terapias de trasplante de células.

Resumen de la invención

- En la presente descripción se describen composiciones basadas en células y los métodos para la terapia de trasplante de células basado en la expresión forzada a largo plazo de al menos una proteína HLA-G exógena en células donantes para trasplantarse a un sujeto que necesite tales células donantes. La divulgación proporciona los datos que muestran
- 35 que las células (ya sean pluripotentes o diferenciadas) modificadas para expresar HLA-G exógena de la manera descrita en la presente descripción tienen inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión aumentada. Las capacidades de inmunogenicidad disminuida y/o de inmunosupresión aumentada proporcionadas por la modificación genética de HLA-G son estables y perduran durante largos períodos de tiempo, que incluye todo el proceso de diferenciación. La implicación es que las células HLA-G modificadas de la invención pueden servir como células o tejido donantes universales (*es decir*, que disminuyen o que eliminan la necesidad de coincidir con el tipo de moléculas de clase I y clase II del antígeno leucocitario humano clásico (HLA) entre células donantes y el receptor) para
- 40 numerosas lesiones, enfermedades o trastornos. En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una célula de mamífero modificada genéticamente que tiene inmunogenicidad reducida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, comprendiendo el método: modificar genéticamente una célula de mamífero in vitro con un ácido nucleico exógeno que comprende:

- i. una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-G que comprende el aminoácido de la SEQ ID NO: 2; y
- 50 ii. una región no traducida 3' (UTR) que comprende la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 3,

en donde la proteína HLA-G codificada es expresada por la célula de mamífero modificada genéticamente.

En una realización, la inmunogenicidad reducida y/o

- 55 la inmunosupresión de la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética está determinada bien sea por:

- iii. una reducción de la citotoxicidad inducida por NK-92 de la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética,
- 60 iv. una reducción de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica in vitro por la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, o
- v. un aumento en el tamaño y peso de la formación de tumores por la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética en ratones NSG humanizados.

- 65 En una realización, la célula de mamífero modificada genéticamente expresa la proteína HLA-G durante al menos 7 semanas, al menos 20 semanas o al menos 50 semanas.

En una realización, el HLA-G expresado está presente en la superficie celular de la célula de mamífero modificada genéticamente.

5 En una realización, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula humana.

10 En una realización, la célula modificada genéticamente es una célula humana, o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre, una célula progenitora, una célula obtenida por diferenciación in vitro de la célula madre o la célula progenitora, una célula completamente diferenciada, una célula progenitora epidérmica, una célula progenitora pancreática, una célula madre hematopoyética, un queratinocito, un fibroblasto, un hepatocito, una célula madre mesenquimatosa, un cardiomiocito, una célula madre neural, una neurona o un astrocito, o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre embrionaria humana, una célula progenitora epidérmica embrionaria humana, o en donde la célula modificada genéticamente es un fibroblasto dérmico humano.

15 En una realización, la célula de mamífero modificada genéticamente comprende además un promotor del Factor 1 alfa de Elongación (EF-1 α), en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína HLA-G está unida operativamente al promotor EF-1 α , opcionalmente en donde el promotor EF-1 α comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

20 En una realización, el ácido nucleico exógeno es un vector de expresión, en donde opcionalmente el vector de expresión es un vector de transposón, u opcionalmente en donde el vector de expresión comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera.

25 En un aspecto, la invención proporciona un método para producir un tejido artificial in vitro, comprendiendo el método la etapa de generar el tejido artificial a partir de las células de mamífero modificadas genéticamente producidas mediante el método de la invención y, opcionalmente en donde la etapa de generar el tejido artificial de las células de mamífero modificadas genéticamente comprende proporcionar uno o más supercántigos sintéticos biocompatibles.

30 En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una composición de injerto de piel, una composición de reparación de piel o una composición de regeneración de piel in vitro, comprendiendo el método generar la composición de injerto de piel, la composición de reparación de piel o la composición de regeneración de la piel a partir de la célula de mamífero modificada genéticamente producida mediante el método de la invención.

35 En una realización, la modificación genética de una célula de mamífero con un ácido nucleico exógeno comprende transfectar transitoriamente la célula de mamífero con el ácido nucleico exógeno.

En una realización, la modificación genética de una célula de mamífero con un ácido nucleico exógeno comprende transfectar de forma estable la célula de mamífero con el ácido nucleico exógeno.

40 En una realización, las células de mamífero modificadas genéticamente se seleccionan usando resistencia a antibióticos o citometría de flujo.

45 En consecuencia, se describe en la presente una célula de mamífero modificada genéticamente (una célula HLA-G modificada) que tiene una inmunogenicidad disminuida y/o que es capaz de proporcionar inmunosupresión mejorada en un recipiente alogénico en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética, donde (i) la célula de mamífero modificada genéticamente comprende: (a) un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, un vector de expresión) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-G que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 85% a la del HLA-G humana, y que comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-Golgi y/o (b) una secuencia 3' UTR (región no traducida) que no contiene sitios de unión de microARN tales como SEQ ID NO: 3 o una secuencia que no comprende la SEQ ID NO: 4; y (ii) la proteína HLA-G codificada es expresada por la célula de mamífero modificada genéticamente durante al menos siete semanas (por ejemplo, al menos 20 semanas o al menos 50 semanas).

55 La divulgación proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente que tiene inmunogenicidad reducida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética, en donde: (i) la célula de mamífero modificada genéticamente comprende un ácido nucleico exógeno que comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico (tal como SEQ ID NO: 2) que codifica una proteína HLA-G que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a la HLA-G humana consenso de tipo silvestre (tal como SEQ ID NO: 1), y
60 que comprende uno o más mutaciones de aminoácidos que reducen la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-Golgi; y (b) una región no traducida 3' (UTR) (tal como SEQ ID NO: 3) que es al menos un 85% idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' del gen consenso HLA-G humano de tipo silvestre y no comprende SEQ ID NO: 4; y (ii) la proteína HLA-G codificada es expresada por la célula de mamífero modificada genéticamente durante al menos siete semanas.

65

- En algunas realizaciones, una célula modificada genéticamente tiene inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada si muestra: (1) una disminución de la citotoxicidad por NK-92 de la célula modificada genéticamente en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética, (2) una disminución de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica *in vitro* de la célula modificada genéticamente en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética, y/o (3) un aumento en el tamaño y el peso del tumor formado por la célula modificada genéticamente en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética en ratones NSG humanizados.
- En algunas realizaciones, la célula de mamífero modificada genéticamente no tiene coincidencias (*es decir*, el mismo alelo(s)) en uno o más antígenos HLA en comparación con el receptor alogénico, en donde los antígenos HLA se seleccionan a partir del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero modificada genéticamente solo tiene 1, 2, 3, 4, o 5 coincidencias en uno o más antígenos HLA en comparación con el receptor alogénico, en donde los antígenos HLA se seleccionan a partir del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR. En una realización, la célula de mamífero modificada genéticamente no tiene coincidencias con el receptor alogénico con respecto a HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR.
- En algunas realizaciones, la célula modificada genéticamente comprende un transgén de HLA-G sin una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-Golgi (*es decir*, una secuencia consenso de HLA-G de tipo silvestre tal como la SEQ ID NO: 1), pero tiene un transgén HLA-G que comprende una secuencia 3' UTR (región no traducida) que no contiene sitios de unión de microARN tal como SEQ ID NO: 3, o una secuencia que no comprende SEQ ID NO: 4.
- En algunas realizaciones, la una o más mutaciones que reducen la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-Golgi incluyen una mutación del motivo de di-lisina (KK). En algunas realizaciones, la mutación del motivo KK incluye una mutación K334A, una mutación K335A o ambas mutaciones.
- En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno que se va a expresar en la célula modificada genéticamente incluye una secuencia 3' UTR que no contiene la SEQ ID NO: 4. En una realización, cuando la secuencia 3' UTR del ácido nucleico exógeno no incluye la SEQ ID NO: 4, la secuencia de ácido nucleico contiene la SEQ ID NO: 3.
- En algunas realizaciones, el HLA-G expresado está presente en la superficie celular de la célula de mamífero modificada genéticamente.
- En algunas realizaciones, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula humana, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de mono, o una célula de cerdo.
- En algunas realizaciones, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre, una célula progenitora o una célula que se obtiene mediante la diferenciación dirigida de la célula madre o de la célula progenitora. En algunas realizaciones, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula que ya estaba diferenciada (ya sea de origen natural o *in vitro*) antes de la introducción de un transgén exógeno de HLA-G. En algunas realizaciones, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre (por ejemplo, una célula madre pluripotente). En algunas realizaciones, cuando la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre, la célula madre es una célula madre pluripotente inducida.
- En otra realización, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre pluripotente inducida. En una realización adicional, la célula de mamífero modificada genéticamente no es de un tipo de célula del sistema inmunitario. En otra realización, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula que se obtiene mediante la diferenciación *in vitro* de una célula madre o de una célula progenitora en donde la célula madre o la célula progenitora está modificada genéticamente y después se diferencian *in vitro*.
- En otras realizaciones, la célula modificada genéticamente es una célula totalmente diferenciada, una célula progenitora epidérmica, una célula progenitora pancreática, una célula madre hematopoyética, una célula que se obtiene por diferenciación de la célula madre pluripotente, un queratinocito, un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa, un cardiomiocito, una célula madre neural, una neurona, un astrocito o un progenitor de células β pancreáticas.
- En algunas realizaciones, cuando el ácido nucleico exógeno en la célula de mamífero modificada genéticamente es un vector de expresión, el vector de expresión es un vector de transposón o un vector retroviral. En algunas realizaciones, cuando el ácido nucleico exógeno es un vector de expresión, el vector de expresión es un vector de direccionamiento, y la célula de mamífero modificada genéticamente se obtuvo mediante recombinación homóloga del vector de direccionamiento. En algunas realizaciones, el vector de expresión puede incluir, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera tal como una proteína fluorescente verde (GFP).
- En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno incluye, además, una secuencia de ácido nucleico que (i) es al menos 85 % idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' del gen HLA-G humano; y (ii) que comprende al menos

una mutación que inhibe la unión de un microARN afín al sitio mutado dentro de un ARNm que comprende el sitio de unión mutado dentro de su región no traducida 3'. En una realización, tal secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un tejido artificial que contiene la célula modificada genéticamente.

Se divulga en este documento un ácido nucleico aislado que incluye (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 85% a la humana, HLA-G; y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que es al menos un 85% idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' del gen HLA-G humano y enlazada operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia de aminoácidos comprende una mutación que disminuye la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-golgi, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende al menos una mutación que inhibe la unión de un microARN afín a un ARNm que comprende el sitio de unión mutado dentro de su región no traducida 3'.

15 En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado de la secuencia de la región no traducida 3' no comprende la SEQ ID NO:4. En una realización, donde la secuencia de la región no traducida 3' no comprende la SEQ ID NO: 4, la secuencia de la región no traducida 3' comprende la SEQ ID NO: 3

20 En algunas realizaciones, se proporciona un vector de expresión de mamífero que incluye el ácido nucleico aislado y un promotor unido operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde el promotor no está silenciado en una célula madre. En algunas realizaciones, el promotor contiene la secuencia de ácido nucleico del promotor de hámster chino EF-1 α (CHEF-1 α) o del promotor humano EF-1 α . En algunas realizaciones, el promotor CHEF-1 α comprende la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, el promotor usado para dirigir la expresión de un transgén HLA-G es un promotor selectivo de tipo de tejido o célula. En algunas realizaciones, el vector de expresión de mamífero incluye comprender una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera. En algunas realizaciones, el vector de expresión de mamífero es un vector de transposón. En algunas realizaciones, se proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente que contiene el vector de expresión de mamífero.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a HLA-G humana, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una mutación que disminuye la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-golgi; y (ii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' del gen HLA-G humano y unida operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende al menos una mutación que inhibe la unión de un microARN afín a un ARNm que comprende el sitio de unión mutado dentro de su región no traducida 3'. En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otra realización, la segunda secuencia de ácido nucleico no comprende la SEQ ID NO:4. En una realización, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO:3. En otra realización, se proporciona un vector de expresión de mamífero que comprende dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, y que comprende además, un promotor unido operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde el promotor no está silenciado en una célula madre o en una célula generada mediante la diferenciación de la célula madre. Tal promotor puede comprender la secuencia de ácido nucleico del promotor de hámster chino EF-1 α . En otra realización, el vector de expresión de mamífero comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera. En otra realización, el vector de expresión de mamífero es un vector de transposón. En otra realización, el vector de expresión de mamíferos comprende todos los elementos que se muestran en la Figura 1.

45 En una realización, se proporciona un vector de expresión de mamífero que comprende: (a) un promotor de hámster chino EF-1 α , (b) una secuencia de ácido nucleico que se une operativamente al promotor y que codifica HLA-G humana con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, y (c) una secuencia UTR 3' que comprende la SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, se proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente que comprende tal vector de expresión.

55 En diversas realizaciones, las células de mamífero HLA-G modificadas (por ejemplo, células humanas HLA-G modificadas) se administran a un sujeto que padece de cualquiera de un número de afecciones que incluyen, pero no se limitan a enfermedad cardiovascular, enfermedad de los ojos (por ejemplo, degeneración macular), enfermedad auditiva, (por ejemplo, sordera), diabetes, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, osteoporosis, enfermedad del hígado, enfermedad del riñón, enfermedad autoinmune, artritis, enfermedad de las encías, una afección dental, o un trastorno proliferativo (por ejemplo, un cáncer). En otros casos, el sujeto padece de, o tiene un alto riesgo de padecer de, una afección de salud aguda, por ejemplo, infarto cerebral, lesión de la médula espinal, quemaduras, o una herida. En otros casos, el sujeto padece de la pérdida de tejidos tal como lipoatrofia o las pérdidas en el colágeno asociadas con el envejecimiento. En otros casos, el sujeto padece de una úlcera que no cicatriza, o necesita de un agente para ayudar en el cierre de defectos como la hipospadias y la epispadias. En otros casos, el sujeto necesita un injerto de piel temporal o permanente para la cicatrización de la herida o para sustituir la piel.

65

La divulgación proporciona un método universal de reparación o regeneración celular o tisular a un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método inyectar o injertar al sujeto una composición celular o tisular que comprende una población de células eHLA-G modificadas, en donde el sujeto tiene al menos una molécula de HLA clásica I o HLA de clase II no coincidente en comparación con población de células eHLA-G modificadas, y en donde la población de células eHLA-G modificadas exhibe inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con células del mismo tipo sin la modificación de eHLA-G. La inmunogenicidad disminuida y/o la inmunosupresión mejorada pueden determinarse, por ejemplo, mediante la comparación de la célula eHLA-G modificada con una célula de control del mismo tipo sin la modificación eHLA-G en un ensayo de citotoxicidad de NK-92, un ensayo de crecimiento del tumor NSG humanizado, y/o un ensayo de proliferación de PBMC. En una realización, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente para expresar eHLA-G. En otra realización, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de progenitores epidérmicos humanos modificados genéticamente para expresar eHLA-G. En otra realización, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de células madre mesenquimatosas humanas modificadas genéticamente para expresar eHLA-G. En otra realización, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de células madre embrionarias humanas modificadas genéticamente para expresar eHLA-G. En otra realización, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de células diferenciadas in vitro a partir de células madre embrionarias humanas modificadas genéticamente para expresar eHLA-G. En otras realizaciones, la población de células modificadas genéticamente no es rechazadas por el sistema inmunitario del sujeto durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 36, 48, o 52 semanas.

La divulgación proporciona un método para la regeneración de la piel en un sujeto que lo necesita, el método comprende inyectar una población de fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados en un sitio de lesión de la piel en el sujeto, en donde el sujeto tiene al menos, una no coincidencia de las moléculas HLA Clase I o HLA Clase II clásicas en comparación con los fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o los progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados.

En otra realización se proporciona un método de terapia celular que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una población de células de mamíferos modificadas genéticamente que comprenden una molécula de microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$) humana exógena y un transgén eHLA-G de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una realización no limitante de un vector de expresión de transposón del transgén HLA-G (eHLA-G) mejorado que contiene un marcador de selección (neomicina fosfotransferasa) dirigido por un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK); elementos aisladores flanqueantes "INS"; un promotor de hámster chino EF-1 α que dirige la expresión de eHLA-G; un promotor PGK que dirige la expresión de EGFP; y elementos de transposición de repetición terminal (TR) 5'. Un transgén eHLA-G contiene una combinación de mutaciones y/o elementos no codificantes (tales como, por ejemplo, un promotor o UTR 3' modificado) que potencia la expresión, particularmente la expresión en la superficie de la célula, de la proteína HLA-G. Para los experimentos descritos en la presente descripción, el transgén eHLA-G incluye los elementos anteriores y, más específicamente, incluye una secuencia codificante de HLA-G humana como se indica en la SEQ ID NO:2 con mutaciones del motivo de recuperación del ER de HLA-G (K334A/K335A); y 2) mutación de los sitios de unión de microARN de la UTR 3' de HLA-G, en donde esta UTR 3' modificada tiene la secuencia como se indica en la SEQ ID NO:3. Ver Ejemplo 3 para una descripción adicional.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de una realización no limitante de un vector auxiliar de la expresión de transposasa usado para dirigir la integración genómica de un vector de expresión de transposón cotransfectado.

La Figura 3 muestra micrografías de fluorescencia de colonias de células ES humanas en diversos tiempos después de la transfección estable con un vector de expresión de transposón que dirige la expresión de eHLA-G y EGFP.

La Figura 4 (Panel Superior) muestra un gráfico de barras que representa la relación entre el número inicial de células hES transfectadas con un vector de expresión que contiene EGFP y la fracción de células EGFP⁺ detectadas en la población celular a los 10 días posteriores a la transfección. Los números en el eje x son el número de colonias GFP⁺ por 5×10^5 células. Los números en el eje y son el número de células. (Panel Inferior) muestra un gráfico de barras que muestra la relación entre diversos vectores de transposón (que usan diferentes promotores) y la fracción de células EGFP⁺ detectadas en la población celular. Los números en el eje x son el número de colonias GFP⁺ por 5×10^5 células. Para el panel inferior, de izquierda a derecha: control (con), GFP-puro (el tamaño del vector transfectado es de 7,3 kb); eHLA-G (MSCV)-GFP-puro (el tamaño del vector transfectado es de 8,6 kb); y eHLA-G (EF-1 α)-GFP-puro (el tamaño del vector transfectado es de 9,2 kb). Se realizaron experimentos adicionales de eficiencia de transfección de eHLA-G (EF-1 α)-GFP-puro (no mostrados), que indicaron que a los 10 días posteriores a la transfección, las eficiencias más altas (~500 colonias GFP⁺ por 5×10^5 células) se obtuvieron en la solución V y el programa B16 después de la selección con puomicina durante 10 días.

La Figura 5 muestra una serie de micrografías de fluorescencia que muestran la expresión en células ES humanas HLA-G modificadas de la expresión de HLA-G y la tinción DAPI (imágenes superiores); Oct 3/4 y DAPI (imágenes del medio); y SSEA-4 y DAPI (imágenes inferiores).

La Figura 6 (Panel Superior) muestra un dispersograma de citometría de flujo que muestra la distribución de células doble positivas SSEA-4⁺/GFP⁺ en una población de células hES eHLA-G modificadas. (Panel Inferior) muestra la distribución de células Oct 3/4⁺ en la población de células hES eHLA-G modificadas. SSEA-4 y Oct 3/4 son marcadores de pluripotencia. Estos datos, junto con la Figura 5, indican que las células hES eHLA-G modificada mantuvieron sus marcadores de pluripotencia característicos de autorenovación. Adicionalmente, las hESC eHLA-G(EF-1α)-GFP mantuvieron su pluripotencia y el cariotipo normal in vivo. Los ratones NSG humanizados se inyectaron por vía subcutánea con las hESC eHLA-G(EF-1α)-GFP, y se observó formación de teratoma, que indica que las células inyectadas/trasplantadas no se rechazaron ya que las hESC mostraron una inmunogenicidad disminuida y/o un aumento de la inmunosupresión. El cariotipo de las células del teratoma fue normal.

La Figura 7 (Panel Superior) muestra fotomicrografías de contraste de fase de las células de tipo silvestre (imagen de la izquierda) y de las células hESC generadas, eHLA-G modificadas (imagen de la derecha, con cuerpos embrioides (EB) en el día 15. (Panel Inferior) muestra una micrografía de fluorescencia de las EB que se muestran en el Panel Superior. No se detecta ninguna señal de GFP en los EB de hESC de tipo silvestre, mientras que se detecta la fuerte expresión de GFP en ambos EB de las hESC eHLA-G modificadas. Estos datos indican que las hESC eHLA-G⁺ mantienen la formación de EB.

La Figura 8 muestra que las hESC eHLA-G⁺ son resistentes al silenciamiento. (Panel Superior) muestra un histograma de distribución de citometría de flujo para la expresión de GFP en una línea hESC eHLA-G modificada, que demostró una fuerte expresión similar de GFP después de 6 y 16 pases en cultivo. (Panel Inferior) muestra un histograma de distribución de citometría de flujo para la expresión de HLA-G en la misma línea de hESC, que muestra nuevamente la expresión persistente del transgén eHLA-G en ambos pases en cultivos 6 y 16.

La Figura 9A (Panel Superior) muestra los histogramas de distribución de citometría de flujo para la expresión total (intracelular) de HLA-G en el tipo silvestre (histograma izquierdo), GFP modificada (histograma del medio) y hESC eHLA-G(EF-1α)-GFP modificadas (histograma derecho). (Panel Inferior) muestra histogramas de distribución de citometría de flujo para la expresión de superficie de HLA-G en células tipo silvestre (histograma izquierdo), GFP modificadas (histograma del medio) y hESC eHLA-G(EF-1α)-GFP modificada (histograma derecho). La Figura 9B (Panel Superior) muestra un histograma de distribución de citometría de flujo para la expresión total de HLA-G en las hESC eHLA-G(MSCV)-GFP modificadas. La Figura 9B (Panel Inferior) muestra la expresión de superficie de HLA-G en las hESC eHLA-G(MSCV)-GFP modificadas. Estos datos indican que HLA-G es altamente expresado cuando el transgén se une operativamente al promotor EF-1α, en contraste, la expresión es mínima cuando el transgén está bajo el control del promotor MSCV. Ver además la Figura 15 para datos adicionales que muestran que la expresión del transgén HLA-G está influenciada significativamente por la actividad del promotor.

La Figura 10 muestra que la expresión de HLA clase I y clase II es similar en las células de tipo silvestre y en las hESC eHLA-G⁺. La tabla compara los niveles de expresión de diversas variantes de HLA y de microglobulina β2 en hESC de tipo silvestre versus hESC HLA-G modificadas.

La Figura 11 muestra que el efecto de citotoxicidad inducido por NK92 se suprime en gran medida por las hESC eHLA-G⁺. (véase el Ejemplo 6 para una descripción adicional). La figura muestra un gráfico de barras que ilustra los resultados de un ensayo de citotoxicidad de células NK92. Los valores de 1:10 y 1:30 indican la relación del efector (NK92) a las células diana (control de células silvestre transgénicas de GFP solo, o células modificadas con el transgén eHLA-G-GFP). Este es un ensayo *in vitro* para determinar la inmunogenicidad de hESC eHLA-G modificadas (barras negras; eHLA-G-GFP) en comparación con las hESC de tipo silvestre (barras grises; GFP). Las hESC eHLA-G modificadas exhiben una citotoxicidad sustancialmente disminuida en la presencia de las células NK92 en comparación con el caso de las hESC de tipo silvestre. Estos datos indican que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar capacidades mejoradas de donante para tales células modificadas genéticamente, ya que la citotoxicidad disminuida en la presencia de células NK92 muestra que tales células modificadas genéticamente tienen inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos. Ver Ejemplo 6 para descripción adicional.

