



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 724**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98906314 .4**  
96 Fecha de presentación : **10.02.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1019490**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2000**

54 Título: **Procedimiento para modular la hematopoyesis y el crecimiento vascular.**

30 Prioridad: **10.02.1997 US 37513 P**  
**16.06.1997 US 49763 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.05.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.05.2010**

73 Titular/es:  
**The President and Fellows of Harvard College**  
**Harvard University, University Place**  
**Suite 256, 124 Mt. Auburn Street**  
**Cambridge, Massachusetts 02138, US**

72 Inventor/es: **Baron, Margaret, H.;**  
**Farrington, Sarah, M. y**  
**Belaoussoff, Maria**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**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

Procedimiento para modular la hematopoyesis y el crecimiento vascular.

5 **Campo técnico**

Se proporcionan procedimientos y compuestos novedosos para modular la hematopoyesis y el crecimiento vascular *in vitro* e *in vivo*.

10 **Técnica anterior**

La vida de un nuevo individuo se inicia por la fusión de material génico de los dos gametos, el espermatozoide y el óvulo. Tras varias rondas de división, las células empiezan un proceso de diferenciación que en última instancia da como resultado el organismo adulto maduro. El proceso implica muchas etapas incluyendo un número diverso de factores que actúan en momentos específicos durante la ruta que conduce a la maduración. La maduración hasta la forma adulta no termina completamente el proceso diferenciación. Esto es porque el organismo adulto tiene, además de células completamente diferenciadas, células madre no diferenciadas que están disponibles tanto para el reabastecimiento de células diferenciadas durante el ciclo natural de degeneración y regeneración; como también para la reparación de tejido dañado. Ejemplos de células no diferenciadas en el adulto son células madre de médula ósea (más específicamente células madre hematopoyéticas y células progenitoras) así como células progenitoras endoteliales. Las células de esta clase proporcionan un conjunto de herramientas terapéuticas en la naturaleza para la reparación y reconstitución de tejido dañado o enfermo en un paciente. El uso de este conjunto de herramientas terapéuticas por profesionales sanitarios para tratar pacientes está limitado por la ausencia de procedimientos para manipular las rutas de diferenciación de estas células y para preparar o estimular los números existentes de células no diferenciadas sin provocar diferenciación.

Por tanto, existe una necesidad de descubrir procedimientos novedosos en los que el suministro de células no diferenciadas de cualquier individuo particular puede aumentarse, por ejemplo, estimulando la proliferación de las células sin inducir diferenciación. También es deseable modular la diferenciación de células no diferenciadas de una manera controlada. Las células no diferenciadas que están listas para diferenciarse cuando se estimulan para que lo hagan ofrecen un tratamiento a sujetos que padecen enfermedades en las que o bien las propias células madre se ven reducidas como en quimioterapia que destruye la médula ósea, o bien como alternativa para enfermedades en las que se están reduciendo las células diferenciadas a una tasa superior a la que el organismo puede compensar la pérdida por medio de la utilización del suministro natural de células madre no diferenciadas. Por ejemplo, en el SIDA hay una rápida destrucción de células sanguíneas maduras por el virus de la inmunodeficiencia humana dando como resultado una disminución espectacular de las células inmunitarias en el paciente. Existe una necesidad de identificar los factores que hacen que las células madre proliferen y que puedan modular la diferenciación de modo que se potencie la disponibilidad de tales células.

El organismo adulto contiene tanto células madre endoteliales como células madre hematopoyéticas (HSC). Estas células son no diferenciadas, pero en las condiciones apropiadas, se diferencian para formar células sanguíneas y vasos sanguíneos, respectivamente. Aunque haya amplios estudios sobre el crecimiento vascular en el adulto, no se sabe si el crecimiento vascular se limita a la extensión del vaso (angiogénesis) o si también hay un desarrollo vascular *de novo* (vasculogénesis). La comprensión de los factores que regulan el crecimiento vascular no es sólo importante en la comprensión de cómo inhibir el crecimiento vascular anómalo como se produce en tumores, artritis reumatoide, hemangiomas, angiofibromas, psoriasis y proliferación capilar y diabetes sino también en la comprensión de cómo reparar los vasos tras acontecimientos traumáticos incluyendo cirugía, trasplante y privación de nutrientes a tejidos como se produce en enfermedades vasculares tales como las enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares.

En contraposición al crecimiento vascular, la hematopoyesis es normalmente un proceso continuo a lo largo de toda la vida de un adulto. Las células sanguíneas se degradan regularmente y se forman nuevas células dado como resultado una producción diaria de millones de células sanguíneas maduras. Numerosas enfermedades resultan de desequilibrios entre la degradación y la reconstitución de células sanguíneas o de la generación de números inapropiados de ciertas células sanguíneas. Un esquema simplificado de diferenciación de células sanguíneas se proporciona en la figura 12. Este esquema muestra el ruta de desarrollo de ocho tipos diferentes de células sanguíneas que pueden derivarse de una célula madre hematopoyética (HSC) y que pasa por una fase progenitora inmadura. La célula madre hematopoyética pluripotente da lugar a eritrocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, plaquetas, mastocitos, monocitos, macrófagos tisulares, osteoclastos y linfocitos T y B a través de varias rutas diferentes. En el adulto, los eritrocitos se forman cuando la célula madre pluripotente se diferencia en BFU-E (una unidad formadora de colonias eritroides en ramillete), que a su vez forma una CFU-E (unidad formadora de colonias eritroides). Los órganos que forman células sanguíneas en el adulto incluyen la médula ósea y en un menor grado, el hígado, mientras que el bazo es el sitio principal de aclaramiento posterior de células sanguíneas viejas o anómalas. Aunque la búsqueda de factores que regulan la hematopoyesis no se ha limitado a los adultos, los estudios en embriones se han limitado a acontecimientos que se producen cuando el embrión ya está en una fase relativamente avanzada de desarrollo.

Con respecto a los acontecimientos celulares en el embrión, *Cumano et al., Lymphoid Potential, Probed before Circulation in Mouse, Is Restricted to Caudal Intraembryonic Splanchnopleura, 86 (1996) 907-16*, propusieron que las células madre hematopoyéticas (HSC) que pueblan el adulto surgen de un sitio embrionario. Las células sanguíneas

que se notifica que son las primeras en surgir en los islotes sanguíneos en el embrión, parecen originarse a partir de células hematopoyéticas progenitoras en la esplacnopleura paraaórtica dentro del embrión en desarrollo. (Cumano *et al.* (1996). El desarrollo temprano de un ratón se muestra en la figura 14 y la región de formación temprana de islotes sanguíneos se identifica en la periferia de la cavidad extracelómica.

En este momento existen varios factores de crecimiento que se sabe que estimulan células intermediarias de fase temprana en diferentes rutas hematopoyéticas. Estas incluyen los factores de crecimiento hematopoyéticos, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Por ejemplo, CFU-E responde a eritropoyetina para producir el primero miembro diferenciado reconocible del linaje de eritrocitos, el proeritroblasto. Cuando disminuyen los niveles de oxígeno en la sangre, los niveles de eritropoyetina aumentan, lo que conduce a la producción de más células sanguíneas rojas. Cuando madura una célula sanguínea roja, se convierte en un eritroblasto, que sintetiza una enorme cantidad de hemoglobina y después en un eritrocito. Los eritrocitos dejan la médula ósea para emprender el suministro de oxígeno a los tejidos del cuerpo. Aunque los factores conocidos pueden tener utilidad en el tratamiento de ciertas neoplasias malignas o deficiencias hematológicas/inmunitarias, existe una gran necesidad de desarrollar terapias adicionales, particularmente aquellas con un rango más amplio de actividades biológicas que actúan de manera temprana en la ruta de diferenciación. La disponibilidad de una molécula que podría estimular la proliferación y/o diferenciación de HSC de manera temprana en la ruta de diferenciación sería especialmente valiosa como agente terapéutico. Sin embargo, no existen factores que se sepa más allá de toda la duda que estimulan el crecimiento de las propias HSC pluripotentes. Se ha identificado que una proteína denominada factor de células madres está asociada con células hematopoyéticas pluripotentes, pero se cree que este factor es un factor de supervivencia y no un factor que pueda estimular la proliferación de estas células (Caceres-Cortes *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994), 12084-91). HEMMATI-BRIVANLOU, A *ET AL.*: "Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: Expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4" *Developmental Genetics*, vol. 17, enero de 1995 (1995-01-00), páginas 78-89. El documento XP000578234 da a conocer que BMP-2 y BMP-4 inducen la expresión de  $\alpha$ T1 globina en hemisferios animales de *Xenopus*. Se inyectó ARNm sintético que codifica BMP-2 y BMP-4 en los hemisferios animales. La  $\alpha$ T1 globina es un marcador para eritrocitos. Existe una necesidad de regular la proliferación y diferenciación de células madre hematopoyéticas. Por ejemplo, sería deseable inhibir la proliferación descontrolada de células madre o células progenitoras como se produce en ciertas afecciones patológicas. Existe una necesidad de procedimientos para expandir el número de HSC pluripotentes o bien *in vitro* o bien *in vivo* para su uso en el tratamiento de pacientes con anemia crónica o aquellos que se someten a quimioterapia en la que se destruyen la mayoría de sus células de la médula ósea de modo que es necesario estimular eficazmente las células restantes o aumentar la disponibilidad de HSC para su trasplante a un paciente anémico.

## Sumario de la invención

Esta Invención satisface la necesidad anterior proporcionando procedimientos y compuestos novedosos que modulan la proliferación y/o diferenciación de células derivadas mesodérmicamente no diferenciadas de modo que tengan un efecto sobre al menos uno de crecimiento vascular y hematopoyesis.

En una realización de la invención se proporciona la <reivindicación 1>.

En otra realización de la invención, se proporciona la <reivindicación 16>.

En otra realización de la invención, el compuesto hedgehog como se definió anteriormente es para tratar a un sujeto que adolece de un número anómalo de células eritroides.

En otra realización de la invención se proporciona la <reivindicación 38>.

En otra realización de la invención, el compuesto hedgehog como se definió anteriormente es para tratar a un sujeto que padece una isquemia en tejidos.

Se proporciona un ensayo *in vitro* para determinar la actividad de un compuesto que puede modular la hematopoyesis o el crecimiento vascular, que incluye las etapas de seleccionar una población de células de un tejido derivado de un óvulo fertilizado de un mamífero, en el que la población de células es deficiente en formación de sangre detectable por la ausencia de un marcador predeterminado; y añadir un agente a la población de células de modo que se revierte la deficiencia.

Se proporciona un ensayo para determinar la actividad de un compuesto que puede modular la hematopoyesis o el crecimiento vascular, que incluye las etapas de seleccionar un primer animal transgénico que porta un marcador: gen híbrido de  $\epsilon$ -globina, en el que el gen de  $\epsilon$ -globina puede expresarse al menos hasta 15,5 dpc; aparear el primer animal transgénico con un segundo animal que es transgénico de manera similar; aislar un embrión del apareamiento en un momento dentro del primer tercio del periodo de gestación; y determinar el efecto del compuesto sobre la estimulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular en el embrión aislado midiendo la expresión del marcador.

## Breve descripción de los dibujos

Las características anteriores de la invención se comprenderán más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada tomada con los dibujos adjuntos.

La figura 1 muestra cuatro casetes de expresión usados para generar ratones transgénicos. (a) -179 lacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB70) es el constructo básico con el promotor mínimo de  $\epsilon$ -globina ( $\epsilon$ -pro), que se extiende hasta -179 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción (+1) y ~20 pb de la región no traducida en 5' de  $\epsilon$ -globina (mostrada como un pequeño recuadro negro por debajo de +1).  $\epsilon$ -pro se conecta a un casete de expresión de LacZ que contiene un  
 5 secuencia consenso Kozak y un sitio de iniciación de la traducción (región SDK). En el sentido de 5' del gen indicador LacZ hay un parte de la región en 3' del gen de  $\epsilon$ -globina que contiene parte de exón 2, la totalidad del intrón 2 (IVS 2) y la totalidad del exón 3; estas secuencias se muestran como recuadros negros (exones) y una línea negra (intrón). La región en 3' no traducida (que contiene el sitio de poliadenilación, pA) se muestra como una línea discontinua. Una versión truncada de LCR ( $\mu$ PLCR) se ubica en el sentido de 5' de las secuencias de  $\epsilon$ -lacZ. (b) -849 lacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB73), (c)  $\epsilon$ -PRE(II+V)lacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB72); y (d) - 2kblacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB92). (a)-(d) contienen  $\epsilon$ -pro y diferentes  
 10 partes de la región reguladora en el sentido de 3' del gen de la  $\epsilon$ -globina humana. Secuencias eucariotas en (a)-(d) se escindieron del vector mediante digestión con KpnI y NotI y luego se purificaron para microinyección en los pronúcleos macho de cigotos de ratón.

La figura 2 muestra la expresión de LacZ, correlacionada con la aparición de una tinción azul, en eritroblastos primitivos. A (a) es una representación esquemática de un embrión de 7,5 dpc; (b) es un embrión transgénico teñido con XGal y visto mediante microscopía de campo claro, (c) es el mismo embrión visto mediante microscopía de campo  
 15 oscuro; B (a) es un ratón no transgénico; (b) y (c) son embriones a los 8,5 dpc teñidos con XGal; C(a) es un embrión de tipo natural de 12,5 dpc, (b) y (c) son embriones transgénicos de 12,5 dpc. (1) de tipo natural; (2) transgénico; (3) cono ectoplacentario; (4) islote sanguíneo; (5) cavidad amniótica; (6) trofotodermo; (7) alantoides; (8) mesodermo extraembrionario; (9) el propio embrión (epiblasto).

La figura 3 muestra la formación de estructuras de tipo saco vitelino mediante blastocistos cultivados (a) blastocistos transgénicos antes del cultivo (b) Estructura de tipo saco (no transgénica) teñida con bencidina para revelar células  
 25 que contienen hemoglobina (c) Saco de blastocistos transgénicos cultivados teñidos con XGal para revelar células que contienen hemoglobina tras 9 días de cultivo (d) Embrión transgénico normal de 8,5 dpc y saco vitelino teñido con XGal.

La figura 4 muestra un análisis de RT-PCR de cultivos de blastocistos: (A) se observó  $\epsilon$ -globina en blastocistos  
 30 que se han desarrollado en estructuras de tipo saco (saco) pero no en muestras que eran montones relativamente planos de células (plano). La banda de mayor peso molecular es la actina como control interno. La banda de menor peso molecular es  $\beta$ -globina embrionaria. (B) Los blastocistos cultivados respondieron a señales ambientales lo cual se demostró mediante los efectos del sustrato sobre la diferenciación eritroide (i) el tejido mesodérmico expresó  $\beta$ -globina embrionaria sobre plástico pero no sobre colágeno. Los marcadores endodérmicos (receptor PTHrP y PTHrP)  
 35 se expresaron en tejido endodérmico tanto sobre superficies de plástico como de colágeno.

La figura 5 muestra que la eritropoyesis primitiva se inicia tardíamente en la gastrulación. A la izquierda se muestra un análisis de embriones completos (*whole-mount*) *in situ* de embrión de estricta tardía (~7,5 dpc) y a la derecha hay un  
 40 embrión de estricta temprana (~6,5 dpc). La tinción violeta es un sustrato cromogénico. La sonda de ARN de  $\epsilon$ -globina revela células hematopoyéticas en el embrión a la izquierda como se muestra en la vista rostral (anterior), y ninguna en el embrión en la derecha demostrando la ausencia de formación de sangre en el embrión de 6,5 dpc.

La figura 6 muestra expresión diferencial de los genes *patched* (*ptc*) y *Gli* en el mesodermo de saco vitelino diseccionado a los 10,5 dpc y 12,5 dpc por medio de análisis de RT-PCR, revelando la expresión sustancialmente  
 45 exclusiva de *Gli* y *ptc* en el mesodermo de saco vitelino diseccionado: completo, sacos vitelinos no diseccionados; meso, capa del mesodermo; endo, capa del endodermo; -ADNc, control negativo de ADNc. La actina sirvió como un control interno.

La figura 7 muestra que cuando explantes transgénicos de embriones en gastrulación (aislados a los 6,25-6,5 dpc) se  
 50 ponen en cultivo sobre filtros o portaobjetos de vidrio durante 72 horas, la inducción de la hematopoyesis embrionaria se produce en el embrión completo, pero está ausente en epiblastos solamente, como se determina mediante tinción con XGal. Se dibujaron líneas discontinuas alrededor de los epiblastos para facilitar la visualización de las estructuras. (a) Embrión completo sobre un filtro; (b) epiblasto sobre un filtro; (c) embrión completo sobre un portaobjetos; y (d) epiblasto sobre un portaobjetos.  
 55

La figura 7-1 muestra la formación de sangre en cultivos de explantes embrionarios transgénicos. (Secciones de  
 60 embriones teñidas con lacZ). Secciones de tejido congeladas se tiñeron con XGAL para revelar la agrupación de células hematopoyéticas positivas para lacZ en los embriones completos (a), epiblastos (b), partes posteriores del embrión (c, d) y parte anterior del epiblasto transgénico adyacente al VE (e), pero no en el endodermo visceral circundante ni en el mesodermo no diferenciado ni en el tejido de VE no transgénico de recombinantes de VE/anteriores (e).

La figura 8-1 muestra la inducción de hematopoyesis mediante señales de endodermo visceral (VE). (a) microfotografía de fondo oscuro de recombinante que contiene epiblasto transgénico (Tg) y VE no Tg que muestra tinción de  
 65 lac Z localizada en el embrión adyacente al endodermo visceral; (b) diagrama esquemático que corresponde al panel (a). Abreviaturas: Tg, transgénico; Ve, endodermo visceral; EryP, células eritroides primitivas; (c) microfotografía de fondo claro del recombinante mostrado en (a).

La figura 8-2 muestra la inducción de hematopoyesis embrionaria en embrión completo, y en epiblasto más endodermo visceral, pero ningún en epiblastos solamente, usando RT-PCR. (Se prepararon todas muestras tras una incubación *in vitro* de 72 horas de embriones aislados a las 6,5 dpc). La actina sirvió como un control interno.

La figura 9 muestra que la proteína hedgehog recombinante puede sustituir el endodermo visceral para estimular hematopoyesis primitiva en epiblastos cultivados. Los epiblastos aislados se cultivaron en ausencia (carriles marcados como "ninguno") o en presencia de tres concentraciones diferentes de proteína hedgehog recombinante (0,25, 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se evaluó la hematopoyesis primitiva mediante análisis de RT-PCR para determinar la expresión de  $\epsilon$ -globina. La actina sirvió como un control interno. YS, control de saco vitelino.

La figura 10 muestra la activación de eritropoyesis primitiva mediante un factor difusible en células de endodermo visceral por medio de análisis de RT-PCR.

La figura 11 muestra la inhibición de eritropoyesis primitiva en embriones completos cultivados usando un anticuerpo de bloqueo de SHH por medio de análisis de RT-PCR.

La figura 12 muestra una representación esquemática de la jerarquía hematopoyética de adulto.

La figura 13 muestra la derivación de linajes celulares en el saco vitelino embrionario de mamífero. La estructura circular representa un blastocisto de aproximadamente 3,5 días.

La figura 14 muestra el desarrollo temprano del ratón. La región de formación temprana de islotes sanguíneos se produce en la cavidad exocelómica (f) entre el epiblasto por debajo que está rodeado por el endodermo visceral y el tejido extraembrionario encima.

La figura 15 muestra el esquema experimental para la separación del epiblasto en las partes anterior y posterior. (A) representa el embrión completo de 6,75 dpc con endodermo visceral alrededor del perímetro del epiblasto y el mesodermo extraembrionario. (B) representa el embrión tras haber eliminado el endodermo visceral y (C) muestra el epiblasto solamente, mostrando una línea de puntos de la transección cómo las secciones anterior y posterior se dividen físicamente antes del cultivo por separado.

La figura 16-1 muestra que el mesodermo hematopoyético surge de la estría primitiva posterior (mesodermo posterior) cuando las partes anterior y posterior de embriones transgénicos con lacZ se recogen en la gastrulación de media a tardía. Panel A: no se detecta tinción en los epiblastos anteriores. Panel B: la tinción histoquímica azul oscuro con XGAL muestra la formación de sangre en los epiblastos posteriores en cultivo. Barra de escala, 1 mm.

La figura 16-2 muestra que el endodermo visceral puede reprogramar el ectodermo embrionario anterior (epiblasto) para expresar marcadores hematopoyéticos. La expresión de marcadores de  $\epsilon$ -globina,  $\beta$ -globina, GATA-1 y CD34 se muestra para el epiblasto anterior (anterior: carriles 6-10), el epiblasto posterior (posterior: carriles 6-10) y anterior recombinado con endodermo visceral (recombs a/Ve: carriles 1-5). Los tejidos de control fueron embrión completo no en cultivo [emb(-cx)], embriones completos en cultivo [emb(+cx)] y tejido de saco vitelino de 10,5 dpc. El marcador de control fue actina y miosina cardiaca. Un control adicional es emb(+cx) sometido a PCR en ausencia de transcriptasa inversa.

Figura 16-3. El endodermo visceral puede reprogramar el ectodermo embrionario anterior (epiblasto) para expresar marcadores vasculares. Se muestra la expresión de PECAM-1, flk-1 y actina para el epiblasto anterior (anterior: carriles 6-10), el epiblasto posterior (posterior: carriles 6-10) y anterior recombinado con endodermo visceral (recombs a/Ve: carriles 1-5). Los tejidos de control fueron embriones completos no en cultivo [emb(-cx)], embriones completos en cultivo [emb(+cx)] y tejido de saco vitelino de 10,5 dpc. El marcador de control fue actina.

La figura 17 muestra los resultados de un experimento de rescate usando células madre embrionarias mutantes nulos (ES) y añadiendo de nuevo BMP-4 recombinante al cultivo. (A) y (C) muestra cuerpos embrioides de tipo natural que surgen de células madre embrionarias aisladas de un ratón de tipo natural. En (B) las células madre embrionarias son homocigotas deficientes en BMP-4, y los cuerpos embrioides carecen de formación de sangre detectable. En (D), la proteína BMP-4 se añade a los cuerpos embrioides de (B) y se observa la formación de la sangre.

### Descripción detallada de la invención

La invención identifica por primera vez procedimientos para estimular actividades de desarrollo seleccionadas en tejido embrionario y adulto, concretamente el desarrollo de la sangre caracterizado por la hematopoyesis y el crecimiento vascular. El procedimiento además utiliza moléculas secretadas por tejidos extraembrionarios que pueden modular la proliferación o diferenciación de células madre y células progenitoras de embrión o adulto. Se usan ensayos novedosos para identificar los compuestos que pueden estimular la hematopoyesis y el crecimiento vascular: Se proporciona apoyo para los procedimientos de la invención en los ejemplos contenidos en el presente documento. Según una realización de la invención, se han identificado compuestos que pueden estimular el desarrollo de la sangre en el embrión y en el adulto y son funcionalmente equivalentes a productos génicos expresados en el endodermo visceral y el mesodermo del saco vitelino. Tales productos génicos se ejemplifican mediante compuestos hedgehog, TGF- $\beta$ ,

TNF y compuestos WNT y se identifican en el presente documento como que logran un efecto similar al observado con tejidos extraembrionarios con respecto a la hematopoyesis y el crecimiento vascular en tejidos derivados de mesodermo no diferenciados. En una realización de la invención, compuestos incluyendo los seleccionados de hedgehog y TCF- $\beta$  pueden actuar de manera sinérgica de modo que potencian su efecto estimulador sobre las células diana.

“Adulto” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como descriptivo de tejidos y células derivados de o dentro de un sujeto animal en cualquier momento tras el nacimiento.

“Embrionario” se define en el presente documento y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, como descriptivo de tejidos y células derivados de o dentro de un sujeto animal cualquier momento antes del nacimiento.

“Desarrollo de la sangre” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como hematopoyesis y crecimiento vascular.

