

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 842**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2011** **PCT/US2011/040323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011** **WO11159684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2011** **E 11796290 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **24.04.2024** **EP 2582794**

54 Título: **Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de pequeños volúmenes de sangre periférica**

30 Prioridad:

15.06.2010 US 355046 P

01.10.2010 US 388949 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
16.12.2024

73 Titular/es:

FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC. (100.0%)
University Research Park, 525 Science Drive,
Suite 200
Madison, WI 53711, US

72 Inventor/es:

MACK, AMANDA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 670 842 T5

DESCRIPCIÓN

Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de pequeños volúmenes de sangre periférica

5 Antecedentes de la invención

La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Estados Unidos n.º 61/355.046 presentada el 15 de junio de 2010 y de la Solicitud de Estados Unidos n.º 61/388.949 presentada el 1 de octubre de 2010. La presente solicitud también está relacionada con la Solicitud de Estados Unidos n.º 61/184.546 presentada el 5 de junio de 2009, la Solicitud de Estados Unidos n.º 61/240.116 presentada el 4 de septiembre de 2009 y la solicitud PCT/US10/37376 presentada el 4 de junio de 2010.

1. Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular y las células madre. Más particularmente, concierne a la reprogramación de células somáticas, especialmente células progenitoras hematopoyéticas.

2. Descripción de la técnica relacionada

20 En general, las células madre son células no diferenciadas que pueden dar origen a una sucesión de células funcionales maduras. Por ejemplo, una célula madre hematopoyética puede dar origen a cualquiera de los diferentes tipos de células sanguíneas terminalmente diferenciadas. Las células madre embrionarias (ME) derivan del embrión y son pluripotentes, poseyendo así la capacidad de desarrollarse hasta dar cualquier tipo de órgano o de tejido o, al menos potencialmente, hasta dar un embrión completo.

25 Las células madre pluripotentes inducidas, comúnmente abreviadas como células MPi o CMPi, son un tipo de célula madre pluripotente artificialmente derivada de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta. Se considera que las células madre pluripotentes inducidas son idénticas a células madre pluripotentes naturales, tales como las células madre embrionarias en muchos aspectos, tales como en términos de la expresión de ciertas proteínas y genes de células madre, patrones de metilación de cromatina, tiempo de duplicación, formación del cuerpo embrioide, formación de teratoma, formación de quimera viable, y potencia y diferenciabilidad, pero el alcance completo de su relación con las células madre pluripotentes naturales aún está en estudio.

30 Las células MPi se produjeron primero en 2006 (Takahashi y col., 2006) a partir de células de ratón y en 2007, a partir de células humanas (Takahashi y col., 2007; Yu y col., 2007). Esto se ha citado como un avance importante en la investigación de células madre, dado que les permite a los investigadores obtener células madre pluripotentes que son importantes para la investigación y potencialmente tienen usos terapéuticos, sin el uso controvertido de embriones.

35 En los seres humanos, las células MPi se generan comúnmente a partir de fibroblastos dérmicos. Sin embargo, el requisito de biopsias de piel y la necesidad de expandir células de fibroblastos durante varios pases *in vitro*, hacen que sean una fuente incómoda para generar células madre con especificidad de paciente. Además, los métodos previos para la reprogramación de células somáticas humanas son inconvenientes, dado que necesitan obtener células somáticas directamente de un individuo humano, o mantener las células en un sistema de cultivo de células de trabajo intensivo.

40 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos para inducir células madre pluripotentes de fuentes alternativas, que sean simples, convenientes y de fácil acceso. Al desarrollar la presente invención, el inventor consideró que las células sanguíneas pueden ser una fuente como esta, dado que la sangre puede ser extraída de un paciente o de un individuo sano, almacenarse o transferirse, por ejemplo, de una unidad central para la distribución a uno o más lugares remotos. Sin embargo, persiste la necesidad de desarrollar métodos más eficaces para reprogramar células sanguíneas, especialmente células de sangre periférica.

Sumario de la invención

55 Aspectos de la presente invención pretenden aumentar la eficacia global del proceso (la eficacia de conversión del número de entrada de células sanguíneas al número de salida de líneas de MPi) de la reprogramación de células de sangre periférica y reducir el volumen del volumen de sangre de entrada necesario para obtener un número razonable de colonias de MPi (por ejemplo, al menos 5), por ejemplo, a partir de una muestra de sangre normal (en un volumen de alrededor de 8-10 ml). Ciertas realizaciones de la invención son novedosas por el uso de la capacidad de expandir el número de células de partida CD34+ a partir de sangre periférica para superar la limitación del pequeño número de células de partida CD34+ que se puede obtener a partir de sangre periférica no movilizada. Un experto en la materia podría pensar que la expansión de células CD34+, que también causa inherentemente que se diferencien, podría hacer que las células fuesen menos susceptibles a la reprogramación. Los Ejemplos de la presente invención demostraron que las células expandidas proporcionan un número suficiente para la reprogramación y logran una

60 eficacia global del proceso inesperadamente buena, mucho más elevada que la condición esencialmente idéntica sin expansión. Con este avance, ciertos aspectos de la invención permiten generar células MPi a partir de un pequeño

65

volumen de sangre periférica, particularmente de individuos no movilizados.

Por otro lado, ciertos aspectos de la invención tienen la ventaja de generar células MPi de células de sangre periférica en una matriz extracelular definida para evitar los problemas y la potencial contaminación xenógena de células alimentadoras no definidas. En otro aspecto, la presente invención también supera el problema de usar vectores integradores para la reprogramación.

Por consiguiente, en una primera realización se proporciona un método *in vitro* para producir células MPi humanas a partir de células progenitoras hematopoyéticas, comprendiendo el método las etapas reivindicadas en la reivindicación 1. Como se ha descrito, las células MPi pueden producirse a partir de una muestra de sangre de pequeño volumen, por ejemplo, de hasta 10 ml, con una o más etapas descritas más arriba.

En ciertos aspectos, la fuente de la población celular es de uno o más individuos cuyas células no han sido movilizadas con un factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) o un factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) aplicado extrínsecamente. La fuente de la población celular puede ser una muestra de sangre o componentes sanguíneos. El volumen adecuado de una muestra de sangre podría ser de alrededor de 1 a alrededor de 5 ml, de alrededor de 1 a 10 ml, de alrededor de 1 a 15 ml, o más específicamente, de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 ml o cualquier intervalo derivable de estos. La población celular puede obtenerse de una muestra de sangre crioconservada o la fuente de población celular o la población celular puede haber sido crioconservada.

Por ejemplo, la población celular puede comprender al menos, alrededor de, o como máximo, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^3 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 células progenitoras hematopoyéticas o cualquier intervalo derivable de estos. En ciertos aspectos, las células de partida antes de la expansión o la reprogramación pueden comprender al menos o alrededor de 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 1010, 1011, 1012, 1013 células o cualquier intervalo derivable de estos. La población de células de partida puede tener una densidad de siembra de al menos o alrededor de 10, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 células/ml, o cualquier intervalo derivable de estos. Una muestra de sangre normal de 8 a 10 ml puede tener 6-12.000 células CD34+ y normalmente, no será suficiente para la reprogramación con el fin de obtener colonias de células MPi. Sin embargo, algunos aspectos de la presente invención proporcionan métodos para expandir células progenitoras hasta un número suficiente y reprogramar las células expandidas para lograr una producción exitosa de células MPi. En un aspecto particular, la población celular puede estar esencialmente exenta de cualquier célula sanguínea terminalmente diferenciada, como los linfocitos T o los linfocitos B, por lo que las células MPi derivadas de esta pueden tener un genoma completo sin reorganizaciones genéticas.

Puede emplearse cualquier método útil para aislar las células progenitoras hematopoyéticas en la etapa a) del presente método. Por ejemplo, dicho aislamiento puede basarse en expresión de marcador de superficie, que puede comprender una selección positiva de expresión de CD34 y/o selección negativa de expresión de marcador con especificidad de linaje. Los métodos de selección pueden incluir clasificación de células activada por magnetismo (MACS®) o clasificación de células activada por fluorescencia (FACS™, es decir, citometría de flujo).

Para la expansión de células progenitoras hematopoyéticas o el cultivo de células progenitoras hematopoyéticas reprogramadas en una etapa de recuperación inicial, las células pueden cultivarse en condiciones que comprenden un medio de expansión que comprende una o más citocinas que incluyen factor de células madre (SCF), ligando de Flt-3 (Flt3L), trombopoyetina (TPO), interleucina 3 (IL-3) o interleucina 6 (IL-6). La condición de expansión puede comprender, además, un ligando de Notch-1, tal como un ligando de Notch manipulado inmovilizado (Deltalex-IgG; Delaney y col., 2010). La célula puede ser expandida durante alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 días o cualquier intervalo derivable de estos antes de la etapa de reprogramación.

La condición de expansión para células progenitoras hematopoyéticas puede estar esencialmente exenta de cualquier componente de matriz o, como alternativa, puede incluir una matriz extracelular definida, tal como un fragmento de fibronectina humana, tal como Retronectin®.

Para facilitar la expansión *in vitro* de las células progenitoras hematopoyéticas simulando su microentorno *in vivo*, la condición para la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas o para el cultivo de células progenitoras hematopoyéticas reprogramadas en una etapa de recuperación inicial puede ser una condición de bajo contenido de oxígeno, por ejemplo, de alrededor de 1 a 7 % de tensión de oxígeno, particularmente, de alrededor de 2-5 % de oxígeno.

En otros aspectos más de la invención puede usarse cualquier método para introducir los elementos genéticos episómicos exógenos en las células, tal como una electroporación o entrega de genes mediada por lípidos.

En ciertos aspectos, los elementos genéticos episómicos pueden comprender un origen de replicación y uno o más casetes de expresión para la expresión de factores de reprogramación. Dicho uno o más casetes de expresión pueden

comprender, además, una secuencia de nucleótidos que codifica un factor de actuación en trans que se une al origen de replicación para replicar una plantilla extra-cromosómica. Como alternativa, las células de sangre periférica pueden expresar un factor de actuación en trans como este.

En realizaciones a modo de ejemplo, el origen de replicación puede ser un origen de replicación de un virus de herpes linfótrofo o un virus de herpes gamma, un adenovirus, SV40, un virus de papiloma bovino, o una levadura, tal como un origen de replicación de un virus de herpes linfótrofo o un virus de herpes gamma correspondiente a oriP de VEB. En otro aspecto, el herpes linfótrofo puede ser el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de herpes de sarcoma de Kaposi (VHSK), herpesvirus saimiri (HS) o el virus de la enfermedad de Marek (VEM).

Para la replicación y el mantenimiento transitorio de elementos genéticos episómicos exógenos, el factor de actuación en trans puede ser un polipéptido correspondiente a, o derivado de, una proteína de tipo silvestre de ANEB-1 (antígeno nuclear de VEB 1) de VEB, con preferencia en presencia de un origen de replicación correspondiente a OriP de VEB. El derivado puede tener una capacidad reducida para activar la transcripción de una plantilla integrada en comparación con ANEB-1 de tipo silvestre y así, posibilidades reducidas de activar ectópicamente los genes cromosómicos para provocar una transformación oncogénica. Mientras, el derivado puede activar la transcripción al menos 5 % de la proteína de tipo silvestre correspondiente de una plantilla extracromosómica después de que el derivado se una al origen de replicación.

Para la reprogramación de células progenitoras hematopoyéticas, ciertos aspectos de los presentes métodos pueden involucrar el uso de factores de reprogramación que pueden comprender uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en Sox, Oct, Nanog, Lin-28, Klf4 y C-myc, o una de sus combinaciones, por ejemplo, un conjunto de Sox, Oct, Nanog y opcionalmente, Lin-28, un conjunto de Sox, Oct, Klf4 y opcionalmente C-myc, o una combinación de estos seis factores. En ciertos aspectos, para reducir el posible efecto tóxico de una expresión de C-myc, el gen T grande de SV40 (SV40LT) puede incluirse en C-myc. En aspectos particulares, los elementos exógenos, pueden comprender uno o más casetes policistrónicos, tal como dos o más genes del factor de reprogramación bajo el mismo elemento regulador transcripcional.

En algunos aspectos adicionales, las células progenitoras hematopoyéticas que han sido introducidas con factores de reprogramación exógenos pueden cultivarse en presencia de una matriz extracelular exenta de sustancias xenógenas. En lo que respecta a las células humanas, la matriz exenta de sustancias xenógenas es definida como una matriz extracelular esencialmente exenta de componentes de origen animal, en donde el animal no es un ser humano. En un aspecto particular, la matriz puede definirse, por ejemplo, como que tiene un tipo simple de péptido de matriz extracelular, tal como un fragmento de fibronectina humana, por ejemplo, Retronectin®.

Además, en la etapa e) posterior a la introducción de elementos genéticos exógenos para la reprogramación, las células pueden cultivarse en más de una condición distinta. En la primera sub-etapa inmediatamente posterior a la introducción de elementos de reprogramación, las células pueden cultivarse en un medio de expansión de células progenitoras hematopoyéticas tal como se describió con anterioridad, o un medio de reprogramación, una combinación o equivalente de estos. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en una condición que comprende un medio que comprende una o más citocinas que incluyen factor de células madre (SCF), ligando de Flt-3 (Flt3L), trombopoyetina (TPO), interleucina 3 (IL-3) o interleucina 6 (IL-6) para recuperar las células progenitoras hematopoyéticas. Esta sub-etapa puede durar alrededor de, al menos, o como máximo, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 48, 96 horas o cualquier intervalo derivable de estos. En esta sub-etapa, un componente de matriz puede ser opcional. Después de esta sub-etapa, las células pueden transferirse a una matriz, de no estar ya en una.

Las células pueden cultivarse, además, en una condición que comprende un medio de expansión; un medio de reprogramación, tal como un medio que comprenda un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptor de TGF- β , un inhibidor de miosina II ATPasa y/o un inhibidor de señalización de cinasa asociada con Rho (ROCK) para mejorar con eficacia la reprogramación; una de sus combinaciones o de sus equivalencias seguido de la transición a 100 % de medio de reprogramación. Por ejemplo, el inhibidor de GSK-3 puede ser CHIR99021; el inhibidor de MEK puede ser PD0325901; el inhibidor de receptor de TGF- β puede ser A-83-01; el inhibidor de miosina II ATPasa puede ser blebbistatina; el inhibidor de ROCK puede ser HA-100 o H1152. Esta sub-etapa puede durar alrededor de, al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días o cualquier intervalo derivable de estos. En algunos aspectos, el medio de reprogramación puede ser definido químicamente, o puede basarse en un medio TeSR, un medio de cultivo de células embrionarias humanas o en un medio N2B27. En otro aspecto, las células pueden ser transferidas, con preferencia gradualmente, a un medio esencialmente exento de inhibidores de señalización aplicados extrínsecamente, tales como un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, un inhibidor de miosina II ATPasa y un inhibidor de receptor de TGF- β . Un medio como este puede ser TeSR2 u otro medio de células madre y puede ser preferiblemente definido de forma química.

Un medio puede ser químicamente definido, tal como un medio TeSR™.

En ciertos aspectos, los métodos pueden comprender, además, la selección de las células MPi, por ejemplo, basándose en una o más características de células embrionarias, tal como una morfología de tipo célula ME. En otro aspecto, los métodos pueden comprender el cultivo de células MPi seleccionadas en un medio de expansión de células

MPi que comprende uno o más seleccionados del grupo que consisten en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, un inhibidor de miosina II ATPasa, un inhibidor de receptor de TGF- β , un inhibidor de señalización de cinasa asociada con Rho (ROCK), opcionalmente un factor inhibitorio de leucemia (FIL) o una de sus combinaciones.

5 También puede proporcionarse una población de células MPi producidas de acuerdo con los métodos anteriores.

Las realizaciones analizadas en el contexto de los métodos de la invención pueden emplearse con respecto a cualquier otro método descrito en el presente documento. De esta manera, una realización relacionada con un método también puede aplicarse a otros métodos de la invención.

10 De la forma usada en el presente documento, las expresiones "codificar" o "que codifica" con referencia a un ácido nucleico son usadas para facilitar la comprensión de la invención por parte del experto en la materia; sin embargo, estas expresiones pueden ser usadas indistintamente con "comprender" o "que comprende", respectivamente.

15 De la forma usada en el presente documento, la especificación "un" o "una" pueden significar uno o más. De la forma usada en la o las reivindicaciones del presente documento, al usarse junto con la expresión "que comprende", los términos "un" o "una" pueden significar uno o más de uno.