La Figura 12 muestra una serie de gráficos de barras que representan el curso temporal de los niveles de expresión génica de diversos marcadores de pluripotencia y marcadores de progenitores epidérmicos durante la diferenciación dirigida de las hESC *in vitro* en los progenitores epidérmicos embrionarios (EEP). Los valores del eje y son niveles de expresión relativos de ARNm determinados por RT-PCR semicuantitativa. Los valores del eje x son los días en que se evaluó la expresión. Ver Ejemplo 2 para descripción adicional. Los datos de la Figura 12 indican que los marcadores de diferenciación epidérmica K14, Tap63, y ΔNp63 se mejoraron gradualmente durante la diferenciación. En los datos que no se muestran en la presente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia de K14 y marcadores epidérmicos adicionales p63, CD29, y CD49f. Las células hEEP eHLA-G(EF-1α)-GFP diferenciadas fueron positivas para la expresión de las proteínas K14, p63, CD29 y CD49f, como se indica mediante la inmunofluorescencia.

La Figura 13 (Panel Superior) muestra el curso temporal de la expresión del transgén eHLA-G en una línea hESC transfectada de manera estable con el promotor EF-1 α que dirige la expresión de eHLA-G. (Panel Inferior) muestra una comparación del curso del tiempo (las barras negras indican el día 0; las barras horizontales a rayas a los 7 días; y las barras grises a los 14 días); de la expresión de HLA-G (ARNm) en una línea de hESC GFP modificada (control negativo), una línea de hESC eHLA-G dirigida por el promotor MSCV, y en una línea de hESC eHLA-G dirigida por EF-1 α . Observe el nivel más alto y más persistente de la expresión de eHLA-G dirigida por el promotor EF-1 α .

Figura 14 (Efecto del polimorfismo de inserción/eliminación en K562-HLA-G1 de 14 pares de bases (pb) sobre la actividad citotóxica de las células NK). La figura muestra un gráfico de barras que compara la citotoxicidad mediada por células NK (% de lisis específica) en células de tipo silvestre K562 (barras grises), células K562 que expresan una variante de HLA-G con una inserción de 14 pb en la UTR 3' (Ins14bp) (barras negras), y células K562 que expresan una variante de HLA-G con una eliminación de 14 pb en la UTR 3' (Del14bp) (barras grises). Hay cuatro conjuntos de datos con diferentes relaciones de efectores (células NK) a las células diana (células K562).

La Figura 15 proporciona datos que indican que la expresión del transgén HLA-G es influenciada significativamente por la actividad del promotor. La RT-PCR muestra que tanto los transcritos de GFP como los de HLA-G se expresaron altamente en las líneas celulares hESC eHLA-G (EF-1 α)-GFP. La inmunofluorescencia muestra, además, que tanto las proteínas GFP como HLA-G se expresaron altamente en líneas celulares hESC HLA-G (EF-1 α)-GFP (no mostrados en la presente). Aunque, los transcritos o proteínas de HLA-G rara vez se detectaron en las líneas hESC HLA-G (pMSCV)-GFP-hESC, ya sea por RT-PCR o por inmunofluorescencia, incluso la expresión de GFP fue alta en estas células. (Datos no mostrados en la presente). Por lo tanto, los promotores de EF-1 α son preferidos en determinadas realizaciones de la expresión del transgén HLA-G.

Figura 16. Las hEEP purificadas mostraron una morfología homóloga de queratinocitos como se muestra mediante microscopía de contraste de fase. Los clones 18 y 21 de hEEP eHLA-G-GFP se diferenciaron de las hESC eHLA-G(EF-1 α)-GFP modificadas como se describió en el Ejemplo 2.

Figura 17. La estabilidad del transgén HLA-G en las hEEP diferenciadas se confirmó mediante citometría de flujo. Tanto la expresión total de HLA-G (paneles superiores) como la expresión de superficie (paneles inferiores) fueron robustas para los hEEP eHLA-G(EF-1 α)-GFP diferenciadas (más del 90 % de las células) en comparación con las células control sin HLA-G exógena (hEEP solo GFP) y hEEP de tipo silvestre.

Figura 18. Los resultados de la Figura 11 se repitieron y se confirmaron en experimentos adicionales de citotoxicidad de NK. Como se demostró, la destrucción de las hESC eHLA-G(EF-1 α)-GFP se redujo en más del 100 % en comparación con las hESC de control que contienen solo un transgén GFP (sin transgén HLA-G). (Nota: como se usa en la presente descripción, un transgén "mHLA-G(EF-1 α)-GFP" es sinónimo de "eHLA-G(EF-1 α)-GFP".) Estos datos muestran que la expresión del transgén HLA-G imparte características inmunosupresoras y/o de inmunogenicidad disminuida en las hESC. Ver ejemplo 6 para descripción adicional.

Figura 19. Se realizaron experimentos de citotoxicidad de NK en las hEEP diferenciadas a partir de hESC. Como se demostró, la destrucción de las hEEP eHLA(EF-1 α)-GFP se redujo bastante más del 100 % (aproximadamente 3 veces) en comparación con las hEEP de control. Este dato muestra que la expresión del transgén HLA-G imparte características inmunosupresoras y/o de inmunogenicidad disminuida en células diferenciadas, que muestra, además, que estas características mejoradas de evasión inmunitaria funcional de la expresión de HLA-G a través del transgén eHLA-G sobrevivieron al proceso de diferenciación dirigida. Ver Ejemplo 6 para descripción adicional.

La Figura 20 muestra los resultados de aloinjertos de hESC en ratones humanizados. Las hESC "G0" fueron las hESC control de tipo silvestre que no contienen un transgén eHLA-G, sino más bien solo GFP. "mG1(#1)" y "mG1(#2)" se refieren a dos clones diferentes de hESC eHLA-G(EF-1 α)-GFP nucleofectados. Los tumores G0, mG1(#1), y mG1(#2) como se muestran, se midieron y pesaron. Las hESC G0 formaron un tumor con un volumen de 126.9 milímetros cúbicos y un peso de 32 miligramos. Las hESC mG1(#1) formaron un tumor con un volumen de 748.4 milímetros cúbicos y un peso de 318 miligramos. Las hESC mG1(#2) formaron un tumor con un volumen de 1116.7 milímetros cúbicos y un peso de 675 miligramos. Ver Ejemplo 7 para descripción adicional.

La Figura 21 muestra los resultados promediados de tumores de aloinjertos de hESC en cinco ratones NSG humanizados. El panel superior muestra los resultados del peso del tumor (mg). El panel inferior muestra los resultados del volumen del tumor (milímetros cúbicos). Los datos muestran que las hESC HLA-G ("mG1") nucleofectadas formaron tumores mucho más grandes (más de 3 veces por volumen) y más pesados (más de 2 veces por peso) que las hESC de tipo silvestre ("G0") trasplantadas en ratones NSG humanizados. Esto indica que la expresión del transgén HLA-G puede proporcionar una inmunogenicidad disminuida y/o un aumento de la inmunosupresión en un ambiente de aloinjerto humano (es decir, los ratones humanizados con NSG). Estos datos, junto con los estudios de citotoxicidad de NK92, sustentan la aplicación general de los constructos del transgén eHLA-G descritos en la presente descripción para modificar cualquier tipo de célula conveniente en un donante alogénico superior o universal para la terapia, trasplantes, reparación de tejidos, sustitutos de células y tejidos, y similares. Ver Ejemplo 7 para descripción adicional.

Figura 22. Los fibroblastos dérmicos humanos transfectados de manera estable con el transgén eHLA-G(EF-1 α)-GFP (células "HFD-m1-GFP") o con el constructo de control GFP-solo (células "HFD-G0-GFP") se evaluaron por su capacidad para inhibir la proliferación de PBMC. Como se demostró, el clon HFD-mG1-GFP "mG1-R1" suprimió más la proliferación de PBMC que los controles y que otros clones, lo que indica que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar inmunosupresión en células diferenciadas, tales como los fibroblastos. Ver Ejemplo 9 para descripción adicional, que incluye un resumen de los estudios de citotoxicidad de NK-92 con HFD-m1-GFP y controles, que muestran que la modificación de eHLA-G en los fibroblastos dérmicos disminuye su inmunogenicidad. Por lo tanto, estos datos sustentan adicionalmente el uso de los constructos del transgén eHLA-G descritos en la presente descripción para modificar cualquier tipo de célula conveniente, ya sea pluripotente, multipotente, o totalmente diferenciada, en una célula donante alogénica universal o superior para la terapia, trasplantes, reparación de tejidos, sustitutos de células y tejidos, y similares.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere a células de mamíferos modificadas genéticamente que expresan de manera persistente HLA-G exógena (células HLA-G modificadas), así como también a composiciones de ácido nucleico para generar tales células de mamíferos modificadas genéticamente. Las modificaciones genéticas eHLA-G descritas en la presente descripción proporcionan las células con características de inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada, de manera que esas células tienen la promesa de ser células donantes universales o mejoradas para trasplantes, regeneración o reconstrucción celular y de tejidos, y otras terapias.

I. Composiciones:

A. Células de Mamíferos Modificadas Genéticamente que expresan HLA-G exógena

Como se describe en la presente descripción, pueden generarse una amplia diversidad de tipos de células de mamíferos que expresan HLA-G exógena (células HLA-G modificadas). Tales tipos celulares incluyen, pero no se limitan a, células madre pluripotentes inducidas (por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas humanas), células madre multipotentes, células progenitoras epidérmicas, células madre mesenquimatosas, células progenitoras pancreáticas β , células pancreáticas β , células progenitoras cardíacas, cardiomiocitos, células progenitoras hepáticas, hepatocitos, células progenitoras de músculo, células de músculo, células de riñón, osteoblastos, células progenitoras hematopoyéticas, células de folículos dentarios, células del folículo piloso, células epiteliales pigmentarias de la retina, células madre nerviosas, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células del oído interno, y fibroblastos (que incluyen fibroblastos dérmicos humanos (HFD)). En algunas realizaciones, las células HLA-G modificadas no son células que tienen un tipo de célula del sistema inmunitario. Tales células de mamíferos pueden derivarse de una de numerosas especies que incluyen, por ejemplo, humana, ratón, rata, mono, o cerdo. En esencia, cualquier tipo celular puede transfectarse con los constructos descritos en la presente descripción y después evaluarse para la expresión de HLA-G y como tal expresión puede impartir inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada a la célula modificada.

En algunas realizaciones, para obtener una población sustancialmente enriquecida de células HLA-G modificadas de un tipo celular conveniente, una línea de células madre pluripotente modificada genéticamente, tal como una línea de células madre pluripotente inducida humana, o cualquier línea celular que tiene características multipotentes que incluyen las células madre mesenquimatosas y las células progenitoras del sistema inmunitario que expresan HLA-G, se generan y después se someten a una diferenciación dirigida para obtener una población celular que expresa HLA-G y que es sustancialmente enriquecida para un tipo celular conveniente. En algunas realizaciones, la población sustancialmente enriquecida incluye al menos aproximadamente 2 % a aproximadamente 100 % del tipo celular conveniente, por ejemplo, al menos aproximadamente 3 %, 4 %, 5 %, 7 %, 8 %, 10 %, 20 %, 22 %, 25 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, u otro porcentaje del tipo celular conveniente de al menos aproximadamente 2 % a aproximadamente 100 %. Los métodos para el enriquecimiento celular de un tipo celular conveniente son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente U.S. 12/532,512.

Las líneas de células madre pluripotentes o multipotentes de mamíferos modificadas genéticamente, por ejemplo, células madre pluripotentes humanas inducidas, etcétera, y además, mamíferos modificados genéticamente completamente diferenciados, que expresan de manera estable una proteína HLA-G codificada por uno de los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción se generan por cualquiera de un número de métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la línea celular se modifica genéticamente mediante la transfección estable con uno o más vectores de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un vector plásmido o un vector de minicírculo) que incluyen un casete de expresión para la expresión de una proteína HLA-G como se describe en la presente descripción, un marcador de selección, y opcionalmente una proteína reportera. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados codificados por tales vectores incluyen proteínas que confieren resistencia a un agente de selección. Tales proteínas y sus correspondientes agentes de selección incluyen, sin limitación, puromicina N-acetiltransferasa (puromicina), higromicina fosfotransferasa (higromicina), blasticidina-S-desaminasa (blasticidina), y neomicina fosfotransferasa (neomicina). La selección con el agente de selección apropiado puede durar al menos aproximadamente 3 a aproximadamente 14 días, por ejemplo, aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 u otro período de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 días hasta que las colonias resistentes son visibles.

Los ejemplos de proteínas reporteras fluorescentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, EGFP y sus variantes, tales como YFP, Cian, y dEGFP; DS-Rojo, Naranja monomérico, la proteína fluorescente rojo lejano "Katushka" (Shcherbo y otros (2007), *Nat Methods*, 4:741-746), o variantes de cualquiera de las anteriores. En otras realizaciones, el reportero es una enzima que convierte un sustrato que, en el proceso, produce una señal detectable, por ejemplo, una señal fluorescente o luminiscente en la presencia de un sustrato fluorogénico o luminogénico, respectivamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enzima marcadora de selección comprende la secuencia de aminoácidos de una luciferasa, por ejemplo, una luciferasa de luciérnaga, luciferasa de escarabajo de resorte, o luciferasa de Renilla. La actividad de la luciferasa puede detectarse proporcionando un sustrato luminogénico apropiado, por ejemplo, luciferina de luciérnaga para luciferasa de luciérnaga o celenterazina para luciferasa de Renilla. La actividad de la luciferasa en presencia de un sustrato apropiado puede cuantificarse mediante luminometría para evaluar la actividad total de la luciferasa de las poblaciones de células completas en los pocillos de la placa de cultivo, o, alternativamente, la actividad de la luciferasa de las células o colonias individuales puede detectarse mediante el uso de un microscopio en combinación con una cámara fotónica contadora. Los detalles de los ensayos de luciferasa, que incluyen los métodos de alto rendimiento, se describen en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. núms. 5,650,135, 5,744,320, and 6,982,431. En otras realizaciones, la enzima reportera comprende la secuencia de aminoácidos de una beta-lactamasa modificada, cuya expresión puede detectarse y cuantificarse en células vivas mediante un ensayo de fluorescencia radiométrico para la descomposición de sustratos de β -lactama fluorogénicos como se describe en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 5,741,657, 6,031,094, y la publicación de la patente de los EE.UU. núm. 20070184513. Para una revisión ver, además, Qureshi (2007), *Biotechniques*, 42(1):91-96. Otras enzimas reporteras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la hidrolasa Halo-Tag® (Promega, Madison, Wis., como se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. núm. 7,238,842 y en las publicaciones de patentes núms. 20080026407 y 20080145882) y la beta galactosidasa.

En algunas realizaciones, las células de mamífero modificadas genéticamente, además, se modifican genéticamente para expresar una microglobulina $\beta 2$ humana (número de registro de GenBank AY187687.1). Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que la expresión de la microglobulina $\beta 2$ humana potenciará la expresión superficial de HLA-G transgénica en las células de mamíferos modificadas genéticamente.

En algunas realizaciones, el vector de expresión de ácido nucleico es un vector de transposón que incluye elementos de transposición que facilitan la integración de la transposición del vector de transposón en un genoma huésped cuando se introduce en una célula huésped en la presencia de una transposasa afín (por ejemplo, la transposasa piggyBAC), como se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente U.S. No. 12/728,943. Los vectores de expresión de transposón (por ejemplo, los vectores PiggyBac), así como también los vectores de expresión de transposasa, están disponibles comercialmente en, por ejemplo, System Biosciences (Mountain View, CA). En algunas realizaciones, cuando se usa un vector de transposón, no es necesario un marcador de selección o casete de expresión de proteína reportera para generar una línea celular HLA-G modificada transfectada de manera estable, ya que la eficiencia de la transfección mediante tales vectores es lo suficientemente alta para obviar la necesidad para un marcador de selección. Alternativamente, el vector de expresión puede ser un vector de direccionamiento, que permite la integración sitio específica del transgén eHLA-G en el genoma de la célula huésped. El diseño y el uso de vectores de direccionamiento son rutinarios en la técnica como se ejemplifica en la patente de los EE.UU. núm. 5,464,764.

Los métodos para la preparación de vectores de expresión de ácido nucleico con calidad para transfección y los métodos de transfección están bien establecidos. Ver, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3ra Ed, (CSHL Press); and *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (2005), 9.1-9.14. Los ejemplos de métodos de transfección de alta eficiencia incluyen "nucleofección", como se describe en, por ejemplo, Trompeter (2003), *J Immunol. Methods*, 274(1-2):245-256, y en las patentes U.S. Nos. 7,332,332, 8,003,389; 8,039,259, y 8,192,990 9, la transfección con reactivos de transfección basado en lípidos tales como Fugene® (Roche), DOTAP, y Lipofectamine™ (Invitrogen).

En otras realizaciones, las células modificadas genéticamente, por ejemplo, líneas de células madre diferenciadas, multipotentes, o pluripotentes, se generan mediante la transducción con un virus recombinante. Los ejemplos de virus recombinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, retrovirus (que incluyen los lentivirus); adenovirus; y virus adenoasociados. Con frecuencia, el retrovirus recombinante es el virus de la leucemia moloney murina (MMLV), pero pueden usarse, además, otros retrovirus recombinantes, por ejemplo, el Virus de la Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina (MLV), el Virus que induce focos en las células Mink, el Virus del Sarcoma Murino, virus de la Retículoendoteliosis, Virus de la Leucemia del Mono Gibbon, Virus del Mono Mason Pfizer o Virus del Sarcoma de Rous, ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Núm. 6,333,195.

En otros casos, el retrovirus recombinante es un lentivirus (por ejemplo, Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1); Virus de Inmunodeficiencia de Simio (SIV); o Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV), ver, por ejemplo, Johnston y otros, (1999), *Journal of Virology*, 73(6):4991-5000 (FIV); Negre y otros, (2002), *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 261:53-74 (SIV); Naldini y otros, (1996), *Science*, 272:263-267 (HIV).

El retrovirus recombinante puede comprender un polipéptido viral (por ejemplo, env retroviral) para ayudar a la entrada en la célula diana. Tales polipéptidos virales están bien establecidos en la técnica, ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Núm. 5,449,614. El polipéptido viral puede ser un polipéptido viral anfotrópico, por ejemplo, anfotrópico env, que ayuda a la entrada en células derivadas de múltiples especies, que incluyen las células diferentes de las especies huéspedes originales. Ver, por ejemplo, id. El polipéptido viral puede ser un polipéptido viral xenotrópico que ayuda a la entrada en las células que incluyen las células diferentes de las especies huéspedes originales. Ver, por ejemplo, id. En algunas realizaciones, el polipéptido viral es un polipéptido viral ecotrópico, por ejemplo, ecotrópico env, que ayuda a la entrada en las células de las especies huéspedes originales. Ver, por ejemplo, id.

La transducción viral de las células puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, Palsson, B., y otros, (1995), WO95/10619; Morling, F. J. y otros, (1995), Gene Therapy, 2:504-508; Gopp y otros, (2006), Methods Enzymol, 420:64-81. Por ejemplo, la infección puede lograrse mediante una infección por centrifugación o métodos de "espinoculación" que involucran someter las células a una centrifugación durante el período próximo a la adición del virus a las células. En algunos casos, el virus puede concentrarse antes de la infección, por ejemplo, mediante ultracentrifugación.

La multiplicidad de infección (m.o.i.) que se usa para transducir las células para ser modificadas genéticamente puede variar desde aproximadamente 1 m.o.i. a aproximadamente 50 m.o.i., por ejemplo, aproximadamente 1 m.o.i., aproximadamente 5 m.o.i., aproximadamente 7,5; m.o.i., aproximadamente 10 m.o.i., aproximadamente 15 m.o.i., aproximadamente 20 m.o.i., aproximadamente 30 m.o.i., aproximadamente 40 m.o.i., o aproximadamente 50 m.o.i.;

Los métodos para generar diversos tipos de células a partir de células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes humanas inducidas) mediante diferenciación dirigida son conocidos en la técnica, como se describe en, por ejemplo, las patentes U.S. Nos. 7,955,849, 7,763,466, 7,264,968; y las solicitudes de patentes U.S. Nos. 12/179,462, y 12/187,543.

En una realización ilustrativa, los progenitores epidérmicos embrionarios humanos (hEEP) se derivan de una línea de células madre pluripotente humana, por ejemplo, células madre pluripotentes humanas inducidas de la manera siguiente.

Las células madre pluripotentes se mantienen en medio de crecimiento de células madre embrionarias (ESC) que contiene DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero de reemplazo inactivado 20 %, aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM, GlutaMax 1 mM, β -mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mM. El medio de crecimiento de ESC está acondicionado para sembrar los fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente (MEF) (CF-1, ATCC) a una densidad de 5×10^4 células/cm² y se incuban durante 18-24 horas. Después del acondicionamiento, se adiciona bFGF 4 ng/mL y se filtra de forma estéril el medio acondicionado completo. Las hESC se subcultivan cada 5-6 días (en una proporción de 1:3 o 1:4) en placas recubiertas con Matrigel® (BD Biosciences) mediante el uso de Dispasa 1 mg/mL para eliminar las colonias celulares. La diferenciación de hEEP de células madre pluripotentes en hEEP K14⁺/p63⁺, mediante el primer cultivo de las células madre pluripotentes en placas de 6 pocillos durante 4 días en medio de crecimiento de ESC y después se cambia a medio de diferenciación 2 mL/pocillo, que comprende el medio de crecimiento no condicionado de hESC que contiene ácido retinoico todo trans 1 μ M (Sigma) y BMP4 25 ng/mL. Después del cambio de medio diariamente durante 7 días, las células se tratan con dispasa, se centrifugan y se suspenden en medio definido de queratinocitos sin suero (DSFM) y se siembran en placas recubiertas de gelatina en una proporción de 1:3. El DSFM se cambiará en días alternos durante 3-4 semanas. Después, las células se subcultivan mediante el uso de tripsina, se centrifugan, se lavan y se siembran en placas de cultivo de tejidos a 10 000 células por cm² recubiertas con gelatina en DSFM. Para verificar que las monocapas epiteliales tengan una pureza de ≥ 90 % y expresen K14, las células se someten a citometría de flujo de acuerdo con el método de Metallo y otros (2010), Methods Mol Biol 585:83-92. Para mejorar la pureza de las células hEEP aisladas, las células se clasificaron mediante el uso de la clasificación celular activada magnéticamente (MASC) con anticuerpos CD29. Aproximadamente el 92 por ciento de las células hEEP en cultivo de células clasificadas por CD29 MASC diferenciadas a partir de hESC eHLA-G(EF-1 α)-GFP modificadas, fueron positivas para K14, un marcador específico de queratinocitos.

Las células de mamífero modificadas genéticamente que expresan eHLA-G transgénico, como se describe en la presente descripción, tienen una inmunogenicidad disminuida en relación con las células de mamífero correspondientes que no expresan HLA-G. Por ejemplo, la inmunogenicidad puede disminuirse en al menos aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 %, con relación a al tipo celular correspondiente que no expresa HLA-G exógena, por ejemplo, aproximadamente 6 %, 7 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 65 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, u otro porcentaje de inmunogenicidad con relación a células del mismo tipo celular que no expresa HLA-G exógena.

Los métodos para determinar la inmunogenicidad de las células son conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células de mamífero HLA-G modificadas (por ejemplo, células que ya están completamente diferenciadas antes de la modificación, etcétera) o células de mamífero sin modificar se cultivan en la presencia de una línea de células asesinas naturales alógenicas (por ejemplo, NK-92) y después se determina la citotoxicidad para las células HLA-G modificadas frente a las no modificadas inducidas por las células NK-92 mediante cualquiera de una serie de ensayos de viabilidad celular estándar.