“Crecimiento vascular” se define en el presente documento como al menos uno de vasculogénesis y angiogénesis e incluye formación de capilares, arterias, venas o vasos linfáticos.

“Hematopoyesis” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como el proceso de producción de células sanguíneas.

“Célula madre hematopoyética” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como un precursor multipotente del cual se derivan todas las clases de células sanguíneas.

“Células sanguíneas definitivas” se definen en el presente documento y en las reivindicaciones como células sanguíneas del organismo fetal o adulto.

“Células sanguíneas primitivas” se definen en el presente documento y en las reivindicaciones como una población transitoria de células sanguíneas que se forman durante el desarrollo de la sangre en el embrión.

“Endodermo definitivo” es el endodermo que se deriva durante la gastrulación de células de la estría primitiva que contribuyen a tejidos adultos derivados endodérmicamente como intestino e hígado.

“Endodermo visceral” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como células endodérmicas extraembrionarias que son secretoras y no contribuyen directamente a ningún tejido del organismo totalmente formado.

“Células progenitoras” se definen en el presente documento y en las reivindicaciones como células no diferenciadas que están más restringidas en su potencial para dar lugar a tipos celulares diferenciados en comparación con una célula madre.

“Comprometidas” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como células destinadas a diferenciarse junto con un linaje específico en lugar de conservar la multipotencia.

“RT-PCR” se define en el presente documento como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa que permite la detección de la transcripción de un gen en un tejido.

“Efecto sinérgico” se define en el presente documento en cuanto a dos o más compuestos en los que se observa poco o ningún efecto biológico con los compuestos solos pero juntos los compuestos tienen un efecto biológico potente.

“Compuesto hedgehog” se define en el presente documento y en las reivindicaciones como una clase de moléculas de la familia hedgehog (erizo) que incluye proteína hedgehog recombinante, análogos, y derivados de proteínas hedgehog, y agonistas y antagonistas de los receptores de proteína hedgehog y equivalentes funcionales de los mencionados anteriormente.

“Células derivadas del mesodermo no diferenciadas” quiere decir en el presente documento y en las reivindicaciones que incluyen células que no están diferenciadas o no están comprometidas y además incluye células madre y células progenitoras

CFU-E se define en el presente documento como célula formadora de colonia eritroide (unidad), que es una célula progenitora tardía (madura). Las colonias que se puntúan como CFU-E son pequeñas agrupaciones apretadas, de células pigmentadas y aparecen en un plazo de 2-3 días de cultivo.

BFU-E se define en el presente documento como unidad formadora de colonias eritroides en ramillete, una célula eritroide primitiva. Estas colonias están pigmentadas y son de mayor tamaño que CFU-E; sus células están más ampliamente dispersas, y aparecen en un momento posterior tras el cultivo en placa. Sus números son máximos alrededor de 7 días en cultivo.

CFU-GM se define en el presente documento como unidad formadora de colonias mieloides o de granulocitos-macrófagos. Éstas son de aspecto similar a BFU-E pero no están pigmentadas.

CFU-S se define en el presente documento como unidad formadora de colonias de bazo.

La hematopoyesis y el crecimiento vascular son algunos de los primeros requisitos de una masa de tejido en crecimiento para garantizar el suministro de nutrientes a las células en el interior de la masa. El embrión en desarrollo requiere nutrición y, por tanto, la diferenciación de las células para formar eritroblastos (células que transportan oxígeno) y la formación de un sistema vascular (sistema de transporte) son uno de los primeros acontecimientos en el proceso de desarrollo. Mientras que el tejido embrionario está experimentando un movimiento celular que recuerda el observado en gastrulación de aves y reptiles (migración de células de mesodermo y endodermo definitivo a través de una estría primitiva), las células extraembrionarias están fabricando tejido de mamífero que permite que el feto sobreviva en el útero materno. Esto incluye estimular un suministro de sangre materna para formar el endometrio uterino. El pedículo de conexión estrecho de mesodermo extraembrionario que une el embrión al trofoblasto forma finalmente los vasos del cordón umbilical. El órgano totalmente desarrollado, constituido por tejido trofoblástico y mesodermo que contiene vasos sanguíneos, se denomina el corion. La fusión del corion y la pared uterina forma la placenta. A las 4 semanas tras la concepción, el embrión humano tiene una fuente de nutrientes a través de los vasos sanguíneos fetales que están adyacentes a la circulación materna.

En el adulto, el crecimiento vascular se produce durante la reparación de tejidos dañados y en una variedad de enfermedades incluyendo cáncer, en el que un tumor libera factores que estimulan la aparición de vasos sanguíneos en tejido normal en el que los nuevos vasos sanguíneos se dirigen hacia el interior del tejido tumoral. Las células madre hematopoyéticas (HSC) que pueblan el adulto pueden surgir en un sitio intraembrionario. (*Cumano, et al. (1996)*). Se cree que este tejido mesodérmico es un sitio importante si no el principal sitio de origen de células madre hematopoyéticas definitivas y quizás las células que dan lugar a la vasculatura.

Aunque el proceso de hematopoyesis y crecimiento vascular se comprende sólo parcialmente, la ruta de desarrollo en ratones parece que imita el proceso equivalente en seres humanos. El sistema hematopoyético del ratón se deriva de la capa germinal mesodérmica que empieza a formarse en embriones en fase de estría primitiva de alrededor de 6,5 dpc. En primer lugar aparecen islotes sanguíneos en el mesodermo extraembrionario a 7,5 dpc y progenitores hematopoyéticos en el mesodermo del saco vitelino visceral de embriones dentro de 1-2 pares de somitas a 8 dpc. A la mitad de 8 dpc, son visibles glóbulos rojos primitivos nucleados en la vasculatura del saco vitelino pero no entran en el sistema circulatorio primitivo hasta 8,5 dpc. Comenzando en 8,5-9 dpc, se han encontrado células progenitoras hematopoyéticas en regiones derivadas del mesodermo dentro del cuerpo del embrión, de manera notable la esplancnopleura paraaórtica (*Cumano, et al. (1996)*). Células de mesodermo espláncnico que cubren el saco vitelino forman cordones de células que crean un orificio para producir un tubo revestido por las células endoteliales. Las células centrales de los islotes sanguíneos se diferencian en células sanguíneas embrionarias. Según crecen los islotes sanguíneos, finalmente se funden para formar la red de capilares y los vasos vitelinos que en última instancia se conectan al corazón recién formado.

Hasta ahora, poco se ha sabido con respecto a los acontecimientos bioquímicos antes de aproximadamente 8 dpc que desempeñan un papel en la vasculogénesis y hematopoyesis. Sin embargo, los inventores afirman que esta fase en desarrollo desempeña un papel significativo en la maduración del sistema sanguíneo en el embrión y en el adulto. Según realizaciones de la invención, los procesos de crecimiento vascular y hematopoyesis en el desarrollo embrionario se ven afectados por compuestos en el endodermo visceral. Por ejemplo, los inventores han identificado por primera vez que proteínas hedgehog actúan sobre células derivadas del mesodermo no diferenciadas *in vitro* para estimular la formación de la sangre y sobre el desarrollo de tejido embrionario y saco vitelino en fases muy tempranas en las rutas de la hematopoyesis y el crecimiento vascular. Además, según la invención, estos compuestos de actuación temprana son útiles en la regulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular en el animal adulto. (Tablas 1 y 2). Según realizaciones de la invención, “estimular una población de células derivadas del mesodermo no diferenciadas para que experimenten al menos uno de hematopoyesis y crecimiento vascular” incluye estimular la proliferación de células progenitoras y células madre hematopoyéticas antes de la diferenciación (ejemplo 4).

La identificación de factores en el endodermo visceral que estimulan el desarrollo de la sangre y el crecimiento vascular se demuestran en el presente documento a través del uso de ensayos novedosos. Estos ensayos incluyen:

- (a) el análisis de tejidos de explante embrionario antes, durante y después del desarrollo de la sangre. Por ejemplo, pueden derivarse explantes de blastocistos que se forman en la primera fase de desarrollo del mamífero. Los blastocistos se forman cuando el embrión alcanza la fase de 64 células formando una masa celular interna, una capa celular trofoblástica externa formada a partir de células trofoectodérmicas y un espacio interno que contiene fluido identificado como el blastocele. La masa celular interna (ICM) se sitúa en el blastocele y se segrega en el “endodermo primitivo” que forma la capa externa de la ICM, y la propia ICM. El “endodermo primitivo” da lugar al endodermo parietal y visceral. Las células internas de la ICM, que forman el ectodermo primitivo, dan lugar al propio embrión. Los blastocistos, que se aíslan antes de iniciarse el desarrollo de la sangre, pueden mantenerse en cultivo durante periodos de tiempo que permiten la formación de tejidos característicos de órganos asociados con la vasculatura como músculo cardíaco

que late. En primer lugar se observa histológicamente el desarrollo de la sangre cuando se observan islotes sanguíneos entre el endodermo y el mesodermo del saco vitelino embrionario en desarrollo. Sin estar limitado a la teoría, los inventores creen que los islotes observados se forman como resultado de la formación de eritroblastos y células endoteliales a partir de células precursoras no diferenciadas. En el modelo experimental de ratón, pueden aislarse explantes embrionarios a o tras 2 dpc antes de que se observe la formación de islotes sanguíneos y pueden mantenerse *in vitro* hasta 14 dpc y durante más tiempo cuando el desarrollo de órganos está en progreso, proporcionando un sistema modelo para seguir la iniciación y progresión del sistema sanguíneo y vascular. El aislamiento de explantes antes de la formación de la sangre según la invención es novedoso con respecto a la técnica anterior, técnica anterior que describe acontecimientos sobre el desarrollo de la sangre tras haberse producido ya la iniciación de la formación de islotes sanguíneos. (Cumano *et al.* (1996), Palis *et al.*, *Blood* 86 (1995), 160-63, Kanatsu *et al.*, *Development* 122 (1996), 23-30).

- (b) El uso de explantes de animales transgénicos en los que la región reguladora de un producto génico de fase temprana asociado con la formación de la sangre (por ejemplo el gen de la  $\epsilon$ -globina) está acoplado a un marcador, de modo que el marcador (por ejemplo LacZ) sirve para señalar el comienzo de la hematopoyesis y el crecimiento vascular [Ejemplo 1]. El comienzo de la de hematopoyesis o el crecimiento vascular puede detectarse usando procedimientos de detección sensibles como RT-PCR que pueden detectar la iniciación de la expresión y el grado de expresión de productos génicos que están asociados al desarrollo de la sangre; tinción histoquímica ejemplificada por tinción con bencidina de hemoglobina; inmunohistoquímica que utiliza un anticuerpo de especificidad apropiada; hibridación *in situ* de embriones completos; hibridación *in situ* usando ribosondas radiomarcadas y otros procedimientos de detección conocidos en la técnica.

Se describen cuatro diseños de ensayos diferentes a continuación y en los ejemplos 1 y 2 que son útiles tanto individualmente como en combinación para cribar e identificar factores implicados en la hematopoyesis y el crecimiento vascular.

- (i) Cultivos de epiblastos: se recogieron explantes de embrión intactos antes de la aparición histológica de islotes sanguíneos por ejemplo a 6,5 dpc, y se incubaron intactos *in vitro* usando técnicas de cultivo convencionales de modo que permitan que continúe el desarrollo del embrión sirviendo de ese modo como controles positivos de formación de la sangre. (Ejemplo 2A-B). En estas circunstancias, los explantes formaron islotes sanguíneos *in vitro* y la formación de la sangre pudo seguirse midiendo la aparición de marcadores de desarrollo temprano de la sangre como  $\epsilon$ -globina, ( $\beta$ -globina embrionaria) GATA-1, CD 34, sca-1 (marcadores de células madre hematopoyéticas) PECAM-1, flk-1, Vezf-1 (marcador endotelial). En el ejemplo 2, se detectó la expresión del gen de la  $\epsilon$ -globina tras una incubación durante 72 h *in vitro* en cultivos de epiblastos usando RT-PCR. Los embriones explantados de animales transgénicos, que portaban el marcador LacZ bajo el promotor del gen de la  $\epsilon$ -globina, teñido con XGal tras un periodo de tiempo similar. El ensayo incluye la creación de explantes de embrión que no pueden producir islotes sanguíneos, en los que esta incapacidad es reversible. Cuando se separaron por primera vez los embriones del endodermo visceral, los epiblastos resultantes no pudieron teñirse positivamente con XGal en cultivos de explante y por tanto no pudieron expresar  $\epsilon$ -globina (figuras 7, 8). Se han identificado factores difusibles que modulan la iniciación de la hematopoyesis de una manera independiente del contacto directo célula-célula. Estos factores se fabrican en el exterior del epiblasto, por ejemplo, en el endodermo visceral. El papel biológico de estos factores se confirmó mediante experimentos de reconstitución usando tejidos de epiblasto y endodermo visceral (figura 8). El requerimiento de factores contenidos en el endodermo visceral se demostró adicionalmente cuando los inventores compararon el efecto del tratamiento de epiblastos con medio condicionado obtenido de cultivos celulares de endodermo visceral en comparación con epiblastos control no tratados (ejemplo 2A). Mientras que, en ausencia de medio condicionado, los epiblastos no expresan  $\epsilon$ -globina, La adición de medio condicionado que contiene factores celulares secretados indujo la expresión de  $\epsilon$ -globina en el tejido embrionario (figura 10). Se analizaron epiblastos derivados de ratones no transgénicos para detectar la expresión génica usando inmunotinción o hibridación *in situ* de embriones completos.
- (ii) Cultivos de blastocistos: se midió la expresión de XGal en blastocistos derivados de ratones transgénicos que contenían un gen híbrido formado a partir de un marcador detectable controlado por secuencias reguladoras de un gen asociado con la formación de la sangre como globina de tipo  $\beta$  embrionaria: LacZ ( $\epsilon$ -globina: LacZ). En el ejemplo 2(C), se aislaron blastocistos a 3,5 dpc y se incubaron durante 7-10 días más. (Figura 13) Como alternativa, se han preparado cultivos de blastocistos como anteriormente usando ratones no transgénicos y se ha detectado la expresión génica mediante inmunotinción o hibridación *in situ* de embriones completos. Se proporcionan detalles de los cultivos de blastocistos en el ejemplo 2(C) y en la figura 3.
- (iii) Ensayos de cultivos de epiblastos modificados: se han recogido embriones en gastrulación en fase tardía y epiblastos preparados mediante retirada por disección del ectodermo extraembrionario (ejemplo 2(B)). Durante la gastrulación, células embrionarias establecieron el plano básico del cuerpo y el mesodermo extraembrionario contribuye a los tejidos extraembrionarios, respectivamente. Las células mesodérmicas destinadas a sitios extraembrionarios salen de la estría primitiva posterior y subdividen el embrión en tres



cavidades separadas por la fase de estría tardía a 7,5 dpc. La cavidad central, el exoceloma, se reviste por completo con células mesodérmicas. Estas células mesodérmicas se extienden adyacentes al ectodermo embrionario para formar el amnios, el ectodermo extraembrionario para formar el corion y el endodermo visceral para formar el saco vitelino visceral (VYS). Al final de la gastrulación, las células en el embrión se han separado en tres capas germinales: el ectodermo externo, que da lugar a la epidermis y el sistema nervioso; el endodermo interno, que da lugar al revestimiento del tubo digestivo y sus órganos asociados (como páncreas, hígado y bazo); y el mesodermo intermedio, que da lugar a varios órganos (corazón, riñón, gónadas), tejido conjuntivo (hueso, músculo, tendones) y la células sanguíneas definitivas.

Se transeccionaron epiblastos individuales de embriones en gastrulación en fase tardía en sus partes anterior y posterior y se cultivó cada parte individualmente durante varios días (figuras 14 y 15). Mientras que la parte anterior del epiblasto formó pocos o ningún islote sanguíneo como se determinó mediante la expresión de  $\epsilon$ -globina usando técnicas de RT-PCR, las partes posteriores formaron sangre a niveles comparables a los del epiblasto intacto. Usando este ensayo, pueden añadirse composiciones al epiblasto anterior y determinarse la estimulación de la formación de la sangre. El control en este ensayo es la adición de endodermo visceral que sea suficiente para hacer que el epiblasto anterior forme islotes sanguíneos. Cuando se añadió o bien el endodermo visceral o bien la proteína hedgehog al cultivo, se observó la formación de sangre. (Figura 16)

- (iv) Explantes o cuerpos embrioides derivados de mutantes deficientes en la proteína dirigida: se forman cuerpos embrioides a partir de células madre embrionarias recogidas que se incuban *in vitro* usando técnicas bien conocidas en la técnica. (Ejemplo 2(C)) Estas células forman cuerpos embrioides que contienen varios tipos celulares incluyendo células sanguíneas y células precursoras endoteliales (véase la figura 17 (A, C)). Las células madre embrionarias pueden someterse a mutaciones dirigidas en genes de ratón seleccionados, productos que desempeñan un papel en la hematopoyesis y el crecimiento vascular, usando técnicas bien establecidas como recombinación homóloga y resistencia a fármacos seleccionable, que dan como resultado células que son homocigotas para la mutación del gen dirigido. Pueden inducirse mutaciones que (i) “desactivan” un gen codificante o una secuencia reguladora; (ii) “desactivan” un gen codificante o secuencia reguladora y sustituyen la secuencia por una secuencia “activada” que hace con que se produzca otra cosa (la secuencia activada puede ser una secuencia mutada); o (iii) generar una mutación aleatoria mediante la inserción de ADN foráneo en el genoma o el uso de productos químicos para provocar mutaciones. Las consecuencias de formar tales mutaciones incluyen: modificación de actividad de un producto génico particular y anulación de la actividad del producto génico y puede incluir además la substitución de un producto génico por otro producto génico mediante procedimientos establecidos de manipulación génica.

Cuando estas mutaciones dirigidas dan como resultado la no expresión génica de la proteína, las mutaciones se denominan mutaciones nulas. Se formaron mutantes nulos usando células madre embrionarias de tipo natural. Según la invención, los mutantes nulos deficientes en una proteína que está asociada con el endodermo visceral de tal modo que su ausencia da como resultado el fallo para fabricar sangre, es un sistema modelo adecuado para cribar compuestos novedosos de bibliotecas como aquéllas derivadas de tejidos extraembrionarios, bibliotecas que incluyen bibliotecas de péptidos combinatorios y bibliotecas de ADN recombinante. Usando una estrategia de reunión para reducir en número de pruebas experimentales, pueden identificarse los compuestos que son útiles en la modulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular en cuerpos embrioides.

Este tipo general de ensayo puede usarse para estudiar el efecto de otras mutaciones, tales como deficiencia de factores señalización tales como proteínas hedgehog (por ejemplo, Indian hedgehog), sobre la formación de la sangre. (Ejemplos 3-5) Por ejemplo, pueden formarse células ES mutantes nulas *Ihh* e identificarse factores que pueden superar la mutación. Estas células podrían rescatarse o bien proporcionando proteína hedgehog exógena o bien transfectando las células con vectores que expresan un gen hedgehog utilizando vectores convencionales o vectores retrovirales. (Figura 9) Las células mutadas también podrían reintroducirse en ratones para formar quimeras.

Estas técnicas de detección se usaron para detectar la hematopoyesis y el crecimiento vascular en cultivos de epiblastos y blastocistos tal como sigue: según el ensayo de la invención, el comienzo de la formación de islotes sanguíneos puede detectarse usando cualquiera de las técnicas sensibles disponibles en la técnica, incluyendo lo que sigue:

- (1) detección de XGal en explantes derivados de ratones transgénicos que contenían el gen híbrido globina de tipo  $\beta$  embrionaria:LacZ ( $\epsilon$ -globina:LacZ). Los embriones de ratones transgénicos homocigotos se analizaron usando XGal para revelar la transcripción de gen de globina indicativa de desarrollo de sangre antes de la detección visual de células eritroides (figura 1, 2)
- (2) detección de expresión del gen de globina usando sondas de RT-PCR semicuantitativas radiactivas en epiblastos y blastocistos en diversos momentos tras la concepción. Una ventaja distinta de usar un ensayo radiactivo es que la cantidad de tejido recuperado de explantes individuales es muy pequeña, y un ensayo sensible hace posible someter a ensayo la expresión de muchos genes a partir de un único producto de cultivo (figura 4).

Usando los ensayos anteriores, los inventores han identificado varios compuestos que son funcionalmente equivalentes a los productos génicos que se expresan en tejidos extraembrionarios y puede estimular la formación de sangre. Estos compuestos incluyen proteínas TGF- $\beta$ , más específicamente TGF- $\beta$ 1, más específicamente proteína morfogénica ósea (BMP), más específicamente BMP-4; proteínas de factor de necrosis tumoral (TNF), más específicamente TNF- $\alpha$ ; la familia wnt; y proteínas hedgehog (figuras 5, 9 y 17). Los compuestos también pueden incluir agonistas, antagonistas, análogos y derivados de los anteriores, que se producen de manera natural y sintéticos. Estas moléculas pueden interaccionar con proteínas de membrana que inician las rutas de transducción de señales dando como resultado una respuesta biológica. Por tanto, además de los compuestos anteriores, los agonistas y antagonistas a estas proteínas de unión a membrana incluyendo aquellos receptores, agonistas de receptor y antagonistas de receptor asociados con los receptores de unión a hedgehog y rutas de transducción de señalización de hedgehog tales como smoothened, patched y gli pueden tener utilidad en la regulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular.

El sitio diana para estimular la proliferación de células madre y modular la diferenciación se identifica en este caso como tejido derivado de mesodermo diferenciado previamente tal como está presente en el embrión. El tejido mesodérmico diferenciado previamente embrionario incluye saco vitelino visceral, alantoides, amnios, corion, trofotodermo y saco vitelino prenatal, células madre hematopoyéticas en hígado fetal y sangre de cordón umbilical. El tejido derivado de mesodermo diferenciado previamente en el adulto incluye células madre hematopoyéticas y células progenitoras en médula ósea de adulto, hígado y bazo y células madre endoteliales y células progenitoras en el feto y adulto.

Los ensayos novedosos pueden usarse en múltiples aplicaciones, incluyendo:

- (i) cribar bibliotecas de compuestos para determinar actividad en la estimulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular;
- (ii) someter a prueba para determinar el efecto de factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas de señalización sobre la hematopoyesis embrionaria y también sobre el crecimiento vascular;
- (iii) determinar el efecto de proteínas hedgehog sobre la hematopoyesis y el crecimiento vascular en el embrión, el feto y el adulto. Por ejemplo, el ensayo de blastocistos puede usarse para determinar el efecto de las proteínas hedgehog sobre el desarrollo del saco vitelino *ex vivo* cuando se deriva el blastocisto de animales transgénicos o no transgénicos;
- (iv) examinar el potencial hematopoyético de otros tejidos embrionarios tales como el alantoides que normalmente no produce células sanguíneas pero cuyo mesodermo tiene el mismo origen que el del saco vitelino;
- (v) seguir el desarrollo de estructuras vasculares y células eritroides primitivas tiñendo con un marcador tal como XGal de modo que se destaca la vasculatura y permite seguir la pista del crecimiento vascular así como de la hematopoyesis; y proporciona los medios para analizar la hematopoyesis definitiva intraembrionaria temprana así como la hematopoyesis del saco vitelino primitiva;
- (vi) determinar el efecto sobre explantes individuales de mutaciones seleccionadas como diana en genes que afectan a la hematopoyesis o al crecimiento vascular en el animal parental incluyendo las que portan transgenes que expresan hedgehog, patched, Gli y otras proteínas; y
- (vii) examinar el efecto de la terapia génica sobre tejidos derivados mesodérmicamente; en los que por ejemplo, el gen para la proteína hedgehog se introduce en embriones en fase de pre-estría que carece del endodermo visceral, bajo diversos promotores de modo que modula el efecto de la formación de islotes sanguíneos. Este tipo de modelo de terapia génica puede servir como herramienta experimental para identificar moléculas que pueden modular la hematopoyesis y el crecimiento vascular.