20 El uso del término "o" en las reivindicaciones es usado para hacer referencia a "y/o" a menos que se indique de forma explícita que se refiere a alternativas solamente o que las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación respalde una definición que haga referencia a alternativas solamente e "y/o". De la forma usada en el presente documento, "otro/a" puede significar al menos un segundo o más.

25 En la totalidad de la presente solicitud, la expresión "alrededor de" es usada para indicar que un valor incluye una variante de error inherente para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variante que existe entre los sujetos de estudio.

30 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones de preferencia de la invención, son dados solo a modo de ilustración, dado que varios cambios y varias modificaciones dentro del espíritu y del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

35 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar de forma adicional ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede ser mejor comprendida por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

40 FIG. 1 - Esquema de un proceso de reprogramación a modo de ejemplo. De una forma convencional, se procesan viales de 8 ml de sangre completa para obtener CMSP, que son congeladas o bien purificadas en fresco para enriquecer en cuanto a células de expresión de CD34. Luego, se siembran estas células durante un periodo de expansión para obtener un número óptimo de células para la transfección. Las células transfectadas son luego resuspendidas en 100 % de medio de expansión fresco o en combinación con el medio de reprogramación complejado con moléculas pequeñas. Dentro de al menos 48 horas, las células se pasan a una matriz definida exenta de alimentadoras y son alimentadas día por medio con 100 % de medio de reprogramación complejado con moléculas pequeñas. En aproximadamente 9 a 14 días después de la transfección (dpt), se alimenta el cultivo con un medio de células madre pluripotentes definido exento de moléculas pequeñas (es decir, TeSR2). Luego, se tiñen las colonias en 18-25 dpt con Tra1-81 para identificar las colonias de MPi.

55 FIGS. 2A-2E - Las células progenitoras hematopoyéticas (PH) pueden expandirse a partir de donantes de sangre no movilizada. La FIG. 2A demuestra la expansión de las PH a partir de un solo donante de sangre no movilizada usando tres condiciones de prueba. Cada condición se basó en el medio enriquecido con citocina mientras que las matrices variaron entre exenta de matriz, recubierta con fibronectina (Notch-) y recubierta con fibronectina/DLL-1 (Notch+). La FIG. 2B muestra la disminución natural en la expresión de CD34 que se produce mientras los progenitores se desplazan hacia tipos celulares más diferenciados. La expresión de CD45 es un indicador de células hematopoyéticas en general. Las células del mismo donante muestreadas a los 10 días durante la expansión mostraron un perfil de expresión que fue predominantemente de naturaleza mieloide (FIG. 2C) con muy poca expresión o con expresión nula de marcadores de B, T y NK (los datos no se muestran). Además, se descubrió en el presente documento que la expansión es uniforme entre múltiples donantes, pero la magnitud de esa expansión varía entre las muestras de los pacientes (FIG. 2D). Se creó un agrupamiento de 5 donantes para establecer un número mayor de células para realizar múltiples experimentos de reprogramación. El potencial de expansión para este agrupamiento se determinó dos veces (Repeticiones 1 y 2, R1 y R2) (FIG. 2E).

65 FIG. 3 - Vectores para la transfección de progenitores hematopoyéticos (PH). Para reprogramar células con éxito,

se transfectaron PH por electroporación con un plásmido de control de expresión de PVF o una combinación de plásmidos que expresan factores para la reprogramación. Hay múltiples permutaciones de plásmidos que pueden usarse para expresar varias combinaciones de factores de reprogramación que han sido usados con éxito y en el presente documento se muestran ejemplos de dichos plásmidos. Cada plásmido alberga *oriP* y el casete de expresión de ANEB1 para asegurar la retención de los plásmidos dentro de las células transfectadas.

FIG. 4 - Mapas de vectores para vectores policistrónicos - conjunto 1 y conjunto 2.

FIGS. 5A-5F - Optimización de números de células de entrada y eficacia de la transfección para la reprogramación. FIG. 5A. Se expandieron células purificadas a partir de CMSP derivadas de donante GG (fuente Leukopak) durante 6 días. Se transfectó a variedad de números de células con un plásmido de control basado en *oriP*/ANEB-1 que expresa PVF. Se determinó la eficacia de la transfección calculando el porcentaje de células viables que expresan PVF detectados por citometría de flujo. FIG. 5B. Se expandieron células purificadas a partir de CMSP (donante A2389) durante 3 o 6 días y se transfectaron de 6×10^4 a 1×10^5 células con el plásmido de control que expresa PVF. El gráfico representa el porcentaje de la población total que es PVF-positiva y el número absoluto del total de células. FIG. 5C. Este gráfico representa la fracción de células en b que también co-expresan PVF y CD34 cuando se transfectan a los 3 o 6 días de expansión. FIG. 5D. Ensayo de reprogramación representativo de sangre recién extraída (donante 3002) usando el conjunto 2 de plásmido de combinación para la transfección. Se muestra un solo pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene colonias de tinción positiva para la actividad de fosfatasa alcalina (i). Las puntas de flecha blancas indican la colonia ampliada en el panel ii que también tuvo una tinción positiva para la expresión de Tra1-81, panel iii. FIG. 5E. Se realizaron ensayos de reprogramación usando el Conjunto 2 de plásmido en una variedad de números de células de entrada expandidas durante 6 días (donante GG). FIG. 5F. Se expandieron células de expresión de CD34 purificadas a partir de cuatro donantes diferentes durante 6 días y se transfectaron usando la combinación de plásmidos que expresa C-myc (Conjunto 1) o L-myc (Conjunto 2) para compararlos y se comparó el número total de CMPI.

FIG. 6 - La generación de CMPI se produce en ausencia del suplemento que contiene ASB B27.

FIGS. 7A - 7B - La cantidad de expresión de CD34 se correlaciona con la eficacia de reprogramación. FIG. 7A. Ensayo de reprogramación representativo en el que usaron las fracciones tanto CD34 positivas (i) como negativas (ii) después de la purificación para la reprogramación. El panel (i) muestra un pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene colonias reprogramadas con éxito del donante 2939 sobre la base de su capacidad de expresar Fosfatasa Alcalina (tinción AP, azul). La fracción sin CD34 del donante 2939 no fue capaz de formar colonias tal como lo indica la falta de tinción AP cuando se realizó en paralelo con el panel de población purificada, ii. Los paneles iii y iv amplían la colonia en el panel (i) marcado con una punta de flecha blanca y demuestran la expresión de Tra1-81 (verde). FIG. 7B. Se expandieron las células purificadas a partir de cuatro donantes de sangre diferentes durante 3, 6, 9 o 13 días. Se sometió a prueba a una población de células de todos los puntos de tiempo o de un subconjunto de estos en el protocolo de reprogramación exento de célula alimentaria usando el conjunto 2 de combinación de ADN de plásmido que expresa L-myc. Se calculó la eficacia de la reprogramación como el número total de CMPI que muestran rasgos morfológicos característicos de una célula ME y una capacidad de tinción positiva para Tra1-81 dividido por el número total de células usadas para la transfección. Los cuadrados negros representan el porcentaje de la población que expresa CD34 en los puntos de tiempo indicados.

FIGS. 8A-8B - CMPI derivadas de células sanguíneas usando reactivos completamente definidos (exentos de componentes animales). FIG. 8A. Factor de expansión de células que expresan CD34 agrupadas de múltiples donantes en medio exento de componentes animales ($n=2$) completamente definido y normal ($n=13$) tras 6 días de expansión. Se calculó el factor de expansión a partir del número total de células el día 6 dividido por el número de células el día posterior a la purificación. Los porcentajes indican la fracción de células que expresan CD34 en la población total. FIG. 8B. La imagen representa un pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene colonias de tinción positiva para fosfatasa alcalina después de la reprogramación de células expandidas enriquecidas para expresión de CD34 con reactivos no de origen animal, completamente definidos.

Descripción de realizaciones ilustrativas

I. Introducción

La invención se refiere a métodos para mejorar la eficacia global del proceso de reprogramación de células de sangre periférica.

Una evaluación exhaustiva de la relevancia clínica de las células MPi se ha visto obstaculizada por su derivación usando sistemas mal definidos y métodos que involucran métodos de base vírica que se basan en la integración cromosómica. Por ejemplo, se han usado con frecuencia fibroblastos embrionarios de ratón (FER) como capa de soporte para facilitar el desarrollo de MPi junto con un medio de reprogramación que ha sido acondicionado en presencia de FER. El inventor ha descubierto que la eficacia de la reprogramación se ve afectada, en parte, por la calidad de los FER usados, que puede variar entre lotes. Por lo tanto, es difícil controlar y cuantificar esa variabilidad dado que la contribución que imparten los FER sobre la reprogramación está mal definida. Por lo tanto, es preferible

establecer un sistema más definido independiente de FER que sea susceptible de manipulación para que el resultado sea más predecible. Múltiples laboratorios han tenido éxito al generar células MPi usando sustratos exentos de células alimentarias, tales como Matrigel™ (origen de ratón) o sus derivados (Aasen y Belmonte, 2010; Sun y col., 2009), pero ninguno de ellos usó células de sangre periférica o una matriz exenta de sustancias xenógenas.

Además, se ha comprobado, hasta la fecha, que los métodos de reprogramación de base vírica son más eficaces que los métodos no integradores y, por lo tanto, son usados con mayor regularidad para generar células MPi. Desafortunadamente, la presencia de ADN integrado que lleva casetes de expresión que codifican oncogenes conocidos, tales como C-myc y antígeno T, son inaceptables por al menos dos razones. Su presencia siempre resulta una amenaza de reactivación y expresión de aquellos genes que no pueden ser tolerados dentro de los criterios restringidos de aplicaciones clínicas. La integración provocada mediante métodos de base vírica también se produce en localizaciones múltiples y con frecuencia impredecibles que pueden alterar la expresión de genes endógenos presentes dentro del ADN hospedador que puede ser crucial para controlar la proliferación o procesos celulares críticos que llevan a una variabilidad en el rendimiento de estas células en análisis corriente abajo. Por lo tanto, una estrategia no integradora para generar células MPi usando condiciones definidas mitigaría esta potencial variabilidad.

Para proporcionar células de pacientes específicos que cumplan con los criterios exigentes para la aplicación clínica, deben generarse clones de MPi a partir de un material de fuente tratable que contenga una alta fracción de células diana o al menos susceptibles a la expansión, generadas a partir de condiciones exentas de células alimentarias, o condiciones químicamente definidas, y reprogramables a través de un proceso que se pueda aumentar de escala a lo largo de cientos de muestras. La sangre es una fuente de tejido extremadamente accesible que se extrae de rutina de pacientes en todo el mundo, y las células de donantes de sangre movilizada y no movilizada han sido reprogramadas con éxito mediante la integración de vectores víricos (Loh y col., 2009; Ye y col., 2009), (PloS, en prensa). Se ha demostrado que las células enriquecidas para la expresión de CD34, en particular, se reprograman con mayor eficacia que los fibroblastos.

Sin embargo, los métodos actuales para reprogramar células CD34+ no satisfacen los criterios rigurosos de exención de sustancias xenógenas necesarios para aplicaciones clínicas. En primer lugar, las células CD34+ constituyen solo una pequeña fracción (0,1 %) de sangre periférica no movilizada (solo 1000 células por ml de sangre). En segundo lugar, los investigadores se han basado en métodos de base vírica que requieren la integración en el ADN cromosómico. En tercer lugar, los métodos publicados involucran FER y un medio acondicionado y, por lo tanto, están mal definidos y contienen contaminación xenógena.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de un proceso completamente definido para generar células MPi a partir de sangre periférica. Tal como lo muestran los Ejemplos, se proporciona un método para expandir la población de células que expresan CD34 a partir de menos de ml de sangre y para generar células MPi en condiciones exentas de células alimentarias sin ADN integrado y eventualmente extracromosómico.

A continuación se describen otras realizaciones y ventajas de la invención.

II. Definiciones

La "reprogramación" es un proceso que le confiere a una célula una capacidad mensurablemente aumentada para formar progenie de al menos un nuevo tipo de célula, ya sea en cultivo o *in vivo*, que la que tendría en las mismas condiciones sin reprogramación. Más específicamente, la reprogramación es un proceso que le confiere a una célula somática un potencial pluripotente. Esto significa que después de una proliferación suficiente, una proporción mensurable de progenie tiene características fenotípicas del nuevo tipo de célula si esencialmente ninguna de dicha progenie podría formarse antes de la reprogramación; de otra manera, la proporción que tiene características del nuevo tipo de célula es mensurable más que antes de la reprogramación. En ciertas condiciones, la proporción de progenie con características del nuevo tipo de célula puede ser de al menos alrededor de 1 %, 5 %, 25 % o más en orden creciente de preferencia.

La expresión "exento de sustancias xenógenas (ESX)" o "exento de componentes de origen animal (EOA)" o "exento de componentes animales", cuando se usa con relación a un medio, una matriz extracelular o una condición de cultivo, hace referencia a un medio, una matriz extracelular o a una condición de cultivo que esencialmente está exento de componentes heterogéneos derivados de animales. Para cultivar células humanas, cualquier proteína de un animal no humano, tal como un ratón, sería un componente xenógeno. En ciertos aspectos, la matriz exenta de sustancias xenógenas puede estar esencialmente exenta de cualquier componente derivado de animal no humano, por lo tanto, quedan excluidas las células alimentarias de ratón o Matrigel™. Matrigel™ es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de matriz extracelular que incluye laminina (un componente principal), colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y nidógeno/entactina.

El término "definido", cuando se usa con relación a un medio, una matriz extracelular o una condición de cultivo, hace referencia a un medio, a una matriz extracelular o a una condición de cultivo en el que se conocen la naturaleza y las cantidades de aproximadamente todos los componentes.

Un "medio químicamente definido" hace referencia a un medio en el que se conocen la naturaleza química de aproximadamente todos los ingredientes y sus cantidades. Estos medios también son denominados medios sintéticos. Ejemplos de medios químicamente definidos incluyen TeSR™.

Las células están "sustancialmente exentas" de elementos genéticos exógenos o elementos de vector, tal como se usa en el presente documento, cuando tienen menos de % del o de los elementos, y están "esencialmente exentas" de elementos genéticos exógenos o elementos de vector cuando tienen menos de 1 % del o de los elementos. Sin embargo, aún más deseables son las poblaciones celulares en las que menos de 0,5 % o menos de 0,1 % de la población celular total comprende elementos genéticos exógenos o elementos de vector.

Un cultivo, matriz o medio están "esencialmente exentos" de ciertos reactivos, tales como inhibidores de señalización, células alimentarias o componentes animales, cuando el cultivo, la matriz o el medio, respectivamente, tienen un nivel de estos reactivos inferior a un nivel detectable usando métodos convencionales de detección conocidos por un experto en la materia o estos agentes no han sido agregados extrínsecamente al cultivo, matriz o medio.

"Células de sangre periférica" hace referencia a componentes celulares de la sangre, inclusive glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, que se encuentran dentro de la mezcla circulante de sangre.

"Células progenitoras hematopoyéticas" o "células precursoras hematopoyéticas" hace referencia a células que están comprometidas con un linaje hematopoyético, pero son capaces de una mayor diferenciación hematopoyética e incluyen células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas multipotenciales (hematoblastos), progenitores mieloides, progenitores de megacariocitos, progenitores de eritrocitos y progenitores linfoides. Las células madre hematopoyéticas (CMH) son células madre multipotentes que dan origen a todos los tipos de células sanguíneas incluyendo linajes mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK). Las células progenitoras hematopoyéticas pueden expresar o no CD34. Las células progenitoras hematopoyéticas pueden coexpresar CD133 y pueden ser negativas para la expresión de CD38. En ciertas realizaciones, ciertas células progenitoras hematopoyéticas humanas pueden no expresar CD34, pero sin embargo, estas células pueden convertirse en células MPi a través de los métodos desvelados en el presente documento. Las células precursoras hematopoyéticas incluyen células precursoras hematopoyéticas CD34+ / CD45+ y células precursoras hematopoyéticas CD34+ / CD45+ / CD43+. Las células precursoras hematopoyéticas CD34+ / CD43+ / CD45+ pueden estar muy enriquecidas en progenitores mieloides. Varios linajes de células progenitoras hematopoyéticas, tales como las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ / CD43+ / CD45+, pueden convertirse en células MPi a través de los métodos desvelados en el presente documento. Las células progenitoras hematopoyéticas también incluyen varios subconjuntos de células hematopoyéticas primitivas que incluyen: células CD34-/CD133+/CD38- (células precursoras hematopoyéticas primitivas), CD43(+)/CD235a(+)/CD41a(+/-) (eritro-megacariopoyéticas), lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(-) (multipotentes) y lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(+) (con sesgo mieloides), CD133+/ALDH+ (aldehído deshidrogenasa) (por ejemplo, Hess y col., 2004; Christ y col., 2007). Se anticipa que cualquiera de estos tipos de células hematopoyéticas primitivas o de células precursoras hematopoyéticas puede convertirse en células MPi tal cual se describe en el presente documento.