Ácidos Nucleicos que Contienen el Transgén HLA-G (eHLA-G) Mejorado

Los ácidos nucleicos aislados (por ejemplo, los vectores de expresión de plásmidos de mamíferos) que se usan para generar células de mamíferos HLA modificadas, como se describe en la presente descripción, contienen un transgén HLA-G "eHLA-G" mejorado que dirige una mayor expresión de superficie celular y/o secreción de HLA-G con relación a la expresión de superficie celular dirigida por un transgén HLA-G de tipo silvestre. Tal transgén incluye, típicamente, al menos tres componentes distintos: un promotor y una secuencia de la región no traducida 5' (5' UTR); una secuencia codificante; y una secuencia de la región no traducida 3' (3' UTR).

En algunas realizaciones, el promotor para usarse para dirigir la expresión del transgén eHLA-G es uno capaz de dirigir la expresión del transgén eHLA-G en un tipo celular de interés durante un período de al menos aproximadamente siete semanas a aproximadamente 50 semanas, por ejemplo, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 15 semanas, 20 semanas, 25 semanas, 30 semanas, 35 semanas, 40 semanas, 42 semanas, 45 semanas, 47 semanas, 48 semanas, u otro período al menos aproximadamente siete semanas a aproximadamente 50 semanas. Los promotores capaces de dirigir la expresión durante períodos tan prolongados de tiempo son efectivos para evadir el silenciamiento que se produce en numerosos tipos celulares, que incluyen, por ejemplo, las células madre tales como células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas o células madre mesenquimatosas.

Los promotores adecuados resistentes al silenciamiento incluyen, pero no se limitan a, el promotor del factor 1 alfa de elongación de hámster chino (CHEF-1 α) (véase Running Deer y otros (2004), Biotechnol. Prog., 20:880-889; y Núm. de Acceso al GenBank AY188393.1), la variante del promotor M-U3/R del promotor del Virus de Células Madre Murino (MSCV) (como se describe en Swindle y otros (2004), J Biol Chem, 279:34-41), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor de la β -actina humana, y el promotor de la ubiquitina C.

En algunas realizaciones, el promotor usado para dirigir la expresión de un transgén eHLA-G se expresa en uno o más tipos de células convenientes a un nivel que es más alto que en otros tipos celulares. Un experto en la técnica apreciará que, por ejemplo, cuando una célula madre HLA-G modificada va a diferenciarse en un tipo de célula particular, puede ser ventajoso seleccionar un promotor que sea activo dentro o incluso selectivo para ese tipo celular particular. Por ejemplo, para un promotor selectivo del tipo de tejido o célula dado, el nivel de expresión puede ser aproximadamente de dos a 100 veces más alto en el tipo celular conveniente en comparación con otro tipo celular, por ejemplo, aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, u otro nivel de expresión más alto en el tipo celular conveniente en comparación con otro tipo celular. Los ejemplos de promotores selectivos del tipo de tejido o célula incluyen, pero no se limitan a, los promotores para: Enolasa Específica de Neuronas (neuronal), Sinapsina (neuronal), CamKII (neuronas del cerebro anterior), HB9 (neuronas motoras), y Transportador de Dopamina (neuronas dopaminérgicas); Proteína Ácida Fibrilar de la Glía (astrocitos); Albúmina (hígado); Cadena Pesada de α -Miosina (α MHC-cardiomiocitos); Neurogenina 3 y Caja Homeótica 1 Páncreas-Duodeno (páncreas); Queratina 14 (piel); y Bestrofina 1 (epitelio pigmentario de la retina);

Típicamente, la secuencia del transgén eHLA-G codifica una proteína HLA-G que contiene al menos una a aproximadamente diez mutaciones puntuales con relación a la secuencia consenso de humano (GenBank Núm. NP_002118.1), o de chimpancé, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mutaciones puntuales en relación con las secuencias consenso de la proteína HLA-G mencionadas anteriormente.

La secuencia consenso humano de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) se muestra más abajo:

**MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVD
DTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTL
RGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSW
TAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMQLRADPP
KTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGD
GTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGL
VVLAAVVTGA AVAVLWRKKSSD**

En algunas realizaciones, el al menos una a aproximadamente diez mutaciones puntuales aumentan el nivel de expresión de la proteína HLA-G en la superficie celular de la célula huésped que la expresa mediante la disminución de la retención de HLA-G en el retículo endoplásmico durante el procesamiento y maduración de la proteína. Tales mutaciones incluyen, por ejemplo, una mutación en el motivo "KK" de HLA-G. Ver, por ejemplo, Park y otros (2001), Immunity, 15:213-224. En algunos casos, la mutación del motivo KK incluye una mutación K334A, una mutación K335A o ambas mutaciones de sustitución. En otros casos, la sustitución puede hacerse con un aminoácido alifático diferente (por ejemplo, leucina) u otro tipo del tipo de aminoácido que no sea básico.

En un ejemplo, la proteína HLA-G codificada tiene la secuencia de aminoácidos de la (SEQ ID NO:2), en la que se introdujeron las sustituciones K334A y K335A, con relación a la secuencia de tipo silvestre, (subrayadas):

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVD
DTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTL
RGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSW
TAADTAAQISKRKCEAAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMQLRADPP
KTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEILTQWRDGEDQTQDVELVETRPAGD
GTFQKWA⁵AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGL
VVLAAVVTGA⁵AVAVLWRA⁵ASSD

En algunas realizaciones, un transgén eHLA-G codifica una proteína HLA-G cuya secuencia de aminoácidos es al menos 75 % a 100 % idéntica a esa de la SEQ ID NO:2, por ejemplo, 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 87 %, 88 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, u otro porcentaje idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

El transgén eHLA-G divulgado en la presente descripción incluye, además, una región no traducida 3' (3' UTR) que contiene una serie de elementos reguladores que afectan la eficiencia de la expresión/traducción de los transcritos de HLA-G. En algunas realizaciones, la secuencia 3' UTR del transgén de eHLA-G es una secuencia de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75% idéntica a la secuencia de (SEQ ID NO: 3), por ejemplo, al menos 77%, 80 %, 82%, 85%, 87%, 88%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97% u otro porcentaje idéntico a la secuencia 3' UTR de HLA-G (SEQ ID NO : 3):

TGTGAAACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGTCCCTTTG
TGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTGTGCAGAGACCAGCCCAA
CCCTGTGCCCACCATGACCCTCTTCCTCATGCTGAACTGCATTCCT
TCCCCAATCACCTTTCCTGTTCCAGAAAAGGGGCTGGGATGTCTC
CGTCTCTGTCTCAAATTTGTGGTCCACTGAGCTATAACTTACTTCT
GTATTAAAATTAGAATCTGAGTG

Tales secuencias contienen mutaciones (subrayadas) que disminuyen la unión de dos sitios de unión de microARN que resulta en un aumento de la expresión del transgén que codifica HLA-G. Estas secuencias incluyen una delección de una secuencia de 14 pares de bases presente en el exón 8 de algunos alelos de HLA-G. Esta secuencia de 14 pares de bases se muestra más abajo como la SEQ ID NO NO:4; SEQ ID NO:4 14-bp secuencia de inserción en UTR 3' de HLA ATTTGTTTCATGCCT

SEQ ID NO:5, más abajo, se corresponde a la SEQ ID NO:3 con la inserción de esta secuencia de 14 pares de bases (minúscula):

SEQ ID NO:5 (variante UTR 3'+14 BP HLA-G)

TGTGAAACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGatttgttcatgcct
TCCCTTTGTGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTGTGCAGAGACCA
GCCCAACCCTGTGCCCACCATGACCCTCTTCCTCATGCTGAACTGC
ATTCCTTCCCCAATCACCTTTCCTGTTCCAGAAAAGGGGCTGGGAT
GTCTCCGTCTCTGTCTCAAATTTGTGGTCCACTGAGCTATAACTTAC
TTCTGTATTAAAATTAGAATCTGAGTG

Se ha informado de que los alelos HLA-G que tienen una UTR 3' que incluye la inserción de 14 bases mencionada anteriormente (véase SEQ ID NO:4), producen un transcrito de ARNm de HLA-G más estable. Ver Rousseau y otros (2003), Human Immunology, 64:1005-1010. Sorprendentemente, como base para algunas realizaciones de la presente divulgación, se encontró inesperadamente que la expresión del alelo con una delección de 14 pares de bases (mostrada en la SEQ ID NO:3) parecía ser más inmunoprotectora que el alelo que incluye la inserción de 14 pares de bases. Ver la Figura 13. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que el efecto de la delección de 14 pb en los niveles de expresión de HLA-G puede ser específico del tipo de célula, por ejemplo, la delección de 14 pb aparentemente mejora la expresión de eHLA-G en células humanas, que incluyen, al menos hESC, hEEP, y células fibroblastos dérmicos humanas.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que contiene el transgén eHLA-G incluye, además, secuencias aisladoras que flanquean el casete de expresión eHLA-G. Las secuencias aisladoras mitigan los efectos de posición genómica que podrían afectar falsamente la expresión de un casete de expresión exógeno integrado. En algunas realizaciones, las secuencias aisladoras a usar contienen la secuencia aisladora del núcleo de β -globina HS4 de pollo.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que contiene el transgén eHLA-G incluirá, además, un marcador de selección como se describe en la presente descripción. Opcionalmente, el ácido nucleico aislado que contiene el transgén eHLA-G puede contener, además, una proteína reportera como se describe en la presente descripción.

En algunas realizaciones, la generación de una línea celular eHLA-G modificada se genera mediante el uso de un vector de transposón que comprende un casete de expresión eHLA-G, pero no contiene casetes de expresión para un marcador de selección o una proteína reportera. El vector se introduce en las células que se modificarán junto con un vector de expresión de transposasa, seguido de una clonación por dilución limitante. Como la población de células transfectadas se modifica de manera muy eficiente, puede evitarse la necesidad de usar marcadores de selección o proteínas reporteras. Esta es una consideración importante, especialmente para las células que se usarán en el contexto de la terapia celular en pacientes humanos. El porcentaje de células que se modifica con éxito mediante los métodos de transfección estables basados en transposones puede variar entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 50 %, por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 7 %, 8 %, 15 %, 20 %, 22 %, 30 %, 40 %, u otro porcentaje de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 50 % de las células transfectadas.

En algunas realizaciones, la expresión de proteínas codificadas por un ácido nucleico que codifica dos o más proteínas es dirigida por promotores separados. En otras realizaciones, un casete de expresión policistrónico puede incorporar una o más secuencias del sitio de entrada ribosomal interno (IRES) entre los marcos abiertos de lectura incorporados en el casete de expresión policistrónico. Las secuencias IRES y su uso son conocidos en la técnica como se ejemplifica en, por ejemplo, Martínez-Salas (1999), Curr Opin Biotechnol, 10(5):458-464. Alternativamente, múltiples marcos abiertos de lectura pueden vincularse entre sí mediante una secuencia intermedia del péptido 2A del virus de la enfermedad fiebre aftosa (F2A) o secuencias similar a 2A de otros virus. Ver, por ejemplo, Hasegawa y otros (2007), Stem Cells, 25:1707-1712y Symczak y otros (2004), Nat Biotechnol, 589-594. La inclusión de la secuencia del péptido 2A permite la escisión postraducciona de un polipéptido contiguo que contiene eHLA-G y otras secuencias (por ejemplo, una secuencia de la proteína reportera o una secuencia de proteína marcador de selección) en proteínas separadas.

Si bien la identidad entre secuencias de aminoácidos relativamente cortas o secuencias de ácido nucleico puede determinarse fácilmente mediante inspección visual, el análisis con un algoritmo apropiado, que típicamente se facilita mediante un programa informático, se usa comúnmente para determinar la identidad entre secuencias más largas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia, típicamente, se introducen en una computadora, si es necesario posteriormente se designan coordenadas, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba(s) con relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros de programa designados. Una serie de algoritmos matemáticos para obtener rápidamente la alineación óptima y calcular la identidad entre dos o más secuencias son conocidos e incorporados en numerosos programas informáticos disponibles. Los ejemplos de tales programas incluyen los programas para el análisis de secuencia de aminoácidos MATCH-BOX, MULTAIN, GCG, FASTA, y ROBUST, y los programas para las secuencias de nucleótidos SIM, GAP, NAP, LAP2, GAP2, y PIPMAKER. Los programas informáticos de análisis preferidos para el análisis de las secuencias de aminoácidos y polinucleótidos incluyen los programas ALIGN, CLUSTALW (por ejemplo, versión 1.6 y versiones posteriores de estos), y los programas BLAST (por ejemplo, BLAST 2.1, BL2SEQ, y versiones posteriores de estos).

"Identidad" (en ocasiones denominada "identidad general", en contraste con la "identidad local", que se describe más adelante en la presente descripción) con respecto a las secuencias de aminoácidos o nucleótidos se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o bases de nucleótidos, respectivamente, que son idénticas en las dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos cuando dos de tales secuencias de aminoácidos o dos de tales secuencias de nucleótidos están alineadas óptimamente entre sí. Si, en el alineamiento óptimo, una posición en una primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o residuo de nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos correspondiente, las secuencias exhiben identidad con respecto a esa posición del residuo. El nivel de identidad entre dos secuencias (o "porcentaje de identidad de

secuencia") se mide como una relación del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias con respecto al tamaño de las secuencias analizadas (es decir, porcentaje de identidad de secuencia=(número de posiciones idénticas/número total de posiciones).veces.100).

- 5 Además, se incluyen en la presente descripción los ácidos nucleicos que se hibridan específicamente en condiciones de rigurosidad baja, media o alta a una sonda de al menos 100 nucleótidos de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o a la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOS:3 o 5.

10 Las condiciones de hibridación de baja rigurosidad, como se usan en la presente descripción, incluyen, por ejemplo, la hibridación con una sonda de 100 nucleótidos de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 % de contenido de GC; a 42 °C en 2X SSC y SDS al 0,1 %. Las condiciones de hibridación de rigurosidad media incluyen, por ejemplo, a 50° C en 0,5X SSC y 0,1% SDS. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad incluyen, por ejemplo, la hibridación con la sonda mencionada anteriormente a 65 °C en 0,2X SSC y 0,1% SDS. En estas condiciones, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, se obtiene un ácido nucleico con una homología de secuencia superior.

15 Composiciones que Comprenden Células eHLA-G Modificadas Genéticamente

En la presente descripción se incluyen, además, composiciones farmacéuticas, composiciones tópicas, injertos celulares y tejidos artificiales que comprenden o que se generan mediante el uso de uno o más tipos de células de mamífero HLA-G modificadas. Como se muestra en la presente descripción, las hESC eHLA-G modificadas mostraron una expresión de HLA-G estable y persistente, incluso a través de la diferenciación dirigida en hEEP. Además, la expresión estable y persistente de HLA-G proporcionó a las células modificadas genéticamente una inmunogenicidad disminuida y o una inmunosupresión mejorada. Además, en la presente descripción se demuestra que los fibroblastos dérmicos humanos eHLA-G modificados, que son células totalmente diferenciadas, tienen además una expresión estable y persistente de HLA-G que proporciona inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada. Por lo tanto, los constructos de eHLA-G descritos en la presente descripción pueden usarse para generar células donantes universales de cualquier tipo, ya sea a partir de la diferenciación dirigida de una célula pluripotente o multipotente modificada genéticamente, o a partir de la modificación genética de una célula totalmente diferenciada.

30 En un aspecto, se proporciona una composición tópica para la regeneración o reparación de la piel que comprende una célula de fibroblasto dérmico modificado genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para inyección que comprende una célula de fibroblasto dérmico modificado genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona una composición para injerto de piel que comprende una célula de fibroblasto dérmico modificado genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona una composición para injerto de piel permanente que comprende una célula progenitora epidérmica embrionaria modificada genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción.

40 En otro aspecto, los supercántigos sintéticos biocompatibles para tejidos artificiales y los métodos para su generación se describen en la técnica y pueden usarse con las células HLA-G modificadas descritas en la presente descripción para producir un tejido artificial que tiene inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con los tejidos que contienen células que no expresan HLA-G exógeno. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 7,960,166 titulada "Composiciones y procesos microfabricados para ingeniería de tejidos que contienen múltiples tipos de células".

II. Métodos

Tratamiento mediante Terapia Celular

50 Debido a que las células modificadas para expresar de manera estable HLA-G exógena de la manera descrita en la presente descripción tienen inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión aumentada, estas características permiten que la célula modificada sirva como una célula o tejido donante universal o mejorado. Esto se debe a que la disminución de la inmunogenicidad y/o la mejora en la inmunosupresión, mediada por HLA-G, proporcionada a la célula pueden disminuir o eliminar el requisito de la coincidencia de las moléculas de clase I y clase II del antígeno leucocitario humano clásico (HLA) entre las células del donante y el receptor) para numerosas lesiones, enfermedades, o trastornos.

60 Por lo tanto, las células HLA-G modificadas que expresan de manera estable eHLA-G (y opcionalmente, además, la microglobulina $\beta 2$ humana exógena), como se describe en la presente descripción, pueden usarse como terapia. La terapia puede dirigirse al tratamiento de la causa de la enfermedad; o alternatively, la terapia puede ser para tratar los efectos de la enfermedad o afección. Las células modificadas genéticamente pueden transferirse a, o aproximarse a, un sitio lesionado en un sujeto; o las células pueden introducirse al sujeto de una manera que permita que las células migren, o se dirijan, al sitio lesionado. Las células transferidas pueden reemplazar ventajosamente las células dañadas o lesionadas y permitir una mejora en la condición general del sujeto. En algunos casos, las células

transferidas pueden estimular la regeneración o reparación de tejidos, que incluye la regeneración de la piel o la reparación de la piel.

En diversas realizaciones, las células de mamífero HLA-G modificadas (por ejemplo, células humanas HLA-G modificadas) se administran a un sujeto que padece de cualquiera de un número de afecciones que incluyen, pero que no se limitan enfermedad cardiovascular, enfermedad de los ojos (por ejemplo, degeneración macular), enfermedad auditiva, (por ejemplo, sordera), diabetes, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, osteoporosis, enfermedad del hígado, enfermedad del riñón, enfermedad autoinmune, artritis, enfermedad de las encías, una afección dental, o un trastorno proliferativo (por ejemplo, un cáncer). En otros casos, el sujeto padece de, o tiene un alto riesgo de padecer de, una afección de salud aguda, por ejemplo, infarto cerebral, lesión de la médula espinal, quemaduras, o una herida. En otros casos, el sujeto padece de la pérdida de tejidos tal como lipoatrofia o las pérdidas en el colágeno asociadas con el envejecimiento. En otros casos, el sujeto padece de una úlcera que no cicatriza, o necesita de un agente para ayudar en el cierre de defectos como la hipospadias y la epispadias. En otros casos, el sujeto necesita un injerto de piel temporal o permanente para la cicatrización de la herida o para sustituir la piel.

La divulgación proporciona un método universal de injerto celular o de tejido a un sujeto que lo necesite, el método comprende inyectar o injertar al sujeto una composición celular o tisular que comprende una población de células eHLA-G modificadas, en donde el sujeto tiene al menos una molécula de HLA clásica I o HLA de clase II no coincidente en comparación con la población de células eHLA-G modificadas, y en donde la población de células eHLA-G modificadas exhibe inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con células del mismo tipo sin la modificación de eHLA-G. La inmunogenicidad disminuida y/o la inmunosupresión mejorada pueden determinarse, por ejemplo, mediante la comparación de la célula eHLA-G modificada con una célula de control del mismo tipo sin la modificación eHLA-G en un ensayo de citotoxicidad de NK-92, un ensayo de crecimiento del tumor NSG humanizado, y/o un ensayo de proliferación de PBMC.

La divulgación proporciona un método para regenerar la piel a un sujeto que lo necesite, el método comprende inyectar una población de fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o los progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados a un sitio de lesión de la piel en el sujeto, en donde el sujeto tiene al menos una molécula clásica de HLA clase I o HLA clase II no coincidente en comparación con la población de fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados.

Los tipos de células HLA-G modificadas para administrarse a un sujeto que las necesite incluyen, pero no se limitan a, células progenitoras epidérmicas, células madre mesenquimatosas, células progenitoras pancreáticas β , células pancreáticas β , células progenitoras cardíacas, cardiomiocitos, células progenitoras hepáticas, hepatocitos, células progenitoras de músculo, células de músculo, células de riñón, osteoblastos, células progenitoras hematopoyéticas, células de folículos dentarios, células del folículo piloso, células epiteliales pigmentarias de la retina, células madre neural, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, o cualquier combinación de estas. Tales células de mamíferos pueden derivarse de una de numerosas especies que incluyen, por ejemplo, humana, ratón, rata, mono, o cerdo.

La terapia puede dirigirse al tratamiento de la causa de la enfermedad; o alternatively, la terapia puede ser para tratar los efectos de la enfermedad o afección. Las células HLA-G modificadas pueden transferirse a, o aproximarse a, un sitio lesionado en un sujeto; o las células pueden introducirse al sujeto de una manera que permita que las células migren, o se dirijan, al sitio lesionado. Las células transferidas pueden reemplazar ventajosamente las células dañadas o lesionadas y permitir una mejora en la afección general del sujeto. En algunos casos, las células transferidas pueden estimular la regeneración o reparación de tejidos.

Las células transferidas pueden ser células diferenciadas a partir de células madre pluripotentes HLA-G modificadas. Las células transferidas pueden ser células madre multipotentes diferenciadas a partir de células HLA-G modificadas, pluripotentes.

El número de administraciones de tratamiento a un sujeto puede variar. La introducción de células HLA-G modificadas y/o diferenciadas en el sujeto puede ser un evento único; pero en determinadas situaciones, tal tratamiento puede provocar una mejoría durante un período de tiempo limitado y requerir una serie continua de tratamientos repetidos. En otras situaciones, pueden requerirse múltiples administraciones de las células antes de que se observe un efecto. Como se apreciará por los expertos en la técnica, los protocolos de tratamiento exactos dependerán de la enfermedad o afección, y de la etapa de la enfermedad y de los parámetros del sujeto individual que se está tratando.

Las células HLA-G modificadas pueden introducirse en el sujeto a través de cualquiera de las siguientes vías: parenteral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratraqueal, intraperitoneal, o en el fluido espinal.

Las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en células y después transferirse a los sujetos que padecen de una amplia gama de enfermedades o trastornos.

Las células de los islotes pancreáticos (o las células primarias de los islotes de Langerhans) pueden trasplantarse a un sujeto que padece diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus, tipo 1), ver por ejemplo, Burns y otros, (2006) Curr.

Stem Cell Res. Ther., 2:255-266. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células beta pancreáticas derivadas de células HLA-G modificadas se trasplantan en un sujeto que padece diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus, tipo 1).

En otros ejemplos, las células hepáticas o las células madre hepáticas derivadas a partir de células HLA-G modificadas se trasplantan a un sujeto que padece de una enfermedad hepática, por ejemplo, hepatitis, cirrosis, o insuficiencia hepática.

Las enfermedades cardíacas degenerativas, tales como la miocardiopatía isquémica, la enfermedad de conducción, y los defectos congénitos, podrían beneficiarse de las terapias con células madre. Ver, por ejemplo, Janssens y otros, (2006), Lancet, 367:113-121.

Las células hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas (HSC) derivadas de células HLA-G modificadas pueden trasplantarse en un sujeto que padece de cáncer de la sangre, u otro trastorno sanguíneo o inmunológico. Los ejemplos de cánceres de la sangre que son potencialmente tratados con células hematopoyéticas o HSC incluyen: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica (CML), enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin. Con frecuencia, un sujeto que padece de tal enfermedad debe someterse a radiación y/o tratamiento quimioterapéutico para destruir las células sanguíneas que se dividen rápidamente. La introducción en estos sujetos de las HSC derivadas de células HLA-G modificadas puede ayudar a repoblar los reservorios de células depletados.