*El recién identificado papel de las proteínas morfogénicas en la hematopoyesis y el crecimiento vascular:*

Proteínas hedgehog: Los inventores han demostrado en el presente documento por primera vez que las proteínas hedgehog pueden estimular la hematopoyesis en el saco vitelino, y la esplancnopleura y otros tejidos hematopoyéticos del embrión o feto y estimular la hematopoyesis en la médula ósea del adulto. (Ejemplos 3-5, tablas 1-2, figuras 6, 9). Al cribar moléculas que estaban presentes en el endodermo visceral, los inventores identificaron el producto génico hedgehog. Cuando se añadió una proteína hedgehog (SHH) a cultivos de epiblasto y se aisló el ARN tras 2-3 días y se analizó mediante RT-PCR (ejemplo 3, figura 9), se observó que se estimulaba la hematopoyesis, como se determinó mediante la activación del gen de  $\epsilon$ -globina. Además, la proteína SHH podía estimular la hematopoyesis en el epiblasto que carecía de endodermo visceral. Cuando se añadieron anticuerpos frente a SHH a embriones enteros, como se describe en el ejemplo 4 y la figura 11, se redujo sustancialmente la expresión de  $\epsilon$ -globina.

Los ensayos anteriores muestran que las proteínas hedgehog expresadas en el tejido extraembrionario así como las proteínas hedgehog que están estrechamente relacionadas con las proteínas expresadas en tejidos extraembrionarios,

estimulan la hematopoyesis y la vasculogénesis. Se saben que los miembros de la familia hedgehog que son una familia diferenciada de moléculas de señalización (por ejemplo, revisada en *Goodrich et al., Genes & Develop.* 10 (1996), 301-12) desempeñan un papel en la morfogénesis de extremidades, el desarrollo neural, el modelado óseo y la espermatogénesis. Inicialmente se identificó la familia como implicada en la formación de patrones en segmentos normal en *Drosophila* (*Nusslein-Volhard et al., Nature*, 287 (1980), 795-801). La familia hedgehog incluye la proteína Desert hedgehog (DHH), la proteína Indian hedgehog (IHH), Moonrat hedgehog (cebrita) y Tiggly winkle hedgehog (cebrita).

Aunque la invención no tiene la finalidad de quedar limitada por las teorías, los inventores sugieren que la expresión inicial de IHH en el endodermo visceral puede dar como resultado la activación de DHH posteriormente en el mesodermo del saco vitelino y que la DHH pueda actuar sobre el mesodermo extraembrionario del saco vitelino de una manera autocrina. De este modo, los epiblastos separados del endodermo visceral a 6,5 dpc pueden producir islotes sanguíneos a 7,5 dpc en presencia de IHH que actúa sobre la señalización de DHH. Una vez que se inicia la señalización de DHH de este modo, IHH pueden no requerirse ya de manera absoluta. Los inventores han observado el efecto de desactivación de IHH o desactivación de DHH solos o juntos. Los inventores observaron que la desactivación de DHH no impide la formación de islotes sanguíneos y se concluye que IHH tiene un efecto estimulante continuado sobre el desarrollo de la sangre en ausencia de DHH. Los inventores sugieren que sería necesario desactivar tanto IHH como DHH para dar como resultado un fenotipo de saco vitelino que carece de células sanguíneas y vasculatura. Las diferencias funcionales evidentes en las propias moléculas pueden no residir tanto en sus diferencias bioquímicas sino más bien proceder de las diferencias en el sitio de expresión o el momento de expresión. Un precedente para esto se proporciona por los genes *engrailed* (*Hanks, et al., Science*, 269 (1995), 679-82). Las propuestas presentadas anteriormente representan las explicaciones preferidas para la relación de DHH e IHH pero no pretenden excluir otras explicaciones para las asociaciones observadas entre estas proteínas.

La utilidad de las proteínas hedgehog en la estimulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular se refuerza adicionalmente mediante nuestros experimentos sobre moléculas diana a través de las que actúan estas proteínas. Usando RT-PCR para analizar la expresión de *patched* y *Gli*, (ejemplo 5, figura 6) los inventores identificaron sustancialmente una expresión exclusiva de estas proteínas en el mesodermo del saco vitelino, un tejido cuya única función es producir células endoteliales vasculares y sanguíneas.

En apoyo de las observaciones de los inventores de que las proteínas hedgehog pueden estimular la hematopoyesis, los inventores identificaron la expresión enriquecida de *Gli* y *patched* en el mesodermo del saco vitelino. *Gli* es un factor de transcripción implicado en la ruta de transducción sobre la que actúan las proteínas hedgehog, mientras que PTC (*patched*) es una proteína de membrana que se une a la proteína hedgehog para iniciar la ruta de transducción de señales que provoca en última instancia una respuesta biológica en la célula diana. La asociación de estas proteínas con mesodermo del saco vitelino apoya además la observación de que las proteínas hedgehog estimulan la hematopoyesis. Puesto que *ptc* es la supuesta puerta a una respuesta celular, se espera que cualquier agonista de hedgehog que pueda unirse a *patched* induzca el mismo efecto biológico que hedgehog en este caso, hematopoyesis y crecimiento vascular.

Se ha notificado que ciertas proteínas hedgehog están implicadas en el inicio de la expresión de las moléculas de señalización secundaria BMP-2 y BMP-4 (proteínas que pertenecen a la familia TGF- $\beta$ ) en el mesodermo y Fgf-4 en el ectodermo (documento WO 95/18856). Los inventores han identificado por primera vez que las proteínas hedgehog pueden interaccionar de una manera sinérgica con las moléculas de señalización secundaria para estimular la hematopoyesis y el crecimiento vascular (ejemplo 6). Estas moléculas de señalización incluyen BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7 y otros miembros de la familia TGF- $\beta$  incluyendo Wnts y FGF, que pueden encontrarse que están asociados con el endodermo visceral y/o el mesodermo del saco vitelino.

La actividad de compuestos que son equivalentes funcionales para un producto génico expresado en tejido extraembrionario tal como proteína hedgehog recombinante, análogos, derivados y productos de disociación de proteínas hedgehog, y agonistas de receptores de proteína hedgehog tales como PTC según la invención, pueden estimular la hematopoyesis y el crecimiento vascular actuando sobre las células o los tejidos de embriones de diferentes edades incluyendo células fetales, sangre periférica fetal y sangre de cordón, así como sobre células madre hematopoyéticas adultas y células progenitoras adultas. La invención incluye el uso de péptidos funcionales de proteína hedgehog. La expresión "péptido funcional" como una subclase de un compuesto hedgehog definida anteriormente, pretende incluir fragmentos peptídicos de la proteína hedgehog que pueden inducir una actividad biológica que es igual o equivalente a la proteína completa (documento WO 96/16668). La invención incluye además los compuestos hedgehog descritos en el documento WO 95/18856, incluyendo homólogos de proteínas hedgehog, proteínas hedgehog recombinantes, ácidos nucleicos que codifican hedgehog, moléculas antisentido, constructos génicos para su uso en terapia génica incluyendo vectores virales conocidos en la técnica, mutantes combinatorios de proteínas hedgehog como agonistas o antagonistas, y anticuerpos específicos para un epítipo de la proteína hedgehog. Estos y otros compuestos pueden seleccionarse para modular la hematopoyesis y el crecimiento vascular según los ensayos descritos en el presente documento.

Según la invención, estos factores pueden usarse para estimular la hematopoyesis y el crecimiento vascular en animales incluyendo los mamíferos, incluyendo los seres humanos. De manera similar los antagonistas de los compuestos de la invención pueden usarse para inhibir el crecimiento vascular y la hematopoyesis. La utilidad terapéutica de estos factores se discute a continuación.

Nuestro ensayo de blastocistos novedoso puede usarse para determinar el efecto de las proteínas hedgehog sobre el desarrollo del saco vitelino. Además, pudieron someterse a ensayo blastosacos para determinar la gen expresión no sólo usando LacZ como marcador histoquímico, sino también mediante hibridación *in situ* de embriones completos o mediante inmunotinción.

*Modelos de ratón transgénico para estudiar el efecto de compuestos seleccionados sobre la hematopoyesis y el crecimiento vascular*

Los modelos de ratón transgénico tienen utilidad en el estudio de acontecimientos de desarrollo. Cuando se introduce un gen marcador histoquímico en el genoma de ratones, puede establecerse la formación de patrones asociada con las células marcadas.

Los ratones transgénicos de la técnica anterior tienen al menos cuatro limitaciones principales: (i) la capacidad de seguir la transcripción de los transgenes se basa en la protección de ARNasa o ensayos de S1 nucleasa de producción de ARNm, y las muestras de tejido pueden ser limitantes en las fases de desarrollo tempranas; (ii) la especificidad de expresión no puede examinarse al nivel de célula individual (salvo que se realicen hibridaciones *in situ* usando ribosondas, pero estos experimentos son técnicamente complicados y caros); (iii) un desequilibrio en la expresión de un gen de  $\beta$ -globina exógeno en ausencia de un gen de  $\alpha$ -globina que lo contrarreste es probable que conduzca a talasemia grave (Hanscombe, *et al.*, *Genes & Develop.* 3 (1989), 1572-81) y se cree que reduce el rendimiento de la progenie transgénica por una muerte temprana en el útero (Hanscombe *et al.*, 1989; Pondel *et al.* *Nucleic Acids Res.* 20 (1992), 5655-60.); (iv) el uso del gen de globina completo con sus secuencias reguladoras en el sentido de 5', en ratones transgénicos y el examen de ratones tras 8,5-9,5 dpc ha dado como resultado el análisis del desarrollo de la sangre tras la iniciación, Pondel, *et al.*, (1992).

Los inventores han desarrollado animales transgénicos que proporcionan modelos para el desarrollo de la sangre que superaron las limitaciones de los ratones transgénicos de la técnica anterior. Los inventores han adoptado en el presente documento el uso de modelos de ratones seleccionados en los que se pone un gen marcador bajo el control de secuencias reguladoras de globina para obtener explantes adecuados para el ensayo como se describió anteriormente. Los inventores han seleccionado un marcador, ejemplificado mediante el gen indicador de  $\beta$ -galactosidasa (LacZ), en lugar del cuerpo del gen de  $\epsilon$ -globina, de modo que la proteína de hemoglobina exógena funcional no se fabricará y de modo que pueda usarse un ensayo enzimático sensible para seguir la expresión transgénica (ejemplo 1). Una ventaja adicional de usar un gen indicador tal como LacZ es que permite estudios histoquímicos detallados, rápidos, en los que puede analizarse la especificidad de expresión al nivel de célula individual o cuantitativamente en los lisados tisulares. La capacidad para examinar la expresión de células individuales dentro de un tejido complejo es particularmente útil para estudios que implican embriogénesis temprana.

Los genes indicadores alternativos al de LacZ incluyen fosfatasa alcalina y proteína fluorescente verde o sus derivados. Los embriones formados según el ejemplo 1 pueden expresar LacZ a un nivel pico tan pronto como 7,5 dpc de desarrollo, continuando hasta tanto como 16,5 dpc. La expresión de LacZ en el modelo de ratón de la presente invención puede identificarse en la esplancopleura para-aórtica intraembrionaria y en la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM); véase a continuación). Como tal, son adecuados de manera única para estudios sobre hematopoyesis en fases de desarrollo tardías y tienen utilidad en una variedad de estudios *in vitro* e *in vivo* sobre hematopoyesis embrionaria. En consecuencia, estos animales tienen utilidad como fuente de células eritroides marcadas genéticamente para diversos tipos de cultivos de embriones o explantes.

Usando la metodología transgénica descrita en la invención, pueden usarse ratones transgénicos LacZ como modelos para la modulación de la expresión de hematopoyesis y crecimiento vascular en un animal o bien embrionario o bien adulto utilizando potenciadores y/o promotores que dirigen el momento de expresión durante el desarrollo o dirigiendo la especificidad tisular de la expresión, pudiendo inducirse opcionalmente tal potenciador. Los ejemplos incluyen un potenciador de  $\alpha$ -fetoproteína que dirige la expresión génica al saco vitelino y al intestino en desarrollo, un potenciador de actina cardiaca que dirige la expresión al músculo cardiaco, y secuencias reguladoras sca-1 para expresar proteína en células madre hematopoyéticas (Miles *et al.* *Development*, Vol. 124, (1997) págs. 537-547), o un elemento regulador específico de retina de la proteína de unión a interfotorreceptor retinoide (Bobola *et al.* *J. Biol. Chem.* Vol 270, (1995) págs. 1289-1294). Pueden formarse otros ratones transgénicos en los que puede ponerse una secuencia seleccionada de la familia de genes hedgehog bajo el control de un potenciador y/o promotor de la clase descrita anteriormente. Además, pueden generarse ratones transgénicos en los que el hedgehog o agonista o antagonista de hedgehog se expresa bajo el control de promotores/potenciadores específicos de tejido heterólogos tales como los descritos anteriormente. Pueden formarse otros animales transgénicos en los que las secuencias reguladoras hedgehog se usan para dirigir la expresión de secuencias codificantes de genes heterólogos en tejidos embrionarios o adultos específicos, por ejemplo secuencias reguladoras de *Lhh* para dirigir la expresión de *Shh* o *Dhh*.

Pueden formarse modelos de ratón transgénico según lo anterior mediante la metodología descrita en el ejemplo 1. Pueden prepararse ratones "no deficientes" usando el procedimiento de Hanks *et al.* *Science* vol 269 (1995) págs. 679-682, para seleccionar como diana genes hedgehog en sitios seleccionados en el genoma bajo el control de secuencias endógenas en células madre embrionarias (ES). Estas células ES modificadas pueden microinyectarse entonces en blastocistos para formar animales quiméricos (Joyner 1995). Estos animales son heterocigotos para el gen seleccionado como diana y expresarán de manera errónea las secuencias introducidas. De esta manera puede conseguirse el control del nivel de expresión génica y de los sitios en los que se produce la expresión. Un ejemplo de un ratón transgénico

de este tipo sería uno en el que se “meten” secuencias *Ihh* en el locus *flk-1* endógeno para permitir la expresión en precursores de células endoteliales y HSC. El transgén (gen “activado”) puede modificarse como una proteína de fusión con por ejemplo LacZ o GFP, para permitir una detección molecular o inmunológica o histoquímica conveniente.

El uso de tecnología de animales transgénicos puede proporcionar sistemas de modelo de ratón para aplicaciones que incluyen las siguientes: identificar acontecimientos adicionales en los procesos normales de hematopoyesis y crecimiento vascular en mamíferos embrionarios, fetales y adultos, y acontecimientos que dan lugar a enfermedades de la sangre tales como leucemias y crecimiento vascular anómalo y hematopoyesis anómala. Estos acontecimientos pueden analizarse con respecto a los compuestos hedgehog.

#### *Aplicaciones terapéuticas*

Hay varias aplicaciones terapéuticas de la invención. Tales usos están asociados con la modulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular e incluyen procedimientos que dan como resultado la estimulación así como los que dan como resultado la inhibición de la proliferación y/o diferenciación de células madre. Los ejemplos de compuestos usados según la invención se han discutido anteriormente.

En realizaciones de la invención, el procedimiento de estimular la hematopoyesis y el crecimiento vascular puede utilizar:

- (a) compuestos terapéuticos tales como proteínas hedgehog, y péptidos funcionales de proteínas hedgehog. Los compuestos terapéuticos pueden aislarse de cultivos de tejidos extraembrionarios, fabricados mediante tecnología recombinante o preparados mediante química sintética;
- (b) secuencias codificantes para los compuestos terapéuticos enumerados anteriormente, incorporados en vectores adecuados para las técnicas de terapia génica; y
- (c) células de mamífero que se han transformado con secuencias codificantes de las anteriores para el trasplante de células.

El tratamiento de sujetos con desarrollo de la sangre anómalo puede lograrse administrando, en una dosis eficaz, durante un tiempo eficaz, un agente terapéutico que se haya identificado en uno de los ensayos de la invención al paciente mediante cualquiera de los procedimientos anteriores. Como alternativa, pueden someterse los pacientes a terapia génica creando un plásmido o vector viral que contiene la secuencia codificante para el agente terapéutico usando cualquiera de las técnicas disponibles en la técnica. Por ejemplo, puede introducirse una proteína, un análogo, un derivado, un antagonista o un receptor, de una proteína identificada (denominados colectivamente compuestos) tal como compuestos relacionados con hedgehog, en un vector e introducirse el vector en el tejido diana apropiado en el que se ubica este tejido en un adulto o en un embrión. La expresión del agente terapéutico puede regularse mediante un potenciador seleccionado para garantizar la expresión selectiva en el tejido seleccionado como diana. Por ejemplo, el uso del potenciador de actina cardiaca para expresar el compuesto deseado en el corazón, el potenciador MCK para expresar el compuesto en músculo esquelético; secuencias reguladoras *sca-1* para expresar el compuesto hedgehog en células madre hematopoyéticas o un elemento regulador específico de retina de la proteína de unión a interfotorreceptor retinoide para expresar el compuesto en la retina.

Los sujetos con un desarrollo de la sangre anómalo pueden tratarse administrando el agente terapéutico por medio de trasplante de células usando líneas celulares manipuladas genéticamente como sistemas de suministro del agente secretado. Por ejemplo, pueden manipularse células autólogas tales como fibroblastos autólogos o células heterólogas contenidas dentro de una barrera protectora inmunitaria, mediante técnicas convencionales para secretar la proteína seleccionada tal como hedgehog, o análogos, derivados, antagonistas o receptores de proteína.

En una realización de la invención, se proporcionan procedimientos y compuestos para estimular la hematopoyesis en un sujeto para tratar anomalías asociadas con deficiencias en linajes celulares hematopoyéticos. Ejemplos de dianas para tales tratamientos incluyen la exposición *in vivo* o *in vitro* de células derivadas mesodérmicamente no diferenciadas a un compuesto de la invención. Los ejemplos de células diana incluyen células madre de médula ósea, células progenitoras y células de sangre de cordón. Estas células pueden aislarse de un sujeto y almacenarse en un banco de células para su uso posterior, o las células pueden aislarse poco antes y mantenerse *in vitro* en un medio de cultivo. La exposición de tales células al compuesto da como resultado la potenciación de la proliferación y/o diferenciación de las células, implantándose las células estimuladas en el mismo sujeto o uno diferente del que se derivaron las células, por medio de tecnología de trasplante. Como alternativa, puede accederse a células derivadas mesodérmicamente no diferenciadas en el embrión o adulto *in vivo* mediante cualquiera de las diversas rutas incluyendo: vías oral, intradérmica subcutánea, transmucosa, intramuscular o intravenosa.

El procedimiento de la invención puede usarse para tratar sujetos (embrión o adulto) que padece anomalías sanguíneas. Éstas pueden surgir de lesiones genéticas, efectos secundarios de tratamientos terapéuticos tales como radiación y quimioterapia para el cáncer o de una enfermedad provocada por agentes infecciosos tales como virus de la deficien-

cia inmunitaria humana y puede tratarse usando un procedimiento y compuestos que estimulan la hematopoyesis. Las consecuencias de tales anomalías si no se tratan son diversas formas de anemia (asociada con niveles anómalamente bajos de eritrocitos). Los ejemplos de anemias incluyen: anemia aplásica (idiopática, formas constitutivas o formas secundarias); anemia mielodisplásica; anemia en pacientes con carcinoma metastásico o necrotizante; enfermedad de Hodgkin; linfoma maligno; anemia de enfermedad hepática crónica; anemia de enfermedad renal crónica (fallo renal); anemia de trastornos endocrinos; aplasia de glóbulos rojos; idiopática o asociada con otros trastornos, anemia debida a enfermedad inflamatoria crónica; y trombocitopenia de muchas etiologías. Además, la estimulación de la hematopoyesis es beneficiosa en el tratamiento de leucopenias (por ejemplo, leucemia y SIDA).

Según una realización de la invención, se propone además un compuesto para tratar la formación anómala de vasos sanguíneos (hipervascularización) que resulta de enfermedades genéticas, enfermedad degenerativa crónica, envejecimiento, traumatismo o agentes infecciosos. Los ejemplos incluyen úlceras crónicas diabéticas, quemaduras, congelación, acontecimientos isquémicos tras accidente cerebrovascular y trasplante. Los compuestos de la invención pueden usarse en el adulto para la inducción de la revascularización o formación de vasos colaterales en miocardio isquémico o extremidades isquémicas, y en derivaciones arteriales coronarias y en promover la cicatrización de heridas en general. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden usarse en el tratamiento de úlceras duodenales potenciando la densidad de microvasos y promoviendo una cicatrización más rápida. Además, los compuestos de la invención pueden usarse para corregir trastornos de desarrollo en el embrión (como se definió anteriormente) provocados por anomalías en el crecimiento vascular.

Según una realización de la invención, se proporcionan compuestos para inhibir la hematopoyesis en sujetos que padecen un exceso de producción de eritrocitos por ejemplo policitemia verdadera y eritroleucemia u otros tumores hematopoyéticos.

De manera similar, se proporcionan compuestos para inhibir el crecimiento vascular en sujetos que padecen un exceso de vascularización o neovascularización como se encuentra, por ejemplo, en una variedad de tumores sólidos tales como cáncer de mama, hemangiomas en la infancia, neovascularización ocular asociada con diabetes, trastornos hemorrágicos del aparato reproductor femenino y ciertas formas de artritis.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Formación de modelos de ratón transgénico para detectar la formación de células eritroides primitivas y hematopoyesis*

Las células eritroides individuales formadas durante la embriogénesis temprana pueden identificarse controlando la expresión de  $\epsilon$ -globina. Los inventores desarrollaron vectores de  $\epsilon$ -globina/LacZ novedosos para la expresión de transgenes a partir de los cuales los inventores obtuvieron datos histoquímicos detallados, así como datos sobre la especificidad de expresión a nivel de la célula individual acerca de la hematopoyesis y el crecimiento vascular. Puesto que el transgén  $\epsilon$ -globina/LacZ se expresa sólo en células eritroides primitivas en embriones de ratón (saco vitelino e hígado fetal), estos ratones sirven como diana ideal para la manipulación farmacológica o el examen de los efectos de sobreexpresar o desactivar otros genes que podrían afectar a la hematopoyesis embrionaria (que es principalmente eritroide). Por ejemplo, ratones transgénicos que sobreexpresan un gen de interés pueden cruzarse con una de las líneas transgénicas descritas anteriormente (convertida en homocigota de modo que toda la progenie lleve el indicador lacZ) y puede medirse el efecto sobre la hematopoyesis embrionaria mediante la tinción de LacZ. El análisis cuantitativo de la expresión en lisados tisulares se realizó usando los procedimientos descritos por Wassarman, *et al.*, *Guide to Techniques in Mouse Development* (San Diego: Academic Press, Inc., 1993); Herbomel, *et al.*, *Cell* 39 (1984), 653-62). Como alternativa, los ratones que portan mutaciones dirigidas (mutaciones nulas u otras mutaciones más sutiles) pueden cruzarse con nuestros ratones transgénicos y pueden evaluarse los efectos de las mutaciones sobre la hematopoyesis embrionaria. Por tanto, este ensayo *in vivo* es una herramienta poderosa para evaluar los efectos de los productos génicos sobre la hematopoyesis embrionaria.

Los inventores han diseñado el transgén en asociación con un gen indicador para proporcionar un ensayo enzimático sensible para determinar la expresión. Por consiguiente, los inventores insertaron el gen indicador de  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) en un vector en el sentido de 3' de varios elementos reguladores asociados con la transcripción del gen de hemoglobina tipo  $\beta$  embrionaria humana ( $\epsilon$ -globina) (figura 1). Más adelante se facilitan ejemplos de constructos de transgén usados para seguir el desarrollo de las células sanguíneas. Estos constructos son ilustrativos del procedimiento del ensayo que no es necesario que se limite únicamente a esos constructos, sino que puede utilizar otros transgenes y otros genes indicadores en otros constructos de vectores.