Un "vector" o "construcción" (a veces denominado "vehículo" de entrega de genes o de transferencia de genes) hace referencia a una macromolécula o complejo de moléculas que comprende un polinucleótido que será entregado a una célula hospedadora, *in vitro* o *in vivo*. Un vector puede ser una molécula lineal o circular.

Un "plásmido", un tipo común de vector, es una molécula de ADN extra-cromosómico separada del ADN cromosómico, que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. En ciertos casos, es circular y bicatenario.

"Construcción de expresión" o "casete de expresión" significa una molécula de ácido nucleico que es capaz de dirigir la transcripción. Una construcción de expresión incluye, como mínimo, un promotor o una estructura funcionalmente equivalente a un promotor. También pueden incluirse elementos adicionales, tales como un mejorador, y/o una señal de terminación de la transcripción.

El término "exógeno", al usarlo con relación a una proteína, un gen, un ácido nucleico o un polinucleótido en una célula o en un organismo, hace referencia a una proteína, un gen, un ácido nucleico o un polinucleótido que ha sido introducido en la célula o en el organismo por medios artificiales, o con relación a una célula, hace referencia a una célula que fue aislada y posteriormente introducida en otras células o en un organismo por medios artificiales. Un ácido nucleico exógeno puede provenir de un organismo o célula diferente, o puede ser una o más copias adicionales de un ácido nucleico que se presenta de forma natural dentro del organismo o de la célula. Una célula exógena puede provenir de un organismo diferente o puede ser del mismo organismo. A modo de ejemplo no limitante, un ácido nucleico exógeno está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o de otra manera, está flanqueado de una secuencia de ácido nucleico diferente de la que se encuentra en la naturaleza.

La expresión "corresponde a" es usada en el presente documento para significar que una secuencia polinucleotídica es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada evolutivamente en sentido riguroso) a la totalidad o a una porción

de una secuencia polinucleotídica de referencia, o que una secuencia polinucleotídica es idéntica a una secuencia polinucleotídica de referencia. En contraposición, la expresión "complementaria a" es usada en el presente documento para significar que la secuencia complementaria es homóloga a la totalidad o a una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia. A título ilustrativo, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Un "gen", "polinucleótido", "región codificante", "secuencia", "segmento", "fragmento" o "transgén" que "codifica" una proteína particular, es una molécula de ácido nucleico que es transcrita y opcionalmente también traducida hasta dar un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, la molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria (es decir, la cadena con sentido) o bicatenaria. Los límites de una región codificante son determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxi). Un gen puede incluir, pero sin limitaciones, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota y secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción habitualmente estará ubicada en 3' respecto de la secuencia de genes.

El término "célula" es usado en el presente documento en su sentido más amplio en la técnica y hace referencia a un cuerpo vivo que es una unidad estructural de tejido de un organismo multicelular, rodeado de una estructura de membrana que lo aísla del exterior, tiene la capacidad de auto-replicarse y tiene información genética y un mecanismo para expresarla. Las células usadas en el presente documento pueden ser células naturales o células artificialmente modificadas (por ejemplo, células de fusión, células genéticamente modificadas, etc.).

De la forma usada en el presente documento, la expresión "célula madre" hace referencia a una célula con capacidad de auto-replicarse y pluripotencia. Normalmente, las células madre pueden regenerar un tejido dañado. Las células madre del presente documento pueden ser, pero sin limitaciones, células madre embrionarias (ME) o células madre de tejido (también denominadas célula madre con especificidad de tejido, o célula madre somática). Cualquier célula artificialmente producida que pueda tener las capacidades arriba descritas (por ejemplo, células de fusión, células reprogramadas o similares usadas en el presente documento) puede ser una célula madre.

Las "células madre embrionarias (ME)" son células madre pluripotentes derivadas de embriones tempranos. En 1981 se estableció por primera vez una célula ME, que también ha sido aplicada a la producción de ratones con gentes desactivados desde 1989. En 1998, se estableció una célula ME humana, que está actualmente poniéndose a disposición para la medicina regenerativa.

A diferencia de las células ME, las células madre de tejido tienen un potencial de diferenciación limitado. Las células madre de tejido están presentes en localizaciones particulares en tejidos y tienen una estructura intracelular no diferenciada. Por lo tanto, la pluripotencia de las células madre de tejido es normalmente baja. Las células madre de tejido tienen una relación mayor núcleo/citoplasma y tienen pocas organelas intracelulares. La mayoría de las células madre de tejido tienen baja pluripotencia, un ciclo celular largo y una capacidad proliferativa más allá de la vida del individuo. Las células madre de tejido se dividen en categorías, basándose en los sitios de los que derivan las células, tales como el sistema dérmico, el sistema digestivo, el sistema de médula ósea, el sistema nervioso y similares. Las células madre de tejido en el sistema dérmico incluyen células madre epidérmicas, células madre de folículo piloso y similares. Las células madre de tejido en el sistema digestivo incluyen células madre pancreáticas (comunes), células madre hepáticas y similares. Las células madre de tejido en el sistema de médula ósea incluyen células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales y similares. Las células madre de tejido en el sistema nervioso incluyen células madre neuronales, células madre retinianas y similares.

Las "células madre pluripotentes inducidas", comúnmente abreviado como células MPi o CMPi, hacen referencia a un tipo de célula madre pluripotente preparada de forma artificial a partir de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta o una célula que se ha terminado de diferenciar, tal como un fibroblasto, una célula hematopoyética, un monocito, una neurona, una célula epidérmica o similar, introduciendo ciertos factores, denominados factores de reprogramación.

"Pluripotencia" hace referencia a una célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en todas las células que constituyen uno o más tejidos u órganos, o en particular, cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (recubrimiento interno del estómago, tubo gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). "Células madre pluripotentes" usado en el presente documento hace referencia a células que pueden diferenciarse en células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales, por ejemplo, descendientes directos de células totipotentes o células pluripotentes inducidas.

"Operativamente unidas" con referencia a moléculas de ácido nucleico significa que dos o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico a ser transcrita, un promotor y un elemento mejorador) están conectadas de manera tal que permiten la transcripción de la molécula de ácido nucleico. "Operativamente unidas" con referencia a moléculas de péptido y/o polipéptido significa que dos o más moléculas de péptido y/o polipéptido están conectadas de manera tal que proporcionan una única cadena de polipéptido, es decir, un polipéptido de fusión,

que tiene al menos una propiedad de cada componente de péptido y/o polipéptido de la fusión. El polipéptido de fusión es particularmente quimérico, es decir, está compuesto por moléculas heterólogas.

III. Reprogramación de células sanguíneas

Para proporcionar células MPi de fuentes alternativas además de fibroblastos dérmicos comúnmente usados en la técnica actual, pueden proporcionarse métodos para reprogramar una población de células que comprenda células de sangre periférica. Asimismo, es muy deseable reprogramar células sanguíneas que sean fácilmente accesibles y que estén menos expuestas a mutágenos ambientales. Por ejemplo, las células de sangre periférica que son recolectadas y almacenadas en bancos de sangre podrían usarse como fuente de líneas celulares de MPi autólogas o alogénicas, pero histocompatibles. De un modo más crucial, la capacidad de reprogramar células sanguíneas es esencial si se desea generar células MPi que contengan mutaciones somáticas que se limitan a las células sanguíneas y se encuentran solo en trastornos hematológicos adquiridos para investigar su patogenia. En ciertas realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas en la población de células de sangre periférica se expanden para proporcionar un número significativo de células de partida para la reprogramación. Por lo tanto, la reprogramación a partir de células sanguíneas humanas en la presente invención representa una forma novedosa de establecer células MPi a partir de células de donante que requieren un corto tiempo de manipulación en cultivo. La capacidad de reprogramar células a partir de sangre humana facilitará el desarrollo de un método confiable para generar células madre con especificidad de paciente.

A. Células progenitoras hematopoyéticas

Debido al potencial médico significativo de las células madre y progenitoras hematopoyéticas, se ha realizado una tarea sustancial para intentar mejorar los métodos para la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas a partir de células madre embrionarias. En el ser humano adulto, las células madre hematopoyéticas presentes principalmente en la médula ósea producen poblaciones heterogéneas de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+) de división activa que se diferencian en todas las células del sistema sanguíneo. Si bien se anticipa que las células endoteliales CD34+ pueden convertirse en células MPi, en ciertas realizaciones puede ser deseable usar células hematopoyéticas que no sean células endoteliales; por ejemplo, en algunos casos puede ser deseable usar células progenitoras hematopoyéticas o células precursoras hematopoyéticas que no expresen CD31 o VE-cadherina. Otros marcadores, tales como el marcador CD43 y/o CD45, también pueden usarse para ayudar a identificar células progenitoras hematopoyéticas (por ejemplo, Kadaja-Saarepuu y col., 2008; Vodyanik y col., 2006). Las células progenitoras hematopoyéticas incluyen varios subconjuntos de células hematopoyéticas primitivas que incluyen: células CD43(+)CD235a(+)CD41a(+/-) (eritro-megacariopoyéticas), lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(-) (multipotentes) y lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(+) (sesgo mieloide). En un ser humano adulto, los progenitores hematopoyéticos proliferan y se diferencian, lo que da como resultado la generación de cientos de miles de millones de células sanguíneas maduras por día. Las células progenitoras hematopoyéticas también están presentes en la sangre del cordón umbilical. *In nitro*, las células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse en células progenitoras hematopoyéticas. Las células progenitoras hematopoyéticas también pueden expandirse o enriquecerse a partir de una muestra de sangre periférica tal cual se describe más adelante. Las células hematopoyéticas pueden ser de origen humano, de origen murino o de cualquier otra especie de mamífero.

El aislamiento de células progenitoras hematopoyéticas incluye cualquier método de selección, inclusive clasificadores de células, separación magnética usando perlas magnéticas revestidas de anticuerpo, columnas de relleno; cromatografía por afinidad; agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usados junto con un anticuerpo monoclonal, inclusive, pero sin limitaciones, complementos y citotoxinas; y "selección" con un anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, una placa o cualquier otra técnica conveniente.

El uso de técnicas de separación o aislamiento incluye, pero sin limitaciones, aquellas basadas en diferencias en propiedades físicas (centrifugación de gradiente de densidad y elutriación centrífuga a contracorriente), de superficie celular (afinidad por lectina y anticuerpos) y de tinción vital (colorante de unión a mitocondria rho 123 y colorante de unión a ADN de Hoechst 33342). Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, pero sin limitaciones, FACS (clasificación de células activada por fluorescencia) o MACS (clasificación de células activada por magnetismo) que pueden tener varios niveles de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, canales de impedancia, etc.

Los anticuerpos usados en las técnicas anteriores o en las técnicas usadas para evaluar la pureza del tipo de célula (tales como citometría de flujo) pueden conjugarse con agentes identificables, inclusive, pero sin limitaciones, enzimas, perlas magnéticas, perlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radioactivos, fármacos o haptenos. Las enzimas que pueden conjugarse a los anticuerpos incluyen, pero sin limitaciones, fosfatasa alcalina, peroxidasa, ureasa y β -galactosidasa. Los fluorocromos que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen, pero sin limitaciones, isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina, ficoeritrina, aloficocianinas y Rojo de Texas. En cuanto a fluorocromos adicionales que pueden conjugarse con anticuerpos, véase Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (1992-1994). Los compuestos metálicos que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen, pero sin limitaciones, ferritina, oro coloidal y particularmente perlas superparamagnéticas coloidales. Los haptenos que pueden conjugarse con los

anticuerpos incluyen, pero sin limitaciones, biotina, digoxigenina, oxazalona y nitrofenol. Los compuestos radiactivos que pueden conjugarse con o incorporarse a los anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitaciones, tecnecio ^{99m} (^{99}TC), ^{125}I y aminoácidos que comprenden cualquier radionúclido, inclusive, pero sin limitaciones, ^{14}C , ^3H y ^{35}S .

5 Pueden emplearse otras técnicas para la selección positiva que permitan una separación precisa, tales como columnas de afinidad y similares. El método debería permitir la retirada de una cantidad residual de menos de alrededor de 20 %, preferentemente de menos de alrededor de 5 % de las poblaciones de células no diana.

10 Las células pueden seleccionarse basándose en propiedades de dispersión de la luz así como también su expresión de varios antígenos de superficie celular. Las células madre purificadas tienen perfiles de baja dispersión lateral y de baja a media dispersión directa por análisis FACS. Las preparaciones de Cytospin muestran que las células madre enriquecidas tienen un tamaño entre células linfoides maduras y granulocitos maduros.

15 Asimismo, es posible enriquecer la población de inoculación para células CD34+ antes del cultivo, usando, por ejemplo, el método de Sutherland y col. (1992) y el descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.714.680. Por ejemplo, las células se someten a selección negativa para retirar aquellas células que expresan marcadores de linaje específicos. En una realización ilustrativa, una población de células puede someterse a selección negativa para reducir la cantidad de células hematopoyéticas no CD34+ y/o subconjuntos de células hematopoyéticas particulares. Puede realizarse una selección negativa basándose en la expresión de superficie celular de una variedad de moléculas, incluso marcadores de linfocitos T tales como CD2, CD4 y CD8; marcadores de linfocitos B tales como CD 10, CD 19 y CD20; marcador de monocitos CD 14; el marcador de linfocito NK CD2, CD16 y CD56 o cualquier marcador de linaje específico. Puede realizarse una selección negativa basándose en la expresión de superficie celular de una variedad de moléculas, tales como un cóctel de anticuerpos (por ejemplo, CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 y CD235a) que pueden usarse para la separación de otros tipos celulares, por ejemplo, mediante MACS o separación en columna.

20 Tal como se usa en el presente documento, linaje-negativo (LIN-) hace referencia a células carentes de al menos un marcador asociado a células comprometidas con el linaje, por ejemplo, marcadores asociados con linfocitos T (tales como CD2, 3, 4 y 8), linfocitos B (tales como CD10, 19 y 20), células mieloides (tales como CD14, 15, 16 y 33), linfocitos citolíticos naturales ("NK") (tales como CD2, 16 y 56), RBC (tales como glicoforina A), megacariocitos (CD41), mastocitos, eosinófilos o basófilos u otros marcadores tales como CD38, CD71 y HLA-DR. Preferentemente, los marcadores de linaje específicos incluyen, pero sin limitaciones, al menos uno de CD2, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD33, CD38, HLA-DR y CD71. De mayor preferencia, LIN-incluirá al menos CD14 y CD15. Puede lograrse una purificación adicional con una selección positiva, por ejemplo, para c-kit+ o Thy-1+. Puede obtenerse un enriquecimiento adicional mediante el uso de colorante de unión mitocondrial rodamina 123 y selección de células rodamina+, mediante métodos conocidos en la técnica. Puede obtenerse una composición muy enriquecida mediante aislamiento selectivo de células que son CD34+, preferentemente CD34+ LIN-y de máxima preferencia, CD34+ Thy-1+ LIN. Las poblaciones muy enriquecidas en células madre y métodos para obtenerlas son conocidos por los expertos en la materia; véanse, por ejemplo, los métodos descritos en los documentos PCT/US94/09760; PCT/US94/08574 y PCT/US94/10501.

30 Pueden emplearse varias técnicas para separar las células retirando inicialmente las células de linaje especializado. Los anticuerpos monoclonales son de particular utilidad para identificar marcadores asociados con linajes de células particulares y/o etapas de diferenciación. Los anticuerpos pueden ser unidos a un soporte sólido para permitir una separación en crudo. Las técnicas de separación empleadas deberían maximizar la conservación de viabilidad de la fracción que va a ser recolectada. Pueden emplearse varias técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones "relativamente en crudo". Dichas separaciones se presentan cuando hasta 10 %, habitualmente no más de alrededor de 5 %, de preferencia no más de alrededor de 1 %, del total de las células presentes son células no deseadas que permanecen en la población de células a ser conservada. La técnica particular empleada dependerá de la eficacia de la separación, de la citotoxicidad asociada, de la facilidad y velocidad de rendimiento y de la necesidad de un equipo sofisticado y/o de la habilidad técnica.