Los sujetos que padecen de enfermedades o trastornos neurológicos podrían beneficiarse especialmente de la terapia de células HLA-G modificada, especialmente cuando la barrera hematoencefálica puede haberse comprometido. En algunos enfoques, las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en células madre neurales o neuronas y después trasplantarse a un sitio lesionado para tratar una afección neurológica, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, infarto cerebral, lesión de la médula espinal, u otro trastorno del sistema nervioso central, ver, por ejemplo, Morizane y otros, (2008), Cell Tissue Res., 331(1):323-326; Coutts and Keirstead (2008), Exp. Neurol., 209(2):368-377; Goswami and Rao (2007), Drugs, 10(10):713-719.

Para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en neuronas que actúan mediante dopamina y después trasplantarse al cuerpo estriado de un sujeto con enfermedad de Parkinson. Para el tratamiento de la esclerosis múltiple, las células madre neurales pueden diferenciarse en oligodendrocitos o progenitores de oligodendrocitos, que después se transfieren a un sujeto que padece EM.

Para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno neurológico, un enfoque exitoso puede ser introducir células madre neurales al sujeto. Por ejemplo, para tratar la enfermedad de Alzheimer, el infarto cerebral o una lesión de la columna vertebral, las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en células madre neurales seguido por el trasplante en el sitio lesionado. Las células HLA-G modificadas pueden diseñarse, además, para responder a señales que pueden dirigir su migración hacia lesiones para la reparación del cerebro y la médula espinal, por ejemplo, Chen y otros, (2007), Stem Cell Rev., 3(4):280-288.

Opcionalmente, las células HLA-G modificadas para incluirse en los métodos de terapia celular, además, expresan una proteína reportera como se describe en la presente descripción. En algunas realizaciones, la proteína reportera a usarse es una que facilita la detección *in vivo* (por ejemplo, la formación de imágenes) de las células introducidas. Por ejemplo, las células pueden expresar una proteína fluorescente emisora de rojo lejano, tal como Katushka, cuyas largas longitudes de onda de excitación y emisión son muy adecuadas para la obtención de imágenes en tejidos. Katushka está disponible comercialmente bajo la marca "TurboFP635" (Evrogen, Moscú, Rusia).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos son para interpretarse justo como ilustrativos, y no limitantes del resto de la descripción de modo alguno. Sin entrar en otros detalles innecesarios, se considera que, basándose en la presente descripción, una persona con experiencia en la técnica podrá usar al máximo la presente invención. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que la información particular en Internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente mediante la búsqueda en Internet. La referencia a esto evidencia la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

Ejemplo 1 Identificación de Patrones de Expresión Génica Asociados con la Tolerancia Inmunitaria de las Células Cancerosas

Los arreglos de tejidos blandos de cáncer humanos se examinaron inicialmente en busca de un gen de tolerancia inmunitaria candidato que mostrara una mayor expresión con la progresión del cáncer a estados metastásicos, presumiblemente debido a la evasión de los mecanismos de vigilancia inmunitaria. Los datos revelaron una fuerte correlación positiva entre la metástasis exitosa y los niveles de expresión de diversos genes previamente implicados en la tolerancia inmunitaria. Para evaluar si las MSC podrían inducir tolerancia inmunitaria y aceptación de aloinjerto, las MSC se sometieron a una prueba cruzada mediante RT-PCR para examinar los niveles de expresión de estos genes candidatos y diversos HLA antigénicos. La Tabla 1 ilustra que en el pase de cultivo 1 las MSC expresaban el

HLA clase Ia, HLA-G y II marcadores adicionales a CD200, CD47, e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Se encontró que una población de MSC expresaba HLA-G en niveles moderados, aunque menos que el que se encontró para Jeg-3, una línea de cáncer con potencial metastásico agresivo.

5

Tabla 1

Tipo celular	Pase en cultivo #	HLA clase Ia	HLA-G	HLA clase II	IDO	CD200	CD47
MSC G	1	++++	-	-/+	+	++	+
	3	++++	-	++	+	++	+
MSC G ⁺	1	++++	++	-/+	+	++	+
	3	++++	-	++	+	++	+
Jeg3	1	++	+++	-/+	-	-	+
	3	++	+++	-/+	-	-	+

Dado que el efecto inmunosupresor de las MSC in vivo parece ser transitorio, las MSC se pasaron sucesivamente y se controlaron para detectar cambios en los niveles de expresión de los genes seleccionados. En el pase en cultivo 3, la expresión de HLA-G natural fue ausente en las MSC, aunque otros marcadores candidatos permanecieron sin cambios. La expresión de HLA-G no se alteró en las células Jeg-3. Después las MSC se aislaron en base a la expresión de HLA-G en la superficie celular mediante el uso de FACS, y se encontró que entre 0,5-3 % de las MSC expresaban HLA-G en la superficie celular. Para evaluar la capacidad de las MSC HLA-G⁺ para evadir el rechazo del donante *in vivo*, 1-3 x10⁵ células se inyectaron en las venas de la cola de ratones inmunocompetentes. Se recolectaron muestras de sangre (200 µl) del plexo retroorbital y se clasificaron por FACS mediante el uso de un AcM antihumano específico para HLA de clase I. La Tabla 2 muestra 1 semana después del trasplante, las MSC HLA-G⁺ (y las células Jeg-3) demostraron una ventaja de supervivencia 24 y 270 veces sobre las células HSC y Jurkat (ambas HLA-G⁻), respectivamente. Alrededor de las dos semanas, la ventaja de las MSC HLA-G⁺ aumentó a 27 y 311 veces. Las MSC HLA-G⁻ sobrevivieron a la misma tasa que las HSC, lo que sugiere que una subpoblación HLA-G⁺ de MSC pueden exhibir efectos tolerogénicos mejorados con relación a las MSC no clasificadas en un contexto in vivo. De hecho, el análisis post mortem reveló tumores evidentes en los pulmones de los ratones inmunocompetentes 12 semanas después del trasplante con células Jeg-3, pero no con las MSC G⁺ (datos no mostrados).

25

Tabla 2

Tipo celular	HLA-G	Tiempo de Extracción de la Muestra	% de Supervivencia
100k MSC	-	2 semanas	0,51 %
100k MSC	+	1 semana	10,82 %
		2 semanas	12,47 %
150k Jeg-3	+	1 semana	13,5 %
300k HSC	-	1 semana	0,46 %
300k Jurkat	-	1 semana	0,04 %

30

A continuación, un constructo HLA-G modificado se sobreexpresó en células HF (fibroblastos humanos) y K562, y se evaluó la protección contra la lisis inducida por células NK humanas (Tabla 3). La citotoxicidad mediada por NK disminuyó en un 75 % en los HF HLA-G⁺ HF y se eliminó virtualmente en las células K562 HLA-G⁺. Esto es consistente con la protección observada en las Jeg-3 HLA-G⁺ que se revirtió mediante la incubación con el anticuerpo neutralizante anti-HLA-G (87G) pero no con un control de isotipo. Estos datos sugieren que la protección contra la muerte inducida por NK fue dependiente de HLA-G.

35

Tabla 3

Promotor	Recuperación del ER	UTR 3'	Expresión de superficie de HLA-G	Lisis citotóxica (3:1)	Silenciamiento
pMSCV	tipo silvestre	ausente	bajo-medio	32-41 %	4-6 semanas
pMSCV	tipo silvestre	tipo silvestre	bajo	40-60 %	4-6 semanas
pMSCV	mutado	tipo silvestre	medio	25-33 %	4-6 semanas

Promotor	Recuperación del ER	UTR 3'	Expresión de superficie de HLA-G	Lisis citotóxica (3:1)	Silenciamiento
pMSCV ^{mut}	tipo silvestre	ausente	bajo-medio	35-42 %	Ninguno @ 12 mo
pMSCV ^{mut}	mutado	mutado	alto	0-8 %	Ninguno @ 5 mo

Estudios anteriores demostraron que el promotor de MSCV mutado, M-U3/R, evitó la presión del silenciamiento durante 10 semanas de cultivo. Nuestros estudios demostraron que M-U3/R resistió el silenciamiento después de 1 año de cultivo continuo, superior al promotor de tipo silvestre que fue silenciado durante 4-6 semanas de cultivo. Además, la mutación o delección de la UTR 3' mejoró la expresión de superficie de HLA-G, como lo hizo la mutación del motivo de recuperación del ER. La mayor expresión en la superficie de HLA-G se correlacionó negativamente con la lisis citotóxica, lo que refuerza la importancia de emplear un constructo óptimo de suministro de genes.

Ejemplo 2 Cultivo y Diferenciación de Células Madre Embrionarias Humanas en Progenitores Epidérmicos Humanos (hEEP)

Todos los reactivos de cultivo de tejidos fueron de Life Technologies a menos que se especifique de cualquier otra manera. El medio de crecimiento de ESC contiene DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero de reemplazo 20 %, aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM, GlutaMax 1 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma). El medio de crecimiento de ESC se acondicionó para sembrar fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente (MEF) (CF-1, ATCC) a una densidad de 5×10^4 células/cm² y se incubaron durante 18-24 horas. Después del acondicionamiento, se adicionó bEGF 4 ng/mL y se filtró de forma estéril el medio acondicionado completo. Las hESC se subcultivaron cada 5-6 días (fracción 1:3 o 1:4) en placas recubiertas con Matrigel mediante el uso de Dispasa 1 mg/mL, para eliminar las colonias celulares. Se generaron las hEEP K14⁺/p63⁺ de acuerdo con el método de Metallo y otros más arriba. En resumen, las hESC se cultivaron en placas de 6 pocillos durante 4 días y después se trataron con medio de diferenciación 2 mL/pocillo, compuesto por medio de crecimiento de hESC no condicionado que contiene ácido retinoico todo trans 1 μ M (Sigma) y 25 ng/mL de BMP4. Después de los cambios diarios del medio durante 7 días, las células se trataron con dispasa, se centrifugaron y se suspendieron en medio definido de queratinocitos (DSFM) sin suero y se sembraron en placas recubiertas de gelatina en una relación de fracciones de 1:3. El DSFM se cambió en días alternos durante 3-4 semanas. Después, las células se subcultivaron mediante tripsinización, se centrifugaron, se lavaron y se sembraron en placas a 10 000 células por cm² en placas de cultivo de tejidos recubiertas con gelatina en DSFM. Después de 14 días en un medio definido de queratinocitos sin suero, se observaron los primeros signos de diferenciación epidérmica mediante microscopía, caracterizada por la formación de una estructura de lámina epidérmica. Después de cuatro semanas de cultivo, las células en láminas epidérmicas mostraron un fenotipo de diferenciación epidérmica típico con morfología cúbica.

El aislamiento del ARN total de las células y las reacciones de transcriptasa inversa se describieron anteriormente en Zhao y otros (2010), Tissue Eng Part A, 16(2):725-733. La amplificación por PCR específica se realizó en el termociclador Hybaid Omnigene (Bio-rad, Hercules, CA) mediante el uso de cebadores específicos de los genes de interés como se muestra en la Figura 12. Las condiciones de la PCR consistieron en 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 1 minutos y 72 °C durante 1 minuto con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Se detectaron diez μ l de cada producto de PCR mediante electroforesis en gel de bromuro de etidio. Los datos de la Figura 12 indican que los marcadores de diferenciación epidérmica K14, Tap63, y Δ Np63 se mejoraron gradualmente durante la diferenciación. En datos que no se muestran en la presente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia de K14 y marcadores epidérmicos adicionales p63, CD29 y CD49f. Las hEEP eHLA-G(EF-1a)-GFP diferenciadas fueron positivas para la expresión de las proteínas K14, p63, CD29 y CD49f, como se indica mediante la inmunofluorescencia.

Para verificar que las monocapas epiteliales tenían una pureza de ≥ 90 % y que expresaban K14, las células se sometieron a citometría de flujo de acuerdo con el método de Metallo y otros más arriba, y se analizaron en un BD FACS Canto II. El impacto de la expresión del transgén eHLA-G (hESC eHLA-G(EF1- α)-GFP) en la diferenciación de hESC en EP (progenitores epidérmicos) se evaluó mediante la comparación del grado de positividad de K14 para el tipo silvestre en las hEEP G⁻ y G⁺. Para mejorar la pureza de las células hEEP aisladas, las células se clasificaron mediante el uso de la clasificación celular activada magnéticamente (MASC) con anticuerpos CD29. Aproximadamente el 92 por ciento de las células hEEP en cultivo de células clasificadas por CD29 MASC diferenciadas a partir de hESC eHLA-G(EF-1 α)-GFP modificadas, fueron positivas para K14, un marcador específico de queratinocitos. Las hEEP purificadas mostraron una morfología homóloga de queratinocitos como se muestra mediante microscopía de contraste de fase (véase Figura 16).

La estabilidad del transgén HLA-G en las hEEP diferenciadas se confirmó mediante citometría de flujo. Tanto la expresión total de HLA-G como la expresión de superficie fueron robustas para eHLA-G las hEEP diferenciadas (EF-1a)-GFP (más del 90 % de las células) en comparación con las células de control sin HLA-G exógena (hEEP solo GFP) y las hEEP de tipo silvestre (véase Figura 17). Solo los clones que produjeron una diferenciación similar al de las células de tipo silvestre se seleccionaron para estudios posteriores.

Ejemplo 3 Diseño del Constructo eHLA-G y Expresión Estable en las hESC

Se diseñó un constructo novedoso de HLA-G mediante la combinación de múltiples modificaciones: 1) mutación del motivo de recuperación del ER de HLA-G (K334A/K335A); y 2) mutación de los sitios de unión de microARN a la UTR 3' de HLA-G. Dado que los sistemas de suministro de genes virales continúan como un serio desafío para la regulación, se utilizó el sistema PiggyBac, un enfoque no viral basado en transposones que recientemente demostró alcanzar una eficiencia de transfección del 90 % en HI hESC (Lacoste y otros (2009), Cell Stem Cell, 5:332-342.). Este sistema requiere un plásmido donante que contenga el transposón (Figura 1A) y un plásmido auxiliar que exprese la transposasa (Figura 2). Para generar plásmidos auxiliares, el cDNA de transposasa humanizado con codón ePiggyBac se sintetizó según el diseño (GeneArt) y después se clonó en pBluescript (Stratagene) en dirección 3' de un promotor PGK y en dirección 5' de una secuencia de señal de poliadenilación de SV40 (pA). Para el casete de expresión de eHLA-G, se compararon múltiples promotores, que incluyen el promotor M-U3/R, el promotor MSCV y el promotor EF1 α (CHEF-1 α) de hámster chino, cuya secuencia se proporciona más abajo como la SEC ID NO: 6. (SEQ ID NO:6)-una realización del promotor CHEF-1 α

GGATGGCGGGGCTGACGTCGGGAGGTGGCCTCCACGGGAAGGGACACCCGGATC
TCGACACAGCCTTGGCAGTGGAGTCAGGAAGGGTAGGACAGATTCTGGACGCCC
TCTTGGCCAGTCCTCACCGCCCCACCCCGATGGAGCCGAGAGTAATTTCATACAA
AAGGAGGGATCGCCTTCGCCCCCTGGGAATCCCAGGGACCGTCGCTAAATTCTGG
CCGGCCTCCCAGCCCCGAACCGCTGTGCCCCGCCAGCGCGGGGAGGAGCCTG
CGCCTAGGGCGGATCGCGGGTCGGCGGGAGAGCACAAGCCCACAGTCCCCGGCG
GTGGGGGAGGGGCGCGCTGAGCGGGGGCCCGGGAGCCAGCGCGGGGCAAACCTG
GGAAAGTGGTGTCTGTGCTGGCTCCGCCCTCTTCCCCAGGGGTGGGGGAGAACG
GTATAAAAGTGCGGTAGTCGCGTTGGACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGTC
AGAACGCAGGTGAGTGGCGGGTGTGGCCTCCGCGGGGCCCGGGCTCCCTCCTTTG
AGCGGGGTCGGACCGCCGTGCGGGTGTCTGTCGGCCGGGCTTCTCTGCGAGCGTTC
CCGCCCTGGATGGCGGGCTGTGCGGGAGGGCGAGGGGGGGAGGCCTGGCGGGCG
GCCCCGGAGCCTCGCCTCGTGTGCGGGCGTGAGGCCTAGCGTGGCTTCCGCCCCCGC
CGCGTGCCACCGCGGCCGCGCTTTGCTGTCTGCCCCGGCTGCCCTCGATTGCCTGC
CCGCGGGCCCCGGGCAACAAAGGGAGGGCGTGAGCTGGCTGGTAGGGAGCCCC
GTAGTCCGCATGTCGGGCAGGGAGAGCGGCAGCAGTCGGGGGGGGGACCGGGC
CCGCCCGTCCCGCAGCACATGTCCGACGCCGCTGGACGGGTAGCGGCCTGTGTCT
CTGATAAGGCGGCCGGGCGGTGGGTTTTAGATGCCGGGTTACAGGTGGCCCCGGG
TCCCGGGCCCCGTCTGGCCAGTACCCCGTAGTGGCTTAGCTCCGAGGAGGGCGAG
CCCGCCCCGCCGGCACCAAGTTGCGTGC GCGGAAAGATGGCCGCTCCCGGGCCCT
GTAGCAAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCAGCCCGGCGGAGCGGGGCGGGT
GAGTCACCCACACAAAGGAAGAGGGCCTTGCCCCCTCGCCGGCCGCTGCTTCCTGT
GACCCCGTGGTGTACCGGCCGCACTTCAGTCACCCCGGGCGCTCTTTCGGAGCAC
CGCTGGCCTCCGCTGGGGGAGGGGATCTGTCTAATGGCGTTGGAGTTTGCTCACA
TTTGGTGGGTGGAGACTGTAGCCAGGCCAGCCTGGCCATGGAAGTAATTCTTGGA
ATTTGCCCATTTTGAAGTTTGGAGCGAAGCTGATTGACAAAGCTGCTTAGCCGTTC
AAAGGTATTCTTCGAACTTTTTTTTTAAGGTGTTGTGAAAACCACCG

Para generar el plásmido donante, la repetición terminal (TR) 5' del mutante T53C/C136T de 313 pb y la TR 3' de 235 pb (como se describe en Lacoste *más arriba*) se sintetizó según diseño y se clonó hacia los extremos 5' y 3', respectivamente, del siguiente casete de expresión: eHLA-G, un aislador de núcleo de β -globina HS4 de pollo de 250 pb (Recillas-Targa y otros (2002), PNAS USA, 99:6883-6888), EGFP, y pA. HS4 se usó para prevenir la propagación

de la cromatina represiva en el constructo integrado. La expresión de EGFP fue dirigida por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) (véase Figura 1A). La secuencia del elemento HS4 se muestra más abajo como la SEC ID NO:7.

5 (SEQ ID NO:7) una realización del elemento HSF

GAGCTCACGGGGACAGCCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCT
CCCCCGCTAGGGGGCAGCAGCGAGCCGCCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCT
CCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGG
TGGCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGAC
ACCTGGGGGATACGGGGAAAAAGCTT

10 El vector vacío del plásmido donante (HLA-G⁻) fue idéntico al plásmido donante de eHLA-G, excepto que se excluye el constructo eHLA-G (Figura 1B). Antes de la transferencia de genes, las hESC se trataron durante 1 hora con Y-27632 10 μ M, un inhibidor de ROCK que ha demostrado disminuir sustancialmente la apoptosis inducida por disociación y aumenta la eficiencia de clonación (Watanabe y otros (2007), Nat Biotechnol, 25:681-686. Las hESC se disociaron en tripsina-EDTA 0,25 % a 37 °C durante cinco minutos, se lavaron en medio mTeSR acondicionado más Y-27632 y se suspendieron en la solución de nucleofección L (Amaxa). Se añadieron 3 μ g de plásmidos auxiliares y 15 6 μ g del donante de transposón por $1,5 \times 10^5$ células, y se realizó la nucleofección con los parámetros del programa B-016. Después las hESC se sembraron en CM más Y-27632 a 2×10^5 células por placa de 6 cm, para la selección clonal. Después de 24 horas, el medio de cultivo se cambió a CM solo, después y en lo adelante se cambió diariamente. Los clones con la expresión dual más alta de tdT/eHLA-G se seleccionaron mediante el uso de la microscopía de fluorescencia en vez de seleccionar mediante resistencia a antibióticos o citometría de flujo, ya que el silenciamiento de transgenes es frecuente en las hESC y solo una fracción de células transgénicas únicas da lugar a una línea celular marcada (Braam y otros (2008), Nat Methods, 5:389-392).

Ejemplo 4 Evaluación del Sistema de Suministro Génico ePiggyBac

25 La eficiencia de transfección de eHLA-G se determinó mediante la siembra de las células transfectadas en CM más Y-27632 a 2×10^3 células por placa de 6 cm durante 24 horas, después se hizo cambio de medio a CM solo. Después, el medio se cambió diariamente durante siete días, y las colonias se evaluaron mediante tinción de células vivas y microscopía de inmunofluorescencia, como se discute en el Ejemplo 5. Para cada clon, se contaron tres campos de alta potencia y se calculó el porcentaje de proteína reportera en las hESC ⁺/eHLA-G⁺. Los resultados de este 30 experimento se muestran en las Figuras 3-4. El sitio de inserción de eHLA-G se determinó mediante el uso de una estrategia de rescate de plásmidos como se describe en Lacoste y otros *más arriba*. En resumen, se aisló ADN genómico de los clones de hESC transgénicos y se digirió con BamHI/BglII/NotI, se autoligó a baja concentración con ADN ligasa T4 durante toda la noche a 16 °C, se precipitó con isopropanol 100 % y se lavó con etanol 70 % antes de la transformación en DH10B *E. coli* y se seleccionó en ampicilina. El número de copias de eHLA-G se determinó 35 mediante el uso de PCR SplinkTA. Se realizó el bandedo G estándar cada 20 pases en cultivo para evaluar la estabilidad del cariotipo. El eHLA-G y el gen silenciador de la proteína reportera se evaluaron cada 10 pases en cultivo mediante el uso de la citometría de flujo. Antes de la disociación y el análisis, las hESC se trataron durante una hora con Y-27632 10 μ M. Después, las células se disociaron con tripsina-EDTA 0,25 % a 37 °C durante cinco minutos, se lavaron en CM más Y-27632, se suspendieron en PBS enfriado con hielo que contiene BSA al 0,1 % y EDTA 0,5 mM, y 40 después se analizaron mediante el uso de un Citómetro de flujo II canto BD FACS (Becton Dickinson). Como se muestra en las Figuras 8 y 9, en el pase en cultivo 16, esencialmente no se observó silenciamiento de la expresión de EGFP o eHLA-G. Se evaluó la pluripotencia cada 20 pases en cultivo mediante la detección inmunocitoquímica de lo siguiente: 1) marcadores de pluripotencia Oct3/4, SSEA-4, Sox2 y Nanog (Figuras 5 y 6), 2) proteína reportera ⁺/eHLA-G⁺ formación de cuerpos embrioides (Figura 7), y 3) el marcador endodérmico Gata 6, el marcador mesodérmico 45 actina de músculo, y el marcador ectodérmico de la cadena pesada de neurofilamento en células hESC transgénicas diferenciadas (datos no mostrados), todos mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Leica CTR6500. Todos los anticuerpos fueron de Abcam a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Ejemplo 5 Localización en la superficie celular de eHLA-G y otras proteínas HLA

50 La tinción de células vivas se usó para detectar la expresión de las moléculas de superficie HLA clase Ia, HLA-E, eHLA-G, y HLA clase II en células hESC y hEPP transgénicas versus de tipo silvestre. En resumen, las células se recolectaron y se lavaron en PBS frío, se tiñeron con el correspondiente 1° AcM en PBS que contiene suero de cabra 10 % y BSA 3 % durante 60 minutos a 4 °C, se lavaron, se fijaron con paraformaldehído 1 % durante 10 minutos, y 55 posteriormente se tiñeron con una IgG anti-ratón inducida en cabra conjugada con FITC durante 30 minutos a 4 °C. Las alícuotas de control se tiñeron con una IgG de isotipo afín para evaluar la unión no específica a las células diana. Cada anticuerpo (MEMG/9 para HLA-G, MEM-E/08 para HLA-E, Bu8 para HLA clase Ia, y HKB1 (Abbiotec, San Diego, CA) para HLA clase II) se evaluó por primera vez a varias diluciones con el propósito de determinar las condiciones óptimas para lograr solamente la unión específica. Después de la tinción, las células se expandieron en un portaobjetos

de vidrio, se dejaron secar al aire y después se montaron con medio anti-desvanecimiento que contiene DAPI (Vector Laboratories). Los portaobjetos se observaron inmediatamente bajo un microscopio de fluorescencia Leica CTR6500. Como se muestra en las Figuras 5 y 10, la expresión de HLA-A,B,C; HLA-E, HLA-DP, DQ, DR, y β -microglobulina fueron similares en células de tipo silvestre y en las células ES humanas eHLA-G modificadas, mientras que se observó un nivel aproximadamente siete veces mayor de expresión de HLA-G en las células ES humanas eHLA-G modificadas.