#### *Descripción de los transgenes*

Se generaron varios constructos transgénicos diferentes que contenían un "micro-LCR" (una versión truncada de secuencias reguladoras ubicadas lejos en el sentido de 5' del locus del gen de  $\beta$ -globina, ref. Forrester *et al.*, 1989) más: el promotor mínimo de  $\epsilon$ -globina solo (constructo 1); la región reguladora en el sentido de 5' hasta -849 (constructo 2); la región reguladora en el sentido de 5' hasta -2025 (constructo 3); el promotor mínimo dirigido por la combinación  $\epsilon$ -PRE II + V (constructo 4) (Trepicchio, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 13 (1993), 7457-7468). Se

insertó el gen de la  $\beta$ -galactosidasa procariota (LacZ), junto con un oligonucleótido corto (SDK) que contiene una secuencia consenso Kozak (Ravid *et al.*), entre el promotor mínimo y parte del segundo intrón del gen de  $\epsilon$ -globina, delecionando las secuencias de E-globina entre +20 y +473. Para cada constructo, se obtuvieron 8-10 individuos fundadores (transgenicidad del 14-21%).

5

#### Generación de constructos de transgén

##### Constructo 1: -179 lacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB70)

10 Este fue el “casete básico” y se creó usando una serie de etapas de clonación.

En primer lugar, se generó MHB135 mediante acoplamiento de tres vías entre un fragmento de ClaI/EcoRI que contenía el gen de la  $\epsilon$ -globina humana desde -849 hasta +1746, un fragmento de EcoRI/HindIII de 2,5 kb que contenía un  $\mu$ LCR modificado (Trepicchio, William L., *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 13, N.º 12, págs. 7457-7468, (1993)), y un derivado digerido por ClaI/HindIII de SP73 (Promega) en el que el sitio de XhoI se ha destruido por la digestión de XhoI, la reacción con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y luego el acoplamiento de extremos romos. Entonces se insertó un conector KpnI en el sitio de EcoRV de MHB 135 para crear MHB 135K. Se subclonó un fragmento de BamHI/XhoI de pUC $\epsilon$ x (Baron, *et al.*, *Cell*, 46 (1986), 591-602.) que contenía el promotor mínimo de gen de la  $\epsilon$ -globina desde -179 hasta +20 en SP73 digerido por BamHI/XhoI (Promega), luego se escindió mediante digestión con KpnI y XhoI y se acopló en el fragmento de la estructura principal de MHB 135K digerido por KpnI/XhoI para dar MB42.

Se modificó MB42 mediante la inserción de un conector NotI en el sitio de HindIII usando procedimientos convencionales (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); esta etapa introdujo un único sitio de NotI en el extremo del  $\mu$ LCR, dando MB60.

A continuación se generó MB59 como sigue. El fragmento de XbaI/PstI LacZ de -3,1 kb de pSDKlacZpA (REF) se subclonó en SP73 para dar SP73lacZ. Se escindió la parte de 3' del gen de la  $\epsilon$ -globina humana desde +474 hasta +1746 como un fragmento de BamHI/EcoRI de pUC $\epsilon$ x y se ligaron los extremos romos en el sitio de BamHI de extremos romos de SP73lacZ para dar MB59. A continuación se destruyó el sitio de KpnI de MB59 mediante tratamiento con ADN polimerasa de T4 y relegación, dando MB 69. Finalmente, se acopló la estructura principal por XhoI/EcoRI de MB60 a un fragmento que contenía LacZ y se obtuvieron las secuencias en 3' de  $\epsilon$ -globina mediante digestión parcial con EcoRI y luego con XhoI de MB69. Este producto final, MB70, fue el constructo básico, -179lacZ $\epsilon\mu$ LCR.

35

##### Constructo 2: -849lacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB73)

Se aisló la región en el sentido de 5' de  $\epsilon$ -globina desde -849 hasta +20 como un fragmento de BgIII/XhoI de MHB 135 y se subclonó en la estructura principal de MB70 digerida con BgIII/XhoI para dar -849lacZ $\epsilon\mu$ LCR, denominado MB73.

40

##### Constructo 3: -2 kblacZ $\epsilon\mu$ LCR (MB 92)

Se escindió un fragmento de 2 kb que contenía la región en el sentido de 5' de  $\epsilon$ -globina desde -2025 hasta +20 de MB 16-3 mediante digestión con KpnI y XhoI y se conectó en el fragmento de estructura principal de MB70-3 digerido con Kpn/XhoI (-18llacZ $\epsilon\mu$ LCR, véase anteriormente) para generar - 2 kblacZE $\mu$ LCR (MB92).

MB 16-3 se generó tal como sigue. Se aisló la región en el sentido de 5' de  $\epsilon$ -globina de 2 kb de pUC $\epsilon$ x (Baron y Maniatis, 1986) digiriendo con EcoRI, obteniendo extremos romos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y luego digiriendo con XhoI. Entonces se conectó en MHB 135K digerido con KpnI/XhoI (véase anteriormente).

50

##### Constructo 4: $\epsilon$ -PRE(II+V) $\mu$ LCR (MB72)

Este vector se generó acoplando el fragmento de BgIII/BamHI del constructo 6 de la figura 4 de la ref. (Trepicchio *et al.*, 1993) en el sitio de BamHI del constructo básico, MB70.

55

#### Generación de ratones transgénicos

Para la microinyección en embriones, se digirieron ADN de plásmido con enzimas de restricción KpnI/NotI (figura 1) y las partes eucariotas se purificaron usando procedimientos convencionales (Hogan *et al.*, 1994). Se microinyectó a los embriones en la fase unicelular las muestras de ADN y luego se implantaron en madres adoptivas, usando procedimientos convencionales (Hogan *et al.*, 1994). Se usó una cepa de ratón no consanguínea (CD-1) para la generación de ratones transgénicos y ha servido como fuente de donantes de embriones, machos sementales, hembras pseudopreñadas, machos sometidos a vasectomía y hembras maduras para reproducción. Se obtuvo el genotipo de biopsias de la cola mediante transferencia de tipo Southern (usando varias sondas diferentes, de nuevo mediante procedimientos convencionales) o PCR (véase más adelante). El análisis de transferencia de tipo Southern también se usó para confirmar que ni transposiciones, ni duplicaciones ni delecciones acompañaban a la integración genómica del transgén. Los individuos fundadores se cruzaron para obtener machos transgénicos (machos CD-1 transgénicos heterocigotos) que

65

se aparearon con hembras CD-1 normales para producir embriones o animales adultos para el análisis de la expresión de LacZ (véase la figura 2). Se sacrificaron las hembras preñadas en los momentos indicados en la figura (a mediodía el día de la observación del tapón vaginal se consideró 0,5 días post-coito (dpc)). Los embriones se diseccionaron, se fijaron y se tiñeron con XGal. Para el análisis de la expresión del transgén en los embriones de ratón por fases, se siguió la actividad enzimática de  $\beta$ -gal mediante la tinción de embriones completos usando un procedimiento convencional (Wassarman y DePamphilis, 1993).

#### Condiciones de PCR para el genotipado de ratones transgénicos

Se preparó ADN genómico a partir de cortes de los dedos de crías de 10 días de edad o a partir de biopsias de la cola de crías de 3 semanas de edad. Los cortes de los dedos se añadieron a 20  $\mu$ l de tampón de extracción de ADN (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS al 1%) que contenía proteasa K (1 mg/ml) y se incubaron durante 1 h a 55°C con agitación mediante vórtex tras los primeros 30 min. Entonces se diluyeron las muestras con 200  $\mu$ l de agua, se hirvieron durante 10 min. y microcentrifugaron durante 20 min. Se preparó ADN genómico de biopsias de la cola mediante un procedimiento convencional (Hogan *et al.*, 1994). Se llevó a cabo PCR usando 0,4  $\mu$ l de ADN genómico (de dedo o de cola) en una reacción de 50  $\mu$ l que contenía 1X tampón G (kit PCR Optimizer, Invitrogen) y U.I. de Ampli-Taq polimerasa (Perkin-Elmer). Se llevó a cabo la amplificación durante 32 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 minuto), reasociando a 55°C (1 minuto) y extensión a 72°C (1 minuto) seguido por una extensión final de 6 min., a 72°C y dio como resultado un producto de 408 pb. Una parte (10-15  $\mu$ l) de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 2% en 1X Tris-borato-EDTA (Sambrook *et al.*, 1989). Las secuencias de los cebadores de amplificación fueron:

5' H $\epsilon$ : 5'-ATG GAT CCA GCA CAC ATT A -3' (corresponde a de -179 a -165 del gen de H $\epsilon$ -globina)

3' LacZ: 5'-TCG CCA TTC AGG CTG CG -3' (corresponde a de +154 a +170 de LacZ)

#### Resultados

La expresión de LacZ pudo detectarse ya a los 7,5 días post-coito (dpc) (es decir, aproximadamente el tiempo en el que se observan por primera vez islotes sanguíneos en el saco vitelino), en el patrón de "anillos" esperado a nivel del exoceloma (figura 2A). Hacia los 8,5 dpc, se observó tinción de eritroblastos primitivos dentro de los canales vasculares del saco vitelino (figura 2B). Dentro del embrión propiamente dicho, se observó un pequeño número de eritroblastos primitivos con tinción de LacZ (figura 2B(c)). Hacia el día 12,5, el momento en el que la expresión del gen de  $\epsilon$ -globina de ratón alcanza un máximo, se observaron células eritroides primitivas con tinción de LacZ dentro de los vasos sanguíneos del saco vitelino (figura 2C). Los inventores han teñido la sangre embrionaria directamente para verificar que estas células expresaban LacZ.

Los ratones que portaban MB 70, MB72 o MB73 expresaban LacZ en las células eritroides primitivas del saco vitelino y también en el hígado fetal a los 16,5 dpc. Los ratones transgénicos para MB 70 y MB 73 no expresaban LacZ en tejidos adultos. En contraposición, en ausencia de elementos reguladores negativos en el sentido de 5' del promotor, los ratones transgénicos con MB72 también expresaban LacZ en células eritroides adultas.

Por tanto, MB 72 puede usarse para estudiar la inducción farmacológica de anemias o policitemia en animales adultos. Estos ratones también pueden cruzarse con otros ratones transgénicos o deficientes para examinar los efectos sobre la eritropoyesis en adultos de sobreexpresar o desactivar otros genes. Los ejemplos de enfermedades que pueden estudiarse usando estos ratones (tras aparearse con otros ratones que portan mutaciones apropiadas) incluyen anemia falciforme y talasemias (por ejemplo, Skow, L.C., *et al.*, *Cell*, Vol. 34, págs. 1043-1052, (1983); Ciavatta, D.J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, págs. 9259-9263, (1995)).

Con respecto a la expresión en el saco vitelino, las células eritroides primitivas fueron positivas para LacZ en ratones con MB 92, de manera similar a lo detectado para ratones que portan cualquiera de los otros tres constructos.

#### Ejemplo 2

*Demostración de que el mesodermo embrionario primitivo por sí mismo no puede dar lugar a hematopoyesis y crecimiento vascular; se usan cultivos de explante de embrión para identificar agentes que estimulan la hematopoyesis y el crecimiento vascular en estos cultivos*

Se han reproducido ratones transgénicos para obtener un indicador LacZ conectado a una de varias secuencias reguladoras en el sentido de 5' de la  $\beta$ -globina embrionaria humana (figura 1) hasta obtener la homocigosidad. Estos animales sirven como fuente de embriones marcados en los que el transgén se expresa sólo en células eritroides primitivas (figura 2).



(A) *Se requiere el endodermo visceral para la hematopoyesis primitiva*

El cultivo de explante de embrión: Se aislaron embriones de los ratones transgénicos del ejemplo 1 entorno al comienzo de la gastrulación a los 6,25-6,5 dpc antes de la formación del mesodermo hematopoyético y se mantuvieron individualmente en las cámaras de un portaobjetos de 8 pocillos (Costar) o en los pocillos de una placa de 24 pocillos (Costar) o en pocillos individuales de placas de Terasaki (Nunc) o en los pocillos de una placa de 4 pocillos durante 48-72 h. Entonces se fijaron los embriones y se tiñeron con XGal usando un protocolo convencional (Wasserman, P. M. y Melvin L. DePamphilis, eds., *Guide to Techniques in Mouse Development*, Vol. 225, págs. 461-463. 1993) para controlar la generación de eritroblastos primitivos. Se cultivaron embriones completos o bien en medio que contenía suero o bien en medio definido químicamente (CDM) para determinar islotes sanguíneos positivos para LacZ. El CDM fue similar al usado por (Johansson y Wiles, 1995) excepto en que se añadieron penicilina (1.000 U/ml), estreptomycin (1.000 µg/ml) y Hepes pH 7,4 (20 mM).

*Separación del endodermo visceral del epiblasto:* Se separaron enzimáticamente embriones en la fase de pre-estría a estría temprana (Farrington, S. M., *et al.*, *Mechanisms of Development*, Vol. 62, págs. 197-211, (1997)) en componentes del ectodermo (epiblasto) y el endodermo visceral usando tripsina/pancreatina (de 15 s a 2 min.) usando una técnica convencional (Hogan *et al.*, 1994). Se encontró que la contaminación cruzada tisular durante este procedimiento era insignificante (Farrington *et al.* 1997). Se cultivaron epiblastos o embriones completos individualmente. La figura 2a representa el epiblasto que es un descendiente de la masa celular interna del blastocisto, del que se derivan las células ES.

*Se requiere el endodermo visceral para la hematopoyesis primitiva en el mesodermo*

(a) Aunque los islotes sanguíneos positivos para LacZ se detectaron fácilmente en cultivos de embriones completos, se observó poca o ninguna tinción de LacZ en cultivos de epiblasto, o bien en el medio definido químicamente (CDM) o en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO-BRL) que contiene un 30% de suero bovino fetal inactivado por calor (56°C, 30 min.) (HyClone). Estos resultados demuestran que el mesodermo no puede dar lugar por sí mismo a hematopoyesis embrionaria, sino que requiere el contacto con o señales liberadas del endodermo visceral. En contraposición, los epiblastos tomados de embriones posteriores (de 6,75 dpc a 7,5 dpc) sí forman islotes sanguíneos tras 48 horas en cultivo, presumiblemente debido a que las células mesodérmicas presentes en esta fase ya habrán recibido señales del endodermo visceral.

(b) Experimentos de recombinación: Se recombinaron epiblastos con endodermo visceral en geles de colágeno (colágeno de cola de rata de tipo I, Collaborative Biomedical Products). El colágeno se preparó según las instrucciones del fabricante. Se dejó que una gota de colágeno de 10 µl solidificara en la superficie de plástico; entonces se yuxtapusieron los tejidos en una pequeña depresión creada usando pinzas de relojero y después se cubrieron con 1 µl de colágeno para mantenerlos en su sitio. Como alternativa, los tejidos se expulsaron suavemente en una gota de colágeno de 5 µl y se yuxtapusieron para permitir el contacto físico; entonces se permitió que el colágeno solidificara. Tras 10 min., se añadió medio de cultivo de explante (DME complementado con FBS al 30% (inactivado por calor a 56°C, 30 min.), glutamina 2 mM, Hepes 10 mM pH 7,4, α-metil-tioglicerol 68 µM, penicilina (1.000 U/ml) y estreptomycin (1.000 µg/ml) al pocillo (0,5 ml para placas de 24 pocillos, menos para los pocillos más pequeños). Se manipularon los fragmentos de embrión usando una pipeta Pasteur larga. Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Se cambió el medio tras un día. Se recogió el ARN tras 3 días usando el procedimiento a pequeña escala de (Chomezynski, P., *et al.*, *Anal. Biochem*, Vol 162, págs. 156-159, (1987)) y se analizó para determinar la expresión génica de globina embrionaria mediante RT-PCR (Farrington *et al.*, 1997). Estos experimentos demostraron la activación de la expresión génica de globina cuando los epiblastos se recombinaron con endodermo visceral y, por tanto, se estableció una necesidad de endodermo visceral en la inducción de hematopoyesis durante la gastrulación (figuras 7, 8-1).

(c) Activación de eritropoyesis primitiva mediante un factor difusible en células de endodermo visceral: Se hizo crecer END-2 (Mummary *et al.*, *Dev. Biol.*, 109 (1985), 402-410), una línea celular derivada de endodermo visceral, hasta la confluencia en DME que contenía un 15% de suero bovino fetal (FBS). Las células se tripsinizaron, se resuspendieron en 5 ml de DME que contenía un 30% de FBS (DME-30) y se irradiaron con rayos gamma (6000 rad) usando una fuente de <sup>137</sup>Cs. Se pipetearon las células para disolver los agrupamientos y luego se añadieron a 15 ml adicionales de DME-30 en una placa de 10 cm. Se permitió que las células se acondicionaran al medio durante 3 días a 37°C (5%) de CO<sub>2</sub>. Se recogió el medio, se extrajeron las células residuales mediante centrifugación durante 10 min. a 1500 rpm y luego se esterilizó el sobrenadante usando un filtro de 0,2 µm. El medio acondicionado (CM) resultante se almacenó en alícuotas a -80°C.

Se incubaron epiblastos con (+) o sin (-) CM. La mayoría de los epiblastos cultivados sin CM no pudieron activar un marcador de eritropoyesis primitiva (el gen de ε-globina), mientras que la mayoría de los epiblastos cultivados en presencia de CM sí activaron el gen. Estos resultados sugieren que el contacto célula-célula no es esencial para la estimulación de la hematopoyesis por el endodermo visceral, sino que el efecto está mediado por uno o más factores difusibles. El asterisco en la figura 10 indica un producto de amplificación artefactual.

Los resultados muestran que para los embriones completos no tratados, 6/6 producían globina. En contraposición, de 8 epiblastos no tratados, sólo 1 mostró alguna expresión detectable. Cuando se añadió medio acondicionado, 8/10 cultivos de epiblastos expresaron globina.

5 *Determinación del tiempo en el que se produce por primera vez la hematopoyesis durante el desarrollo del ratón. Hibridación in situ e histología*

Se llevó a cabo la hibridación *in situ* de embriones completos como en Wilkinson y Nieto, 1993, usando BM Purple (Boehringer Mannheim) como sustrato para la detección de la fosfatasa alcalina. La sonda usada es la sonda de  $\epsilon$ -globina de ratón. Se preparó la ribsonda marcada con digoxigenina mediante la transcripción con polimerasa de T7 de un molde de ADN linealizado con EcoRI denominado SP73 mERB, usando un procedimiento convencional (Wilkinson y Green, Postimplantation Mouse Embryos: A Practical Approach. Ed. A. Copp. Oxford: IRL Press, 1990). Se generó SP73 mERB mediante acoplamiento del fragmento de EcoRI-BamHI del gen de  $\epsilon$ -globina de ratón (Baron y Maniatis, 1986) desde +187 hasta +439. Este fragmento contiene una pequeña región del primer intrón y la mayor parte del segundo exón de este gen. Los resultados de la hibridación *in situ* en los embriones completos para determinar el momento en que podía detectarse la hematopoyesis en los ratones de tipo natural se muestra en la figura 5.

Se usó el protocolo de RT-PCR Multiplex para medir la inducción de hematopoyesis porque es un ensayo más sensible y cuantitativo para la inducción de hematopoyesis que la tinción con XGal. También es más versátil que la tinción con XGal porque permite el análisis de una variedad de genes en un tejido. El material de partida para esta técnica es el ARN. Se prepararon cebadores de oligonucleótidos. En la tabla 1 se facilitan ejemplos de cebadores. El ARN total se preparó mediante extracción con guanidinio-ácido-fenol (Chomczynski, *et al.* (1987)) a partir de tejidos de embriones individuales (muestras de 6,25 dpc a 6,5 dpc).

Se realizó la transcripción inversa del ARN total con la transcriptasa inversa de VMA (virus de la mieloblastosis aviar) (Life Sciences, Inc.) mediante procedimientos convencionales, usando un cebador de oligo(dT) (Sambrook *et al.*, 1989). Se realizó la PCR Multiplex en una reacción de 15  $\mu$ l que contenía 5 pmoles de cebadores de  $\beta$ -actina (como patrón interno), 10- 45 pmoles de cebadores del gen de prueba y una cantidad traza de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP para permitir la detección de productos de amplificación mediante autorradiografía tras electroforesis en gel de poliacrilamida. En la tabla 1 se describen los cebadores usados para la PCR. Las cantidades de ADNc de entrada se normalizaron para la expresión de  $\beta$ -actina. En cada caso se determinó empíricamente el número de ciclos y las cantidades de cebador y ADNc molde que produjeron amplificación sin saturación.

No se detectó la expresión del gen de la globina ( $\epsilon$ ) de tipo  $\beta$  embrionaria en los epiblastos o embriones completos de 6,5 dpc aislados a de 6,25 dpc a 6,5 dpc. Tras 72 h en cultivo, se activó el gen de  $\epsilon$ -globina en embriones completos, pero en epiblastos aislados pudo detectarse poca o ninguna transcripción de  $\epsilon$ -globina (figuras 7, 8). Esto demostró que la hematopoyesis embrionaria no era autónoma con respecto al mesodermo y que la inducción de la expresión del gen de la globina embrionaria se producía en presencia de endodermo visceral. Este efecto era compatible con una necesidad del endodermo visceral de inducción de expresión del gen de la globina embrionaria. (El efecto observado podía distinguirse fácilmente del efecto pronosticado de acontecimientos aleatorios que resultan de variaciones en el desarrollo del embrión en una camada en la que epiblastos aislados en una fase más avanzada de desarrollo en el momento en que se recogió el embrión pueden proporcionar bajos niveles de expresión del gen de la globina).

45 (B) *Formación de sangre en la parte anterior de un epiblasto obtenido de un embrión en gastrulación en fase tardía*

Se recogieron embriones en gastrulación individuales en fase tardía (aproximadamente de 6,75 dpc) y se eliminó el endodermo visceral circundante. En ese momento, el epiblasto ya ha recibido señales del endodermo visceral y ha desarrollado la capacidad de formar sangre. Sin embargo, esta capacidad parece ubicarse en este momento en la región posterior del epiblasto. Los inventores han demostrado en el presente documento que la región anterior conserva su dependencia del endodermo visceral extraembrionario. Se eliminó enzimáticamente el endodermo visceral tal como describen Farrington *et al.* (1997) y se eliminó mediante disección el ectodermo extraembrionario. Se realizó una transección del epiblasto (ectodermo embrionario) en secciones anterior y posterior y se incubaron por separado durante 3 días. La sección posterior se identificó partiendo de la base de marcas morfológicas tales como la estría primitiva (epiblasto posterior), como describen Downs *et al.* *Development*, vol. 118 (1993) 1255-1266 (figura 55 15). Los resultados se muestran en las figuras 5 y 16-1, 16-2, 16-3 y 16-4 y se discuten más adelante.

(i) *Durante la gastrulación en fase tardía, la parte posterior pero no la anterior del embrión puede formar sangre en ausencia de endodermo visceral*

Usando RT-PCR como se describió anteriormente se observó poca o ninguna expresión de  $\epsilon$ -globina en la parte anterior del embrión y no pudo observarse histológicamente el desarrollo de sangre. En contraposición, la sección posterior formó sangre incluso en ausencia del endodermo visceral, a niveles comparables con los de un embrión intacto (mostrado como control). Los controles incluyeron (i) una reacción de PCR llevada a cabo en ausencia de molde de ADNc; (-ADNc), (ii) incubaciones de ARN llevadas a cabo usando un cóctel de transcripción inversa sin transcriptasa inversa (ant (-RT), post (-RT), Farrington *et al.*, 1997). En este experimento, la actina se amplificó durante 18 ciclos y la globina se amplificó durante 23 ciclos.

(ii) *Las señales del endodermo visceral pueden restaurar la capacidad de la parte anterior de embriones en fase de gastrulación tardía para formar sangre*

(a) Se cultivaron cuatro partes de epiblasto anteriores y cuatro posteriores de embriones en fase de estría primitiva tardía individualmente en ausencia de endodermo visceral. Tal como se observa en el experimento de la figura 2A, las partes posteriores pero no las anteriores de estos embriones en fase de gastrulación tardía pudieron formar sangre. En contraposición, cuando se cultivaron partes anteriores del epiblasto en gotas de colágeno con endodermo visceral, se reconstituyó la formación de sangre en 2 de 4 muestras (denominadas "recombs" en la figura). En este experimento, la actina se amplificó durante 21 ciclos y la globina se amplificó durante 26 ciclos.