35 La selección de las células progenitoras hematopoyéticas no necesita lograrse únicamente con un marcador específico para las células. Al usar una combinación de selección negativa y selección positiva pueden obtenerse poblaciones de células enriquecidas.

B. Fuentes de células sanguíneas

40 Las células madre hematopoyéticas (CMH) normalmente residen en la médula ósea pero pueden ser forzadas al interior de la sangre, un proceso denominado movilización usado clínicamente para recolectar grandes números de CMH en sangre periférica. Un agente de movilización de elección es el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF).

45 Las células madre hematopoyéticas CD34+ o progenitores que circulan en la sangre periférica pueden recolectarse mediante técnicas de aféresis, ya sea en estado no perturbado, o después de la movilización posterior a la

administración externa de factores de crecimiento hematopoyético tales como G-CSF. El número de las células progenitoras o madre recolectadas después de la movilización es mayor que el que se obtiene después de la aféresis en el estado no perturbado. En un aspecto particular de la presente invención, la fuente de la población de células es un sujeto cuyas células no han sido movilizadas mediante factores aplicados extrínsecamente porque no hay necesidad de enriquecer células madre hematopoyéticas o células progenitoras *in vivo*.

Las poblaciones de células para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden ser células de mamífero, tales como células humanas, células de primates no humanos, células de roedor (por ejemplo, ratón o rata), células bovinas, células ovinas, células porcinas, células equinas, células de oveja, células caninas y células felinas o una de sus mezclas. Las células de primate no humano incluyen células de macaco *rhesus*. Las células pueden obtenerse a partir de un animal, por ejemplo, un paciente humano, o pueden provenir de líneas celulares. Si las células se obtienen de un animal, estas pueden usarse como tales, por ejemplo, como células no separadas (es decir, una población mixta); pueden haber sido establecidas en cultivo primero, por ejemplo, por transformación; o pueden haber sido sometidas a métodos de purificación preliminar. Por ejemplo, una población de células puede manipularse por selección positiva o negativa basándose en expresión de marcadores de superficie celular, puede estimularse con uno o más antígenos *in vitro* o *in vivo*, puede tratarse con uno o más modificadores biológicos *in vitro* o *in vivo*, o una combinación de cualquiera de todos estos.

Las poblaciones de células incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), sangre completa o fracciones de esta que contienen poblaciones mixtas, células del bazo, células de la médula ósea, linfocitos infiltrantes de tumor, células obtenidas por leucaféresis, tejido de biopsia, ganglios linfáticos, por ejemplo ganglios linfáticos que drenan de un tumor. Los donantes adecuados incluyen donantes inmunizados, donantes no inmunizados (sin inmunidad), donantes tratados o no tratados. Un donante "tratado" es el que ha sido expuesto a uno o más modificadores biológicos. Un donante "no tratado" es el que no ha sido expuesto a uno o más modificadores biológicos.

Por ejemplo, pueden obtenerse células mononucleares de sangre periférica (CMSP) según lo descrito de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos métodos son analizados por Kim y col. (1992); Biswas y col. (1990); Biswas y col. (1991).

Asimismo, se conocen en la técnica métodos para obtener células precursoras hematopoyéticas a partir de poblaciones de células. Pueden expandirse células precursoras hematopoyéticas usando varias citocinas, tales como hSCF, hFLT3 y/o IL-3 (Akkina y col., 1996), o pueden enriquecerse células CD34+ usando MACS o FACS. Tal como se mencionó con anterioridad, también pueden usarse técnicas de selección negativa para enriquecer células CD34+.

También es posible obtener una muestra celular de un individuo, y luego, enriquecerla para un tipo celular deseado. Por ejemplo, pueden aislarse CMSP y/o células hematopoyéticas CD34+ de la sangre tal como se describe en el presente documento. También pueden aislarse células de otras células usando una variedad de técnicas, tales como aislamiento y/o activación con un anticuerpo uniéndolo a un epítipo sobre la superficie celular del tipo celular deseado. Otro método que puede usarse incluye una selección negativa usando anticuerpos para marcadores de superficie celular para enriquecer selectivamente en cuanto a un tipo celular específico sin activar la célula por enganche con receptores.

Pueden obtenerse células de médula ósea a partir de la cresta ilíaca, fémur, tibia, columna vertebral, costillas u otros espacios medulares. La médula ósea puede ser extraída del paciente y aislada mediante varias separaciones y procedimientos de lavado. Un procedimiento a modo de ejemplo para aislar células de médula ósea comprende las siguientes etapas: a) separar por centrifugación una suspensión de médula ósea en tres fracciones y recolectar la fracción intermedia, o capa leucocítica; b) centrifugar la fracción de la capa leucocítica de la etapa (a) una o más veces en un fluido de separación, comúnmente Ficoll (una marca comercial de Pharmacia Fine Chemicals AB), y recolectar una fracción intermedia que contiene las células de médula ósea; y c) lavar la fracción recolectada de la etapa (B) para recuperar las células de médula ósea re-trasfundibles.

IV. Condiciones de cultivo

La investigación de las células madre pluripotentes humanas es uno de los campos más dinámicos de la biología moderna. Principalmente, se han derivado y cultivado células MPi humanas, al igual que células ME humanas, bajo una capa alimentaria de fibroblastos embrionarios de ratón (FER). Por ejemplo, el potencial terapéutico de las células madre pluripotentes humanas se basa en el trasplante de tipos celulares diferenciados para trastornos tales como la enfermedad de Parkinson y la diabetes que surgen de la pérdida, o no función, de un solo tipo de células. Sin embargo, estas aplicaciones clínicas están actualmente limitadas por la xeno-contaminación durante las fases de derivación y propagación *in vitro*. Las células alimentarias de ratón o el medio acondicionado, tal como se usa tradicionalmente, conllevan el riesgo de introducir patógenos no humanos que descartarían el trasplante en el futuro. Así, cerrar la brecha entre los modelos de investigación y las aplicaciones clínicas requiere el diseño y la implementación de procesos exentos de sustancias xenógenas. La condición de cultivo exento de sustancias xenógenas (ESX, o exento de componentes de origen animal, EOA; o exento de componentes animales), tal como los medios exentos de sustancias xenógenas y la matriz extracelular exenta de sustancias xenógenas, son, por lo tanto, un elemento esencial en el desarrollo de tratamientos regenerativos de células madre, en los que se desea la implantación en el ser humano.

Además, la eficacia de la reprogramación puede verse afectada por la variabilidad de las células alimentarias de FER usadas o de cualquier producto derivado de animales.

Para mejorar la eficacia de la reprogramación global a partir de células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica y reducir la variabilidad, pueden proporcionarse varios medios, matrices o condiciones de cultivo exentos de células alimentarias o definidos para la expansión de células progenitoras hematopoyéticas así como también la reprogramación de dichas células.

A. Condición de expansión de células progenitoras hematopoyéticas

El método de expansión de la invención puede comprender la inoculación de la población de células sustancialmente enriquecidas en células progenitoras hematopoyéticas y sustancialmente exentas de células estromales en un recipiente de expansión y en un volumen de un medio adecuado de manera que la densidad de las células sea de al menos alrededor de 5.000, preferentemente de 7.000 a alrededor de 200.000 células/ml de medio, y más preferentemente de alrededor de 10.000 a alrededor de 150.000 células/ml de medio, y en una concentración de oxígeno inicial de alrededor de 1 a 20 % y preferentemente de menos de 8 %. En una realización, la concentración de oxígeno inicial está en un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 % o cualquier intervalo derivable de estos.

En un aspecto, la población de células de inoculación deriva de la médula ósea de adulto y es de alrededor de 7.000 células/ml a alrededor de 20.000 células/ml y preferentemente de alrededor de 20.000 células/ml. En un aspecto diferente, la población de células de inoculación deriva de sangre periférica movilizada y es de alrededor de 20.000 células/ml a alrededor de 50.000 células/ml, preferentemente de alrededor de 50.000 células/ml. En otro aspecto, la población de células de inoculación deriva de sangre periférica no movilizada y es de alrededor de 7.000 células/ml a alrededor de 50.000 células/ml y preferentemente de alrededor de 20.000 células/ml.

Puede usarse cualquier recipiente de expansión adecuado, matraz o tubo apropiado, tal como una placa de 24 pocillos, matraz en T de 12,5 cm² o bolsa permeable a gas en el método de la presente invención. Dichos recipientes de cultivo son comercializados por Falcon, Corning o Costar. Tal como se usa en el presente documento, "recipiente de expansión" también pretende incluir cualquier cámara o recipiente para expandir células ya sea o no independiente o incorporado a un aparato de expansión, tal como los biorreactores descritos en el presente documento. En una realización, el recipiente de expansión es un espacio de volumen reducido de la cámara que se forma mediante una superficie deprimida y un plano en el que se orienta una superficie de soporte de células restante.

Pueden usarse varios medios para la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas. Los medios ilustrativos incluyen MEM de Dulbecco, IMDM y RPMI-1640 que pueden suplementarse con una variedad de diferentes nutrientes, factores de crecimiento, citocinas, etc. Los medios también pueden estar exentos de suero o estar suplementados con cantidades suficientes de suero. De preferencia, por su uso en tratamientos en seres humanos, el medio está exento de suero o está suplementado con suero autólogo. Un medio adecuado es uno que contiene IMDM, cantidades eficaces de al menos uno de peptona, un inhibidor de proteasa y un extracto de hipófisis y cantidades eficaces de al menos uno de albúmina sérica humana o fracción de proteína plasmática, heparina, un agente reductor, insulina, transferrina y etanolamina. Otras formulaciones de medios adecuados son conocidas por los expertos en la materia, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.728.581.

Independientemente del medio específico usado en cualquier expansión de célula progenitora hematopoyética dada, el medio usado es preferentemente suplementado con al menos una citocina en una concentración de alrededor de 0,1 ng/ml a alrededor de 500 ng/ml, más habitualmente de 10 ng/ml a 100 ng/ml. Las citocinas adecuadas incluyen, pero sin limitaciones, ligando de c-kit (LK) (también denominado factor de acero (StI), factor de crecimiento de mastocitos (MGF) y factor de células madre (SCF), IL-6, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-1 α , IL-11 MIP-1 α , LIF, ligando c-mph/TPO y ligando de flk2/flk3 (Flt2L o Flt3L). (Nicola y col., 1979; Golde y col., 1980, Lusi, 1981; Abboud y col., 1981; Okabe, 1982; Fauser y col., 1981). Particularmente, el cultivo incluirá al menos uno de SCF, Flt3L y TPO. Más particularmente, el cultivo incluirá SCF, Flt3L y TPO.

En una realización, las citocinas están contenidas en el medio y son rellenadas por perfusión de medio. Como alternativa, al usar un sistema de biorreactor, las citocinas pueden agregarse por separado, sin perfusión de medio, como una solución concentrada a través de orificios de entrada separados. Cuando se agregan citocinas sin perfusión, son agregadas normalmente como una solución de 10x a 100x en una cantidad igual a de un décimo a 1/100 del volumen en los biorreactores con citocinas frescas agregadas aproximadamente entre cada 2 y 4 días. Además, las citocinas concentradas frescas también pueden ser agregadas por separado además de las citocinas en el medio perfundido.

Luego se pueden cultivar las células en condiciones adecuadas, de manera que las células acondicionan el medio. Puede lograrse una expansión mejorada de células progenitoras hematopoyéticas purificadas cuando no se cambia el medio de cultivo, por ejemplo, la perfusión no se inicia hasta después de los primeros días de cultivo.

En ciertos aspectos, las condiciones adecuadas comprenden el cultivo de 33 a 39 y preferentemente de alrededor de 37 °C (la concentración inicial de oxígeno es, de preferencia, de 4-8 % y de máxima preferencia de alrededor de %)

durante al menos 6 días y preferentemente de alrededor de 7 a alrededor de 10 días, para permitir la liberación de factores autocrinos de la células sin liberación de suficientes productos de desecho para inhibir sustancialmente la expansión de células progenitoras hematopoyéticas. Transcurrido ese tiempo, puede aumentarse la concentración de oxígeno a alrededor de 20 % ya sea en forma escalonada o gradual durante el resto del periodo de cultivo, lo que puede ser durante un total de 10-28 días. Pueden cultivarse células madre de médula ósea, células de sangre periférica movilizada o células de sangre periférica no movilizada durante alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 días o cualquier intervalo derivable de estos.

Después del periodo de cultivo inicial sin cambiar el medio, el medio de cultivo puede cambiarse a una velocidad que permita la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas. En un sistema en el que no se usa ningún volumen variable, el medio puede cambiarse el día 7 (para células madre de sangre periférica movilizada) o el día (para células de médula ósea). El cambio de medio fresco en un sistema perfundido puede ser, por ejemplo, laminar. Este flujo uniforme, no turbulento, evita la formación de "espacios muertos" en los que regiones de células no quedan expuestas al medio. El medio puede ser cambiado a una velocidad de alrededor de 0,10/día a 0,50/día o 1/a $1/2$ volumen de cambio por día. Por ejemplo, la velocidad de perfusión puede ser de alrededor de 0,25/día a 0,40/día. De máxima preferencia, para las células madre de médula ósea, la perfusión puede realizarse a una velocidad de 0,27/día comenzando alrededor del día 14, y para células de sangre periférica movilizada y no movilizada, la perfusión comienza a 0,25/día alrededor del día 10 y aumenta a 0,40/día alrededor del día 12.

Particularmente, la concentración de células puede mantenerse en un óptimo a lo largo de la expansión. Por ejemplo, las células progenitoras pueden expandirse hasta ~1500 veces comparado con una población de células mononucleares (CMN) que se expande solo ~10-20 veces. Las células progenitoras tienen una gran capacidad proliferativa, como tal, cuando el cultivo se lleva a cabo en un sistema cerrado, un sistema como ese debe proporcionar un volumen suficiente para una expansión total de células. Sin embargo, las células progenitoras también pueden tener una densidad de inoculación relativamente alta. Pueden lograrse condiciones óptimas de proliferación y densidad de inoculación cultivando las células en un biorreactor como el descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.728.581. Las células pueden sembrarse con una densidad de células apropiada en una depresión y se agregan medios adicionales cuando se logra una densidad de células apropiada. La forma del dispositivo puede permitir que el volumen del medio aumente hasta tres veces sin reducir significativamente la eficacia de transferencia de oxígeno a las células.

B. Condiciones de cultivo durante y después de la reprogramación

La célula de partida (es decir, la célula progenitora hematopoyética expandida que va a ser reprogramada) y la célula reprogramada final tienen, en general, diferentes requisitos de condiciones y medio de cultivo. Para permitir esto al tiempo que también se permite que se produzca la reprogramación de la célula, puede ser necesaria una o más condiciones de cultivo transitorias. Para iniciar el proceso de reprogramación pueden transfectarse las células progenitoras hematopoyéticas expandidas al menos, alrededor de o hasta 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días posteriores a la siembra, más particularmente 3, 4, 5 o 6 días posteriores a la siembra y, en una realización a modo de ejemplo, 6 días posteriores a la siembra. En una realización alternativa, la etapa de expansión puede no siempre ser necesaria. Por ejemplo, si se obtienen suficientes células progenitoras hematopoyéticas directamente de la purificación de sangre periférica no movilizada, puede iniciarse una reprogramación sin una etapa de expansión. Sin embargo, cuando se trata con un pequeño volumen de sangre periférica, por ejemplo, de hasta 10 ml en volumen, puede usarse una etapa de expansión para aumentar los números de células progenitoras hematopoyéticas y, así, aumentar la eficacia de la reprogramación.

Inmediatamente después de la transfección y como un medio para estabilizar las células después de la transfección, pueden cultivarse las células en un medio de expansión de células progenitoras hematopoyéticas tal como se describió con anterioridad, o un medio que comprenda una o más citocinas e inhibidores de señalización que favorecen el cultivo de las células reprogramadas, o una combinación de los dos tipos de condiciones (iguales o de otra manera), todo esto estaría exento de sustancias xenógenas. Independientemente del medio usado, la condición puede estar esencialmente exenta de cualquier componente de matriz o puede comprender una matriz, que de preferencia sería una proteína de matriz exenta de sustancias xenógenas tal como un fragmento de fibronectina. Dicha condición de cultivo puede ser durante un periodo de al menos, alrededor de, o de hasta las primeras 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 horas o cualquier intervalo derivable de estos posteriores a la transfección. Luego, las células podrían pasarse a una matriz, de no estar ya en una, y cultivarse en un medio de expansión de células progenitoras hematopoyéticas según se describió con anterioridad o un medio que favorezca la reprogramación de células o una combinación de los dos tipos de condiciones (iguales o de otra manera), todo esto estaría exento de sustancias xenógenas, Independientemente del medio usado, las células podrían hacer una transición gradual durante uno o dos días con cada renovación de medio al 100 por ciento de medio de reprogramación y dicha condición de reprogramación puede continuar durante un periodo de al menos, alrededor de o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días posteriores a la incubación de estabilización de transfección.