Ejemplo 6 Evaluación de la Expresión de eHLA-G en la Citotoxicidad Inducida por Células NK-92

Las células hESC que expresan eHLA-G se cultivaron y se diferenciaron en hEEP como se describió en el Ejemplo 2. Las células NK-92 (CRL-2407, Colección Americana de Tipos de Cultivos, Manassas, VA) se cultivaron en el Medio Alfa del Medio Esencial Mínimo (a-MEM, Invitrogen) suplementado con FBS 12,5 %, suero de caballo 12,5 %, inositol 0,2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, ácido fólico 0,02 mM e IL-2 recombinante 100 IU/mL (Sigma) a 37 °C en una incubadora humidificada al 5 % de CO₂.

La citotoxicidad se realizó mediante el uso de un kit de Ensayo de Citotoxicidad No Radiactiva CytoTox96 (Promega, Madison, WI) como se indica en el protocolo. En resumen, las células efectoras se mezclaron con 5×10^3 células diana a diversas relaciones de células E:T, NK-92 (Efector o "E") con respecto a hESC o hEEP (diana o "T") en placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, MA). Después de 4 horas a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ 5 %, se recolectaron 50 μ l del sobrenadante para determinar la liberación de LDH. La liberación espontánea y la liberación máxima de LDH de la células diana y la liberación espontánea de LDH de la células efectoras se determinaron mediante la incubación de estas células en medio solo. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como porcentajes del % de lisis. El porcentaje de lisis específica se determinó de la siguiente manera: (liberación experimental - liberación espontánea del efector - liberación espontánea de la diana/liberación máxima de la diana - liberación espontánea de la diana) \times 100. En todos los experimentos, la liberación espontánea fue <10 % de la liberación máxima.

Como se muestra en la Figura 11, en una relación E:T de 1:10, la destrucción de las hESC que expresan eHLA-G disminuyó en más del 50 % en relación con las células de tipo silvestre que expresan GFP solo. A una E:T de 1:30, la destrucción de las hESC que expresan eHLA-G disminuyó en aproximadamente un 75 %. Las hESC de tipo silvestre se destruyen a una tasa razonable como se muestra para ambas relaciones E:T (GFP solo). Además, se demostró que la expresión del alelo HLA-G UTR 3' (Del 14 pb) en células K562 resulta en la disminución de la citotoxicidad inducida por células NK en relación con la observada en células K562 que expresan el alelo HLA-G (Ins 14bp), así como también en células K562 no modificadas. Ver la Figura 13.

Los resultados de la Figura 11 se repitieron y se confirmaron en experimentos adicionales de citotoxicidad de NK. Como se muestra en la Figura 18, la destrucción de las hESC eHLA-G (EF-1a)-GFP disminuyó en más del 100 % en comparación con las hESC de control que contienen solo un transgén GFP (sin transgén HLA-G). Estos datos muestran que la expresión del transgén HLA-G imparte características inmunosupresoras y/o inmunogenicidad disminuida en las hESC.

Además, se realizaron experimentos de citotoxicidad de NK en las hEEP diferenciadas a partir de las hESC. Como se muestra en la Figura 19, la destrucción de las hEEP eHLA(EF-1a)-GFP diferenciadas a partir de las hESC eHLA(EF-1a)-GFP disminuyó bastante más del 100 % (aproximadamente 3 veces) en comparación con las hEEP de control. Estos datos muestran que el transgén eHLA(EF-1a)-GFP es estable y persistente durante todo el proceso de diferenciación, y que la expresión de HLA-G es capaz de impartir características inmunosupresoras y/o inmunogenicidad disminuida en células diferenciadas.

Ejemplo 7 Determinación de la Inmunogenicidad de las Células e-HLA-G⁺ *In Vivo* mediante Aloinjertos en Ratones Humanizados

Recientemente se demostró que un modelo de ratón humanizado con linfocitos de sangre periférica humana (Hu-PBL-NSG), pero no ratones NSG inmunodeficientes de tipo silvestre, rechazó islotes no coincidentes dentro de 1-2 semanas después del trasplante (King y otros (2008), Clin Immunol, 126:303-314). Aunque la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) se establece en 4-5 semanas, la supervivencia del injerto se controla hasta que se cumplen los criterios de eutanasia. La presencia de solo niveles más bajos de GVHD nos permite ampliar nuestra ventana de observación. Se adquirieron los ratones NSG (hembras a las seis semanas de edad) de Jackson Laboratory y se manipularon de acuerdo con las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales y las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Instituto de Animales de Laboratorio Recursos, Consejo Nacional de Investigación, Academia Nacional de Ciencias). Se generaron ratones NSG humanizados funcionales mediante la inyección intravenosa de aproximadamente 20×10^6 PBMC humanos en los ratones NSG de acuerdo con (Pearson y (2008), Curr Protoc Immunol, Ch. 15 :Unit15.21; y King y otros más arriba). El injerto se verificó a las cuatro semanas aproximadamente mediante la recolección de la sangre del plexo venoso retroorbital de ratones anestesiados mediante el uso de tubos capilares recubiertos con EDTA (Drummond Scientific) y tubos de 1,5 mL tratados con EDTA (Eppendorf). Después se procesaron células para determinar la positividad de CD45 humana mediante análisis por FACS de acuerdo con King y otros más arriba. Los niveles de células CD45⁺ que alcanzan un 0,1 % en la sangre a las cuatro semanas se consideran un injerto exitoso y permiten estudios de rechazo al trasplante alogénico.

Los sistemas de cultivo hESC y hEEP que se usan típicamente exponen las células a derivados animales inmunogénicos tales como el ácido siálico Neu5Gc (Martin y otros (2005), *Nat Med*, 11:228-232). Por lo tanto, puede agregarse un paso de descontaminación que recientemente se demostró que disminuye significativamente los niveles de Neu5Gc (Heiskanen y otros (2007), *Stem Cells*, 25:197-202). Las hESC pueden descontaminarse de Neu5Gc mediante el uso de dos enfoques: 1) cultivar en medio TeSR1 suplementado con bFGF, LiCl, GABA y ácido pipercolico en placas recubiertas con matriz humana de acuerdo con el método de Ludwig y otros (2006), *Nat Biotechnol*, 24:185-187, y 2) reemplazo de KSR mediante un suero humano inactivado por calor del grupo sanguíneo AB Rh⁻ (Heiskanen y otros (2007), *Stem Cells*, 25:197-202). Las hESC cultivadas bajo ambos métodos pueden evaluarse mediante incubación con AcM anti-Neu5Gc y analizarse mediante citometría de flujo. El segundo enfoque puede adoptarse, ya que el método de Ludwig y otros puede requerir la adaptación de las hESC. Las hEEP se cultivan en DFSM que carece de derivados animales por su fabricante.

El objetivo de realizar aloinjertos con células HLA-G modificadas es evaluar si la expresión de HLA-G disminuye la inmunogenicidad según lo indicado por un aumento en el tamaño del tumor. Antes del trasplante, se afeitó el sitio de inyección para facilitar la observación clínica. Se siguieron en todo momento las pautas para el manejo y cuidado de los animales, que incluyen el uso apropiado de anestesia. Se suspendieron 5×10^6 hESC transgénicas eHLA-G⁺ y HLA-G⁻ en 100 μ l de los medios apropiados que contienen tinta india para marcar el sitio de inyección. Esto facilita la evaluación histológica si se observa una fluorescencia insuficiente. Se inyectaron células por vía subcutánea en la almohadilla de grasa mamaria torácica de cinco ratones Hu-PBL-NSG de 3 meses de edad. Los resultados esos aloinjertos se muestran en las Figuras 20 y 21. Las hESC "G0" son las hESC control que no contienen un transgén eHLA-G, sino solo el GFP. "mG1(#1)" y "mG1(#2)" se refieren a dos clones diferentes de hESC eHLA-G(EF-1 α)-GFP nucleofectados. Los tumores G0, mG1(#1), y mG1(#2), como se muestran en la Figura 20, se midieron y pesaron. Las hESC G0 formaron un tumor con un volumen de 126,9 milímetros cúbicos y un peso de 32 miligramos. Las hESC mG1(#1) formaron un tumor con un volumen de 748,4 milímetros cúbicos y un peso de 318 miligramos. Las hESC mG1(#2) formaron un tumor con un volumen de 1116,7 milímetros cúbicos y un peso de 675 miligramos.

La Figura 21 muestra los resultados promediados de tumores de aloinjertos de hESC en cinco ratones NSG humanizados. Los datos muestran que las hESC HLA-G ("mG1") nucleofectadas formaron tumores mucho más grandes (más de 3 veces por volumen) y más pesados (más de 2 veces por peso) que las hESC de tipo silvestre ("G0") trasplantadas en ratones NSG humanizados. Por lo tanto, los datos indican que la expresión del transgén eHLA-G puede proporcionar inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión aumentada. Esto sustenta la aplicación general de los constructos del transgén eHLA-G descritas en la presente descripción para modificar cualquier tipo de célula conveniente en un donante alogénico superior o universal para terapia, trasplantes, reparación de tejidos, sustitutos de células y tejidos, y similares.

Los experimentos de aloinjerto descritos anteriormente con ratones NSG humanizados pueden realizarse con cualquier tipo de célula eHLA-G modificada que prolifera activamente o puede inducirse a proliferar.

Además, los aloinjertos en ratones humanizados pueden monitorearse mediante el uso de un Sistema de Imágenes In Vivo Spectrum (Caliper, Mountain View, CA) con un filtro de emisión de 620 nm y un tiempo de exposición de 2,5 segundos. A una longitud de onda de 620 nm o más, la autofluorescencia experimentada con GFP se elimina y la señal puede detectarse a una profundidad de 2,5 cm debajo de la superficie de la piel (Shaner y otros (2004), *Nat Biotechnol*, 22:1567-1572). A los ratones se les toman imágenes longitudinalmente y se pesan semanalmente. Si no se observa ninguna señal durante el período de cuatro semanas, los ratones se sacrifican y la almohadilla de grasa mamaria torácica inyectada se evalúa histológicamente mediante el uso de la microscopía de fluorescencia para detectar la proteína reportera fluorescente utilizada. En todos los casos, después de sacrificar los ratones, el tejido se tiñe con hematoxilina y eosina para evaluar la formación de teratoma y el rechazo inmunitario. La inmunohistoquímica se realiza, además, para detectar la microglobulina β 2 humana (PBMC, hESC, hEEP) y CD45 (PBMC), y esta última sirve como medida complementaria de la infiltración de células inmunitarias del aloinjerto. Los portaobjetos se leen por un patólogo experto cegado con respecto a las condiciones experimentales.

Ejemplo 8 Evaluación de la tumorigenicidad de las hEEP eHLA-G⁺ y HLA-G⁻

El impacto de la influencia de eHLA-G en la tumorigenicidad de hEEP se evaluó mediante la inyección de hEEP transgénica G⁺ y hEEP no transgénica G⁻ mediante el uso de un protocolo similar al descrito en el Ejemplo 8, excepto que las células se trasplantan a ratones NSG no humanizados. Un total de 14 ratones se monitorizan mediante el uso de imágenes longitudinales fluorescentes de animales vivos y la evaluación del peso mensualmente durante los primeros nueve meses o hasta que cumplan con los criterios de eutanasia. Después, los ratones se sacrifican y se colecta la glándula mamaria torácica inyectada en paraformaldehído tamponado neutro al 4 %. El tejido fijado se transfiere a etanol al 70 % y se embebe en parafina. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina y se procesan para la microscopía de proteína reportera fluorescente. Si se encuentra que las secciones de tejido son negativas para la proteína reportera, se teñirán mediante el uso de AcM específicos para la microglobulina β 2 humana y CD45, y esta última servirá para garantizar la presencia de células distintas de las PBMC en el lugar de la inyección.

Se asume la significación estadística de las medias independientes para valores de $p < 0,05$. Las comparaciones de las medias de dos muestras se determinan mediante el uso de una prueba t de Student. Las comparaciones de tres o más medias se realizan mediante el uso de un análisis de varianza de una o dos vías, y la prueba post-hoc de Bonferroni. Todas las medidas de varianza se presentan como error estándar de la media. Se realiza una regresión lineal para comparar la relación entre los datos in vitro e in vivo para determinar si el primero tiene un valor predictivo hacia el rechazo del aloinjerto humano en el modelo de ratón Hu-PBL-NSG que se utiliza en este estudio. Por ejemplo, el aumento del porcentaje en la aloproliferación in vitro disminuirá contra el par coincidente de PBMC usado en la fase in vivo (el resultado es el nivel de fluorescencia de la proteína reportera a las cuatro semanas posteriores al trasplante). Un resultado exitoso en la presente es un alto valor R^2 y un coeficiente de pendiente negativo, lo que sugiere que la expresión de eHLA-G conduce a un aumento del injerto. Tal interpretación está supeditada a una alta correlación entre la expresión de eHLA-G y la positividad de la proteína reportera en los clones seleccionados para usar en los estudios in vitro e in vivo.

Ejemplo 9 Evaluación de la inmunosupresión e inmunogenicidad de eHLA-G transfectada establemente en fibroblastos completamente diferenciados

Los constructos del transgén eHLA-G(EF-1 α)-GFP y control se transfectaron en fibroblastos dérmicos humanos recién nacidos (un tipo de célula que ya está completamente diferenciado) mediante el uso de la nucleofección. Las células fibroblastos dérmicos humanos recién nacidos (HFD) se adquirieron de la ATCC y se cultivaron en Medio Dulbecco Iscove Modificado (IMDM) (ATCC) suplementado con FBS 10 % y PS 1 % PS (Invitrogen). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 %, las células se cosecharon mediante la incubación con tripsina-EDTA 0,25 % (Invitrogen) durante 3 minutos a 37 °C. Se contaron $0,5 \times 10^6$ células, se centrifugaron y se suspendieron en solución de nucleofección de fibroblastos dérmicos humanos (Cat. Núm. VPD-1001, Lonza, Walkersville, MD). Los plásmidos auxiliares y de transposón se adicionaron a la suspensión celular, y la nucleofección se realizó con los parámetros del programa U-020 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Lonza). Después, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en humidificado a 37 °C/5% CO₂ durante 24 horas. Después de 24 horas, las células transfectadas estables se seleccionaron con puomicina 1 μ g/mL (Sigma) 7 días. Las células estables positivas para GFP se mantuvieron en puomicina 500 ng/mL y la expresión de HLA-G y GFP se detectó mediante citometría de flujo. Los transfectantes estables se mantuvieron en cultivo para usar en ensayos de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en ensayos de citotoxicidad de NK-92 como se describió más abajo.

Ensayos de proliferación de PBMC. Los fibroblastos dérmicos humanos transfectados de manera estable con el transgén eHLA-G(EF-1 α)-GFP (células "HFD-m1-GFP") o con el constructo de control GFP-solo (células "HFD-G0-GFP") se evaluaron por su capacidad para inhibir la proliferación de PBMC. Las células HFD-G0-GFP y -mG1-GFP se inactivaron con Mitomicina C (10 μ g/mL durante 2,5 horas), se sembraron a $3,0 \times 10^3$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se les permitieron adherirse durante 24 horas. 1×10^5 PBMC en la presencia de PHA 6 μ g/mL se adicionaron en triplicado en las células HFD correspondientes. Se incluyeron células HFD-G0-GFP y -mG1-GFP solas para la corrección MTT-OD. (El "MTT" es un reactivo de sustrato de color amarillo pálido que es escindido por células vivas para producir un producto de formazán azul oscuro. Este proceso requiere mitocondrias activas, e incluso las células recién muertas no escinden cantidades significativas de MTT. Por lo tanto, el MTT proporciona un ensayo colorimétrico que puede usarse para ensayos de proliferación o citotoxicidad). Se incluyeron como control PBMC sin PHA y PBMC con PHA 6 μ g/mL. Los co-cultivos se incubaron durante 3 días y se estimó la proliferación de PBMC con el uso del reactivo MTT mediante el uso de la siguiente fórmula: % de proliferación de PBMC = [(OD570 de HFD/PBMC/PHA - OD570 de HFD) / (OD570 de PBMC/PHA)] \times 10. Como se muestra en la Figura 22, el clon HFD-mG1-GFP "mG1-R1" suprimió la proliferación de PBMC en mayor proporción que los controles y que otros clones, lo que indica que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar inmunosupresión y/o inmunogenicidad disminuida para células diferenciadas, tales como los fibroblastos.

Ensayos de citotoxicidad de NK-92. Los ensayos se realizaron sustancialmente como se describió anteriormente. En resumen, $2,5 \times 10^3$ células diana (es decir, células HFD-m1-GFP o células HFD-G0-GFP) se incubaron con células NK-92 a una relación E:T 3:1, 10:1, 30:1 en medio CTL durante 7 horas. Se incluyeron células K562-WT como control positivo para la citotoxicidad de NK-92. La citotoxicidad se determinó con un kit de ensayo de citotoxicidad CytoTox96. El porcentaje de lisis específica se determinó de la siguiente manera: % de lisis específica = [(liberación de LDH experimental - liberación espontánea del efector - liberación espontánea de la diana) / (liberación máxima de la diana - liberación espontánea de la diana)] \times 100. Como se muestra en la Tabla 4 más abajo, los clones HFD-mG1-GFP "mG1-R1" y "mG1-#1" suprimieron la citotoxicidad de NK-92 en mayor proporción que los controles y que los otros clones, lo que indica que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar inmunosupresión y/o inmunogenicidad disminuida para células diferenciadas, tales como los fibroblastos.

Tabla 4: Citotoxicidad de NK-92 Contra las Células Diana HFD-G0 y HFD-G1

Células diana ($2,5 \times 10^3$)	% de citotoxicidad		
	10.1	30.1	60,1 (E.T)
HFD-G0-2	0	0	15

Células diana (2,5x10 ³)	% de citotoxicidad		
	10.1	30.1	60,1 (E.T)
HFD-mG1-#1	0	1	4
HFD-mG1#3	0	0	0
HFD-mG1-R1	0	1	4
HFD-mG1-R2	2	1	9
K562-WT	X	36	44

Listado de secuencias

<110> HANTASH, BASIL M.
 5 ZHAO, LONGMEI
 <120> CÉLULAS HLA-G MODIFICADAS Y MÉTODOS
 <130> 2200876.126WO1
 <140> PCT/US2013/052767
 <141> 2013-07-30
 10 <150> 61/677,739
 <151> 2012-07-31
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 15 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
 20 25 30
 Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
 35 40 45
 Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser
 50 55 60
 Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln
 85 90 95
 Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
 100 105 110
 Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly
 115 120 125
 Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
 145 150 155 160

ES 2 837 487 T3

Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val
165 170 175

Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190

His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro
195 200 205

Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr
210 215 220

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr
225 230 235 240

Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu
245 250 255

Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
260 265 270

Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285

Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro
290 295 300

Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala
305 310 315 320

Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser
325 330 335

Ser Asp

<210> 2

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

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

ES 2 837 487 T3

Leu	Thr	Leu	Thr	Glu	Thr	Trp	Ala	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	20	25	30	
Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	35	40	45	
Met	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln	Phe	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	50	55	60	
Ala	Cys	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Trp	Val	Glu	Gln	Glu	Gly	65	70	75	80
Pro	Glu	Tyr	Trp	Glu	Glu	Glu	Thr	Arg	Asn	Thr	Lys	Ala	His	Ala	Gln	85	90	95	
Thr	Asp	Arg	Met	Asn	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Ser	100	105	110	
Glu	Ala	Ser	Ser	His	Thr	Leu	Gln	Trp	Met	Ile	Gly	Cys	Asp	Leu	Gly	115	120	125	
Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Gly	130	135	140	
Lys	Asp	Tyr	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	145	150	155	160
Asp	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile	Ser	Lys	Arg	Lys	Cys	Glu	Ala	Ala	Asn	Val	165	170	175	
Ala	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	180	185	190	
His	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Leu	Gln	Arg	Ala	Asp	Pro	195	200	205	
Pro	Lys	Thr	His	Val	Thr	His	His	Pro	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ala	Thr	210	215	220	
Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	225	230	235	240
Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln	Thr	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Val	Glu	245	250	255	
Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	260	265	270	

ES 2 837 487 T3

Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285

Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro
290 295 300

Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala
305 310 315 320

Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Trp Arg Ala Ala Ser
325 330 335

Ser Asp

<210> 3

<211> 250

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 3

tgtgaaacag ctgccctgtg tgggactgag tggcaagtcc ctttgtgact tcaagaaccc 60

tgacttctct ttgtgcagag accagcccaa ccctgtgccc accatgaccc tcttcctcat 120

gctgaactgc attccttccc caatcacctt tcctgttcca gaaaaggggc tgggatgtct 180

ccgtctctgt ctcaaatttg tggtcactg agctataact tacttctgta ttaaaattag 240

aatctgagtg 250

10 <210> 4

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 4

attgttcat gcct 14

<210> 5

<211> 264

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 5

tgtgaaacag ctgccctgtg tgggactgag tggcaagatt tgttcatgcc ttccctttgt 60

gacttcaaga accctgactt ctctttgtgc agagaccagc ccaaccctgt gccaccatg 120

accctcttcc tcatgctgaa ctgcattcct tcccaatca cctttcctgt tccagaaaag 180

gggctgggat gtctccgtct ctgtctcaaa tttgtggtcc actgagctat aacttacttc 240

25 tgtattaaaa ttagaatctg agtg 264

<210> 6

<211> 1457

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

30 <400> 6

ggatggcggg gctgacgtcg ggaggtggcc tccacgggaa gggacacccg gatctcgaca 60
cagccttggc agtggagtc ggaagggtag gacagattct ggacgccctc ttggccagtc 120
ctcaccgccc cacccccgat ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc 180
gcccctggga atcccaggga ccgtcgctaa attctggccg gcctcccagc ccggaaccgc 240
tgtgcccgcc cagcgcggcg ggaggagcct gcgcctaggg cggatcgcg gtccggcggga 300
gagcacaagc ccacagtccc cggcgggtggg ggagggggcg gctgagcggg ggcccgggag 360
ccagcgcggg gcaaaactggg aaagtgggtg cgtgtgctgg ctccgccctc ttcccagggg 420
tggggggagaa cggataaaaa gtgcggtagt cgcgttggac gttctttttc gcaacggggtt 480
tgccgtcaga acgcaggtga gtggcgggtg tggcctccgc gggcccgggc tccctccttt 540
gagcggggtc ggaccgccgt gcgggtgtcg tcggccgggc ttctctgcga gcgttcccgc 600
cctggatggc ggctgtgctg ggagggcgag ggggggaggg ctggcggcgg ccccgagacc 660
tcgcctcgtg tcgggcgtga ggcctagcgt ggcttccgcc ccgcgcgtg ccaccgcggc 720
cgcgctttgc tgtctgcccc gctgccctcg attgcctgcc cgcggcccg gccaacaaag 780
ggagggcgtg gagctggctg gtagggagcc ccgtagtccg catgtcgggc agggagagcg 840
gcagcagtcg ggggggggac cgggcccgcc cgtcccgcag cacatgtccg acgccgcctg 900
gacgggtagc ggcctgtgtc ctgataaggc ggccggggcg tgggttttag atgccgggtt 960
caggtggccc cgggtcccgg cccggtctgg ccagtacccc gtagtggctt agctccgagg 1020
agggcgagcc cggccgccc gcaccagttg cgtgcgcgga aagatggccg ctcccgggcc 1080
ctgtagcaag gagctcaaaa tggaggacgc ggcagcccgg cggagcgggg cgggtgagtc 1140
acccacacaa aggaagaggg ccttgcccct cgcggccgc tgcttcctgt gaccccgtagg 1200
tgtaccggcc gcacttcagt caccgcgggc gctctttcgg agcaccgctg gcctccgctg 1260
ggggagggga tctgtctaag ggcgttggag tttgctcaca tttgggtggg ggagactgta 1320
gccaggccag cctggccatg gaagtaattc ttggaatttg cccattttga gtttggagcg 1380
aagctgattg acaaagctgc ttagccgttc aaaggatttc ttcgaacttt ttttttaagg 1440
tggtgtgaaa accaccg 1457