(b) Los inventores determinaron que la formación de sangre por el mesodermo requiere señales del endodermo visceral tal como sigue: se separó el endodermo visceral (VE) de ectodermos embrionarios (epiblastos) transgénicos (Tg) y se recombinó con VE no transgénico en gotitas de colágeno. En estos experimentos, la única fuente posible de células hematopoyéticas sería el epiblasto transgénico, pero no el VE no Tg. Los tejidos se cultivaron durante 3-4 días y luego se tiñeron con XGAL para identificar zonas de expresión de lacZ. Estos experimentos demostraron que la formación de sangre se reconstituía en presencia de tejido de VE. Además, la ubicación de las células sanguíneas en la zona inmediatamente alrededor del tejido de VE sugirió o bien que se requiere el contacto directo célula-célula o bien que está implicada una señalización de intervalo corto mediante moléculas difusibles (figura 8-1).

(c) Los inventores determinaron que el endodermo visceral puede reprogramar el ectodermo embrionario anterior del epiblasto para expresar tanto marcadores endoteliales vasculares como hematopoyéticos tal como sigue: Se recombinó el epiblasto anterior con endodermo visceral, para obtener activación tanto de marcadores hematopoyéticos ( $\epsilon$ -globina, GATA-1, CD-34) mostrados en la figura 16-2 como de marcadores endoteliales (PECAM-1, flk-1 y Vezf-1) mostrados en la figura 16-3. Estos marcadores se expresaban fuertemente en epiblastos posteriores cultivados aislados en la gastrulación de media a tardía (figura 16-2, carriles posteriores 6-10, y figura 16-3, carriles posteriores 6-10) y en embriones completos cultivados (emb+cx). Se detectó poca o ninguna expresión de estos marcadores en el endodermo visceral solo (figura 16-2, carriles anteriores 6-10; figura 16-4, carriles anteriores 6-10) o en embriones completos no cultivados (figura 16-2, emb (-cx); figura 16-3, emb (-cx)) de la misma fase de desarrollo. Estos experimentos demostraron que tanto el tejido hematopoyético como el vascular se inducían mediante señales del endodermo visceral y que las señales eran instructivas. Como control de la especificidad, no se detectó miosina cardíaca que se esperaba que se expresase en el tejido cardíaco (y, por tanto, sólo en una fase de desarrollo posterior, alrededor de los 7-8 dpc) (Lyons *et al.* 1990) en epiblastos anteriores o posteriores ni en recombinantes durante los primeros 3 días en cultivo (figura 16-2, carriles 3-17) pero se detectó en un control embrionario de 10,5 dpc (figura 16-2, 16-3). Los cebadores en (5') y (3') de Vezf-1 dieron un producto de aproximadamente 700 pb. Vezf-1 es una proteína en dedo de cinc homóloga a una proteína humana denominada db-1 y se expresa en la vasculatura en desarrollo. Se demostró que se producía predominantemente en el epiblasto posterior y en los epiblastos recombinantes, pero no en los epiblastos anteriores (Figura 16-3).

*Cebadores de PCR usados para identificar la expresión de marcadores*

Secuencias de cebadores:

GATA-1 (5'):	5'-CAGCACTAGGCCTACTACAG-3'	El producto de la PCR es de
	237 pb; 32 ciclos	
GATA-1 (3')	5'-TCAAGGTGTCCAAGAACGTG-3'	
Bra(5')	5'-TGCTGCCTGTGAGTCATAAC-3'	El producto de la PCR es de
	741 pb; 34 ciclos	
Bra (3')	5'-CTACTCTAAGGCAACAAGCC-3'	
Otx-2 (5')	5'-AGGAGCTGAGTCGCCACCTC-3'	El producto de la PCR es de
	312 pb; 34 ciclos	
Otx-2 (3')	5'-GTAGCCCACGGAGGGATGCA-3'	
CD34 (5')	5'-GTTACCTCTGGGATCCCTTC-3'	El producto de la PCR es de
	612 pb; 32 ciclos	

CD34 (3')	5'-GAGGTGACCAATGCAATAAG-3'
PECAM-1 (5')	5'-TGCGATGGTGTATAACGTCA-3' El producto de la PCR es de 384 pb; 32 ciclos
PECAM-1 (3')	5'-GCTTGGCAGCGAAACACTAA-3'
Flk-1 (5')	5'-CCATACCGCCTCTGTGACTT-3' El producto de la PCR es de 507 pb; 32 ciclos
Flk-1 (3')	5'-ACACGATGCCATGCTGGTCA-3'
c-miosina(5')	5'-CTCGCAGAACAGCAGCCTAA-3' El producto de la PCR es de 679 pb; 32 ciclos
c-miosina(3')	5'-AGGGTCTGCTGGAGAGGTTA-3'

(C) Los blastocistos aislados aproximadamente a los 3,25-3,5 DPC proporcionan un sistema modelo para cribar compuestos que pueden estimular la hematopoyesis y el crecimiento vascular de células mesodérmicas no diferenciadas

Se prepararon cultivos de blastocistos y se usaron para analizar los efectos de compuestos sobre la estimulación de células derivadas del mesodermo no diferenciadas que van a experimentar hematopoyesis y vasculogénesis. El sistema de cultivo de blastocistos descrito en este caso es adecuado para seguir el desarrollo de estructuras embrionarias *in vitro*, tales como el saco vitelino, que normalmente forman la post-implantación *in vivo*. Los efectos de las moléculas de señalización o factores de crecimiento añadidos de manera exógena sobre el desarrollo se analizan en este caso en condiciones definidas. Los blastocistos pueden obtenerse de ratones de tipo natural, ratones transgénicos o ratones deficientes. La hematopoyesis embrionaria en ratones deficientes se estudió usando blastocistos mutantes nulos, obtenidos cruzando animales heterocigotos. Estos blastocistos mutantes nulos se prefieren sobre las células madre embrionarias (ES) mutantes nulas usadas en ensayos de diferenciación *in vitro* (Keller, Current Opin. Cell Biol., 7 (1995) 862-69) debido a su mayor facilidad de aislamiento.

El ensayo de blastocistos se basa en la recuperación de embriones de ratones en un momento anterior a la implantación del embrión en el útero de la madre aproximadamente a los 4,5 dpc. En este caso, los blastocistos se obtuvieron de (a) ratones transgénicos con  $\epsilon$ -globina/LacZ preparados según el ejemplo 1 y analizados mediante tinción de Lac Z; y (b) ratones no transgénicos o ratones deficientes en los que los blastocistos individuales se analizaron a nivel molecular para determinar la expresión de múltiples genes mediante RT-PCR.

Se recogieron los blastocistos a de 3,25 dpc a 3,5 dpc como describe Robertson, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1993. Los inventores han cultivado satisfactoriamente blastocistos de varias variedades diferentes de ratón. En este ejemplo, se usaron ratones CD-1. El procedimiento de cultivo se basó en el procedimiento de Chen y Hsu (Chen, *et al.*, Exp. Hemat., 7 (1979) 231-44). Sin embargo, no se usaron hembras superovuladas. Tras la recogida, se eliminaron de los blastocistos mediante lavado las células sanguíneas maternas contaminantes mediante de dos a tres transferencias secuenciales en cultivos en gota en aceite mineral (Robertson, págs. 471- 478, ed IRL Press 1987) y se transfirieron a placas de cultivo tisular de plástico de 35 mm no tratadas o a los pocillos de una placa de 24 pocillos. Los blastocistos se adhirieron al plástico, se reorganizaron y crecieron. Los blastocistos se cultivaron individualmente (en pocillos de placas de 24 pocillos) o en grupos (placas de 35 mm o placas de 24 pocillos) de hasta 20, en medio CMRL-10 durante las primeras 48 h y luego en CMRL-20 durante hasta 10 días a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>, CMRL-10 era medio CMRL1066 (GIBCO-BRL) que contenía un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, penicilina (2.000 U/ml), estreptomicina (2.000 µg/ml), glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM (GIBCO-BRL) y  $\beta$ -mercaptoetanol 10<sup>-4</sup> M. Pudieron observarse en primer lugar estructuras de tipo saco aproximadamente a los 7 días en cultivo; hacia los 9-10 días se habían agrandado hasta el punto en el que eran fácilmente visibles a simple vista (0,5-2 mm de diámetro). Estas estructuras de tipo saco (denominadas en el presente documento "blastosacos") se parecen mucho a los sacos vitelinos murinos tempranos.

Los blastosacos transgénicos se tiñeron *in situ* para determinar la expresión de LacZ usando procedimientos convencionales (Wassarman y DePamphilis, 1993). Para el análisis mediante RT-PCR, se transfirieron blastosacos individuales a tubos eppendorf usando una pipeta pipetman P200 y se sometieron a microcentrifugación durante 10 min. a 4°C. Se aspiró el medio y se aisló el ARN de los sedimentos tisulares (Chomczynski *et al.* 1987). Una parte (de 5 a 8 µl de 25 µl) del ARN se usó para la síntesis del ADNc (Farrington *et al.*, 1997). De 0,5 a 2 µl de ARN se amplificaron mediante PCR en 50 µl tal como describe (Farrington *et al.*, 1997). En las figuras 4, las muestras se sometieron a 35 ciclos de amplificación y después se analizaron 10 µl de la mezcla de reacción mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio.

Anteriormente se han descrito los cebadores de PCR GATA-1 de ratón y actina (Baron *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, vol 14, (1994) págs. 3108-3114). El resto de los cebadores se usó a una temperatura de reasociación

## ES 2 339 724 T3

de 55°C. El tamaño de los cebadores fue:  $\epsilon$ -globina de ratón, 487 pb; NF-E2 de ratón, 257 pb; EKLF de ratón, 129 pb; PTH/receptor de PTHrP, 279 pb; PTHrP, 421 pb. Las secuencias de los cebadores fueron:

Me directo: 5'-GGA AAA AAC CCT CAT CAA TG-3'

Me inverso: 5'-ATT CAT GTG CAG AGA GGA GGC ATA -3'

mNF-E2 directo: 5'-cga CTA GTT CGG GAC ATC CG-3' (las letras minúsculas indican un sitio de SpeI)

mNF-E2 inverso: 5'-atg gta ccG TAC ATA TTC CTC TGG TG-3' (las letras minúsculas, un sitio de KpnI)

EKLF directo: 5'-cga cta GTG GCG GTC TGA GGA GAC-3' (las letras minúsculas, un sitio de SpeI)

EKLF inverso: 5'-atg gta ccA CGC ACA GGT CAC GT-3' (las letras minúsculas, un sitio de KpnI)

Se identificó tejido hemoglobinizado en estos "blastosacos" tras la tinción con bencidina (figura 3b). La tinción con bencidina corresponde a la presencia de hemoglobina en las células eritroides. Esto se confirmó analizando embriones de ratones transgénicos. En estos ratones, se observó expresión de LacZ sólo en eritroblastos primitivos, pero no en otros tipos de células embrionarias. Se cultivaron los blastocistos transgénicos durante 9 días y luego se tiñeron con X-Gal. Como puede observarse a partir de la figura 3C, las células eritroides producidas en los blastosacos en desarrollo se revelan fácilmente por su color azul tras la tinción. Tanto los blastosacos de tipo natural como los derivados de líneas con marcador transgénico parecen contener canales vasculares y se parecen a los sacos vitelinos embrionarios tempranos (figura 3D) más que a los sacos vitelinos tardíos con vasculatura bien desarrollada (compárese con la figura 2). El procedimiento de cultivo descrito anteriormente proporcionó blastosacos con una eficacia de entre el 40-80%.

Se usó RT-PCR para identificar el patrón de expresión temporal de los marcadores del mesodermo y el endodermo en los blastosacos en desarrollo y los efectos de diferentes factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular en la formación de diferentes tipos de células. Tal como se muestra en la figura 4A, la globina embrionaria se produce sólo cuando se forman estructuras de tipo saco vitelino, pero no si los blastocistos no progresan en su desarrollo más allá de un montón amorfo de células del trofotodermo.

*Embriones mutantes nulos* se analizaron para determinar los efectos sobre la hematopoyesis y el crecimiento vascular de mutaciones introducidas en la línea germinal del ratón mediante transporte dirigido de genes. Se recogieron cultivos de blastocisto a los 3,5 dpc de ratones deficientes en Bmp-4 heterocigotos (Winnier, G., *et al.*, *Genes & Development*, Vol. 9, págs. 2105-2116, (1995)) que se cruzaron para dar lugar a crías mutantes nulas homocigotas. Se incubaron los blastocistos en cultivo durante periodos de tiempo variables (por ejemplo 9 días), tiempo tras el cual, se extrajeron de la placa de cultivo los blastosacos individuales para un análisis de RT-PCR, dejando el tejido trofotodérmico. Este tejido se usó para determinar el genotipo para establecer que los ratones transgénicos de los que se derivan los blastocistos, eran homocigotos. También se usó hibridación *in situ* de embriones completos e inmunohistoquímica para identificar presuntos mutantes para las mutaciones que dan como resultado una deficiencia grave en células eritroides o endotelio.

"*Cuerpos embrioides*" mutantes nulos. Los cuerpos embrioides son estructuras derivadas de células ES que forman islotes sanguíneos en condiciones de cultivo apropiadas (Keller (1995)). Los inventores han desarrollado un sistema de ensayo usando cuerpos embrioides para demostrar que los cuerpos embrioides mutantes nulos tales como Bmp-4, forman poca o ninguna sangre, y que este defecto puede rescatarse mediante la adición de una proteína recombinante exógena (BMP-4). Las células ES usadas en este experimento se derivaron de la sublínea TL-1. Sin embargo, las condiciones de ensayo descritas a continuación son eficaces para otras varias sublíneas de células ES. También son eficaces si las células se han seleccionado para la independencia de las células alimentadoras o se mantienen en las células alimentadoras (Joyner (1995) *Gene Targeting: A Practical Approach* (New York: IRL Press). Con mutaciones en genes seleccionados se rescataron mediante la adición de un compuesto que es funcionalmente equivalente al producto génico expresado por el gen no mutado.

Se formaron células ES que llevaban una mutación nula en ambos alelos del gen Bmp-4 usando técnicas convencionales (Joyner (1995) *Gene Targeting: A Practical Approach*. (New York: IRL Press), Keller, *Current Opin. Cell Biol.* 7, (1995) 862-869; Orkin *Current Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 870-877, Mortensen, *Molec. Cell Biol.* 12 (1995) 2391-2395). Estas células se sembraron en placa aproximadamente a  $2,5 \times 10^5$  células en una placa de bacterias de 6 cm que contenía 5 ml de IMDM/15% de suero (o bien suero derivado de plasma o bien una mezcla 1:1 de PDS y suero bovino fetal). No se encontró necesaria en este caso la adición de factores de crecimiento exógenos tales como eritropoyetina o IL-3, pese a la existencia de una amplia bibliografía que reivindica que son esenciales diferentes cócteles de factores de crecimiento (por ejemplo Keller 1995). Tras 24 h, las células ES habían formado agregados y éstos se resuspendieron suavemente en el mismo medio y se sembraron en placa en metilcelulosa al 0,8% en IMDM que contenía un 10% de suero con o sin BMP-4 (recombinante humana, de Genetics Institute; 2 ng/ml). La figura 17 (A) y (C) muestra las células TL-1 de tipo natural (parentales) a bajo (A) y alto (C) aumento. El 87% de los cuerpos embrioides procedentes de células ES de tipo natural llegaron a hemoglobinizarse tras 10 días (véase la tabla en la parte superior de la figura). En contraposición, sólo el 4% de los cuerpos embrioides procedentes de células ES mutantes nulas (B) llegaron a hemoglobinizarse. Cuando se añadió BMP-4 a los cultivos (D), el número de cuerpos

embrioides aumentó hasta aproximadamente el 59%. Estos resultados se confirmaron usando un ensayo de RT-PCR semicuantitativa para la B-globina embrionaria descrito anteriormente. Estos resultados muestran que la inhibición de la hematopoyesis puede producirse como resultado de una mutación en el gen de *Bmp-4* y esta deficiencia puede revertirse mediante la adición de la proteína BMP-4 exógena.

### Ejemplo 3

*Los compuestos que son funcionalmente equivalentes a un producto génico expresado en un tejido extraembrionario de embrión (ejemplificado mediante la proteína hedgehog) estimulan la hematopoyesis y el crecimiento vascular de células mesodérmicas no diferenciadas (ejemplificado mediante el mesodermo del epiblasto)*

- (a) Se demostró que una proteína hedgehog, tipificada por Sonic hedgehog, estimula la hematopoyesis en el mesodermo del epiblasto usando el procedimiento del ejemplo 2(A) (figura 9). Se diluyó la proteína SHH amino-terminal expresada en bacterias (*Bumcrot et al., 1995*) en Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 250 mM, glicerol al 5% y DTT 1 mM hasta 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en albúmina sérica bovina 10 mg/ml (Stem Cells Technology). Se añadió la proteína SHH a diversas concentraciones (de 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;) para explantar el medio de cultivo. Se cambió el medio tras un día y se aisló el ARN (*Chomczynski y Sacchi, 1987*) para el análisis de RT-PCR. La figura 9 muestra que la proteína SHH puede sustituirse por endodermo visceral de una manera dependiente de la dosis.
- (b) Los compuestos que son funcionalmente equivalentes a un producto génico expresado en un tejido extraembrionario de embrión (ejemplificado mediante la proteína hedgehog) estimulan la hematopoyesis y el crecimiento vascular de células mesodérmicas no diferenciadas (ejemplificado mediante células de médula ósea adultas).

Para determinar si las proteínas hedgehog recombinantes influyen en el desarrollo o la diferenciación de células progenitoras o madre hematopoyéticas adultas, los inventores llevaron a cabo ensayos de clonación *in vitro*. Se sembraron en placa células mononucleares aisladas de médula ósea murina en metilcelulosa tal como sigue:

#### *Ensayos con progenitores hematopoyéticos de médula ósea*

Se lavó la médula ósea de fémures y tibias de 2 a 3 ratones ICR hembras, con edades comprendidas entre las 5 y las 6 semanas, mediante un procedimiento convencional (*Lord, en Haemopoiesis: A Practical Approach, págs. 1-53, ed. Testa y Molineux, 1993 pub. Oxford University Press*) y se transfirió a 5 ml de medio alfa (GIBCO-BRL) que contenía un 2% de suero bovino fetal (hyClone). Se aislaron células mononucleares de las muestras reunidas mediante centrifugación en un colchón de Ficoll (Accurate Chemical Co.) (*Testa y Molineux, 1993*) y se determinó el número de células usando un contador Coulter. Se resuspendieron las células en medio modificado por Dulbecco de Iscove (IMDM) a 3 x 10<sup>5</sup>/ml y se sembraron en placa en una mezcla de metilcelulosa (Fisher Scientific, 1,2%) en IMDM que contenía suero bovino fetal (10%), albúmina sérica bovina desionizada (BSA de calidad para cultivo celular, 1%), 2-mercaptoetanol (1x10<sup>-6</sup> M) y los factores de crecimiento y las proteínas hedgehog recombinantes indicados. La eritropoyetina (Epo) humana recombinante se obtuvo de Amgen y se usó a 40 U/ml. La interleuquina-3 recombinante (IL-3) y el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) se usaron a 50 U/ml cada uno. Se sembraron en placa partes (0,3 ml) de la mezcla de metilcelulosa-células mononucleares en 3 pocillos de cada una de dos placas de 4 pocillos (Nunc) para cada condición de crecimiento sometida a prueba. El cuarto pocillo de cada placa contenía dH<sub>2</sub>O para mantener la humedad. Se incubaron los cultivos en un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante aproximadamente 2 semanas y se anotaron los números de colonias en los días indicados. Las colonias se anotaron como CFU-E, BFU-E, mieloides o mixtas. Cuando se incluyeron en los cultivos, las proteínas hedgehog recombinantes se añadieron a concentraciones entre 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se añadió tampón solo (fosfato de sodio 5 mM, pH 5,5, NaCl 150 mM, DTT 0,5 mM) a algunos cultivos como control negativo. Para cada condición de cultivo, se recopilaron datos de los recuentos de los 3 pocillos de cada una de las dos placas (6 pocillos totales) +/- desviaciones estándar.

Se sembraron en placa las células mononucleares aisladas de la médula ósea en metilcelulosa que contenía factores de crecimiento hematopoyéticos solos (eritropoyetina sola; o GM-CSF + IL-3; o la combinación Epo + GM-CSF + IL-3) o complementada con uno de péptido amino-terminal marcado con histidina de SHH (SHH-HIS), un péptido amino-terminal de SHH (SHH-N) o un péptido amino-terminal marcado con histidina de IHH. Los cultivos que contenían factores de crecimientos solos o factores de crecimiento más tampón se usaron como controles negativos.

En tres experimentos independientes, los números de colonias de todos los tipos (eritroide: CFU-E, BFU-E; mieloides: CFU-GM) aumentaron en de -1,5 a más de 4 veces, de una manera dependiente de la dosis (proteína hedgehog recombinante añadida a 1, 2,5, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , X  $\mu\text{g}$ ). La observación de que las proteínas hedgehog aparentemente no son selectivas para el linaje eritroide frente al linaje mieloides concuerda con la hipótesis de que estimulan el desarrollo de las células progenitoras tempranas o madre. Las tres proteínas hedgehog recombinantes estimularon la formación de colonias. A partir de estos datos los inventores concluyeron que tanto SHH como IHH potencian la proliferación, la diferenciación y/o la supervivencia de las células progenitoras/madre hematopoyéticas *in vitro*, incluso en presencia de uno o más factores de crecimiento hematopoyéticos.

# ES 2 339 724 T3

TABLA 1

Estimulación de células progenitoras de la médula ósea mediante las proteínas HH recombinantes <sup>1</sup>							
Adición	Concentración (µg/ml)	CFU-E (día 2)	veces de aumento <sup>2</sup>	BFU-E (día 7)	veces de aumento	CFU-GM (día 11)	veces de aumento <sup>2</sup>
ninguna		94,6±8,2		18,7±3,9		20,9±0,9	
tampón		84,7±2,4		14,7±5,0		27,1±0,5	
IHH-HIS	1,0	134±29,2	1,49	19,4±3,7	1,16	27,1±6,0	1,1
	2,5	150±31,5	1,67	15,8±2,6	0,95	29,3±6,5	1,2
	5,0	156±17,0	1,74	15,0±3,6	0,90	42,5±2,3	1,8
SHH-N	1,0	138±30,0	1,54	14,3±4,6	0,86	31,9±5,4	1,3
	2,5	143±31,5	1,59	20,2±0,5	1,23	34,5±9,9	1,4
	5,0	154±25,2	1,72	21,3±1,0	1,28	31,9±4,1	1,3
SHH-HIS	1,0	197±19,2	2,20	24,6±1,0	1,47	30,8±4,1	1,3
	2,5	153±24,7	1,71	16,9±1,9	1,01	32,6±6,1	1,4
	5,0	146±13,9	1,63	29,7±3,2	1,78	43,4±8,9	2,0
<sup>1</sup> Todos los cultivos contenían EPO (2 U/ml), IL-3 (50 U/ml) y GM-CSF (2 ng/ml) más la adición indicada (ninguna, tampón o proteína HH). <sup>2</sup> Veces de aumento calculadas basándose en el promedio de los dos valores control (sin adición o con tampón solo).							