Después de introducir los factores de reprogramación en células usando los métodos desvelados y cultivar tal como se describió con anterioridad, las células resultantes pueden transferirse a un medio suficiente para mantener la pluripotencia de las células, tal como TeSR2. Dicha condición puede obtenerse gradualmente, de preferencia, durante la última mitad de la condición de reprogramación agregando TeSR2 (o medio de cultivo pluripotente similar) al medio

de reprogramación sin retirar el medio, seguido de un reemplazo completo para que las células sean cultivadas en 100 % de medio de cultivo de células pluripotentes. El cultivo de las células en medio de cultivo de células pluripotentes, incluyendo el periodo transitorio gradual, puede continuar durante un periodo de al menos, alrededor de o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días posteriores al 100 % de condición de reprogramación. Esta condición de cultivo de células pluripotentes puede comprender una matriz extracelular porque las células madre pluripotentes son células adherentes.

Tradicionalmente, se ha usado medio que contiene suero en células alimentarias de FER. La presente invención obvia la necesidad de suero o células alimentarias de FER, y proporciona una condición y un proceso definidos para reprogramar células.

El cultivo de células madre pluripotentes inducidas (MPi) generadas en la presente invención puede usar varios medios y técnicas desarrollados para cultivar células madre pluripotentes de primate, más especialmente, células madre embrionarias, tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20070238170 y en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030211603. Se aprecia que pueden usarse en la presente invención métodos adicionales para el cultivo y el mantenimiento de células madre pluripotentes humanas, tal como lo conocen los expertos en la materia.

Por ejemplo, pueden cultivarse células pluripotentes y mantenerse en un estado esencialmente no diferenciado usando un sistema de cultivo definido, independiente de células alimentarias, tal como un medio de TeSR (Ludwig y col., 2006; Ludwig y col., 2006). Se usan sistemas de cultivo independientes de células alimentarias y medios para cultivar células reprogramadas. Estos enfoques permiten que las células reprogramadas se desarrollen en un estado esencialmente no diferenciado sin necesidad de "capas de células alimentarias" de fibroblasto de ratón. Tal como se describe en el presente documento, pueden hacerse varias modificaciones a estos métodos con el fin de reducir costes, según se desee.

El medio de acuerdo con ciertos aspectos de la presente invención puede prepararse usando un medio usado para cultivar células animales como su medio basal, tal como cualquiera de TeSR, BME, BGJb, CMRL 1066, Glasgow MEM, MEM Zinc Option mejorado, IMDM, Medio 199, Eagle MEM, α MEM, DMEM, Ham, RPMI 1640 y medio de Fischer, así como cualquiera de sus combinaciones, pero el medio no se limita particularmente a estos siempre que pueda usarse para cultivar células animales. Particularmente, el medio puede estar químicamente definido.

El medio de acuerdo con la presente invención puede ser un medio que contenga suero o que esté exento de suero. El medio exento de suero hace referencia a medios sin suero no procesado o no purificado, y por consiguiente, puede incluir medios con componentes derivados de sangre purificada (tales como factores de crecimiento). A partir del aspecto de la prevención de la contaminación con componentes derivados de animales heterogéneos, el suero puede derivar del mismo animal que la o las células madre.

El medio de acuerdo con la presente invención puede contener o puede no contener alguna alternativa al suero. Las alternativas al suero pueden incluir materiales que contienen, de forma apropiada, albúmina (tal como albúmina rica en lípidos, sustitutos de albúmina tales como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteína), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, 3'-tiolglicerol o sus equivalentes. Las alternativas al suero pueden prepararse mediante el método desvelado en la publicación internacional n.º 98/30679, por ejemplo. Como alternativa, puede usarse cualquier material disponible en el mercado para mayor conveniencia. Los materiales disponibles en el mercado incluyen sustituto de suero Knockout (SSK), lípido químicamente definido concentrado (Gibco) y Glutamax (Gibco).

El medio de la presente invención también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), vitamina(s), factores de crecimiento, citocinas, sustancias antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes tamponantes y sales inorgánicas. La concentración de 2-mercaptoetanol puede ser, por ejemplo, de alrededor de 0,05 a 1,0 mM, y particularmente de alrededor de 0,1 a 0,5 mM, pero la concentración no se limita particularmente a esto siempre que sea apropiada para cultivar célula(s) madre.

Un recipiente de cultivo usado para cultivar la o las células puede incluir, pero particularmente sin limitaciones: un matraz, un matraz para cultivo de tejidos, plato, placa de Petri, placa para cultivo de tejidos, multi-plato, micro-plato, microplaca de pocillos, multi-placa, placa de múltiples pocillos, micro-portaobjetos, portaobjetos de cámara, tubo, bandeja, cámaras CellSTACK®, bolsa para cultivo y frasco rotativo, siempre que se puedan cultivar las células madre en su interior. Las células pueden cultivarse en un volumen de al menos o alrededor de 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 1500 ml, o cualquier intervalo derivable de estos, según las necesidades del cultivo. En cierta realización, el recipiente de cultivo puede ser un biorreactor, que puede referirse a cualquier dispositivo o sistema que soporte un entorno biológicamente activo. El biorreactor puede tener un volumen de al menos o alrededor de 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 litros, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 metros cúbicos o cualquier intervalo derivable de estos.

El recipiente de cultivo puede ser adhesivo o no adhesivo celular y puede seleccionarse según el fin. El recipiente de cultivo adhesivo celular puede revestirse con cualquiera de los sustratos para la adhesión celular tal como una matriz

extracelular (MEC) para mejorar la capacidad de adhesión de la superficie del recipiente a las células. El sustrato para la adhesión celular puede ser cualquier material destinado a fijar células. El sustrato para la adhesión celular incluye colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, laminina y fibronectina, sus fragmentos o mezclas.

Pueden definirse apropiadamente otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de alrededor de 30 a 40 °C, por ejemplo, de al menos o de alrededor de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 °C pero en particular, sin limitaciones a estas. La concentración de CO₂ puede ser de alrededor de 1 a 10 %, por ejemplo, de alrededor de 2 a 5 %, o cualquier intervalo derivable de estos. La tensión de oxígeno puede ser de al menos, de hasta, o de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 % o de cualquier intervalo derivable de estos.

Los métodos de la presente invención también pueden usarse para un cultivo en suspensión de células tales como células reprogramadas o células madre, inclusive un cultivo en suspensión sobre vehículos (Fernandes y col., 2004) o encapsulamiento de gel/biopolímero (Publicación de Estados Unidos 2007/0116680). La expresión cultivo en suspensión de células significa que las células son cultivadas en una condición no adherente respecto del recipiente de cultivo o células alimentarias (de usarlas) en un medio. El cultivo en suspensión de células incluye un cultivo de disociación de células y un cultivo en suspensión de agregado de células. La expresión cultivo de disociación de células significa que se cultivan células madre suspendidas y el cultivo de disociación de células madre incluye aquellos de una sola célula o de pequeños agregados de células compuestos por una pluralidad de células (por ejemplo, de alrededor de 2 a 400 células). Cuando se continúa con el cultivo de disociación arriba mencionado, las células madre disociadas cultivadas podrían formar un agregado mayor de células, y a partir de ahí, puede realizarse un cultivo en suspensión de agregado. El cultivo en suspensión de agregado incluye un método de cultivo embrioide (véase Keller y col., 1995) y un método SFEB (Watanabe y col., 2005; Publicación Internacional n.º 2005/123902).

C. Componentes de la matriz

Pueden usarse varios componentes de matriz definidos en la reprogramación de células de sangre periférica para que sirvan de sustrato para un cultivo celular adherente. Por ejemplo, puede usarse colágeno IV recombinante, fibronectina, laminina y vitronectina en combinación para revestir una superficie de cultivo como un medio para proporcionar un soporte sólido para el desarrollo de células pluripotentes, según se describe en Ludwig y col. (2006a; 2006b).

Puede inmovilizarse una composición de matriz sobre una superficie para proporcionar soporte a las células. La composición de la matriz puede incluir una o más proteínas de matriz extracelular (MEC) y un disolvente acuoso. La expresión "matriz extracelular" es reconocida en la técnica. Sus componentes incluyen una o más de las siguientes proteínas: fibronectina, laminina, vitronectina, tenascina, entactina, trombospondina, elastina, gelatina, colágeno, fibrilina, merosina, ancorina, condronectina, proteína de enlace, sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, epinectina, hialuronectina, undulina, epiligrina y calina. Otras proteínas de matriz extracelular se describen en Kleinman y col. (1993). Se pretende que la expresión "matriz extracelular" abarque una matriz extracelular actualmente desconocida que pueda ser descubierta en el futuro, dado que su caracterización como matriz extracelular será fácilmente determinable por expertos en la materia.

En algunos aspectos, la concentración total de proteína en la composición de la matriz puede ser de alrededor de 1 ng/ml a alrededor de 1 mg/ml. En algunas realizaciones de preferencia, la concentración total de proteína en la composición de la matriz es de alrededor de 1 µg/ml a alrededor de 300 µg/ml. En realizaciones de mayor preferencia, la concentración total de proteína en la composición de la matriz es de alrededor de 5 µg/ml a alrededor de 200 µg/ml.

Las proteínas de la matriz extracelular (MEC) pueden ser de origen natural y purificarse de tejidos humanos. Como alternativa, las proteínas de MEC pueden ser proteínas recombinantes modificadas por ingeniería genética o sintéticas por naturaleza. Las proteínas de MEC pueden ser una proteína completa o pueden tener forma de fragmentos de péptido, naturales o modificados. Ejemplos de proteína de MEC que pueden ser útiles en la matriz para el cultivo celular incluyen laminina, colágeno I, colágeno IV, fibronectina y vitronectina. En algunas realizaciones, la composición de la matriz incluye fragmentos de péptido sintéticamente generados de fibronectina o de fibronectina recombinante.

En aun otras realizaciones, la composición de la matriz incluye una mezcla de al menos fibronectina y vitronectina.

En algunas otras realizaciones, la composición de la matriz incluye, de preferencia, laminina.

La composición de la matriz incluye, de preferencia, un único tipo de proteína de matriz extracelular. En algunas realizaciones de preferencia, la composición de la matriz incluye fibronectina, particularmente para su uso con cultivo de células reprogramadas o de células progenitoras hematopoyéticas. Por ejemplo, puede prepararse una composición de matriz adecuada diluyendo fibronectina humana, tal como la fibronectina humana comercializada por Becton, Dickinson & Co. de Franklin Lakes, N.J. (BD) (Cat. n.º 354008), en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (SSTFD) en una concentración de proteína de 5 µg/ml a alrededor de 200 µg/ml. En un ejemplo particular, la composición de la matriz incluye un fragmento de fibronectina, tal como RetroNectin®. RetroNectin® es una proteína de ~63 kDa de (574 aminoácidos) que contiene un dominio de unión celular central (repetición de tipo III, 8, 9, 10), un dominio II de unión a heparina de alta afinidad (repetición de tipo III, 12, 13, 14) y sitio CS1 dentro de la región IIIICS

alternativamente cortada y empalmada de fibronectina humana.

En algunas otras realizaciones, la composición de la matriz incluye, de preferencia, laminina. Por ejemplo, puede prepararse una composición de matriz adecuada diluyendo laminina (Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.); Cat. n.º L6274 y L2020) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (SSTFD) en una concentración de proteína de 5 µg/ml a alrededor de 200 µg/ml.

La composición de la matriz está exenta de sustancias xenógenas, en el sentido de que la matriz, o sus proteínas componentes, son solo de origen humano. Esto puede desearse para ciertas aplicaciones de investigación. Por ejemplo, en la matriz exenta de sustancias xenógenas para cultivar células humanas, pueden usarse componentes de la matriz de origen humano, en donde se excluye cualquier componente animal no humano.

D. Inhibidores de señalización para la reprogramación

En ciertos aspectos de la invención, durante al menos parte del proceso de reprogramación, la célula puede mantenerse en presencia o ausencia de uno o más inhibidores de la señalización que inhiben un transductor de señales involucrado en una cascada de señalización, por ejemplo, en presencia de un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de receptor de TGF-β y/o un inhibidor de miosina II ATPasa, o un inhibidor de otros transductores de señales dentro de estas mismas vías. En ciertos aspectos pueden usarse inhibidores de ROCK, tales como HA-100 o H1152, para facilitar la expansión clonal de células reprogramadas y células MPi resultantes. También puede usarse una alta concentración de FGF, en combinación con un medio de reprogramación específico tal como un medio de cultivo de célula ME humana acondicionado o un medio N2B27 exento de suero, para aumentar la eficacia de la reprogramación. En aspectos de preferencia, el medio está definido.

En ciertas realizaciones, además de introducir las células con factores de reprogramación (por ejemplo, dos, tres o más, según lo descrito en el presente documento) por elementos genéticos episómicos exógenos, las células son tratadas con un medio de reprogramación que comprende: un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptor de TGF-β, un inhibidor de GSK3, un inhibidor de miosina II ATPasa y/o LIF, con las ventajas de mejorar la eficacia y la cinética de reprogramación y de facilitar la identificación de células MPi en el cultivo de reprogramación primario, lo que conserva así la capacidad de clonación de las células MPi.

Se comprenderá que en estos aspectos y realizaciones pueden sustituirse otros inhibidores de señalización que inhiben un componente de señalización de la misma vía de señalización (por ejemplo, la cascada de ERK1 o ERK2) cuando se desee para el inhibidor de MEK. Esto puede incluir la inhibición de un estímulo corriente arriba de la vía de MAPK, en particular, mediante el receptor de FGF (Ying, 2008). De la misma manera, puede sustituirse el inhibidor de GSK3 cuando se desee por otros inhibidores de vías de señalización relacionadas con GSK3, tales como la síntesis de insulina y la señalización de Wnt/β-catenina; puede sustituirse el LIF cuando se desee por otros activadores de señalización Stat3 o qp130.

Puede usarse un inhibidor de señalización como este, por ejemplo un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3, un inhibidor de receptor de TGF-β, en una concentración eficaz de al menos o de alrededor de 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 500 a alrededor de 1000 µM o cualquier intervalo derivable de estos.

Los expertos en la materia pueden proporcionar u obtener inhibidores por medios convencionales o de fuentes convencionales (véase también el documento WO2007113505).

1. Inhibidor de glicógeno sintasa cinasa 3

La glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) es una serina/treonina proteína cinasa que media en la adición de moléculas de fosfato en ciertos aminoácidos de serina y treonina en sustratos celulares particulares. La fosforilación de estas otras proteínas con GSK-3 habitualmente inhibe la proteína diana (también denominada el "sustrato"). Tal como se mencionó, GSK-3 es conocida por fosforilar y así inactivar la glicógeno sintasa. También se ha implicado en el control de la respuesta celular a ADN dañado y señalización Wnt. GSK-3 también fosforila Ci en la vía Hedgehog (Hh), dirigiéndola para la proteólisis a una forma inactiva. Además de la glicógeno sintasa, GSK-3 tiene muchos otros sustratos. Sin embargo, GSK-3 es poco habitual entre las cinasas porque generalmente requiere una "cinasa cebadora" para fosforilar primero un sustrato.

La consecuencia de la fosforilación de GSK-3 es, habitualmente, la inhibición del sustrato. Por ejemplo, cuando GSK-3 fosforila otro de sus sustratos, la familia NFAT de factores de transcripción, estos factores de transcripción no pueden trasladarse al núcleo y por lo tanto, son inhibidos. Además de su importante función en la vía de señalización de Wnt, que se requiere para establecer el diseño de tejidos durante el desarrollo, GSK-3 también es fundamental para la síntesis de proteínas que se inducen en situaciones tales como hipertrofia de músculos esqueléticos. Sus funciones como una NFAT cinasa también lo ubica como un regulador clave tanto de la diferenciación como de la proliferación celular.

La inhibición de GSK3 puede hacer referencia a la inhibición de una o más enzimas de GSK3. La familia de enzimas de GSK3 es bien conocida y se ha descrito un número de variantes (véase, por ejemplo, Schaffer y col., 2003). En realizaciones específicas se inhibe GSK3- β . Los inhibidores de GSK3- α también son adecuados, y en ciertos aspectos, los inhibidores para su uso en la invención inhiben tanto GSK3- α como GSK3- β .