<210> 7

<211> 243

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 7

gagctcacgg ggacagcccc ccccaaaagc cccagggat gtaattacgt ccctcccccg 60
ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggg ccggcgctcc ccccgcatcc 120
ccgagccggc agcgtgctgg gacagcccg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgccttc 180
ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagcc tgcagacacc tgggggatac ggggaaaaag 240
ctt 243

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una célula de mamífero modificada genéticamente que tiene inmunogenicidad reducida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, comprendiendo el método:
 - 5 modificar genéticamente una célula de mamífero in vitro con un ácido nucleico exógeno que comprende:
 - i. una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-G que comprende el aminoácido de la SEQ ID NO: 2; y
 - ii. una región no traducida 3' (UTR) que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3,
 en donde la proteína HLA-G codificada es expresada por la célula de mamífero modificada genéticamente.
 - 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la inmunogenicidad reducida y/o la inmunosupresión mejorada de la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética está determinada bien sea por:
 - i. una reducción de la citotoxicidad inducida por NK-92 de la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética,
 - 15 ii. una reducción de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica in vitro mediante la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, o
 - iii. un aumento en el tamaño y peso de la formación de tumores por la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética en ratones NSG humanizados.
 - 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la célula de mamífero modificada genéticamente expresa la proteína HLA-G durante al menos 7 semanas, al menos 20 semanas o al menos 50 semanas.
 4. El método de la reivindicación 1, en el que el HLA-G expresado está presente en la superficie celular de la célula de mamífero modificada genéticamente.
 5. El método de la reivindicación 1, en donde la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula humana.
 - 25 6. El método de la reivindicación 1, en donde la célula modificada genéticamente es una célula humana, o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre, una célula progenitora, una célula obtenida por diferenciación in vitro de la célula madre o la célula progenitora, una célula completamente diferenciada, una célula progenitora epidérmica, una célula progenitora pancreática, una célula madre hematopoyética, un queratinocito, un fibroblasto, un hepatocito, una célula madre mesenquimatosa, un cardiomiocito, una célula madre neural, una neurona o un astrocito,
 - 30 o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre embrionaria humana, una célula progenitora epidérmica embrionaria humana, o en donde la célula modificada genéticamente es un fibroblasto dérmico humano.
 7. El método de la reivindicación 1, en donde la célula de mamífero modificada genéticamente comprende además un promotor del Factor 1 alfa de Elongación (EF-1 α), en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína HLA-G está operativamente unida al promotor EF-1 α opcionalmente en donde el promotor EF-1 α comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.
 - 35 8. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico exógeno es un vector de expresión, en donde opcionalmente el vector de expresión es un vector de transposón, o en donde opcionalmente el vector de expresión comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera.
 9. El método de la reivindicación 1, en donde modificar genéticamente una célula de mamífero con un ácido nucleico exógeno comprende transfectar transitoriamente la célula de mamífero con el ácido nucleico exógeno.
 - 40 10. El método de la reivindicación 1, en donde modificar genéticamente una célula de mamífero con un ácido nucleico exógeno comprende transfectar de manera estable la célula de mamífero con el ácido nucleico exógeno.
 11. El método de la reivindicación 1, en donde las células de mamífero modificadas genéticamente se seleccionan usando resistencia a antibióticos o citometría de flujo.
 - 45 12. Un método para producir un tejido artificial in vitro, comprendiendo el método la etapa de generar el tejido artificial a partir de las células de mamífero modificada genéticamente producidas por el método de la reivindicación 1, y opcionalmente en donde la etapa de generar el tejido artificial a partir de células de mamífero modificada genéticamente comprende proporcionar uno o más supercántigos sintéticos biocompatibles.
 13. Un método para producir una composición de injerto de piel, una composición de reparación de piel o una composición de regeneración de piel in vitro, comprendiendo el método generar la composición de injerto de piel, la composición de reparación de piel o la composición de regeneración de piel a partir de la célula de mamífero modificada genéticamente producida por el método de la reivindicación 1.
 - 50

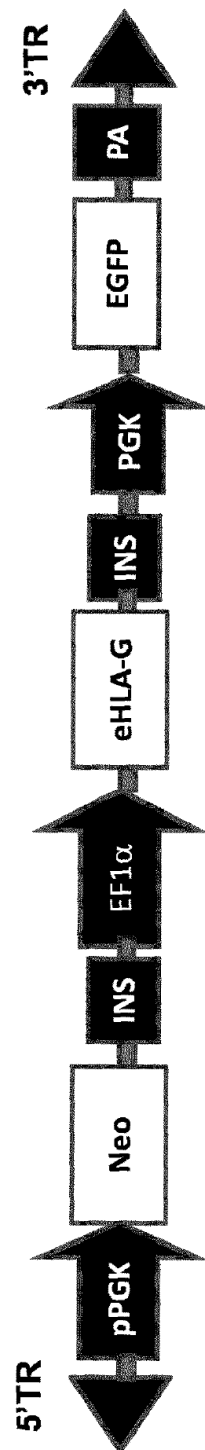


Figura 1

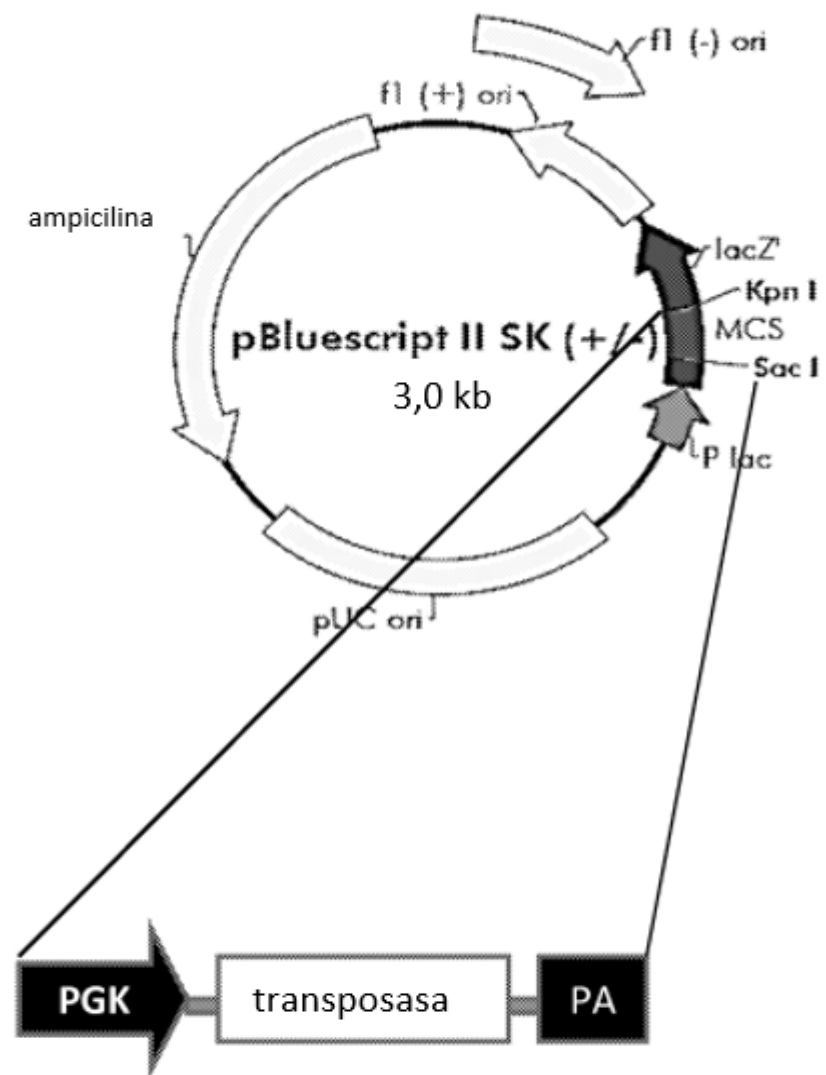


Figura 2

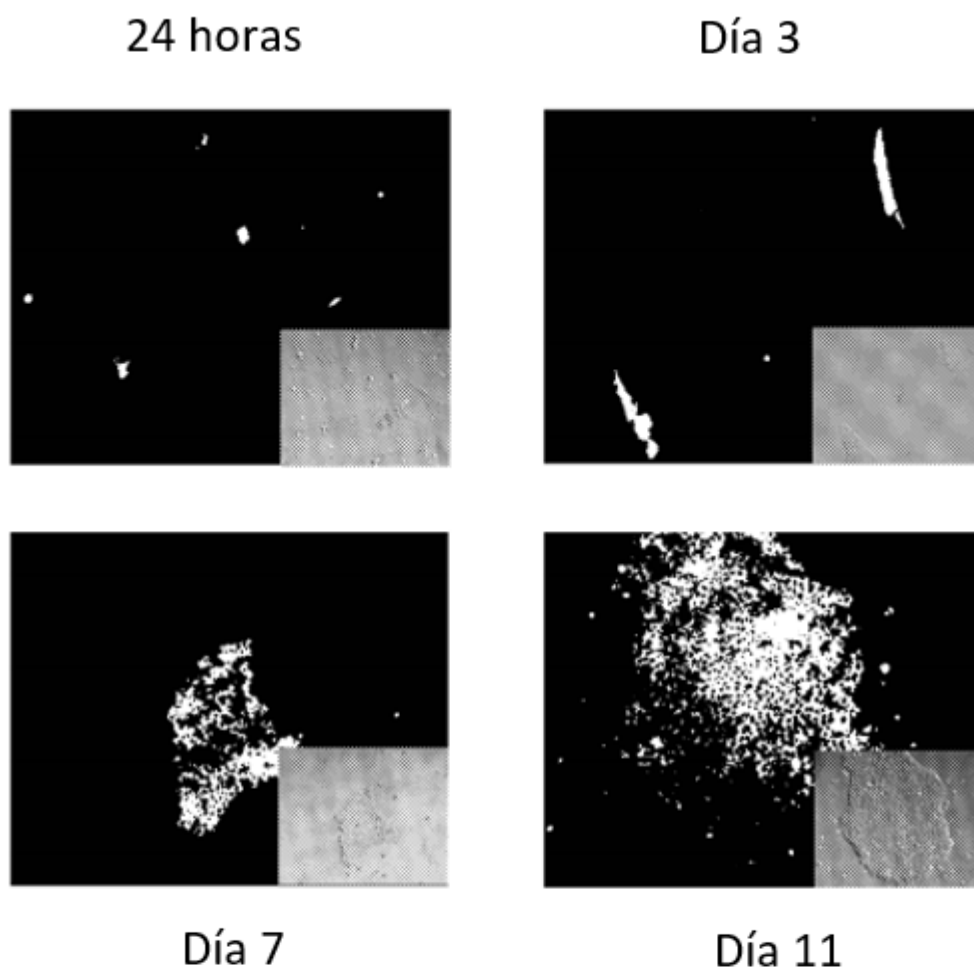


Figura 3

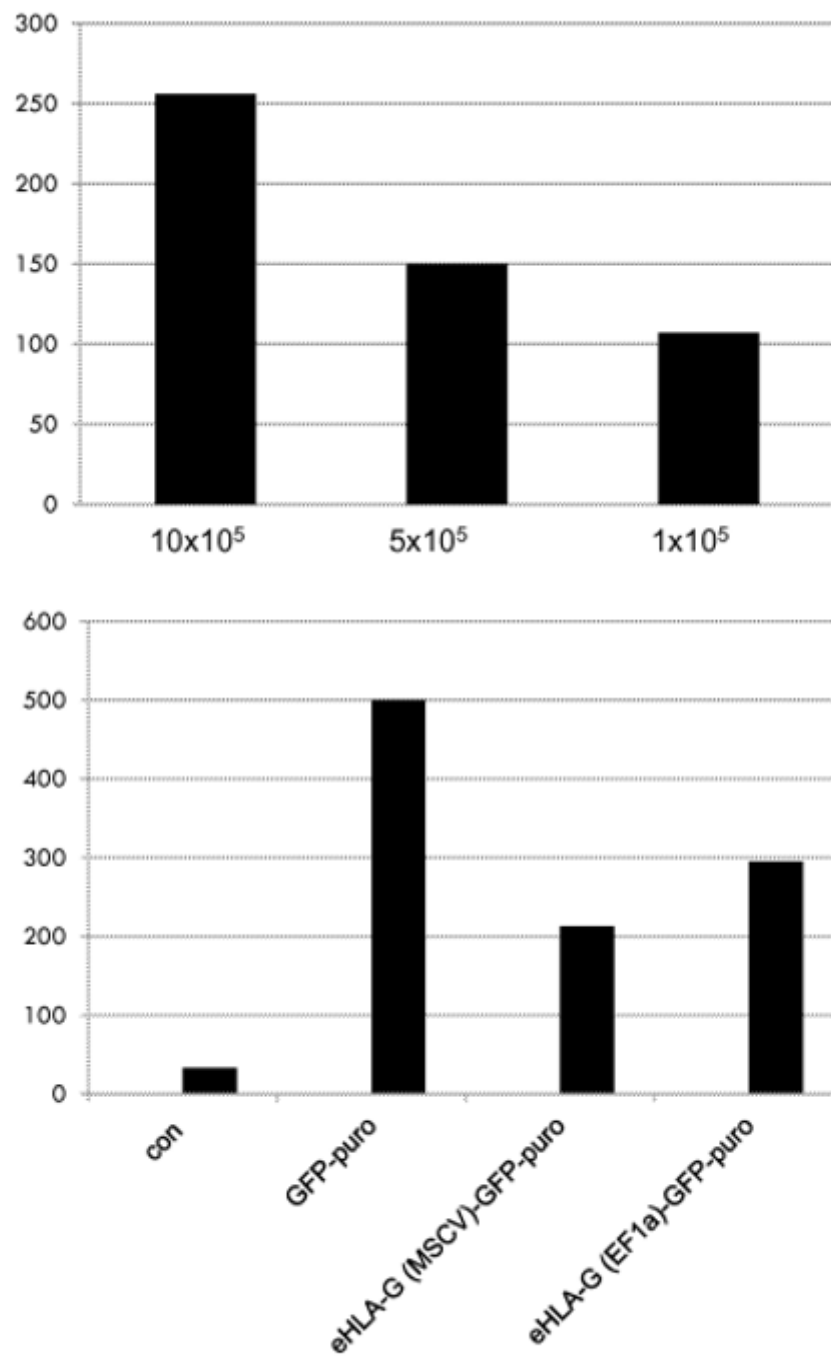
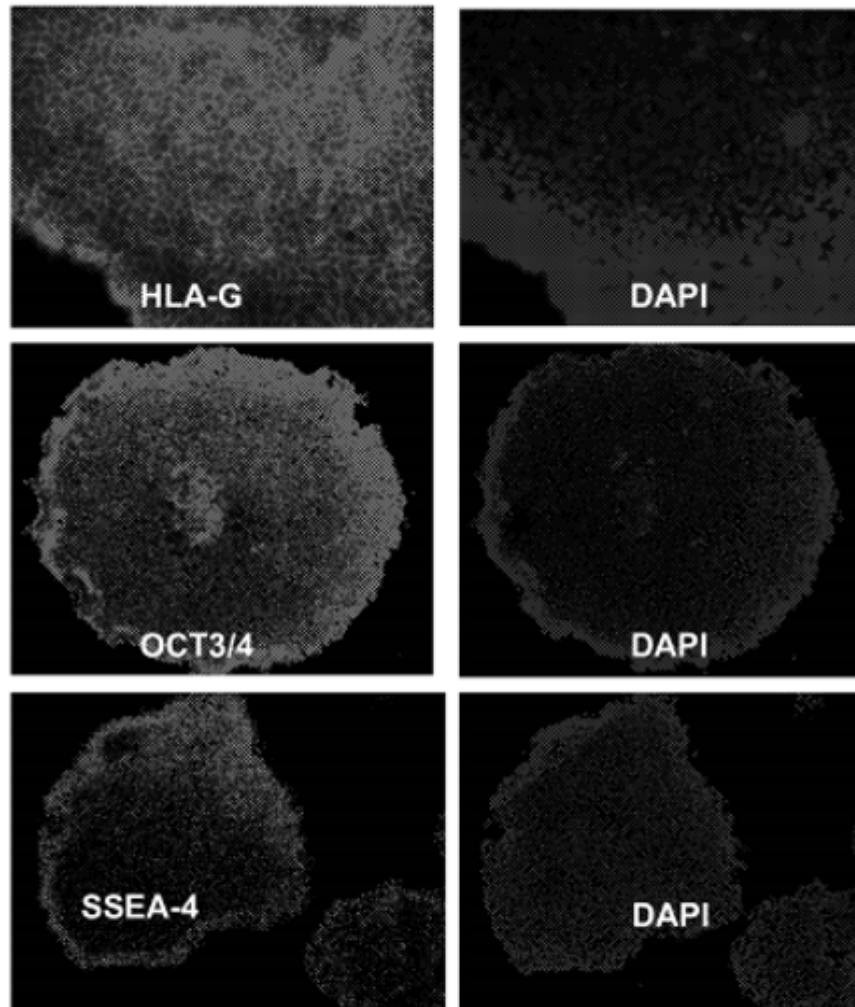