TABLA 2

Estimulación de células progenitoras de la médula ósea mediante las proteínas HH recombinantes <sup>1</sup>							
Adición	Concentración (µg/ml)	CFU-E (día 4)	veces de aumento <sup>2</sup>	BFU-E (día 8)	veces de aumento <sup>2</sup>	CFU-GM (día 8)	veces de aumento <sup>2</sup>
ninguna		31		14		20	
tampón pH 8,0 <sup>3</sup>		44		16		21	
tampón pH 5,5 <sup>3</sup>		34		29		27	
IHH-HIS	5	63	1,75	25	1,25	25	1,09
	10	88	2,44	29	1,45	45	1,96
	25	130	3,61	31	1,55	43	1,87
SHH-N	5	71	1,97	47	2,35	28	1,22
	10	76	2,11	42	2,10	27	1,17
	25	136	3,78	46	2,30	28	1,22
SHH-HIS	5	112	3,11	27	1,35	38	1,65
	10	101	2,81	24	1,20	41	1,78
	25	111	3,08	29	1,45	45	1,96
<sup>1</sup> Se contaron las colonias eritroides (CFU-E y BFU-E) para los cultivos que contenían Epo (2 U/ml) más la adición indicada (ninguna, tampón o proteína HH). Se contaron las colonias mieloides (CFU-GM) para los cultivos que contenían IL-3 (50 U/ml) y GM-CSF (2 ng/ml) más la adición indicada. <sup>2</sup> Las veces de aumento se calcularon basándose en el promedio de los tres valores control (sin adición o con tampón sólo). <sup>3</sup> Las proteínas marcadas con HIS se almacenaron en tampón pH 8,0; SHH no marcada se almacenó en tampón pH 5,5.							

*Otros enfoques para medir el efecto de compuestos que son funcionalmente equivalentes a un producto génico expresado en un tejido extraembrionario de embrión en células mesodérmicas no diferenciadas*

Se llevó a cabo un ensayo de colonias de bazo de CFU-S *in vivo* para células de repoblación de la médula y multipotenciales inyectando una fuente de células progenitoras/madre hematopoyéticas en ratones. Las colonias macroscópicas formadas en el bazo tras 8-10 días reflejaron la presencia de células progenitoras/madre (Testa y Molineux, 1993). Como ocurre para el ensayo de células progenitoras *in vitro* descrito anteriormente, la madurez de la colonia se reflejó en el tiempo que tarda la colonia en desarrollarse: las colonias de aparición temprana representaban más células progenitoras maduras, mientras que las colonias de aparición tardía representaban más células progenitoras primitivas.

En un experimento separado, poblaciones de células progenitoras/madre de tejido hematopoyético murino y humano se enriquecen mediante citometría de flujo (clasificación de células activada por fluorescencia, FACS) o inmunoselección magnética (Testa y Molineux, 1993) y su desarrollo se potencia en presencia de la proteína hedgehog. Estas poblaciones resultantes se examinan usando ensayos *in vivo* incluyendo el ensayo de CFU-S (unidad formadora de colonias del bazo) y cultivos de médula ósea a largo plazo. Un cultivo de médula ósea típico incluye ensayos de repoblación competitivos y estudios de trasplante de médula en serie (Morrison, *et al.*, 1995a; Morrison *et al.*, 1995b).



#### Ejemplo 4

##### *Inhibición de eritropoyesis primitiva en embriones completos cultivados usando un anticuerpo que bloquea SHH*

5 Se aislaron embriones completos de dos camadas de ratones aproximadamente a los 6,5 dpc y se cultivaron individualmente en ausencia de IgG exógena (ninguna) o en presencia de IgG purificada (46 µg/ml) (Ericson *et al.*, *Cell* 87 (1996), 661-73). Se sometió a ensayo la expresión de  $\epsilon$ -globina embrionaria mediante el procedimiento de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados se muestran en la figura 11. El asterisco indica un producto amplificado artefactual. Tal como se predijo en el experimento 3, la expresión de  $\epsilon$ -globina se redujo sustancialmente en presencia del anticuerpo que bloquea SHH.

#### Ejemplo 5

15 *Los receptores celulares con patched y Gli son dianas para la estimulación de la hematopoyesis y el crecimiento vascular*

Usando los procedimientos del ejemplo 2(b), los inventores demostraron que la expresión génica de *patched* y *Gli* se producía de manera sustancialmente exclusiva en el mesodermo del saco vitelino. (Figura 6). La expresión enriquecida de *Gli* y *patched* en el mesodermo del saco vitelino señala al mesodermo como la diana de la señalización de hedgehog: Se separaron sacos vitelinos de embriones de 10,5 dpc y 12,5 dpc en fracciones de endodermo (e) y mesodermo (m) y se preparó el ARN tal como describen Farrington *et al.* (1997). Se llevaron a cabo análisis de RT-PCR tal como se describió en el ejemplo 3 anterior usando los cebadores siguientes:

25 Gli-1 5': 5'-CAG GGA AGA GAG CAG ACT GA-3' (de +465 a +484 de secuencia)

Gli-1 3': 5'-AGC TGA TGC AGC TGA TCC AG-3' (de +697 a +716 de secuencia)

ptc 5': 5'-CTG CTG CTA TCC ATC AGC GT-3' (de +3040 a +3059 de secuencia)

30 ptc 3': 5'-AAG AAG GAT AAG AGG ACA GG-3' (de +3491 a +3472 de secuencia)

35 Se usó una temperatura de reasociación de 55°C y 23 ciclos tanto para Gli como para ptc y 16 ciclos para actina (la actina sirvió como control interno). Los productos amplificados fueron de 252 pb (Gli) y 453 pb (ptc). Se encontró que tanto la expresión de Gli como de ptc era sustancialmente exclusiva para la fracción de mesodermo del saco vitelino.

#### Ejemplo 6

40 *Efecto sinérgico de la proteína hedgehog con proteínas TGF- $\beta$  sobre la hematopoyesis (y el crecimiento vascular)*

Usando los procedimientos del ejemplo 3(A) anterior, los inventores han demostrado usando RT-PCR, que tanto *Indian Hedgehog* como *BMP-6* se expresan en el endodermo visceral temprano. El embrión completo (6,5 dpc), los epiblastos, los epiblastos más la proteína hedgehog, los epiblastos más la proteína BMP-6 y los epiblastos más las proteínas hedgehog y BMP-6; se examinan tras una incubación de 72 h para determinar el grado de activación de la expresión de  $\epsilon$ -globina. El experimento se repite para BMP-2, BMP-4 y BMP-7. Los inventores esperan observar un efecto potenciado cuando estén presentes tanto hedgehog como BMP-4 en comparación con cualquiera de ellas sola.

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de estimulación *in vitro* de una población de células derivadas mesodérmicamente no diferenciadas para que experimenten al menos uno de hematopoyesis o crecimiento vascular, que comprende hacer que un compuesto acceda a las células de modo que estimule a las células para que experimenten al menos uno de hematopoyesis o crecimiento vascular, en el que el compuesto es un compuesto hedgehog seleccionado de una proteína hedgehog, un péptido funcional de una proteína hedgehog, o una secuencia codificante del mismo incorporada en un vector, y en el que dicho compuesto promueve la señalización de hedgehog, con la condición de que las células no sean células embrionarias humanas.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog o un péptido funcional de una proteína hedgehog, y en el que dicho compuesto hedgehog se une a una proteína patched.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto hedgehog es un péptido funcional de una proteína hedgehog.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el péptido funcional es un péptido funcional de una proteína Sonic hedgehog.
5. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog seleccionada de Indian hedgehog, Desert hedgehog o Sonic hedgehog.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que la proteína hedgehog es Indian hedgehog.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición comprende además un segundo compuesto seleccionado de una proteína TGF- $\beta$  o una proteína BMP.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la proteína BMP se selecciona de cualquiera de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7.
9. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el compuesto hedgehog es una proteína Sonic hedgehog.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha población de células se mantiene *in vitro* en un medio de cultivo y el compuesto hedgehog se proporciona en el medio de cultivo.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las células son una población de células madre hematopoyéticas.
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que las células madre hematopoyéticas se seleccionan de cualquiera de células de sangre de cordón umbilical, células de sangre periférica fetal y células de hígado fetal, o se obtienen de médula ósea de adulto.
13. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que las células son células progenitoras obtenidas de un ser humano adulto, o células precursoras de un ser humano adulto que pueden experimentar crecimiento vascular cuando se estimulan mediante el compuesto.
14. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que las células constituyen tejido embrionario, un cultivo de explante embrionario, o un blastocisto.
15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las células son células madre hematopoyéticas aisladas de médula ósea de un animal, o células madre hematopoyéticas seleccionadas de cualquiera de células hematopoyéticas encontradas en al menos uno de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica fetal e hígado fetal.
16. Un compuesto hedgehog que promueve señalización de hedgehog para estimular al menos uno de hematopoyesis o crecimiento vascular en un ser humano o animal, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog, un péptido funcional de una proteína hedgehog, o una secuencia codificante del mismo incorporada en un vector.
17. El compuesto según la reivindicación 16 para estimular una población de células derivadas mesodérmicamente no diferenciadas para que experimenten al menos uno de hematopoyesis o crecimiento vascular.
18. El compuesto según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog o un péptido funcional de una proteína hedgehog, y en el que dicho compuesto hedgehog se une a una proteína patched.
19. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog.

## ES 2 339 724 T3

20. El compuesto según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que el compuesto hedgehog es un péptido funcional de una proteína hedgehog.

21. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog seleccionada de cualquiera de Indian hedgehog, Desert hedgehog y Sonic hedgehog.

22. El compuesto según la reivindicación 21, en el que la proteína hedgehog es Indian hedgehog.

23. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que dicho compuesto hedgehog se combina con un segundo compuesto, en el que el segundo compuesto se selecciona de una proteína TGF- $\beta$  o una proteína BMP.

24. El compuesto según la reivindicación 23, en el que la proteína BMP se selecciona de cualquiera de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7.

25. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, para estimular una población de células derivadas mesodérmicamente no diferenciadas para que experimenten al menos uno de crecimiento vascular o hematopoyético, y en el que las células son: células madre hematopoyéticas *in vivo* dentro de la médula ósea de un animal, o células madre hematopoyéticas presentes en un animal y seleccionadas de cualquiera de las células hematopoyéticas encontradas en al menos uno de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica fetal e hígado fetal.

26. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en el que el compuesto se proporciona como un medicamento administrado mediante cualquiera de las vías oral, intradérmica, subcutánea, transmucosa, intramuscular o intravenosa.

27. El compuesto según la reivindicación 16, para tratar a un sujeto que adolece de un número anómalo de células eritroides.

28. El compuesto según la reivindicación 27, en el que el compuesto hedgehog estimula la proliferación o hematopoyesis de células madre hematopoyéticas.

29. El compuesto según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog o un péptido funcional de una proteína hedgehog que se une a patched.

30. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que el compuesto hedgehog se combina con un segundo compuesto, en el que el segundo compuesto se selecciona de una proteína TGF- $\beta$  o una proteína BMP.

31. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en el que el número anómalo de células eritroides es un número bajo de manera anómala de células eritroides, **caracterizado** por una anemia en el sujeto, seleccionándose la anemia de cualquiera de anemia aplásica idiopática, anemia aplásica constitucional, formas secundarias de anemia aplásica, anemia mielodisplásica, anemia crónica inducida viral, anemia inducida por enfermedad inflamatoria crónica, anemia inducida por cáncer, anemia crónica inducida por insuficiencia orgánica, trombocitopenia y anemia inducida por fármacos.

32. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en el que el número anómalo de células eritroides provoca una enfermedad seleccionada de cualquiera de policitemia verdadera y eritroleucemia.

33. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, para tratar a un sujeto que padece una isquemia en los tejidos.

34. El compuesto según la reivindicación 33, en el que la isquemia es isquemia miocárdica.

35. El compuesto según la reivindicación 33 o la reivindicación 34, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog o un péptido funcional de una proteína hedgehog que se une a patched.

36. El compuesto según la reivindicación 33 o la reivindicación 34, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog seleccionada de Sonic hedgehog, Indian hedgehog o Desert hedgehog.

37. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en el que el compuesto hedgehog se combina con un segundo compuesto, en el que el segundo compuesto se selecciona de una proteína TGF- $\beta$  o una proteína BMP.

38. Un anticuerpo que inhibe la señalización de hedgehog para tratar el crecimiento vascular potenciado de manera anómala o para inhibir la hematopoyesis en un sujeto.

39. El anticuerpo según la reivindicación 38, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de bloqueo de hedgehog.

## ES 2 339 724 T3

40. El anticuerpo según la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en el que el crecimiento vascular potenciado de manera anómala acompaña al cáncer.

41. El anticuerpo según la reivindicación 40, en el que el cáncer es cáncer de mama.

42. El anticuerpo según la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en el que el crecimiento vascular potenciado de manera anómala es neovascularización ocular relacionada con diabetes.

43. El anticuerpo según la reivindicación 38, para tratar una neoplasia maligna hematopoyética.

44. El anticuerpo según la reivindicación 38, para inhibir el crecimiento vascular en sujetos que padecen neovascularización o vascularización en exceso.

45. El anticuerpo según la reivindicación 44, para tratar un tumor sólido o un hemangioma en la infancia.

46. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, para promover la cicatrización de heridas.

47. Uso de un compuesto hedgehog que promueve señalización de hedgehog en la fabricación de un medicamento para estimular al menos uno de hematopoyesis o crecimiento vascular, en el que el compuesto hedgehog es una proteína hedgehog, un péptido funcional de una proteína hedgehog, o una secuencia codificante del mismo incorporada en un vector.

48. El uso según la reivindicación 47, en el que el compuesto hedgehog es según la reivindicación 2 o la reivindicación 5.

49. El uso según la reivindicación 47 ó 48, en el que dicho medicamento es para tratar a un sujeto que padece una isquemia en tejidos.

50. El uso según la reivindicación 49, en el que la isquemia es isquemia miocárdica.

51. El uso de un anticuerpo que inhibe la señalización de hedgehog en la fabricación de un medicamento para tratar el crecimiento vascular potenciado de manera anómala o para inhibir la hematopoyesis en un sujeto.

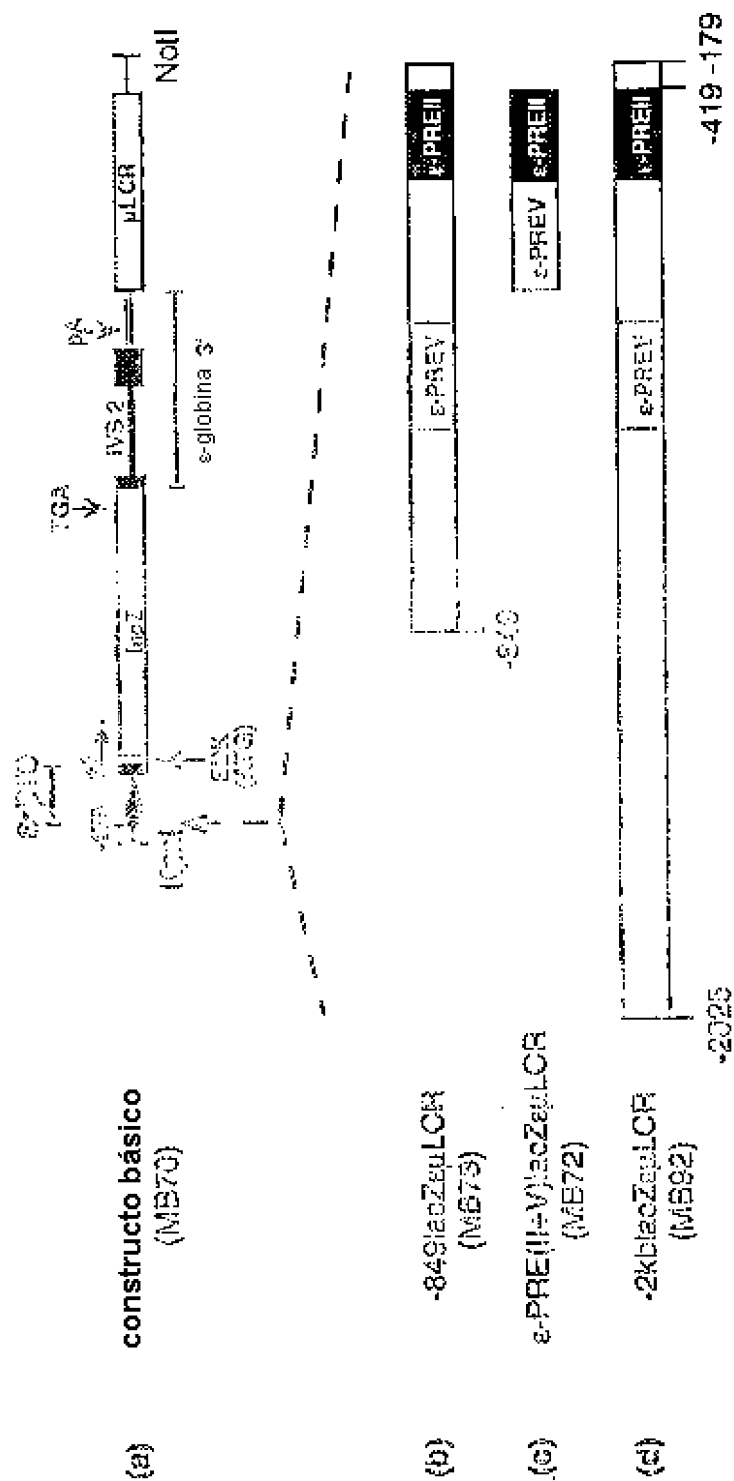
52. El uso según la reivindicación 51, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de bloqueo de hedgehog.

53. El uso según la reivindicación 51 o la reivindicación 52, en el que el crecimiento vascular potenciado de manera anómala es según una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42.

54. El uso según la reivindicación 51, para tratar una neoplasia maligna hematopoyética.

55. El uso según la reivindicación 51, para inhibir el crecimiento vascular en sujetos que padecen neovascularización o vascularización en exceso.

56. El uso según la reivindicación 47 ó 48, en la fabricación de un medicamento para promover la cicatrización de heridas.