Los inhibidores de GSK3 pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de, y ARNsi y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a GSK3. Ejemplos de inhibidores de GSK3 se describen en Bennett y col. (2002) y en Ring y col. (2003).

Ejemplos específicos de inhibidores de GSK3 incluyen, pero sin limitaciones, kenpaulona, 1-azakenpaulona, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418 (véase, por ejemplo, Gould y col., 2004), CT99021 (véase, por ejemplo, Wagman, 2004), CT 20026 (véase Wagman, anteriormente), SB415286, SB216763 (véase, por ejemplo, Martin y col., 2005), AR-A014418 (véase, por ejemplo, Noble y col., 2005), litio (véase, por ejemplo, Gould y col., 2003), SB 415286 (véase, por ejemplo, Frame y col., 2001) y TDZD-8 (véase, por ejemplo, Chin y col., 2005). Otros inhibidores de GSK3 de ejemplo comercializados por Calbiochem (véase, por ejemplo, Dalton y col., documento WO2008/094597), incluyen, pero sin limitaciones, BIO (2'Z,3'E)-6-bromomdirubm-3'-oxima (Inhibidor IX de GSK3); BIO-Acetoxima (2'Z,3'E)-6-bromindirubin-3'-acetoxima (Inhibidor X de GSK3); (5-metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina (Inhibidor XIII de GSK3); complejo de piridocarbazol-ciclopentadienilrutenio (Inhibidor XV de GSK3); TDZD-8 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (Inhibidor I de GSKbeta); 2-tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol (Inhibidor II de GSKbeta); OTDZT 2,4-dibencil-5-oxotiadiazolidin-3-tiona (Inhibidor III de GSKbeta); alfa-4-dibromoacetofenona (Inhibidor VII de GSKbeta); AR-AO 14418 N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea (Inhibidor VIII de GSK3-beta); 3-(1-(3-hidroxipropil)-1H-pirrol-2-il)-4-piridin-3-il]-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona (Inhibidor XI de GSK3-beta); compuesto de TWS1 19 pirrolopirimidina (Inhibidor XII de GSK3-beta); L803 H-KEAPP APPQSP-NH2 o su forma miristoilada (Inhibidor XIII de GSK3-beta); 2-cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-il)-etanona (Inhibidor VI de GSK3-beta); AR-AO144-18; SB216763; y SB415286.

Los inhibidores de GSK3 pueden activar, por ejemplo, la vía de Wnt/ β -catenina. Muchos de los genes corriente abajo de β -catenina co-regulan las redes de genes de pluripotencia. Por ejemplo, un inhibidor de GSK activa la expresión de cMyc y también mejora la estabilidad de sus proteínas y su actividad transcripcional. Así, en algunas realizaciones, los inhibidores de GSK3 pueden usarse para estimular una expresión de polipéptido Myc endógena en una célula, lo que elimina la necesidad de una expresión de Myc para inducir la pluripotencia.

Además, se ha caracterizado la estructura del sitio activo del GSK3- β y se han identificado los restos clave que interactúan con inhibidores específicos y no específicos (Bertrand y col., 2003). Esta caracterización estructural permite que los inhibidores de GSK adicionales sean fácilmente identificados.

Los inhibidores usados en el presente documento son preferentemente específicos para la cinasa a los que van dirigidos. Los inhibidores de ciertas realizaciones son específicos para GSK3- β y GSK3- α , sustancialmente no inhiben erk2 y sustancialmente no inhiben cdc2. De preferencia, los inhibidores tienen una selectividad de al menos 100 veces, más preferentemente al menos 200 veces, muy preferentemente al menos 400 veces para GSK3 humana respecto a erk2 de ratón y/o cdc2 humano, medido como una relación de valores de CI50; aquí, la mención de los valores de CI50 de GSK3 hace referencia a los valores medios para GSK3- β y GSK3- α humanas. Se han obtenido buenos resultados con CHIR99021 que es específico para GSK3. Las concentraciones adecuadas para el uso de CHIR99021 están en el intervalo de 0,01 a 100, preferentemente de 0,1 a 20, más preferentemente de 0,3 a micromolar.

2. Inhibidor de MEK

Los inhibidores de MEK, que incluyen inhibidores de proteína cinasa activada por mitógeno cinasa (MAPK/ERK cinasa o MEK) o sus vías de señalización relacionadas tales como cascada de MAPK, pueden usarse en ciertos aspectos de la invención. La proteína cinasa activada por mitógeno cinasa (sic) es una enzima cinasa que fosforila la proteína cinasa activada por mitógeno. También es conocida como MAP2K. Los estímulos extracelulares conducen a la activación de una MAP cinasa a través de una cascada de señalización ("cascada de MAPK") compuesta por MAP cinasa, MAP cinasa cinasa (MEK, MKK, MEKK o MAP2K), y MAP cinasa cinasa cinasa (MKKK o MAP3K).

En el presente documento, un inhibidor de MEK hace referencia a inhibidores de MEK en general. Así, un inhibidor de MEK hace referencia a cualquier inhibidor de un miembro de la familia MEK de proteína cinasas, inclusive MEK1, MEK2 y MEK5. Además, se hace referencia a los inhibidores de MEK1, MEK2 y MEK5. Ejemplos de inhibidores de MEK adecuados, ya conocidos en la técnica, incluyen los inhibidores de MEK1 PD184352 y PD98059, inhibidores de MEK1 y MEK2 U0126 y SL327, y aquellos analizados por Davies y col. (2000).

En particular, se ha descubierto que PD184352 y PD0325901 tienen un alto nivel de especificidad y potencia al compararlos con otros inhibidores de MEK conocidos (Bain y col., 2007). Otros inhibidores de MEK y clases de inhibidores de MEK se describen en Zhan y col. (2000).

Los inhibidores de MEK pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de, y ARNsi y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de MEK. Ejemplos específicos de inhibidores de MEK incluyen, pero

sin limitaciones, PD0325901 (véase, por ejemplo, Rinehart y col., 2004), PD98059 (comercializado, por ejemplo, por Cell Signalling Technology), U0126 (comercializado, por ejemplo, por Cell Signalling Technology), SL327 (comercializado, por ejemplo, por Sigma-Aldrich), ARRY-162 (comercializado, por ejemplo, por Array Biopharma), PD184161 (véase, por ejemplo, Klein y col., 2006), PD184352 (CI-1040) (véase, por ejemplo, Mattingly y col., 2006), sunitinib (véase, por ejemplo, Voss y col., documento US20008004287 incorporado por referencia al presente documento), sorafenib (véase Voss anteriormente), Vandetanib (véase Voss anteriormente), pazopanib (véase, por ejemplo, Voss anteriormente), Axitinib (véase Voss anteriormente) y PTK787 (véase Voss anteriormente).

Actualmente, varios inhibidores de MEK se están sometiendo a evaluaciones de ensayos clínicos. CI-1040 ha sido evaluado en ensayos clínicos de Fase I y II para cáncer (véase, por ejemplo, Rinehart y col., 2004). Otros inhibidores de MEK que están siendo evaluados en ensayos clínicos incluyen PD 184352 (véase, por ejemplo, English y col., 2002), BAY 43-9006 (véase, por ejemplo, Chow y col., 2001), PD-325901 (también PD0325901), GSK 120212, ARRY-438162, RDEAI 19, AZD6244 (también ARRY-142886 o ARRY-886), RO5126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704).

La inhibición de MEK también puede lograrse convenientemente usando interferencia mediada por ARN (ARNi). Normalmente, se introduce una molécula de ARN bicatenaria complementaria a todo o parte de un gen de MEK en células pluripotentes, favoreciendo así la degradación específica de moléculas de ARNm codificadoras de MEK. Este mecanismo post-transcripcional tiene como resultado una expresión reducida o abolida del gen de MEK direccionado. Se conocen técnicas y protocolos adecuados para lograr una inhibición de MEK usando ARNi.

Se conoce un número de ensayos para identificar inhibidores de cinasa, incluso inhibidores de GSK3 e inhibidores de MEK. Por ejemplo, Davies y col. (2000) describen ensayos de cinasa en los que se incubaba una cinasa en presencia de un sustrato de péptido y ATP radiomarcado. La fosforilación del sustrato por parte de la cinasa tiene como resultado la incorporación del marcador en el sustrato. Se inmovilizan alícuotas de cada reacción sobre papel de fosfocelulosa y se lavan en ácido fosfórico para retirar el ATP libre. Luego, se mide la actividad del sustrato posterior a la incubación y se proporciona una indicación de la actividad de la cinasa. Puede determinarse con facilidad la actividad relativa de la cinasa en presencia y ausencia de inhibidores de cinasa candidatos usando un ensayo como este. Downey y col. (1996) también describen ensayos para la actividad de cinasa que pueden usarse para identificar inhibidores de cinasa.

3. Inhibidor del receptor de TGF- β

Los inhibidores del receptor de TGF- β pueden incluir cualquier inhibidor de señalización de TGF en general o inhibidores específicos para inhibidores del receptor de TGF- β (por ejemplo, ALK5), que pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de, y ARNs y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de receptores de TGF beta (por ejemplo, ALK5). Ejemplos de inhibidores de receptor de TGF β /ALK5 incluyen, pero sin limitaciones, SB431542 (véase, por ejemplo, Inman y col., 2002), A-83-01, también conocido como 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (véase, por ejemplo, Tojo y col., 2005 y comercializado, por ejemplo, por Toicris Bioscience); 2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, por ejemplo, Dalton y col., documento WO2008/094597), BMP4 (véase Dalton anteriormente), GW788388 (- (4-[3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]piridm-2-il)-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)benzamida) (véase, por ejemplo, Gellibert y col., 2006), SM16 (véase, por ejemplo, Suzuki y col., 2007), IN-1130 (3-((5-(6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1H-imidazol-2-il)metil)benzamida) (véase, por ejemplo, Kim y col., 2008), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)piridina) (véase, por ejemplo, Gouville y col., 2006), SB-505124 (clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-tercbutil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina) (véase, por ejemplo, DaCosta y col., 2004) y derivados de pirimidina (véanse, por ejemplo, aquellos enumerados en Stiefl y col., documento WO2008/006583).

Además, si bien no se pretende que un "inhibidor de ALK5" abarque inhibidores de cinasa no específicos, debe comprenderse que un "inhibidor de ALK5" abarca inhibidores que inhiben ALK4 y/o ALK7 además de ALK5, tales como, por ejemplo, SB-431542 (véase, por ejemplo, Inman y col., 2002). Sin pretender limitar el alcance de la invención, se considera que los inhibidores de ALK5 afectan al proceso de conversión/transición mesenquimal a epitelial (TME). La vía de TGF β /activina es un conductor para la transición de epitelial a mesenquimal (TEM). El inventor contempla que la inhibición de la vía de TGF β /activina puede facilitar el proceso de TME (es decir, la reprogramación).

Se considera que la inhibición de la vía de TGF β /activina surtirá efectos similares. Así, cualquier inhibidor (por ejemplo, corriente arriba o corriente abajo) de la vía de TGF β /activina puede usarse en combinación con, o en vez de, inhibidores de TGF β /ALK5 tal como se describe en el presente documento. Inhibidores de la vía de TGF β /activina de ejemplo incluyen, pero sin limitaciones: inhibidores de receptor de TGF β , inhibidores de fosforilación de SMAD2/3, inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD 4 y activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7. Además, las categorizaciones descritas en el presente documento se dan simplemente con fines organizativos y el experto en la materia sabrá que los compuestos pueden afectar a uno o más puntos en una vía, y así, los compuestos pueden funcionar en una o más de las categorías definidas.

Los inhibidores de receptor de TGF beta pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de, y

ARNsi o ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a receptores de TGF beta. Ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero sin limitaciones, SU5416; clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina; (SB-505124); lerdelimumb (CAT-152); metelimumab (CAT-192); GC-1008; ID11; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; Gleevec; 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morina); activina-M108A; P144; TBR2-Fc soluble; y células tumorales transfectadas antisentido que se dirigen a receptores de TGF beta (véanse, por ejemplo, Wrzesinski y col., 2007; Kaminska y col., 2005; y Chang y col., 2007).

4. Inhibidores de ROCK

Las células madre pluripotentes, especialmente las células MPi y células ME humanas, son vulnerables a apoptosis por desprendimiento y disociación celular, que son importantes para el aislamiento clonal o para la expansión e inducción de diferenciación. Recientemente, se ha descubierto que una pequeña clase de moléculas aumenta la eficacia clonal y la supervivencia de células madre pluripotentes disociadas, tales como inhibidores de cinasa asociada con Rho (ROCK), que son inhibidores para vías de señalización relacionadas con ROCK, por ejemplo, inhibidores específicos de Rho, inhibidores específicos de ROCK o inhibidores específicos de miosina II. En ciertos aspectos de la invención pueden usarse inhibidores de ROCK para cultivar y realizar un pase de células madre pluripotentes y/o para la diferenciación de las células madre. Por lo tanto, los inhibidores de ROCK podrían estar presentes en cualquier medio de cultivo de células en el que se desarrollen, disocien, formen agregados o soporten diferenciación células madre pluripotentes, tal como un cultivo adherente o un cultivo en suspensión.

Las vías de señalización de ROCK pueden incluir GTPasas de la familia Rho; ROCK, una cinasa efectora principal corriente abajo de Rho; miosina II, el efector predominante corriente abajo de ROCK (Harb y col., 2008); y cualquier procesador de señal intermedio, corriente arriba o corriente abajo. ROCK puede fosforilar e inactivar la subunidad 1 diana de miosina fosfatasa (MYPT1), una de las principales dianas corriente abajo de ROCK que regulan a la baja la función de la miosina a través de la defosforilación de la cadena ligera reguladora de miosina (MRLC).

Las ROCK son serinas/treonina cinasas que sirven como proteínas diana para Rho (de las que existen tres isoformas, RhoA, RhoB y RhoC). Estas cinasas fueron inicialmente caracterizadas como mediadoras de la formación de fibras de estrés inducidas por Rho y adhesiones focales. Las dos isoformas de ROCK, ROCK1 (p160ROCK, también denominada ROCK β) y ROCK2 (ROCK α), están comprendidas por un dominio de cinasa N-terminal, seguido de un dominio de hélice enrollada que contiene un dominio de unión a Rho y un dominio de homología de pleckstrina (HP). Ambas ROCK son reguladores citoesqueléticos, mediando los efectos de RhoA en la formación de fibras de estrés, contracción de músculo liso, adhesión celular, rizamiento de membrana y motilidad celular. Las ROCK pueden ejercer su actividad biológica dirigiéndose a moléculas corriente abajo, tales como miosina II, cadena ligera de miosina (CLM), fosfatasa de CLM (FCLM) y homólogo de fosfatasa y tensina (HFT).

Ejemplos no limitantes de inhibidores de ROCK incluyen HA-100, Y-27632, H-1152, fasudilo (también denominado HA1077), Y-30141 (descrito en la patente de Estados Unidos 5.478.838), Wf-536, HA-1077, hidroxil-HA-1077, GSK269962A, SB-772077-B, y sus derivados, y ácido nucleico antisentido para ROCK, ácido nucleico que induce ARN interferente (por ejemplo, ARNsi), péptidos competitivos, péptidos antagonistas, anticuerpos inhibitorios, fragmentos de anticuerpo-ScFv, y sus variantes negativas dominantes y sus vectores de expresión. Además, dado que otros compuestos de bajo peso molecular se conocen como inhibidores de ROCK, también pueden usarse tales compuestos o sus derivados en las realizaciones (por ejemplo, véanse las publicaciones de patentes de Estados Unidos n.º 20050209261, 20050192304, 20040014755, 20040002508, 20040002507, 20030125344 y 20030087919, y a las publicaciones de patentes internacionales n.º 2003/062227, 20031059913, 2003/062225, 2002/076976 y 2004/039796). En ciertos aspectos de la presente invención también puede usarse una combinación de uno o dos o más de los inhibidores de ROCK.

Los inhibidores específicos de Rho, tales como exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, y/o inhibidores específicos de miosina II, también pueden usarse como un inhibidor de ROCK en ciertos aspectos de la invención.