Figura 4



hESC eHLA-G⁺

Figura 5

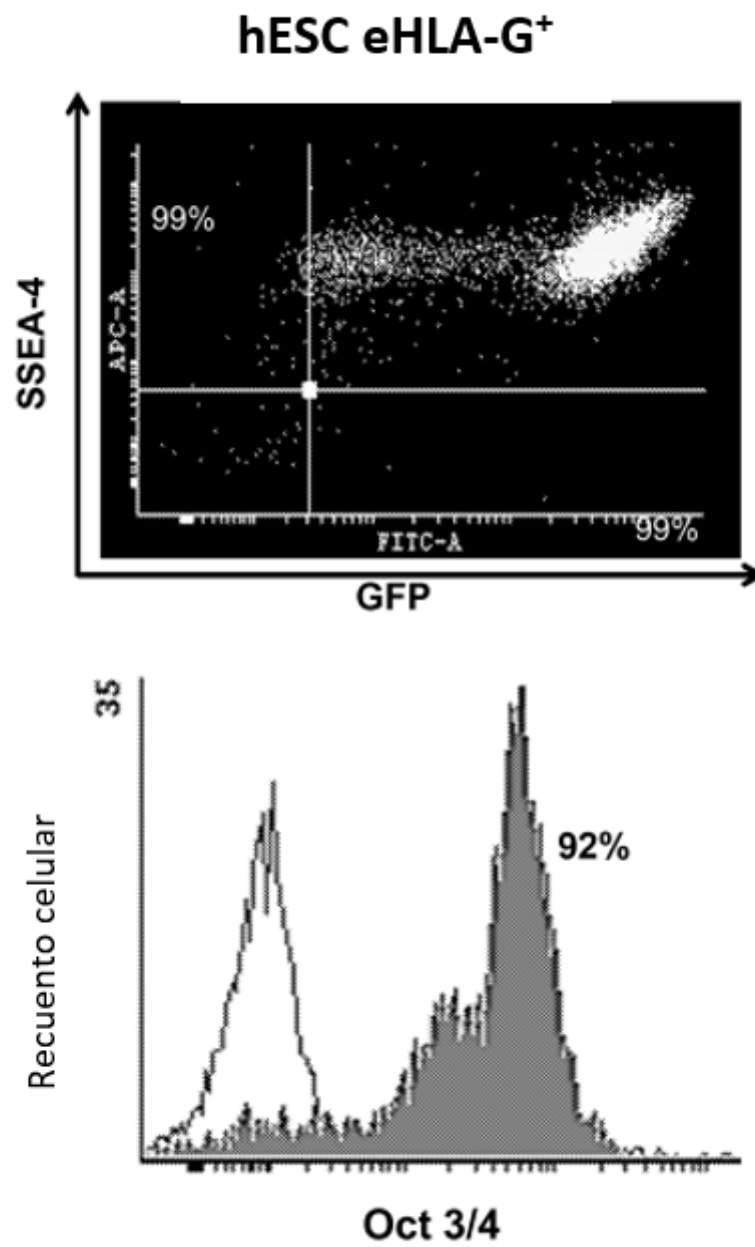


Figura 6

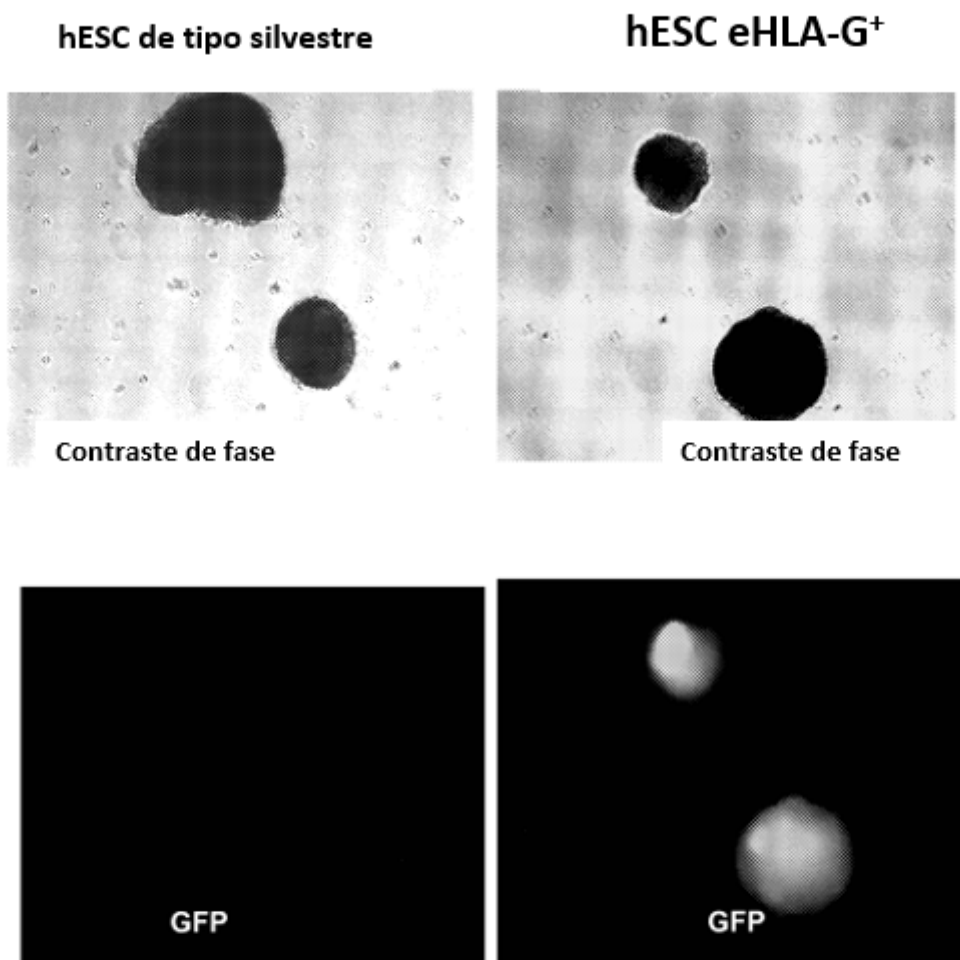


Figura 7

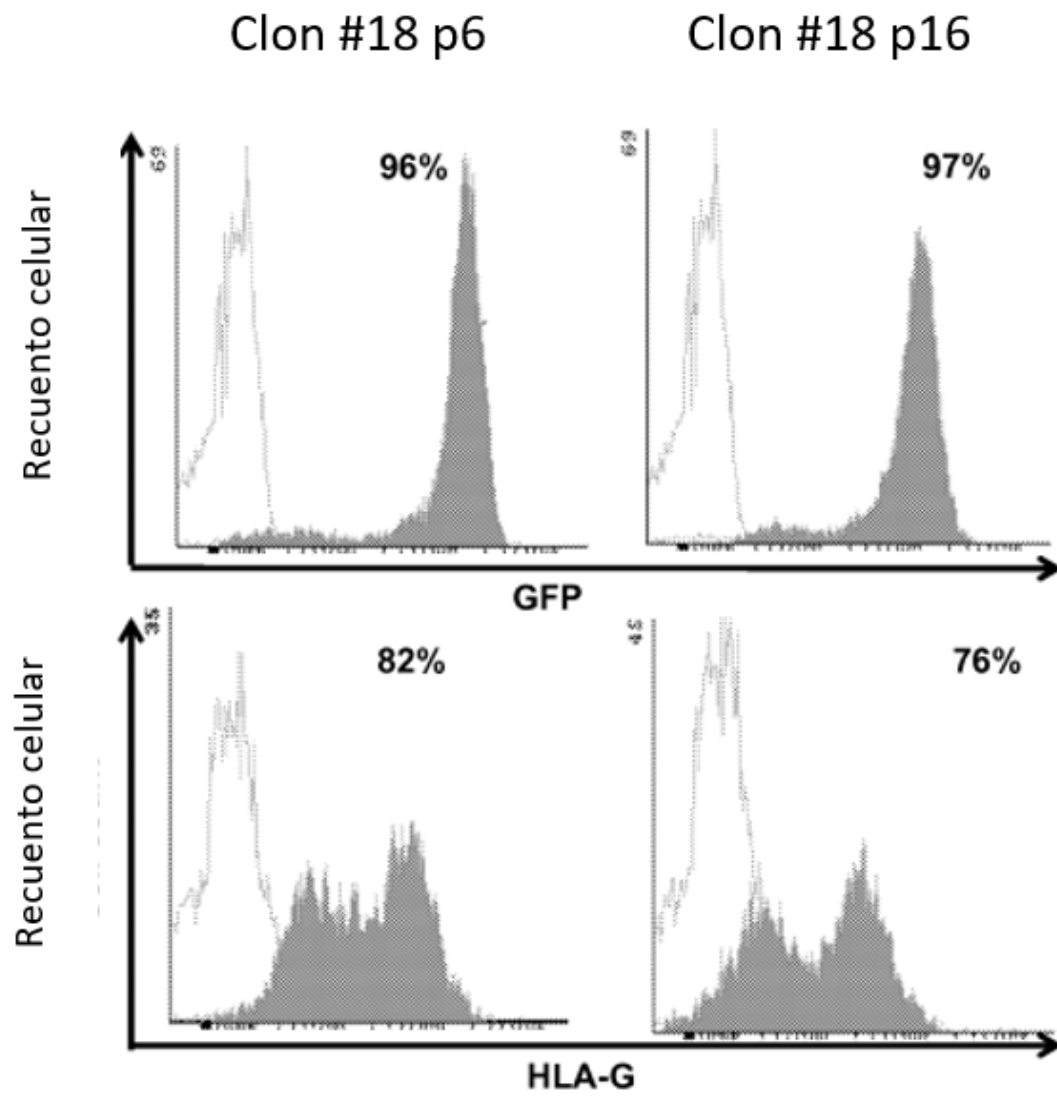


Figura 8

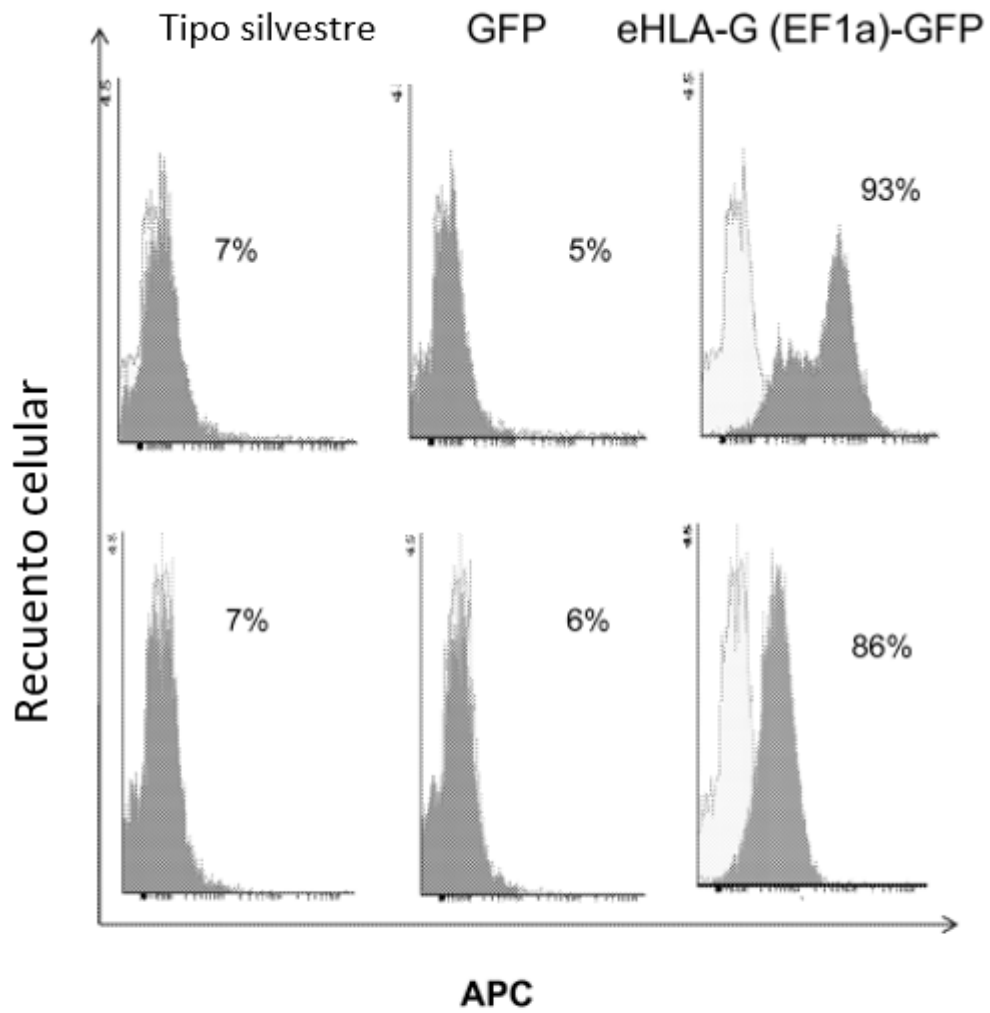


Figura 9A

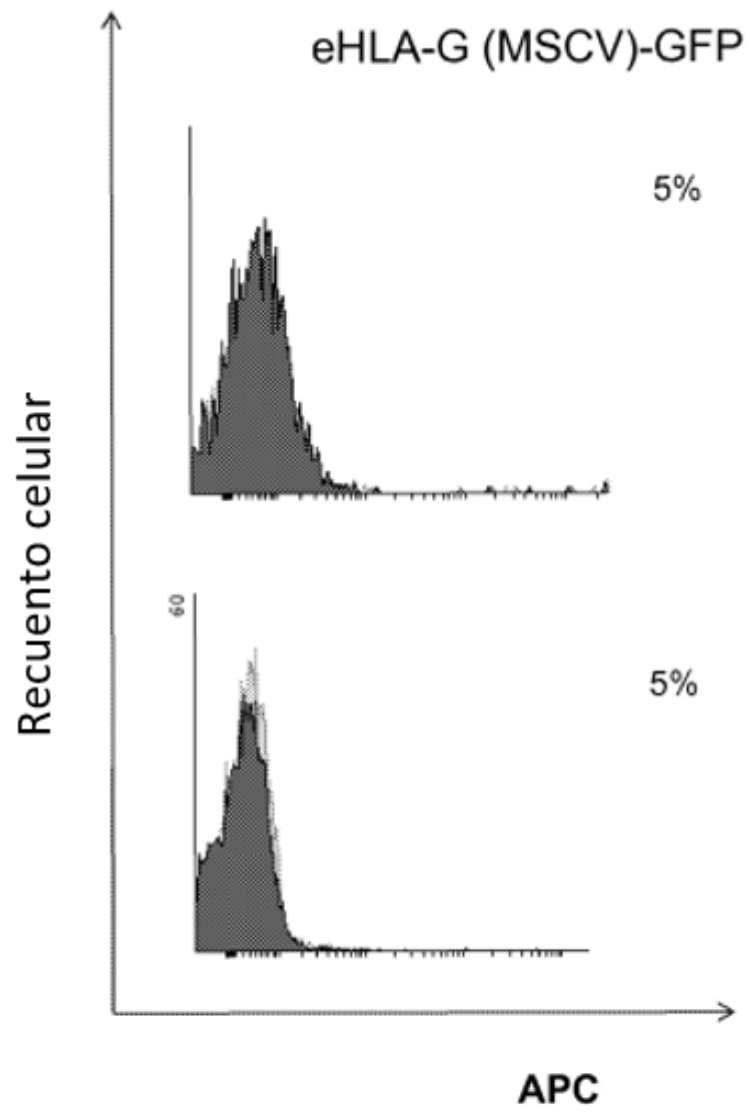


Figura 9B

Anticuerpo	Tipo silvestre		eHLA-G-GFP	
	% reactividad (media \pm EEM)	Relación MFI (media \pm EEM)	% reactividad (media \pm EEM)	Relación MFI (media \pm EEM)
HLA-A,B,C	98.3 ± 0.5	123.5 ± 9.1	98.3 ± 0.4	132.1 ± 9.2
HLA-E	2.4 ± 0.4	0.8 ± 0.1	4.0 ± 0.6	0.8 ± 0.1
HLA-G	8.0 ± 1.0	1.0 ± 0	58.6 ± 6.2	7.1 ± 1.4
HLA-DP,DQ,DR	29.7 ± 3.2	3.7 ± 0.9	29.3 ± 1.9	3.6 ± 0.2
β2M	99	364	99.0 ± 0	357 ± 51