### Casets de expresión de $\varepsilon$ -LCR

## Desarrollo del sistema circulatorio del saco vitelino

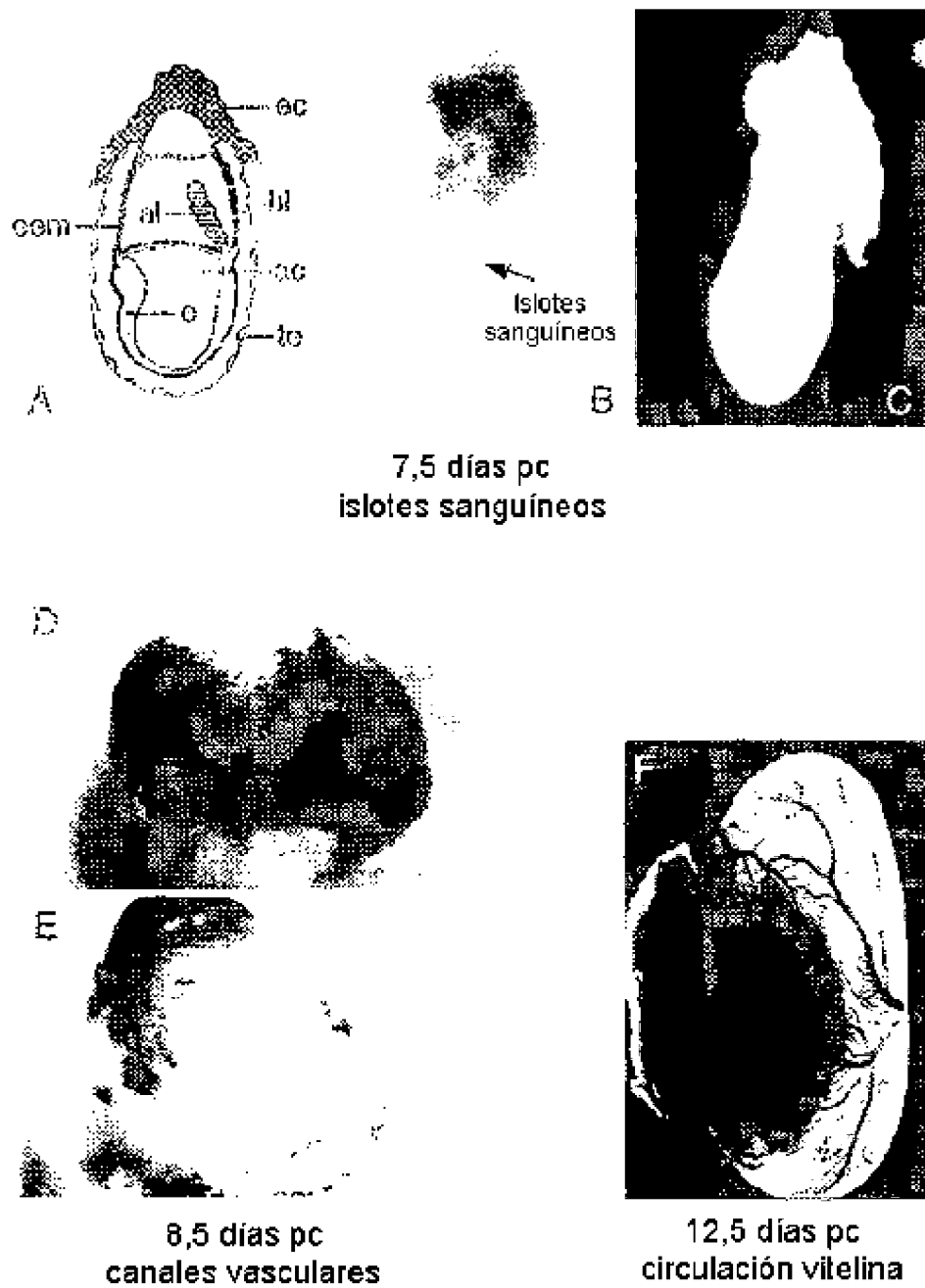


FIG. 2



FIG. 3

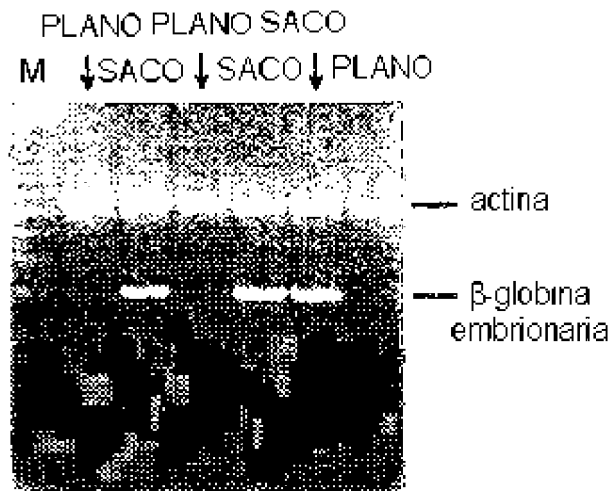


FIG. 4

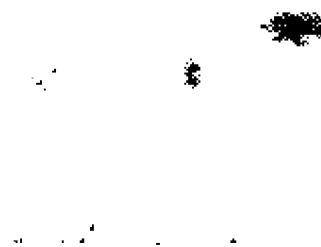


FIG. 5



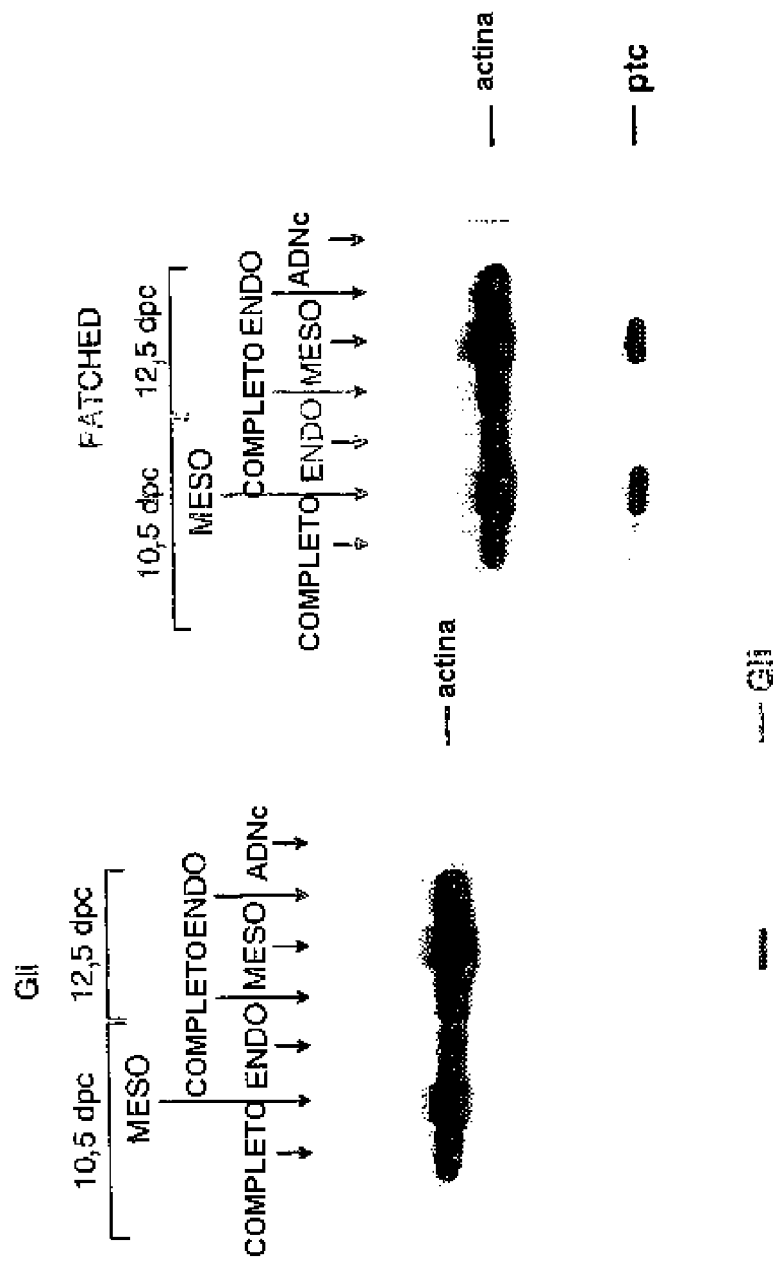


FIG. 6

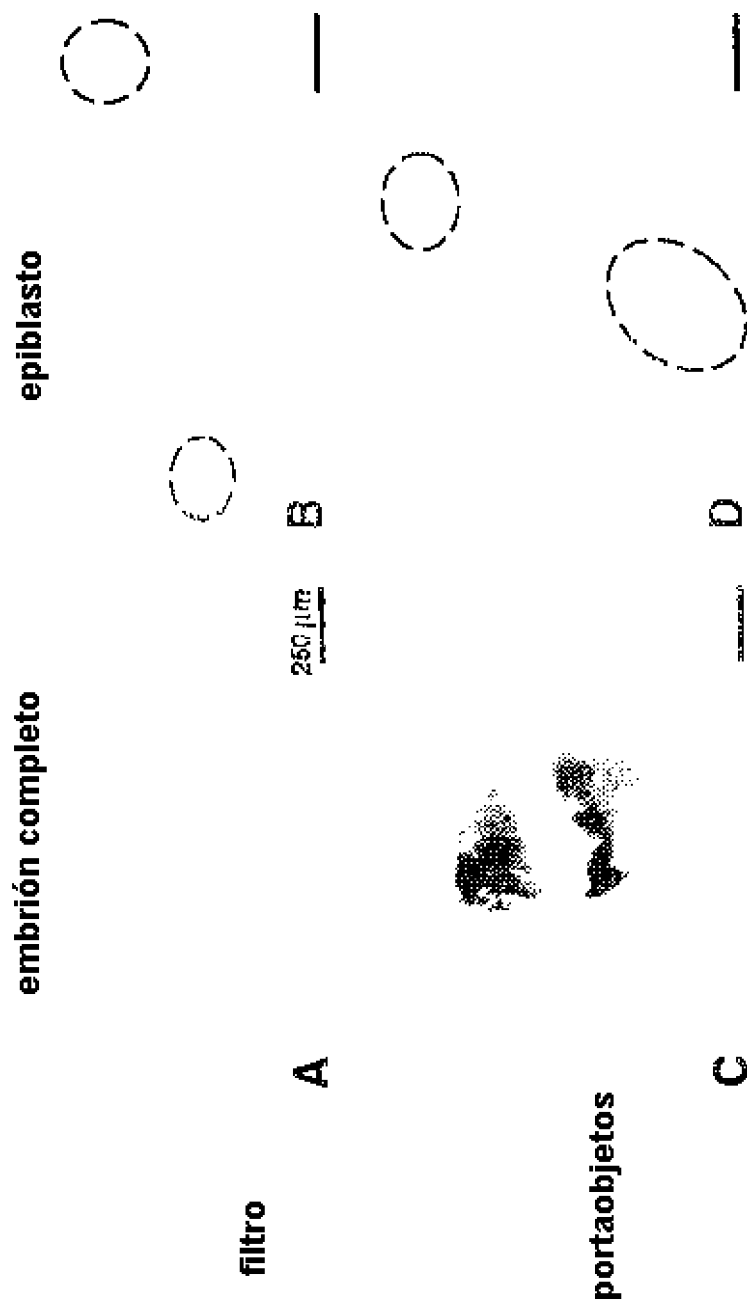


FIG. 7

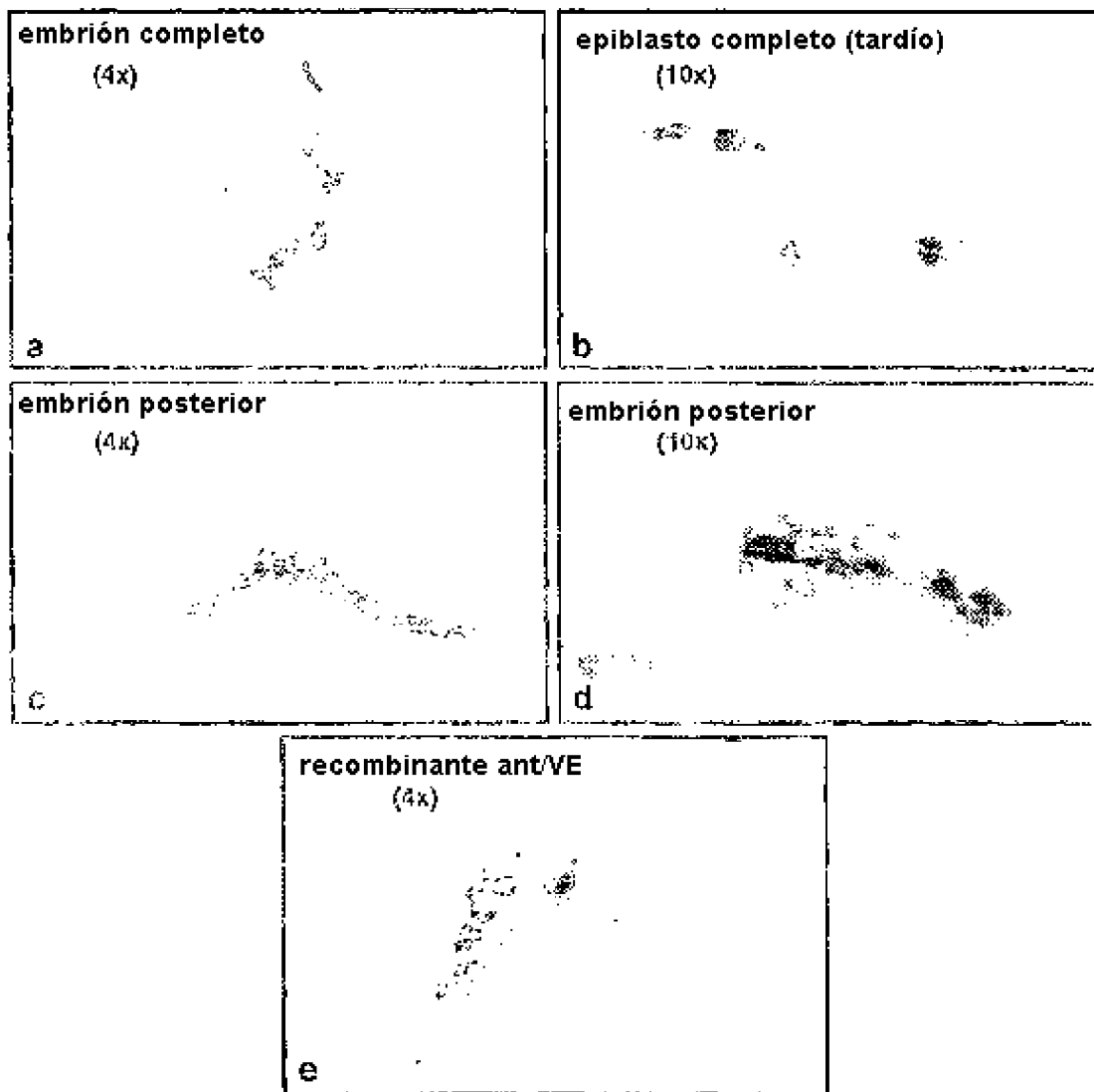


FIG. 7-1

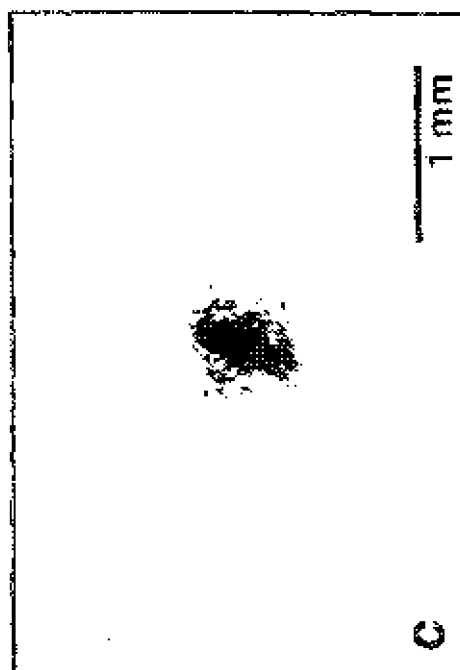
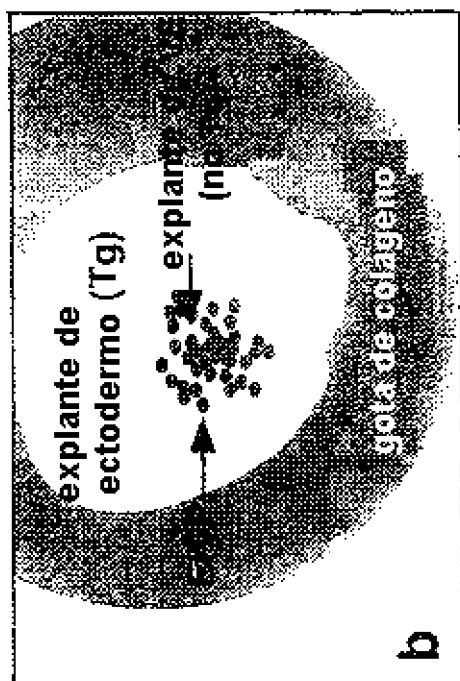
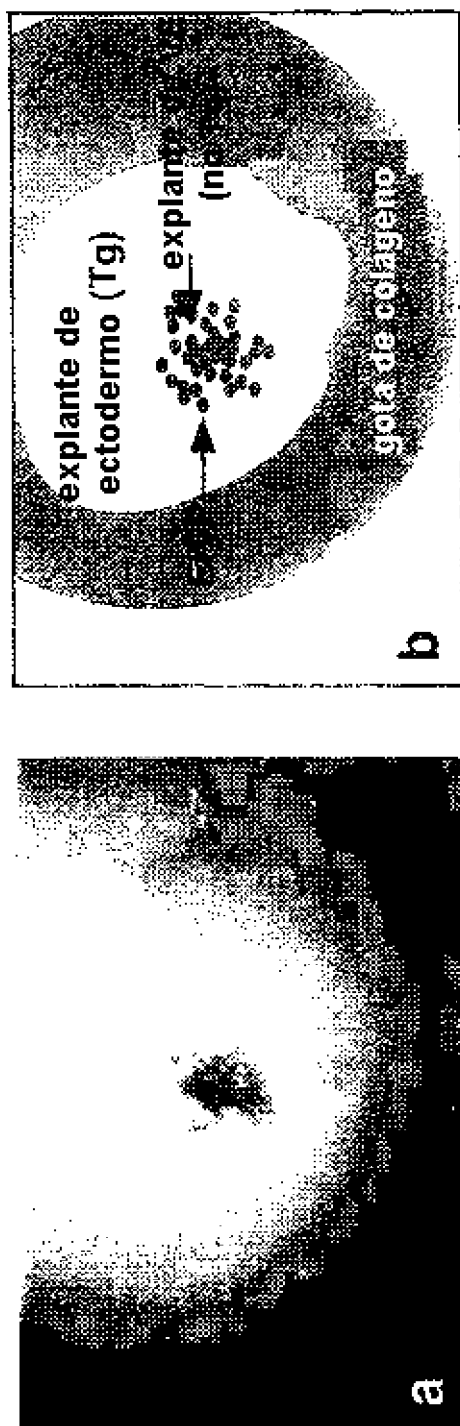