E. Condiciones hipóxicas

Podría usarse un bajo nivel de oxígeno durante toda la etapa de expansión antes de la reprogramación para favorecer el mantenimiento del estado de tipo progenitor y posiblemente, al menos parte de la etapa de reprogramación. En primer lugar, al expandirse las células, estas tienden a alejarse de ser más de tipo progenitor para volverse más diferenciadas (es decir, el nivel de expresión de CD34 se reduce con el tiempo). La condición de bajo contenido de oxígeno simula el microentorno normal de células progenitoras hematopoyéticas (PH) y parece retardar la diferenciación de las células progenitoras (Eliasson y Jönsson, 2010). El bajo contenido de oxígeno usado en el presente documento puede estar en un nivel de alrededor de 2 % o puede estar en un intervalo de alrededor de 1-7 %. En otro aspecto, también puede usarse un bajo contenido de O₂ durante la etapa de reprogramación para estimular la formación de MPi (Yoshida y col., 2009).

V. Elementos genéticos episómicos

Se ha logrado una inducción de células madre pluripotentes a partir de células somáticas humanas usando retrovirus o vectores lentivirales para una expresión ectópica de genes de reprogramación. Los retrovirus recombinantes tales como el virus de leucemia murina de Moloney tienen la capacidad de integrarse en el genoma hospedador de una manera estable. Contienen una transcriptasa inversa que permite la integración en el genoma hospedador. Los lentivirus son una subclase de retrovirus. Están ampliamente adaptados como vectores gracias a su capacidad de integrarse en el genoma de células que no están en división así como también de células en división. El genoma vírico en forma de ARN se somete a transcripción inversa cuando el virus ingresa a la célula para producir ADN, que luego es insertado en el genoma en una posición aleatoria por la enzima integrasa vírica. Por lo tanto, la tecnología actual de reprogramación exitosa depende de los enfoques víricos basados en la integración.

Sin embargo, con la tecnología actual, la integración dirigida aún no rutinaria (Bode y col., 2000) y la alternativa convencional, la integración aleatoria, puede llevar a una mutagénesis insercional con consecuencias impredecibles en células madre pluripotentes inducidas. Por las mismas razones, no puede controlarse la expresión del transgén dado que depende del contexto de la cromatina del sitio de integración (Baer y col., 2000). Solo puede lograrse un alto nivel de expresión en los loci genómicos favorables, pero existe el peligro de que la integración en sitios de alta expresión interfiera con funciones celulares vitales de las células madre pluripotentes inducidas.

Además, hay cada vez más evidencia de la existencia de mecanismos de defensa celulares contra el ADN exógeno que operan regulando a la baja transgenes en un proceso que esté acompañado de metilación de ADN (Bingham, 1997, Garrick y col., 1998). Además, los componentes víricos pueden actuar junto con otros factores para transformar células. Acompañado de la continua expresión de un número de genes víricos, la persistencia de al menos parte del genoma vírico dentro de la célula puede provocar una transformación celular. Estos genes pueden interferir con una vía de señalización de células provocando los cambios fenotípicos observados de la célula, lo que lleva a una célula transformada que muestra una mayor división celular, lo que es favorable para el virus.

Por lo tanto, la presente invención desarrolla métodos novedosos para generar células madre pluripotentes inducidas esencialmente libres de elementos genéticos exógenos, tales como de elementos de vector retroviral o lentiviral usados en los métodos previos. Estos métodos de la presente invención hacen uso de vectores de replicación extra-cromosómica, o vectores capaces de replicarse episómicamente (véase la solicitud de Estados Unidos n.º 12/478.154, incorporada por referencia al presente documento), en combinación con el cultivo de células reprogramadas en presencia de inhibidores de señalización celular para lograr una cinética y una eficacia óptimas en la reprogramación.

Un número de virus de ADN, tales como adenovirus, virus vacuolizante de simios 40 (SV40), virus de papiloma bovino (VPB) o plásmidos que contienen SRA (secuencias de replicación autónoma) de levadura de gemación, se replica extra-cromosómicamente en células de mamífero. Estos plásmidos episómicos están intrínsecamente libres de todas estas desventajas (Bode y col., 2001) asociadas con vectores de integración. Un sistema basado en el virus del herpes linfótrofo que incluye el virus de Epstein Barr (VEB) también puede replicarse extracromosómicamente y puede ayudar a entregar genes de reprogramación a células somáticas.

Por ejemplo, el enfoque basado en el vector episómico usado en la invención extrae elementos sólidos necesarios para la replicación y el mantenimiento exitosos de un sistema basado en elemento de VEB sin comprometer la viabilidad del sistema en una situación clínica como la descrita en detalle más abajo. Los elementos de VEB útiles son OriP y ANEB-1, o sus variantes o equivalentes funcionales. Una ventaja adicional de este sistema es que estos elementos exógenos se perderán con el tiempo después de ser introducidos en las células, lo que lleva a células MPI auto-sostenidas esencialmente exentas de estos elementos.

A. Vectores episómicos

Estos métodos de reprogramación pueden hacer uso de vectores de replicación extra-cromosómica (es decir, vectores episómicos), que son capaces de replicarse episómicamente para formar células MPI esencialmente exentas de vector exógeno o de elementos víricos (véase la Solicitud de Estados Unidos n.º 61/058.858, incorporada por referencia al presente documento; Yu y col., 2009). Un número de virus de ADN, tales como adenovirus, virus vacuolizante de simios 40 (SV40) o virus de papiloma bovino (VPB) o plásmidos que contienen SRA (secuencias de replicación autónoma) de levadura de gemación, se replica extra-cromosómicamente o episómicamente en células de mamífero. Estos plásmidos episómicos están intrínsecamente libres de todas estas desventajas (Bode y col., 2001) asociadas con vectores de integración. Por ejemplo, uno basado en virus del herpes linfótrofo que incluye el virus de Epstein Barr (VEB) de la forma definida con anterioridad puede replicarse extra-cromosómicamente y puede ayudar a entregar genes de reprogramación a células somáticas.

Por ejemplo, el enfoque basado en plásmido usado en la invención puede extraer elementos sólidos necesarios para la replicación y el mantenimiento exitosos de un sistema basado en un elemento de VEB sin comprometer la viabilidad del sistema en una situación clínica como la descrita en detalle más abajo. Los elementos de VEB esenciales son OriP y ANEB-1, o sus variantes o equivalentes funcionales. Una ventaja adicional de este sistema es que estos elementos exógenos se perderán con el tiempo después de ser introducidos en las células, lo que lleva a células MPI auto-sostenidas esencialmente exentas de elementos exógenos.

El uso de vectores extra-cromosómicos basados en plásmido o liposoma, por ejemplo vectores basados en oriP, y/o vectores que codifican un derivado de ANEB-1 permite que se introduzcan grandes fragmentos de ADN en una célula y se mantengan extra-cromosómicamente, se repliquen una vez por cada ciclo celular, se dividan con eficacia en células hija y no susciten sustancialmente ninguna respuesta inmunitaria. En particular, ANEB-1, la única proteína vírica requerida para la replicación del vector de expresión basado en oriP, no suscita ninguna respuesta inmunitaria celular porque ha desarrollado un mecanismo eficaz para evitar el procesamiento requerido para la presentación de sus antígenos en moléculas de clase I de CPH (Levitskaya y col., 1997). Además, ANEB-1 puede actuar en *trans* para mejorar la expresión del gen clonado, induciendo la expresión de un gen clonado hasta 100 veces en algunas líneas celulares (Langle-Rouault y col., 1998; Evans y col., 1997). Por último, la producción de dichos vectores de expresión basados en oriP no es costosa.

Otros vectores extra-cromosómicos incluyen otros vectores basados en virus del herpes linfótrofo. El virus del herpes linfótrofo es un virus de herpes que se replica en un linfoblasto (por ejemplo, un linfoblasto humano B) y se convierte en un plásmido durante una parte de su ciclo vital natural. El virus del herpes simple (VHS) no es un virus de herpes "linfótrofo". Ejemplos de virus del herpes linfótrofo incluyen, pero sin limitarse a VEB, virus del herpes de sarcoma de Kaposi (VHSK); herpesvirus saimiri (HS) y virus de la enfermedad de Marek (VEM). Asimismo, se contemplan otras fuentes de vectores basados en episoma, tales como el SRA de levadura, adenovirus, SV40 o VPB.

B. Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr (VEB), también denominado herpesvirus humano 4 (HHV-4), es un virus de la familia del herpes (que incluye virus del herpes simple y citomegalovirus), y es uno de los virus más comunes en los seres humanos. El VEB mantiene su genoma extra-cromosómicamente y funciona en colaboración con la maquinaria de la célula hospedadora para una replicación y un mantenimiento eficaces (Lindner y Sugden, 2007), basándose únicamente en dos características esenciales para su replicación y su retención dentro de las células durante la división celular (Yates y col., 1985; Yates y col., 1984). Un elemento, comúnmente referido como *oriP*, existe *in cis* y sirve de origen de replicación. El otro factor, ANEB-1, funciona *in trans* uniéndose a secuencias dentro de *oriP* para promover la replicación y el mantenimiento del ADN de plásmido. Como ejemplo no limitante, ciertos aspectos de la invención extraen estas dos características y las usan en el contexto de un vector para transportar los genes necesarios para reprogramar células somáticas con el fin de facilitar la replicación y la expresión sostenida de estos genes con respecto a plásmidos convencionales.

C. Origen de replicación

En ciertos aspectos puede usarse un origen de la replicación del VEB, *OriP*. *OriP* es el sitio en el que, o cerca del cual, se inicia la replicación del ADN y está compuesto por dos secuencias que actúan en *cis* separadas por un par de 1 kilobase aproximadamente conocido como la familia de repeticiones (FR) y la simetría de díada (SD).

La FR está compuesta por 21 copias imperfectas de una repetición de 30 pb y contiene 20 sitios de unión a ANEB-1 de alta afinidad. Cuando la FR está unida por ANEB-1, ambas sirven como mejorador transcripcional de promotores en *cis* separadas por hasta 10 kb (Reisman y Sugden, 1986; Yates, 1988; Sugden y Warren, 1989; Wysokenski y Yates, 1989; Gahn y Sugden, 1995; Kennedy y Sugden, 2003; Altmann y col., 2006), y contribuye a la retención nuclear y al mantenimiento confiable de plásmidos que contienen FR (Langle-Rouault y col., 1998; Kirchmaier y Sugden, 1995; Wang y col., 2006; Nanbo y Sugden, 2007). La partición eficaz de plásmidos de oriP también es similarmente atribuible a FR. Si bien el virus ha evolucionado para mantener 20 sitios de unión a ANEB-1 en FR, el mantenimiento de plásmidos eficaz requiere solo siete de estos sitios, y pueden ser reconstituídos por un polímero de tres copias de SD, con un total de 12 sitios de unión a ANEB-1 (Wysokenski y Yates, 1989).

El elemento de simetría de díada (SD) es suficiente para iniciar la síntesis de ADN en presencia de ANEB-1 (Aiyar y col., 1998; Yates y col., 2000), y se produce el inicio ya sea en la SD o cerca de ella (Gahn y Schildkraut, 1989; Niller y col., 1995). Se cree que la terminación de la síntesis de ADN vírico se produce en la FR porque cuando la FR está unida por ANEB-1, funciona como una barrera de horquilla de replicación tal como se observa por electroforesis en gel 2D (Gahn y Schildkraut, 1989; Ermakova y col., 1996; Wang y col., 2006). El inicio de la síntesis de ADN a partir de SD se permite una vez por ciclo celular (Adams, 1987; Yates y Guan, 1991) y está regulado por los componentes del sistema de replicación celular (Chaudhuri y col., 2001; Ritzi y col., 2003; Dhar y col., 2001; Scheppers y col., 2001; Zhou y col., 2005; Julien y col., 2004). La SD contiene cuatro sitios de unión a ANEB-1, aunque con una afinidad menor que las encontradas en la FR (Reisman y col., 1985). La topología de SD es tal que los cuatro sitios de unión están dispuestos como dos pares de sitios, con un espaciado de centro a centro de 21 pb entre cada par y un espaciado de centro a centro de 33 pb entre los dos sitios de unión internos no emparejados (Baer y col., 1984; Rawlins y col., 1985).

Los roles funcionales de los elementos dentro de SD han sido confirmados por estudios de otra región del genoma de VEB, denominada Rep*, que fue identificado como un elemento que puede sustituirse por SD ineficazmente (Kirchmaier y Sugden, 1998). La polimerización de Rep* en ocho veces produjo un elemento tan eficaz como SD en su soporte de replicación (Wang y col., 2006). La disección bioquímica de Rep* identificó un par de sitios de unión a ANEB-1 con un espaciado de centro a centro de 21 pb crítico para su función replicativa (*ibidem*). Se descubrió que

el replicador mínimo de Rep* es el par de sitios de unión a ANEB-1, dado que se retuvo la función replicativa incluso después de que todas las secuencias flanqueantes en el polímero fueran reemplazadas por secuencias derivadas del fago lambda. Las comparaciones de SD y Rep* han revelado un mecanismo común: estos replicadores soportan el inicio de la síntesis de ADN reclutando la maquinaria replicativa celular a través de un par de sitios aproximadamente espaciados, curvados y unidos por ANEB-1.

Existen otros plásmidos autorizados extra-cromosómicos que se replican en células de mamífero que no se relacionan con VEB y, en ciertas formas, parecen similares a la zona de inicio dentro de la cepa Raji de VEB. Hans Lipps y sus colaboradores han desarrollado y estudiado plásmidos que contienen "regiones de unión a la matriz/estructura nuclear" (S/MAR) y una unidad transcripcional sólida (Piechaczek y col., 1999; Jenke y col., 2004). Su S/MAR deriva del gen de interferón beta humano, es rico en A/T y, operativamente, está definido por su asociación con la matriz nuclear y su desenrollado preferencial con baja fuerza iónica o cuando se incorpora a ADN superenrollado (Bode y col., 1992). Estos plásmidos se replican de forma semi-conservativa, se unen a proteínas ORC y soportan el inicio de la síntesis de ADN de forma efectiva aleatoriamente en todo su ADN (Schaarschmidt y col., 2004). Son mantenidos con eficacia en células humanas y de hámster en proliferación sin selección de fármaco y cuando se introducen en embriones de cerdos pueden soportar la expresión de PVF en la mayoría de los tejidos de animales fetales (Manzini y col., 2006).

D. Factor de actuación en trans

Un ejemplo particular del factor de actuación en trans podría ser el antígeno nuclear 1 de Epstein Barr (ANEB-1), que es una proteína de unión a ADN que se une a FR y SD de *oriP* o Rep* para facilitar la replicación y la partición confiable del vector basado en VEB en células hija independientemente de los cromosomas celulares, pero en consonancia con ellos, durante cada división celular.

Los 641 aminoácidos (AA) de ANEB-1 han sido categorizados en dominios asociados con sus variadas funciones por análisis de mutación y delección. Dos regiones, entre AA40-89 y AA329-378, son capaces de unir dos elementos de ADN en *cis* o en *trans* cuando se unen a ANEB-1, y así, se las ha denominado Región de Unión 1 y 2 (RU1, RU2) (Middleton y Sugden, 1992; Frappier y O'Donnell, 1991; Su y col., 1991; Mackey y col., 1995). La fusión de estos dominios de ANEB-1 a PVF aloja el PVF en cromosomas mitóticos (Marcehal y col., 1999; Kanda y col., 2001). RU1 y RU2 son funcionalmente redundantes para la replicación; una delección de una cualquiera da un derivado de ANEB-1 capaz de soportar la replicación del ADN (Mackey y Sugden, 1999; Sears y col., 2004). RU1 y RU2 son ricas en restos de arginina y glicina, y se asemejan a los motivos de gancho de AT que se unen a ADN rico en A/T (Aravind y Landsman, 1998), (Sears y col., 2004). Un análisis *in vitro* de RU1 y RU2 de ANEB-1 ha demostrado su capacidad para unirse a ADN rico en A/T (Sears y col., 2004). Cuando RU1, que contiene uno de dichos ganchos de AT, se fusionó con el dominio de dimerización y unión a ADN de ANEB-1, se descubrió que era suficiente para la replicación de ADN de plásmidos de *oriP*, aunque menos eficaz que ANEB-1 de tipo silvestre (*ibidem*).

No obstante, RU1 y RU2 sí difieren. La mitad C-terminal de RU1 está compuesta por aminoácidos diferentes de Arg-Gly repetidos de la mitad N-terminal, y es denominada región única 1 (Ru1). Ru1 es necesaria para que ANEB-1 active la transcripción con eficacia a partir de ADN indicadores transfectados e integrados que contienen FR (Wu y col., 2002; Kennedy y Sugden, 2003; Altmann y col., 2006). Ru1 también es esencial para la transformación eficaz de linfocitos B infectados por VEB. Cuando un derivado de ANEB-1 carente de este dominio reemplaza la proteína de tipo silvestre en el contexto de la totalidad del virus, estos virus derivados tienen 0,1 % de la capacidad de transformación del virus de tipo silvestre (Altmann y col., 2006).