Figura 10

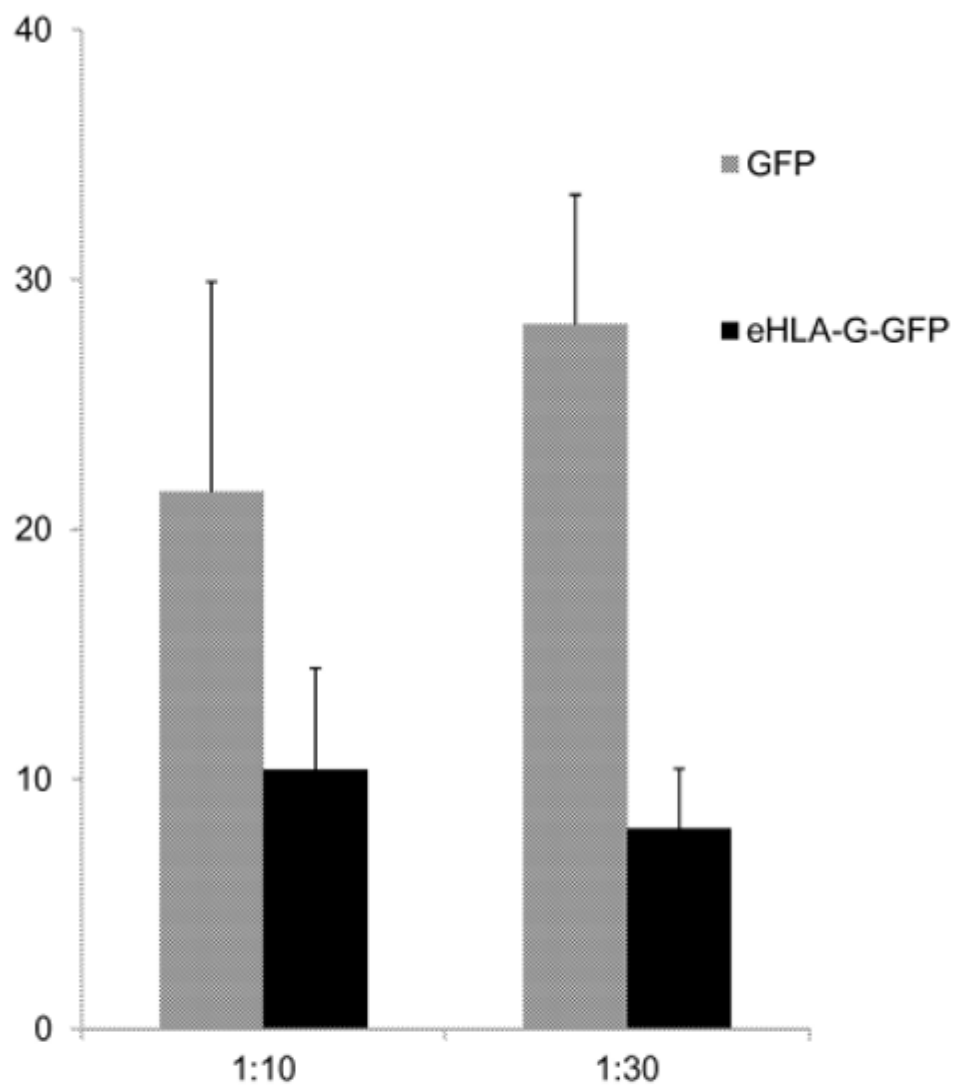


Figura 11

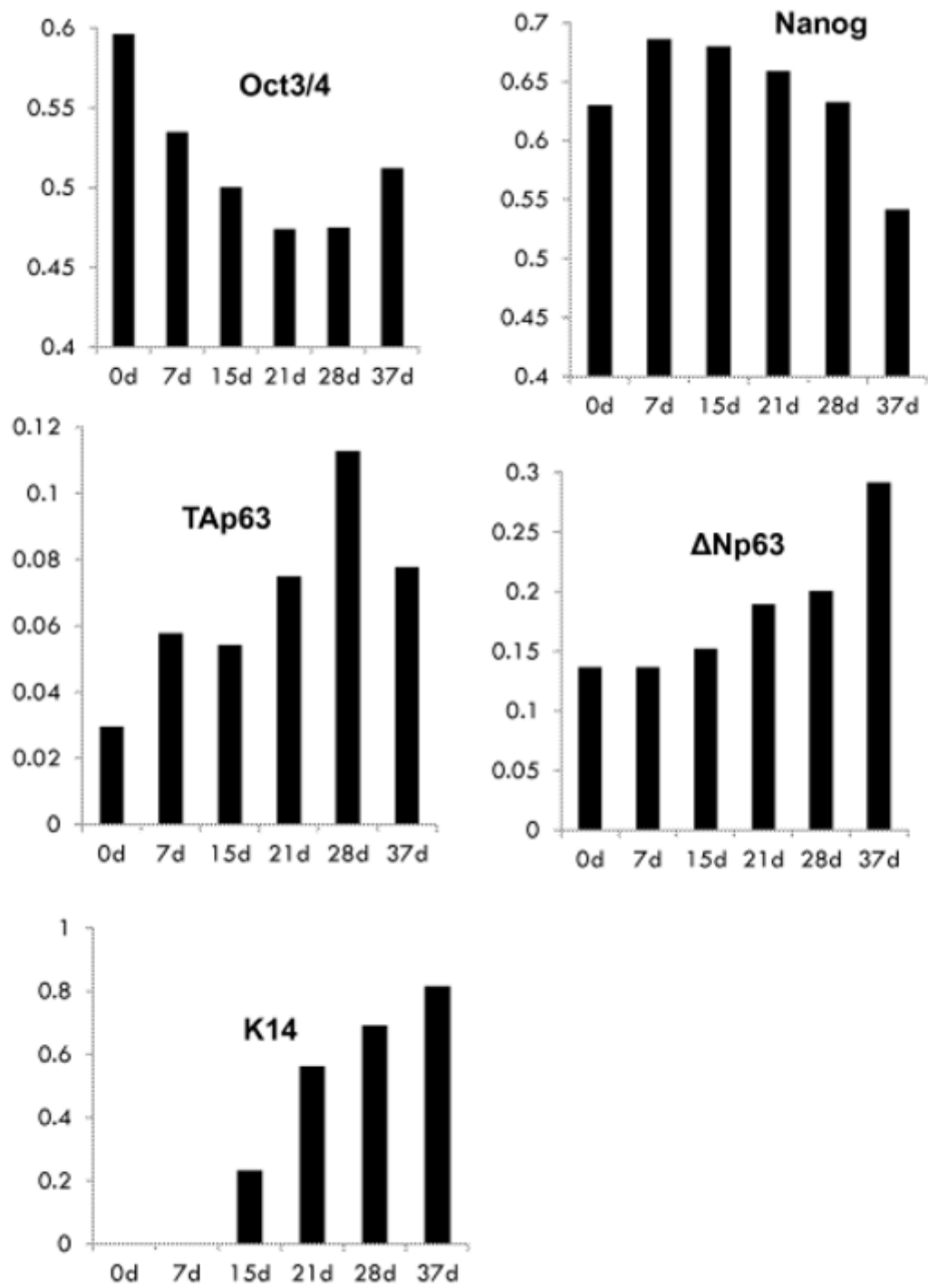


Figura 12

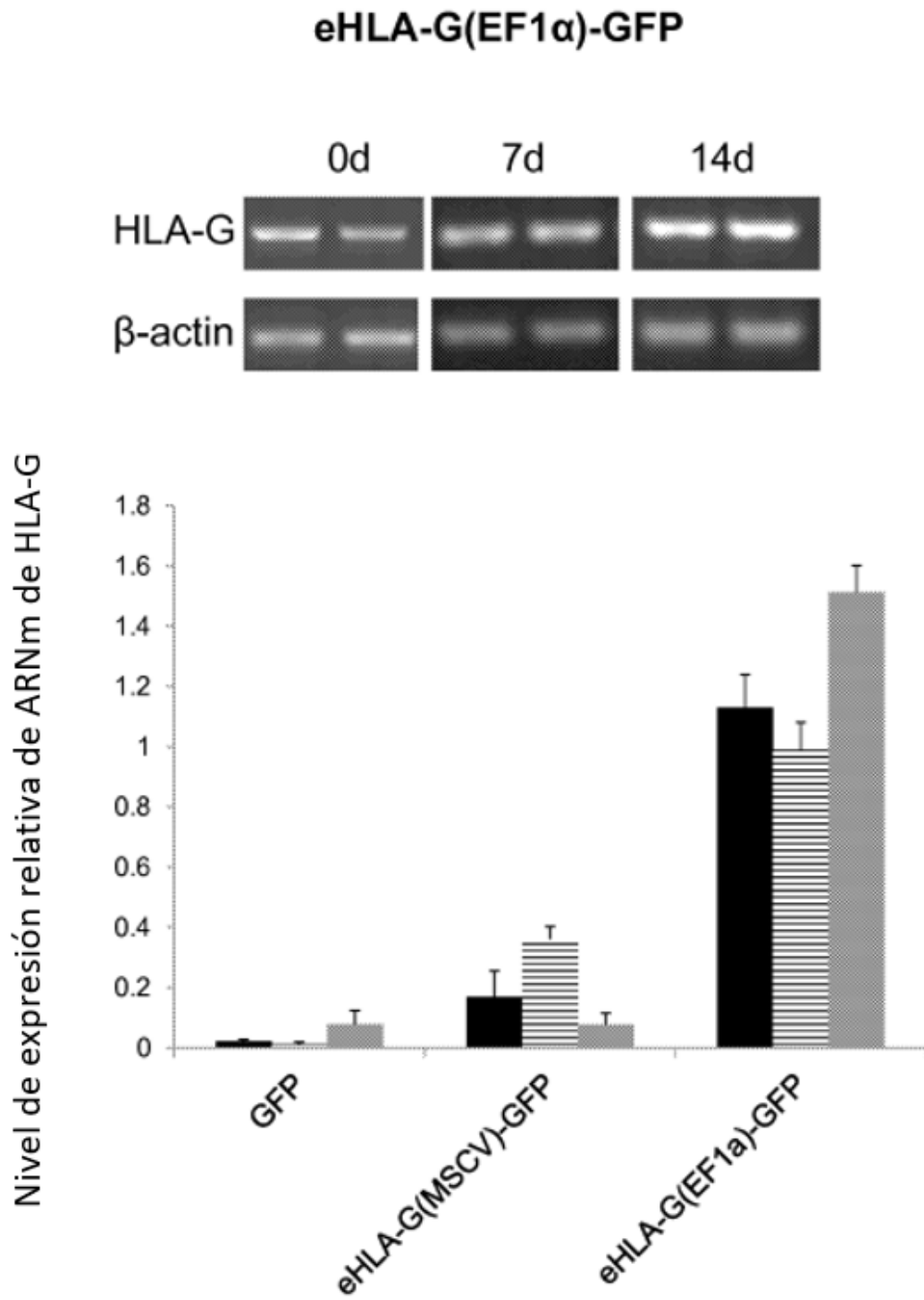


Figura 13

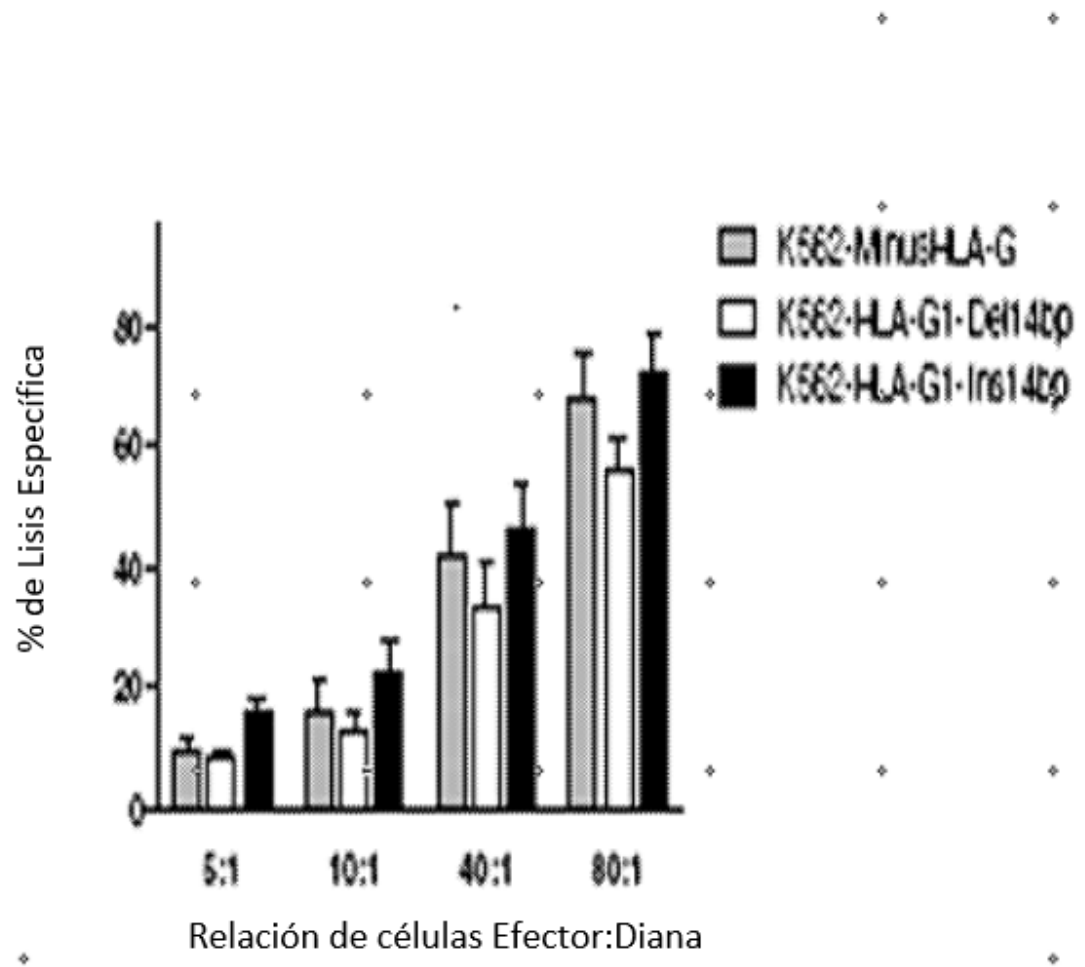


Figura 14

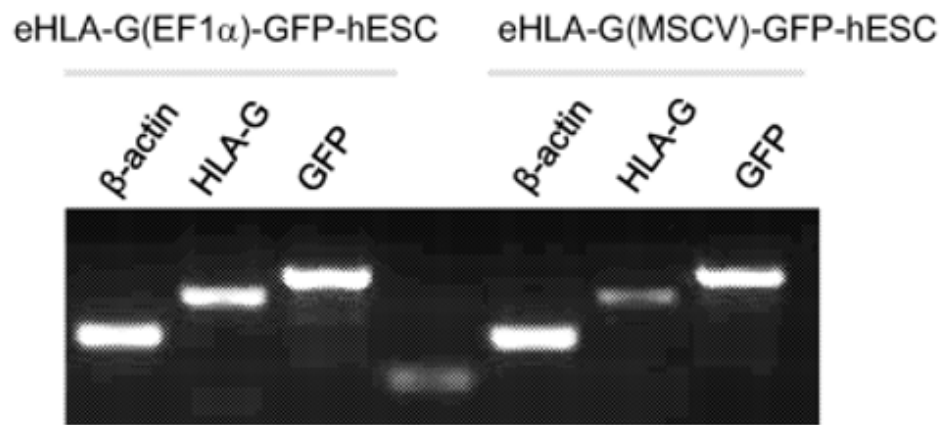


Figura 15

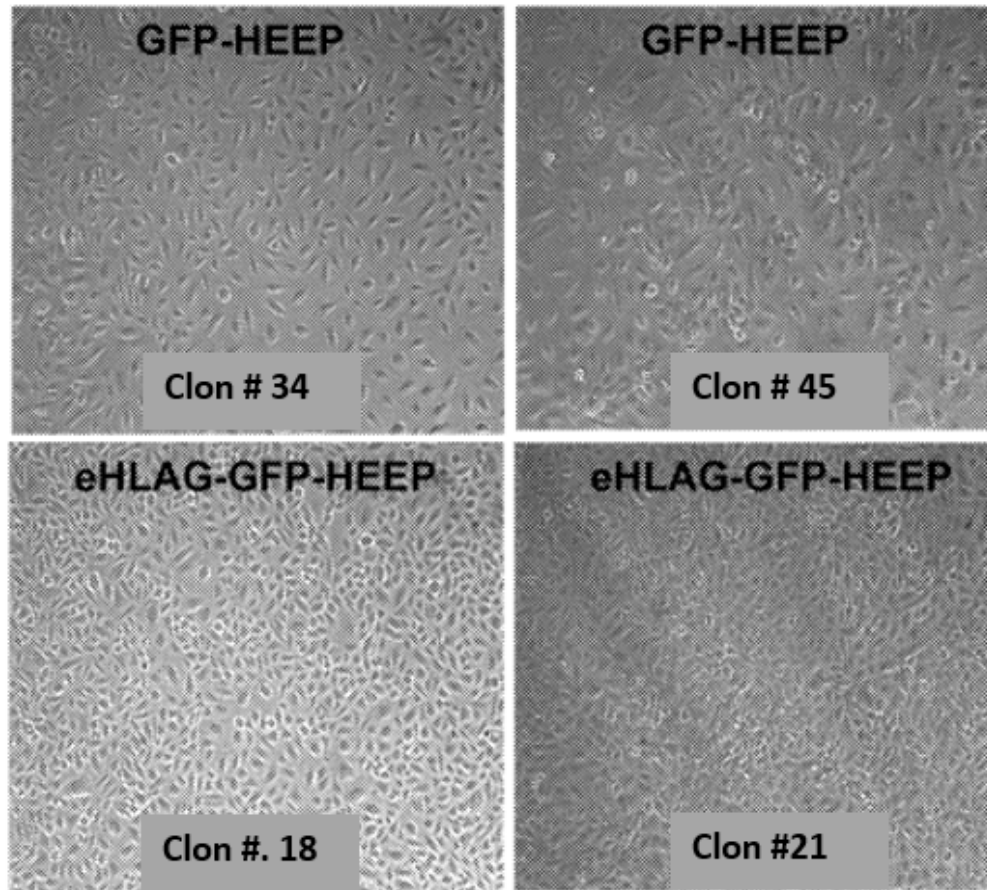


Figura 16

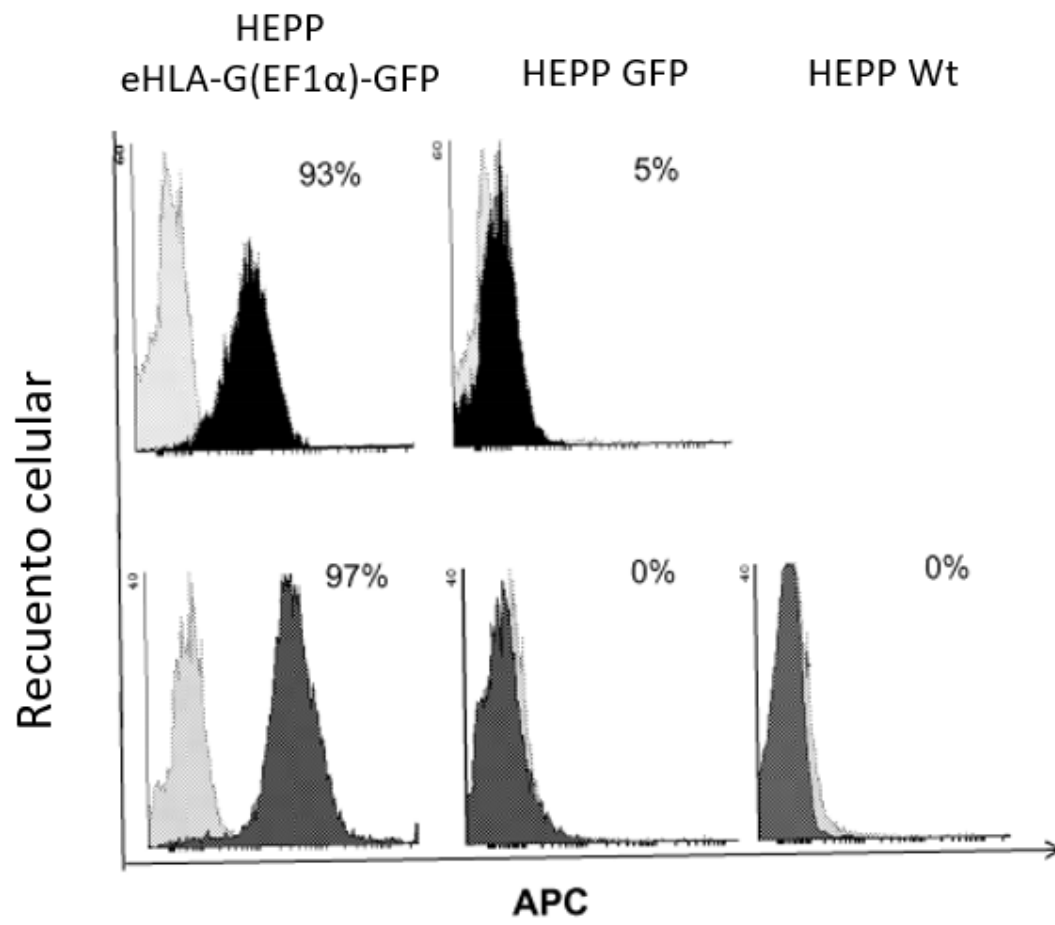


Figura 17

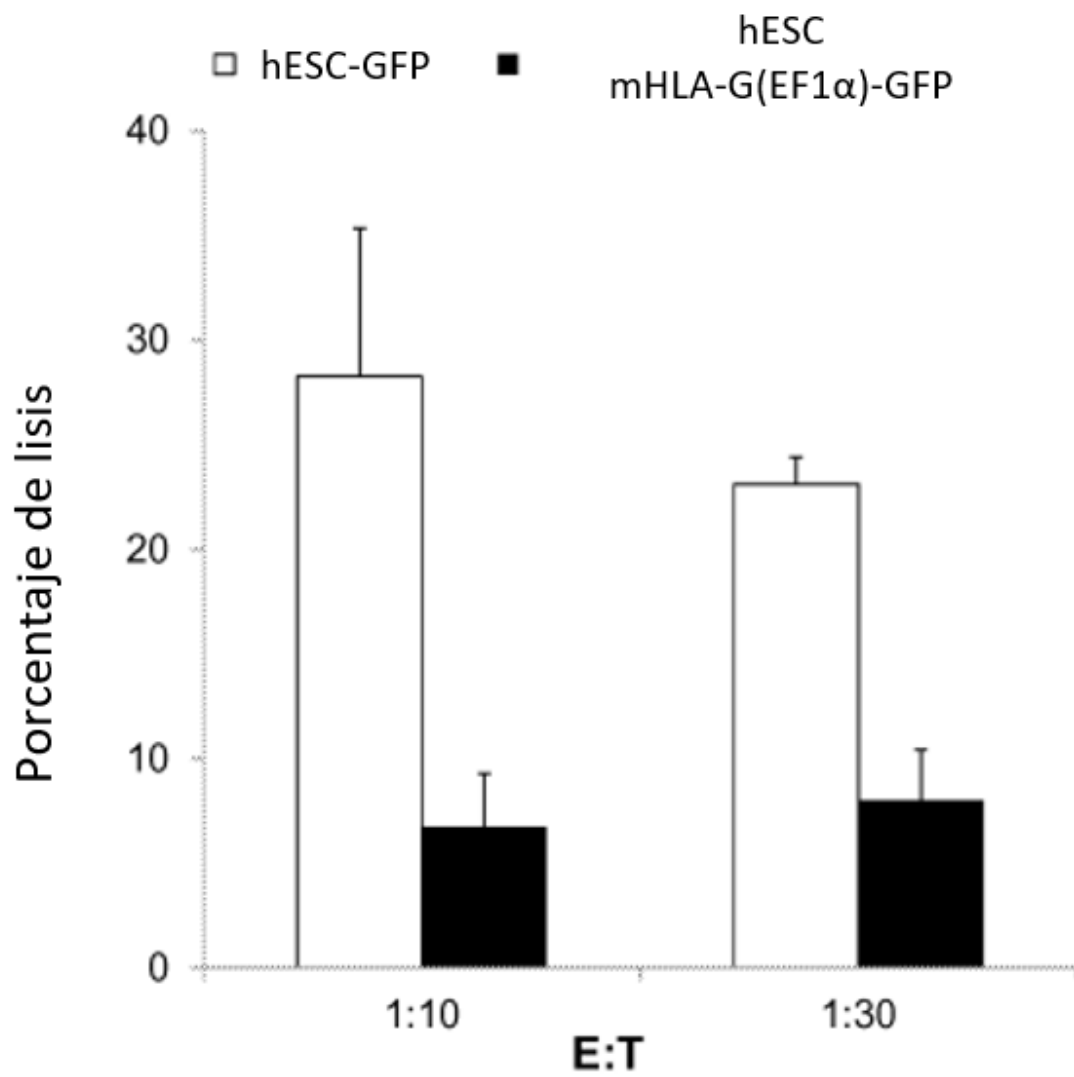


Figura 18

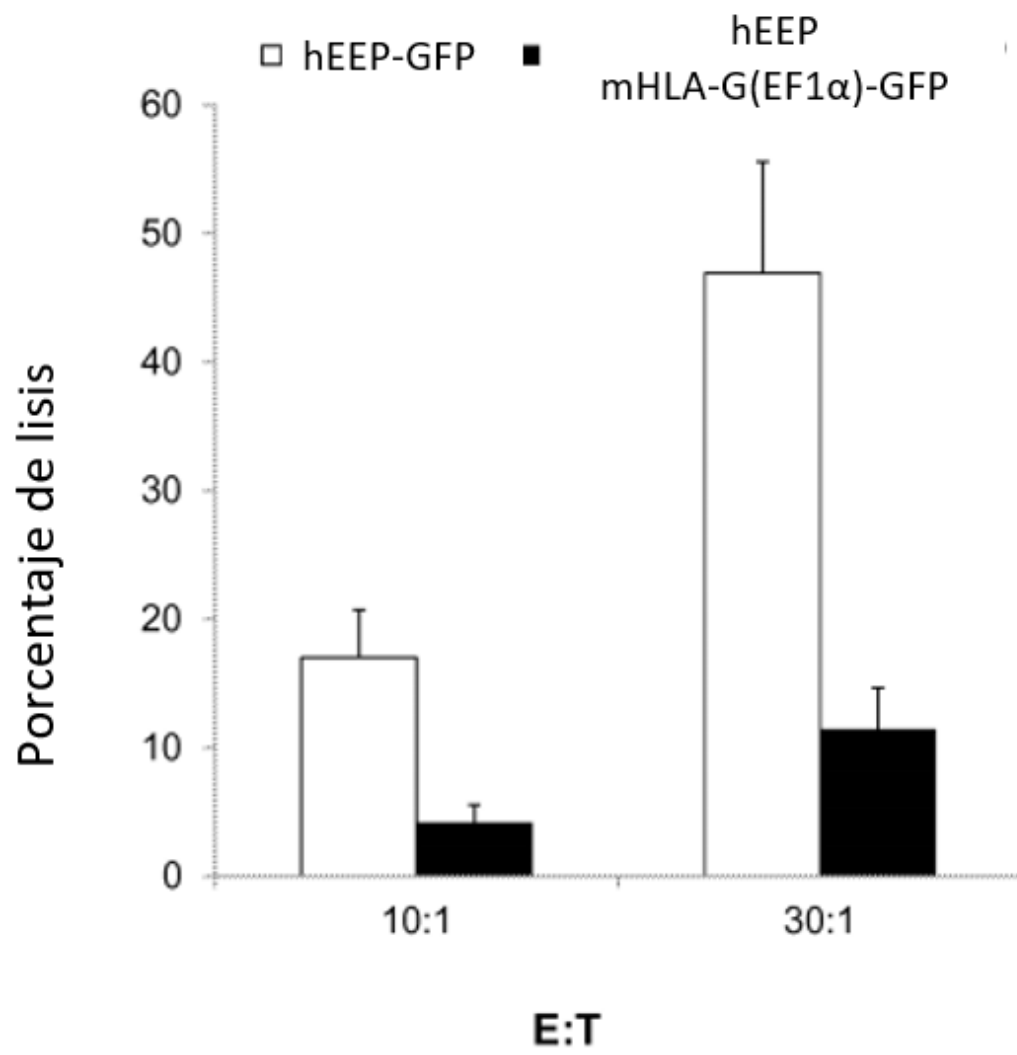


Figura 19

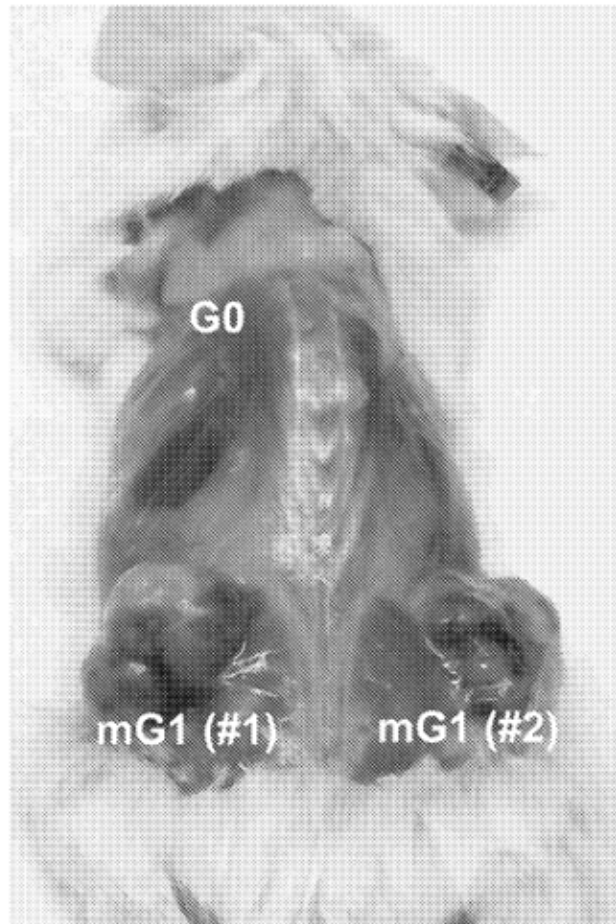


Figura 20

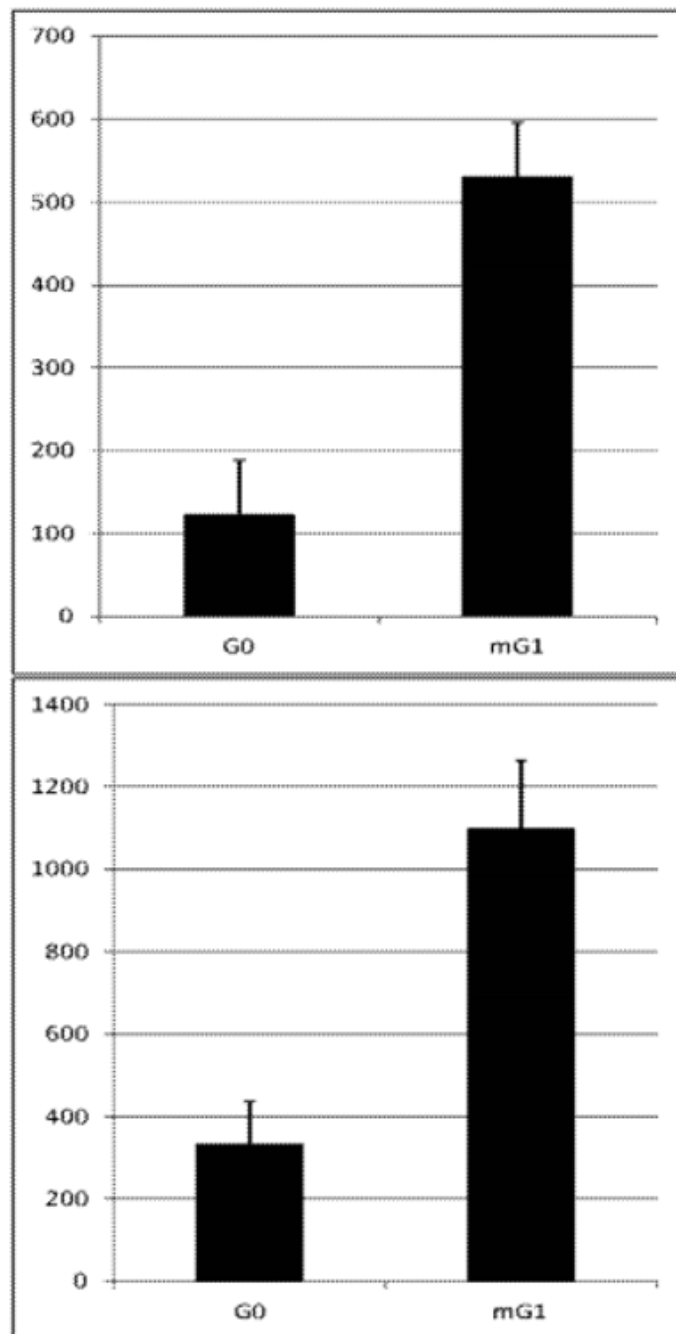


Figura 21

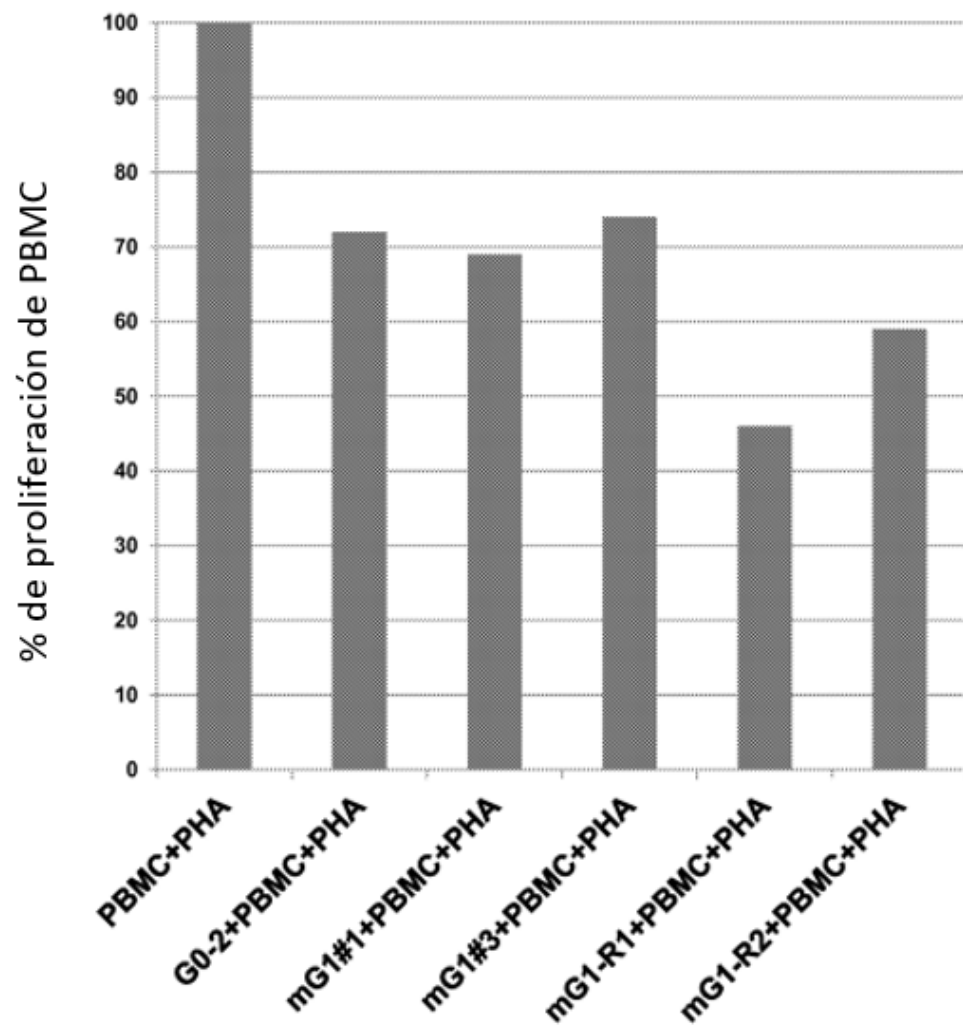


Figura 22