FIG. 8-1

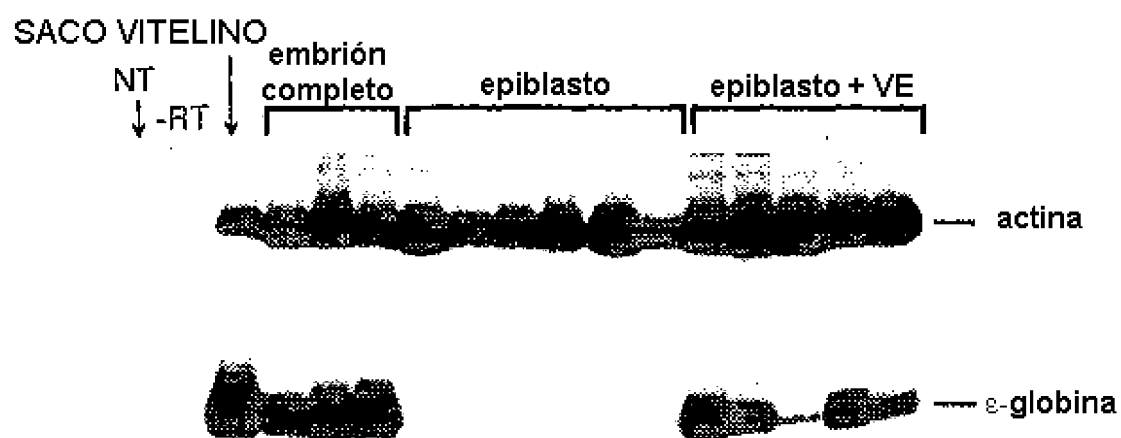


FIG. 8-2

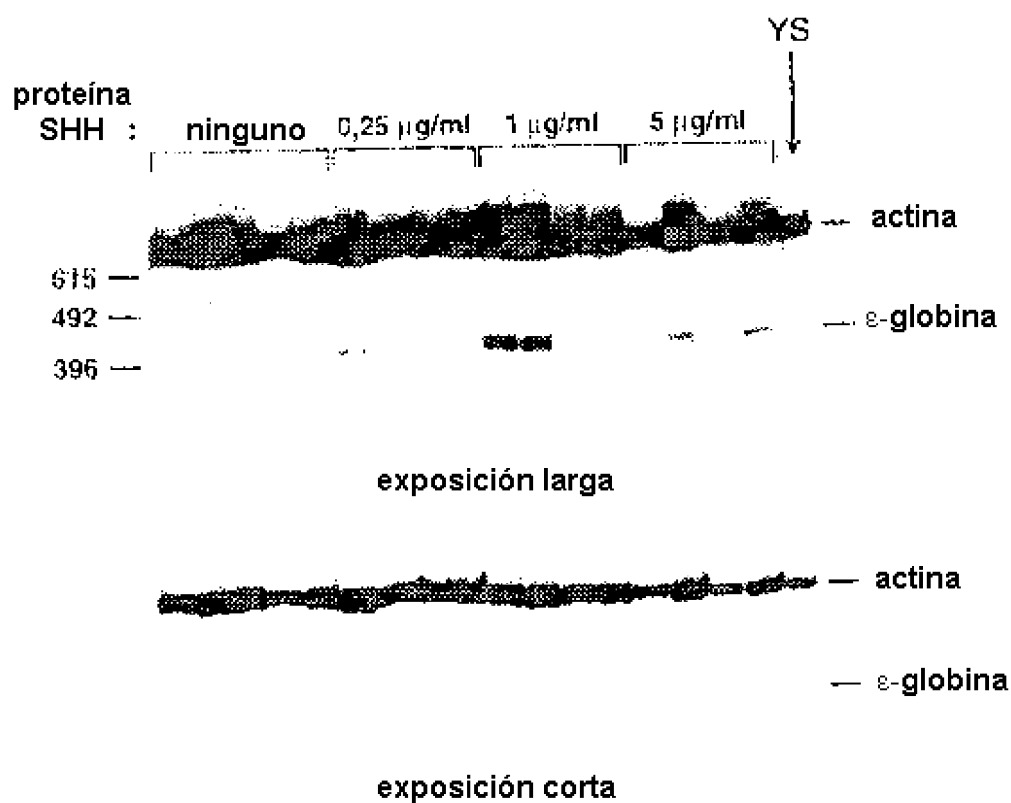


FIG. 9

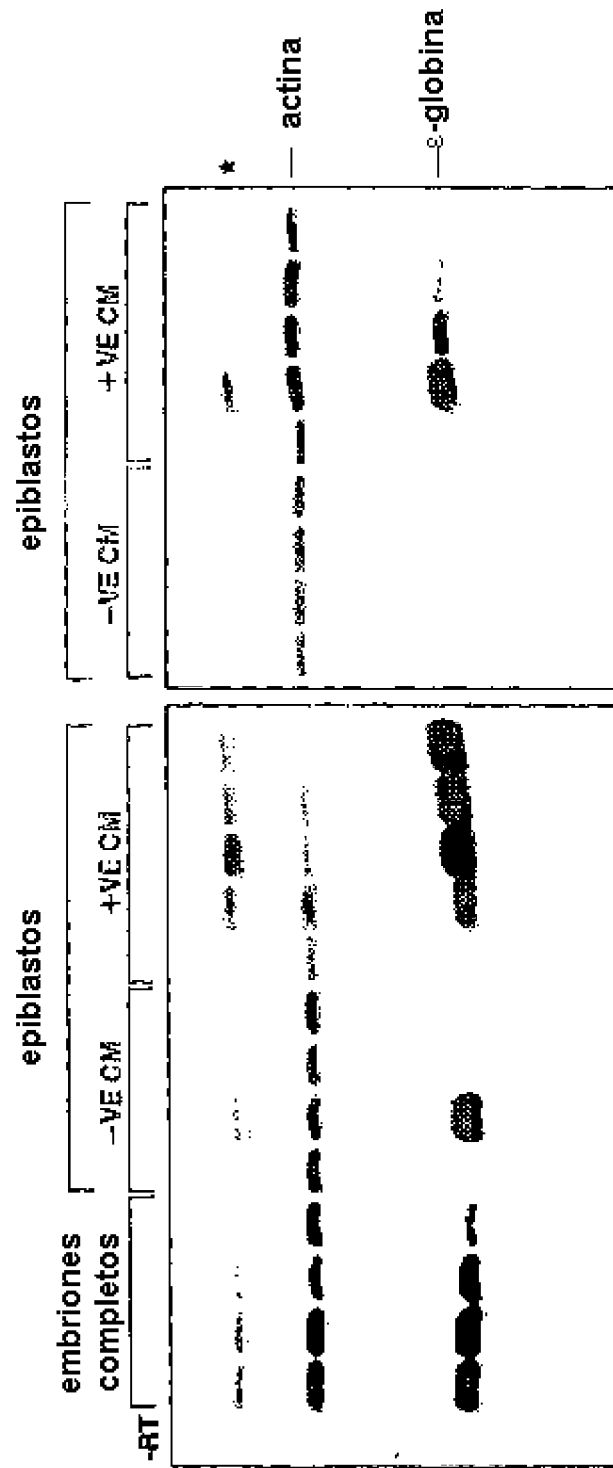


FIG. 10

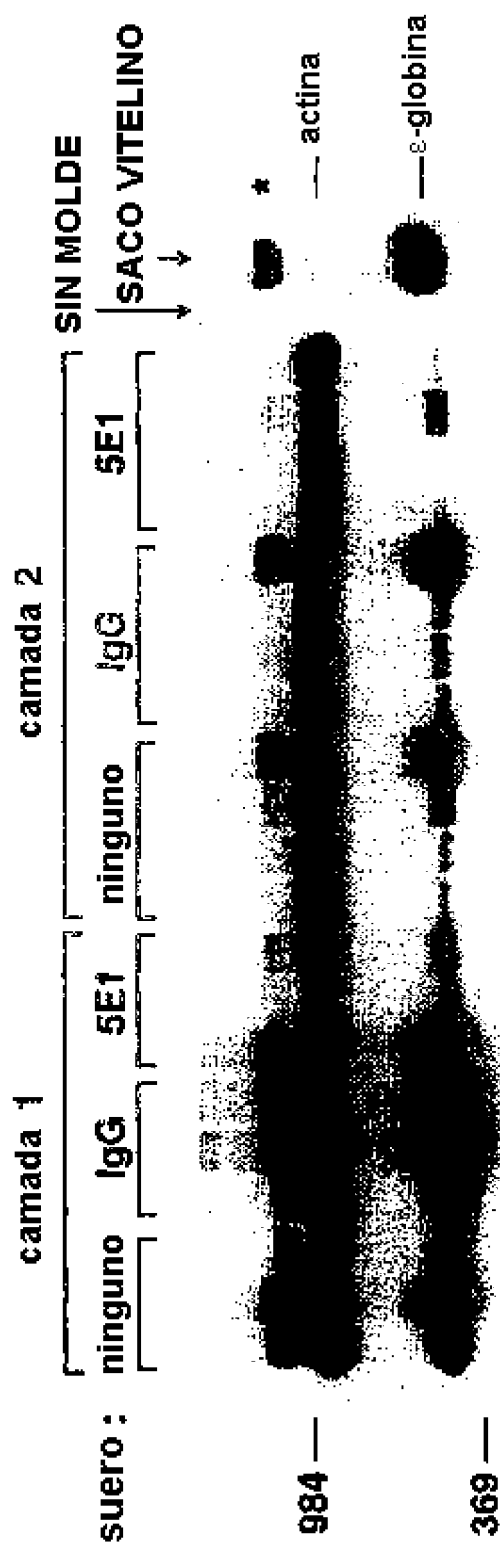


FIG. 11

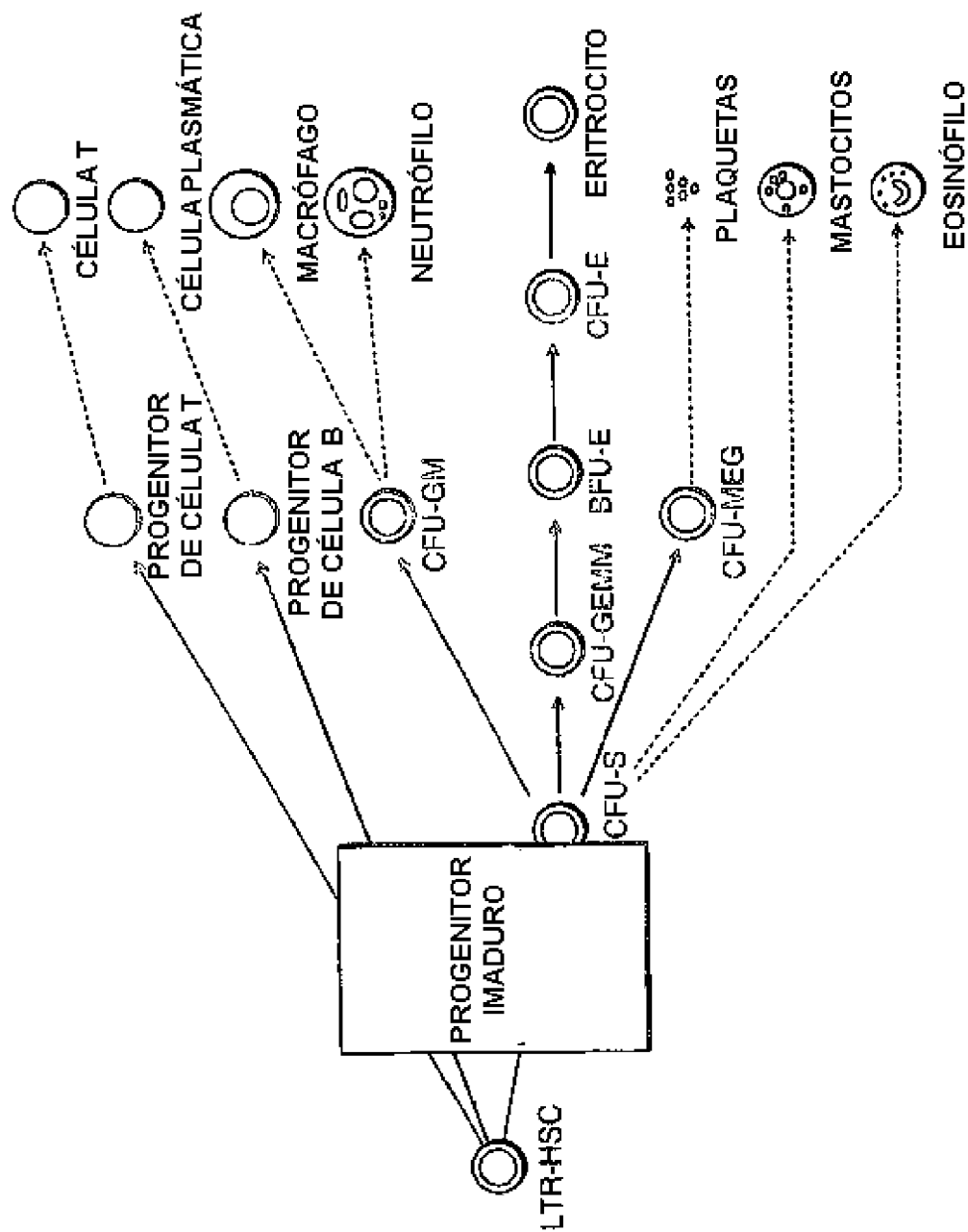


FIG. 12



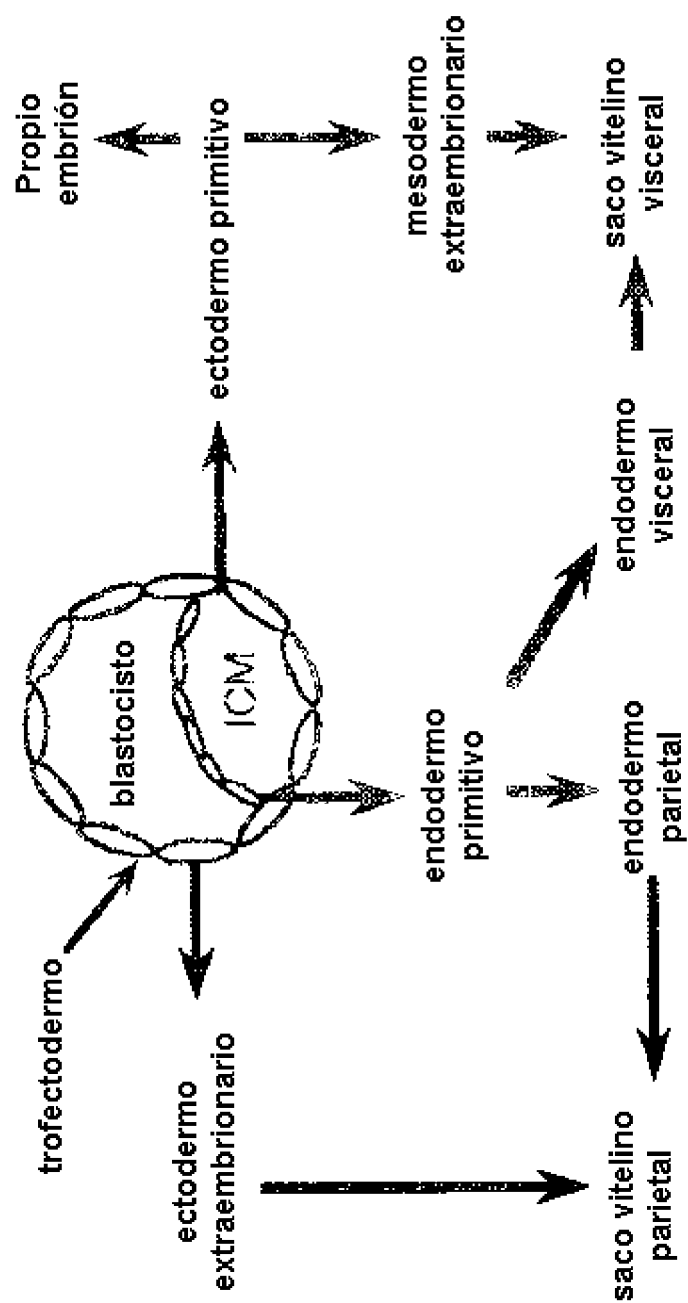
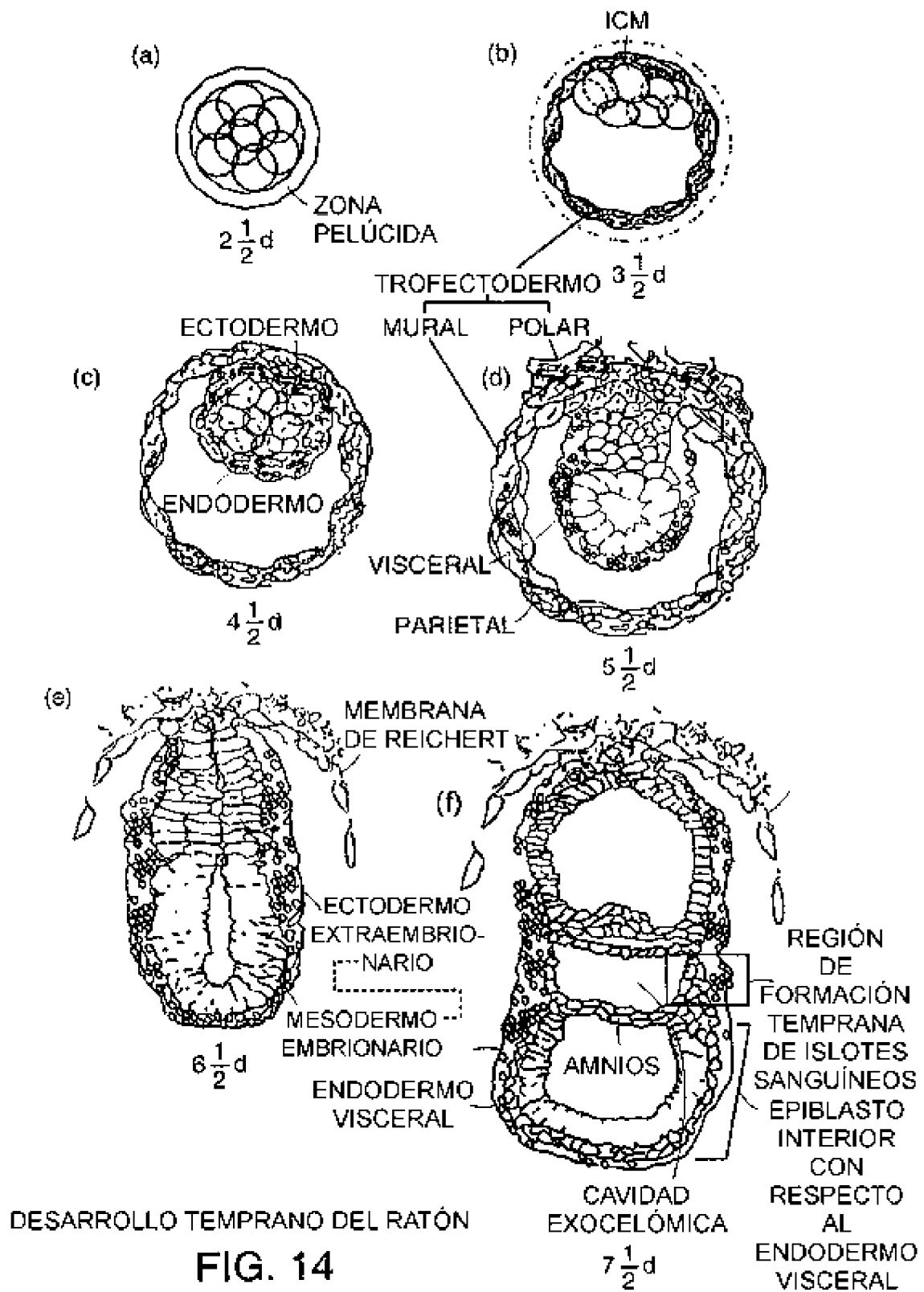
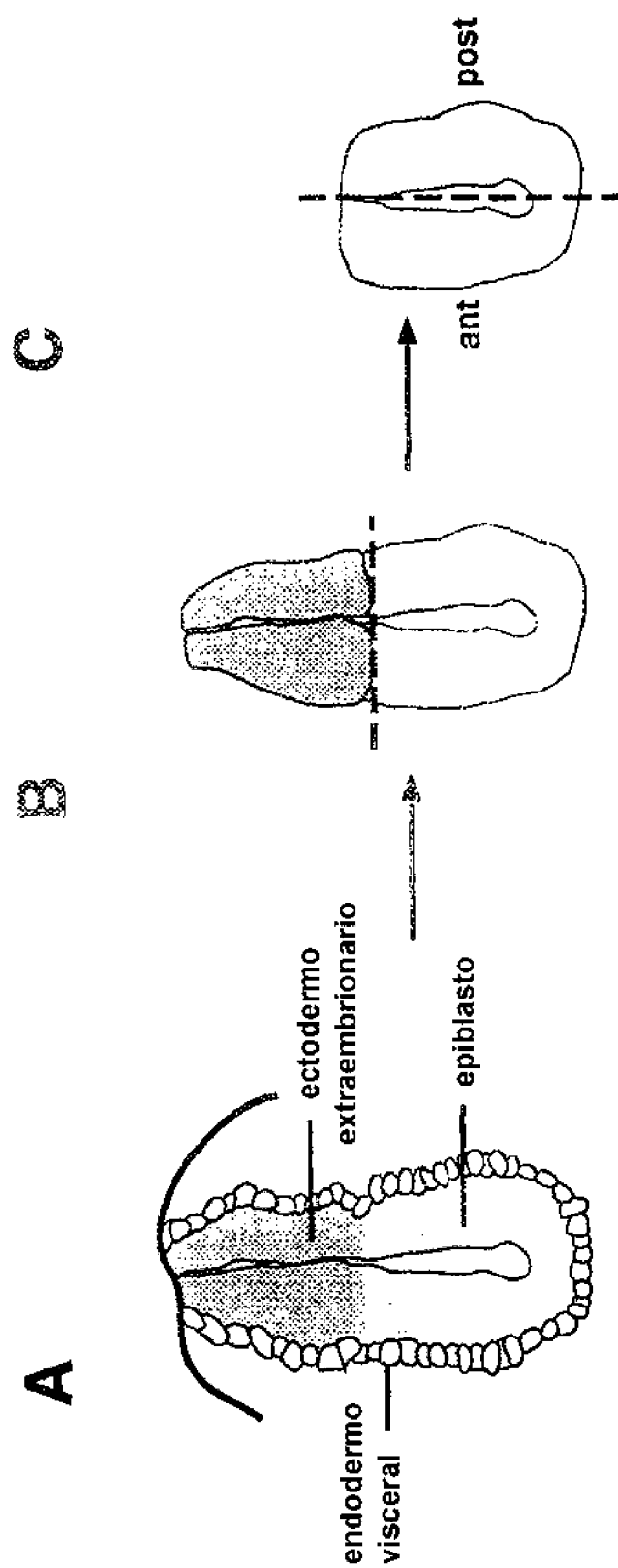


FIG. 13





Separación de epiblasto en las partes anterior y posterior

FIG. 15

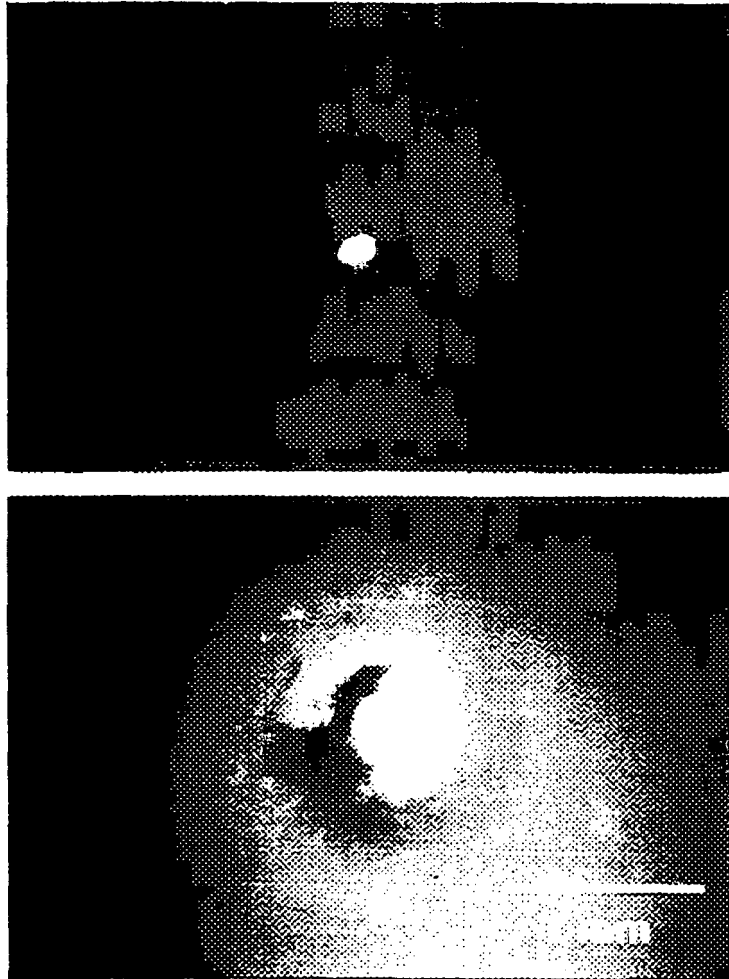


FIG. 16-1

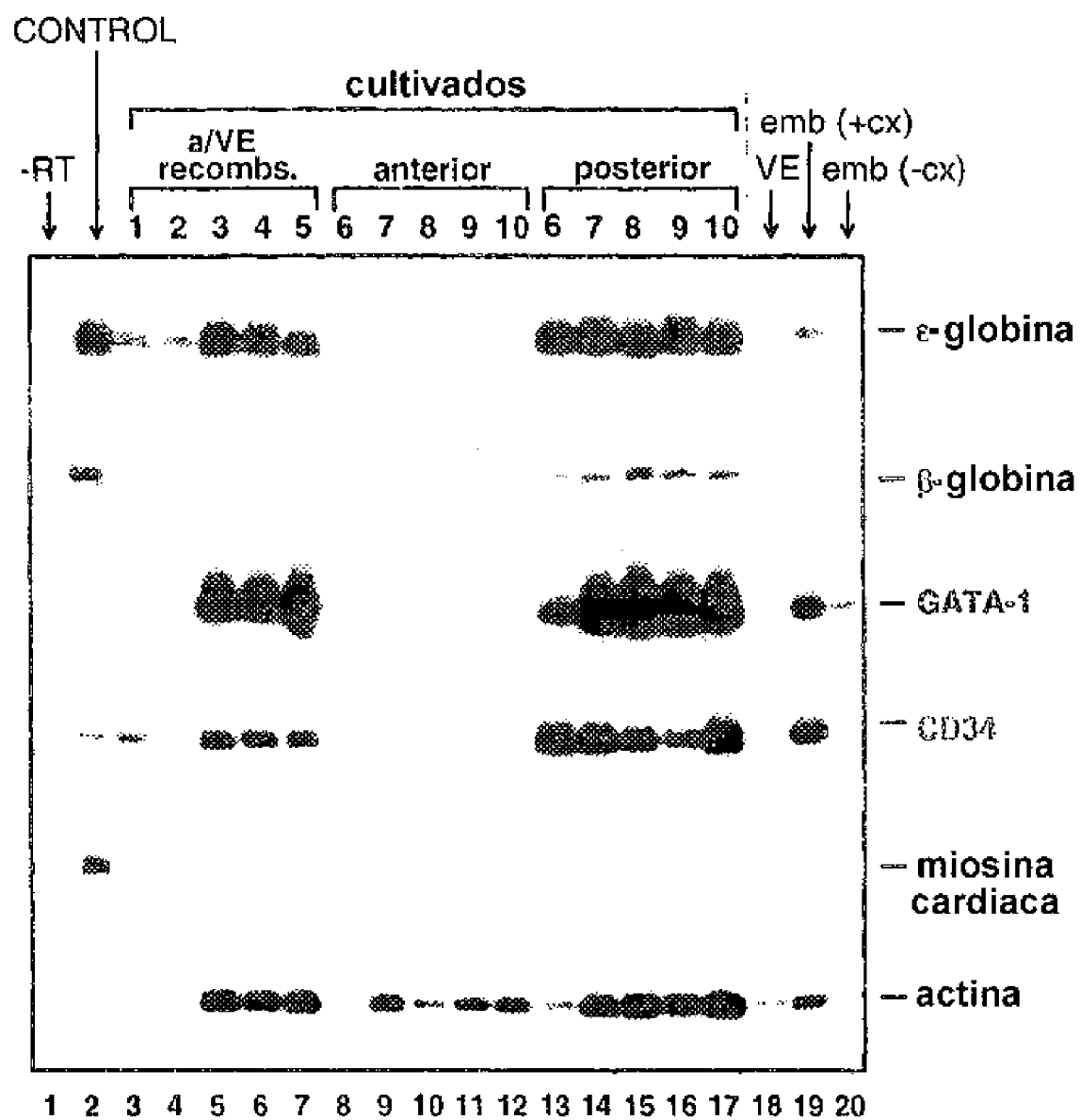


FIG. 16-2

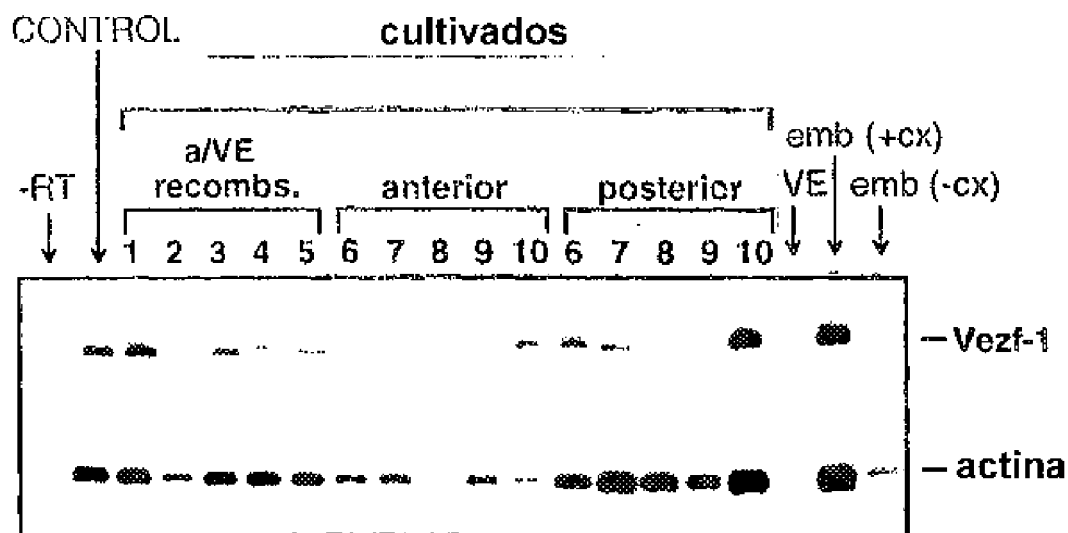
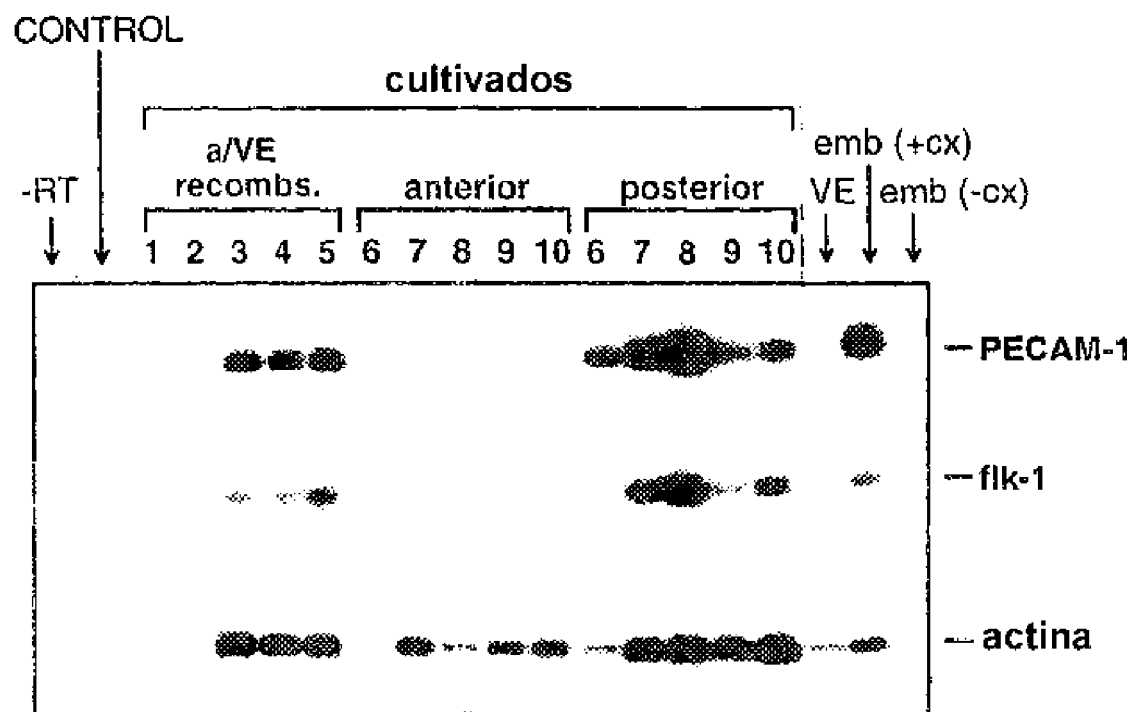


FIG. 16-3

**Rescate del fenotipo mutante nulo mediante BMP-4**

	n.º que contiene hemoglobina	n.º total de CE	porcentaje hemoglobinizado
parental wt	225	260	86,5
mutante ( - BMP-4)	2	50	4,0
mutante ( + BMP-4)	42	72	58,5

**A**

wt

**B**

mut (-BMP-4)

**C**

wt

**D**

mut (+BMP-4)

**FIG. 17**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N° de publicación : ES 2 339 724 T3

⑫ Número de solicitud: E 98906314

## CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE

Pág./Inid	Errata	Corrección
1/73	THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE HARVARD UNIVERSITY, UNIVERSITY PLACE, SUITE 256, 124 MT. AUBURN STREET CAMBRIDGE, MA 02138 US	PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE HARVARD UNIVERSITY, UNIVERSITY PLACE, SUITE 256, 124 MT. AUBURN STREET CAMBRIDGE, MA 02138 US