No se requiere de RU2 para el soporte de ANEB-1 de replicación *oriP* (Shire y col., 1999; Mackey y Sugden, 1999; Sears y col., 2004). De forma adicional, puede reemplazarse la mitad N-terminal de ANEB-1 con proteínas celulares que contienen motivos de gancho AT, tales como HMGA1a, y aún retienen la función replicativa (Hung y col., 2001; Sears y col., 2003; Altmann y col., 2006). Estos descubrimientos indican que es probable que las actividades de gancho de AT de RU1 y RU2 sean necesarias para el mantenimiento de *oriP* en células humanas.

Un tercio de los restos de ANEB-1 (AA91-328) consiste en repeticiones de glicina-glicina-alanina (GGA), involucradas en la capacidad de ANEB-1 para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador inhibiendo la degradación y la presentación proteosómica (Levitskaya y col., 1995; Levitskaya y col., 1997). Se ha descubierto que estas repeticiones también inhiben la traducción del ANEB-1 *in vitro* e *in vivo* (Yin y col., 2003). Sin embargo, la delección de gran parte de este dominio no ejerce un efecto aparente sobre las funciones de ANEB-1 en el cultivo celular, dificultando el esclarecimiento de la función que cumple este dominio.

AA379-386 codifica una señal de localización nuclear (SLN), que también se asocia con la maquinaria de importación nuclear celular (Kim y col., 1997; Fischer y col., 1997). Las secuencias dentro de las regiones ricas en Arg-Gly de RU1 y RU2 también pueden funcionar como SLN debido a su alto contenido básico.

Por último, el extremo C (AA458-607) codifica los dominios de dimerización y unión a ADN solapantes de ANEB-1. La estructura de estos dominios ligados al ADN ha sido resuelta por cristalografía por rayos X, y se descubrió que es similar al dominio de unión a ADN de la proteína E2 de papilomavirus (Hedge y col., 1992; Kim y col., 2000; Bochkarev

y col., 1996).

En realizaciones específicas de la invención, un vector de reprogramación contendrá tanto *oriP* como una secuencia abreviada que codifica una versión de ANEB-1 competente para soportar una replicación de plásmido y su adecuado mantenimiento durante la división celular. La secuencia muy repetitiva dentro de un tercio de extremo amino de ANEB-1 de tipo silvestre y la eliminación de una región de 25 aminoácidos que ha demostrado toxicidad en varias células son prescindibles para la función de actuación en trans de ANEB-1 asociada con *oriP* (Yates y col., 1985; Kennedy y col., 2003). Por lo tanto, la forma abreviada de ANEB-1, conocida como deltaRu1, podría usarse junto con *oriP* dentro de su sistema basado en vectores episómicos en una realización.

En ciertos aspectos, un derivado de ANEB-1 que puede usarse en la invención es un polipéptido que, respecto a un polipéptido de tipo silvestre correspondiente, tiene una secuencia de aminoácidos modificada. Las modificaciones incluyen la delección, inserción o sustitución de al menos un resto de aminoácido en una región correspondiente a la región única (restos de alrededor de 65 a alrededor de 89) de RU1 (restos de alrededor de 40 a alrededor de 89) en ANEB-1, y pueden incluir una delección, inserción y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en regiones correspondientes a otros restos de ANEB-1, por ejemplo, de alrededor del resto 1 a alrededor del resto 40, de alrededor del resto 90 a alrededor del 328 (región de repetición "Gly-Gly-Ala"), de alrededor del resto 329 a alrededor del 377 (RU2), de alrededor del resto 379 a alrededor de 386 (SLN), de alrededor del resto 451 a alrededor del 608 (unión y dimerización de ADN), o de alrededor del resto 609 a alrededor del 641, siempre que el derivado resultante tenga las propiedades deseadas, por ejemplo, que dimerice y una el ADN que contiene un ori correspondiente a *oriP*, localice en el núcleo, no sea citotóxico y active la transcripción desde una plantilla extracromosómica pero no active sustancialmente la transcripción desde una plantilla integrada.

E. Característica libre de restos

Significativamente, la replicación y el mantenimiento del vector episómico basado en *oriP* son imperfectos y se pierde precipitadamente (25 % por cada división celular) a partir de células dentro de las primeras dos semanas de su introducción en las células; sin embargo, aquellas células que retienen el plásmido lo pierden con menos frecuencia (3 % por cada división celular) (Leight y Sugden, 2001; Nanbo y Sugden, 2007). Una vez que se retira la selección de células que alberga el plásmido, los plásmidos se perderán durante cada división celular hasta que todos ellos sean eliminados con el tiempo sin dejar huella de su existencia anterior dentro de las células hija resultantes. Ciertos aspectos de la invención hacen uso de esta característica sin huella del sistema basado en *oriP* como alternativa al enfoque actual asociado con el virus para entregar genes con el fin de generar células MPI. Asimismo, se perderán otros vectores extra-cromosómicos durante la replicación y la propagación de células hospedadoras y podrían también emplearse en la presente invención. En ciertos aspectos, puede usarse un método para retirar elementos de vector episómicos exógenos o la selección de células MPI esencialmente exentas de elementos genéticos exógenos.

VI. Construcción y entrega de vectores

En ciertas realizaciones, podrían construirse vectores de reprogramación que comprendan elementos adicionales además de secuencias de ácido nucleico que codifican factores de reprogramación tal como se describió con anterioridad en las células. A continuación se desvelan detalles de componentes de estos vectores y métodos de entrega.

A. Vector

Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (véanse, por ejemplo, Maniatis y col., 1988 y Ausubel y col., 1994, ambos incorporados por referencia al presente documento).

Los vectores también pueden comprender otros componentes o funcionalidades que modulan además la entrega de genes y/o la expresión de genes, o que proporcionan de otra manera propiedades beneficiosas a las células abordadas. Dichos otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión o direccionamiento de células (incluso componentes que median en la unión con especificidad de tejido o de tipo de célula); componentes que influyen en la incorporación del ácido nucleico del vector por parte de la célula; componentes que influyen en la localización del polinucleótido dentro de la célula después de la incorporación (tales como los agentes que median en la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión del polinucleótido.

Dichos componentes también podrían incluir marcadores, tales como marcadores detectables y/o de selección que pueden usarse para detectar o seleccionar células que fueron incorporadas y expresan el ácido nucleico entregado por el vector. Dichos componentes pueden ser proporcionados como una característica natural del vector (tal como el uso de ciertos vectores víricos que tienen componentes o funcionalidades que median en la unión y la incorporación), o pueden modificarse vectores para proporcionar dichas funcionalidades. Una gran variedad de dichos vectores son conocidos en la técnica y en general están disponibles. Cuando se mantiene un vector en una célula hospedadora, el vector puede replicarse de forma estable por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, incorporarse en el genoma de la célula hospedadora, o bien, mantenerse en el núcleo o en el citoplasma de la célula

hospedadora.

B. Elementos reguladores

- 5 Los casetes de expresión eucariota incluidos en los vectores contienen, en particular (en una dirección 5' a 3'), un promotor transcripcional eucariota unido operativamente a una secuencia de codificación de proteína, señales de corte y empalme que incluyen secuencias intermedias, y una secuencia de poliadenilación/terminación transcripcional.

i. Promotor/mejoradores

- 10 Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan el inicio y la velocidad de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que pueden ligarse las moléculas y proteínas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las expresiones "operativamente ubicado",
15 "operativamente unido", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una orientación y/o localización funcional correcta con relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio transcripcional y/o la expresión de esa secuencia.

- 20 Los promotores adecuados para su uso en un vector de codificación de ANEB-1 de la invención son aquellos que dirigen la expresión de los casetes de expresión que codifican la proteína ANEB-1 para dar como resultado niveles suficientes de estado estacionario de la proteína ANEB-1 para mantener en forma estable los vectores que contienen oriP de VEB. Los promotores también son útiles para una expresión eficaz de casetes de expresión que codifican factores de reprogramación.

- 25 Generalmente, un promotor comprende una secuencia que funciona para ubicar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo más conocido de esto es la secuencia TATA, pero en algunos promotores que carecen de secuencia TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que se superpone con el sitio de inicio propiamente dicho ayuda a fijar el lugar de inicio. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio transcripcional.
30 Normalmente, están ubicados en la región de 30-110pb corriente arriba del sitio de inicio, aunque también se ha demostrado que un número de promotores contienen elementos funcionales corriente abajo del sitio de inicio también. Para llevar una secuencia de codificación "bajo el control de" un promotor, se coloca el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional "corriente abajo" (es decir, en 3') del promotor elegido. El promotor "corriente arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

- 35 El espaciado entre elementos promotores es frecuentemente flexible, para conservar la función del promotor cuando se invierten o se mueven los elementos uno respecto de otro. En el promotor tk, el espaciado entre elementos promotores puede aumentar hasta 50pb de distancia antes de que comience a declinar la actividad. Según el promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar ya sea cooperativa o independientemente para activar la transcripción. Puede usarse o no un promotor junto con un "mejorador", que hace referencia a una secuencia reguladora de actuación en cis involucrada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.
40

- Un promotor puede ser uno asociado naturalmente con una secuencia de ácido nucleico, tal como se puede obtener aislando las secuencias no codificantes 5' ubicadas corriente arriba del segmento codificante y/o exón. Puede denominarse un promotor como este "endógeno". De forma similar, un mejorador puede ser uno asociado naturalmente con una secuencia de ácido nucleico, ubicada corriente abajo o bien corriente arriba, de esa secuencia. Como alternativa, se ganarán ciertas ventajas ubicando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, lo que hace referencia a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un mejorador recombinante o heterólogo también hace referencia a un mejorador no normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o mejoradores pueden incluir promotores o mejoradores de otros genes, y promotores o mejoradores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o mejoradores no "naturales", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras transcripcionales, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores más comúnmente usados en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir sintéticamente secuencias de ácido nucleico de promotores y mejoradores, las secuencias pueden producirse usando tecnología de amplificación de ácido nucleico y/o clonación recombinante, inclusive PCR™, con relación a las composiciones desveladas en el presente documento (véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202 y 5.928.906, incorporadas cada una de ellas por referencia al presente documento). Además, se contempla que también pueden emplearse las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o la expresión de secuencias dentro de organelas no nucleares tales como la mitocondria, los cloroplastos, y similares.
55
60

- Naturalmente, sería importante emplear un promotor y/o un mejorador que dirijan eficazmente la expresión del segmento de ADN en la organela, el tipo celular, el tejido, el órgano o el organismo elegido para la expresión. Los expertos en la materia de la biología molecular generalmente saben del uso de promotores, mejoradores y combinaciones de tipos celulares para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989,
65

incorporado por referencia al presente documento). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, con especificidad de tejido, inducibles y/o útiles en condiciones apropiadas para dirigir una expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como resulta ventajoso en la producción a gran escala de péptidos y/o proteínas recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Además, podría usarse cualquier combinación de promotor/mejorador (por ejemplo, según la Base de Datos de Promotores Eucariotas - EPDB, por sus siglas en inglés, a través de la red en epd.isb-sib.ch/) para dirigir la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmática T3, T7 o SP6 es otra realización posible. Las células eucariotas pueden soportar una transcripción citoplásmica de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de entrega o como una construcción de expresión genética adicional.

Ejemplos no limitantes de promotores incluyen promotores víricos tempranos o tardíos, tales como los promotores tempranos o tardíos de SV40, promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus (CMV), promotores tempranos de virus de sarcoma de Rous (VSR), promotores de célula eucariota, tal como, por ejemplo, el promotor de beta actina (Ng, 1989; Quitsche y col., 1989), promotor de GADPH (Alexander y col., 1988, Ercolani y col., 1988), promotor de metalotioneína (Karin y col., 1989; Richards y col., 1984); y promotores de elementos de respuesta concatenada, tales como los promotores de elementos de respuesta de AMP cíclico (cre), promotor de elementos de respuesta al suero (sre), promotor de éster de forbol (TPA) y promotores de elementos de respuesta (tre) próximos a una secuencia TATA mínima. También es posible usar secuencias de promotores de hormona de crecimiento humana (por ejemplo, el promotor mínimo de hormona de crecimiento humana descrito en el Genbank, n.º de identificación X05244, nucleótido 283-341) o un promotor de tumor mamario de ratón (comercializado por la ATCC, n.º de cat ATCC 45007). Un ejemplo específico podría ser un promotor de fosfoglicerato cinasa (FGC).

ii. Sitios de escisión de la proteasa/péptidos de autoescisión y sitios de unión al ribosoma internos

En ciertos aspectos, según la presente invención, los genes que codifican marcadores o proteínas de reprogramación pueden conectarse entre sí por medio de una secuencia (puede haber más de una) que codifique un sitio de escisión de proteasa (es decir, una secuencia que comprenda el sitio de reconocimiento de una proteasa) o al menos un péptido de auto-escisión. Por ejemplo, puede usarse un mensaje policistrónico que comprenda al menos dos genes de factor de reprogramación en ciertos aspectos de la invención (véase el documento de Estados Unidos de n.º de serie 12/539.366).

Según una cierta realización de la presente invención, la o las proteasas capaces de escindir los sitios de escisión codificados por la o las secuencias que conectan los genes que constituyen el mensaje policistrónico son codificadas por el polinucleótido de la presente invención. Más particularmente, el o los genes que codifican la o las proteasas son parte de al menos uno de los mensajes policistrónicos.

Los sitios adecuados de escisión de proteasas y los péptidos de autoescisión son conocidos para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Ryan y col., 1997; Scymczak y col., 2004). Ejemplos de preferencia de sitios de escisión de proteasas son los sitios de escisión de proteasas de potivirus Nla (por ejemplo, proteasa de virus del grabado del tabaco), proteasas de potivirus HC, proteasas de potivirus P1 (P35), proteasas de biovirus Nla, proteasas codificadas por ARN-2 de biovirus, proteasas de aftovirus L, proteasas de enterovirus 2A, proteasas de rinovirus 2A, proteasas de picorna 3C, proteasas de comovirus 24K, proteasas de nepovirus 24K, proteasa de VETA (virus esférico de tungro del arroz) tipo 3C, proteasa de PY/IF (virus del moteado amarillo de la chirivía) tipo C3, trombina, factor Xa y enterocinasa. Debido a su alta restricción de escisión pueden usarse los sitios de escisión de la proteasa de VGT (virus del grabado del tabaco).

Ejemplos de péptidos de autoescisión (también denominados "elementos hidrolíticos de actuación en cis", EHAC; véase deFelipe (2002) son los derivados de péptidos de potivirus y cardiovirus 2A. Pueden seleccionarse péptidos particulares de autoescisión de péptidos 2A derivados de VEPB (virus de la enfermedad de fiebre aftosa), virus de rinitis equina A, virus de Thoséa asigna y teschovirus porcino.

Puede usarse una señal de inicio específica para la traducción eficaz de las secuencias de codificación en un mensaje policistrónico. Estas señales incluyen el codón de inicio de ATG o secuencias adyacentes. Puede necesitarse proporcionarse señales de control transcripcionales exógenas, incluso el codón de inicio de ATG. Un experto en la materia sería fácilmente capaz de determinar esto y de proporcionar las señales necesarias. Se conoce que el codón de inicio debe estar "en fase" con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Las señales de control transcripcionales exógenas y los codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos apropiados mejoradores de transcripción.

En ciertas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) son empleados para crear mensajes de múltiples genes o policistrónicos. Los elementos de IRES son capaces de evitar el modelo de rastreo ribosomal traducción dependiente de Cap metilado en 5' y de comenzar la traducción en los sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Los elementos de IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (polio y

encefalomiocarditis) han sido descritos (Pelletier y Sonenberg, 1988) así como también un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos de IRES pueden unirse a marcos abiertos de lectura heterólogos. Pueden transcribirse múltiples marcos abiertos de lectura juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento de IRES, cada marco abierto de lectura es accesible para los ribosomas para su traducción eficaz. Pueden expresarse con eficacia múltiples genes usando un solo promotor/mejorador para transcribir un solo mensaje (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.925.565 y 5.935.819).

iii. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante estándar para digerir el vector (véanse, por ejemplo, Carbonelli y col., 1999; Levenson y col., 1998 y Cocea, 1997, incorporados por referencia al presente documento). La expresión "digestión de enzima de restricción" hace referencia a una escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en lugares específicos en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas es ampliamente comprendido por los expertos en la materia. Con frecuencia, un vector es linealizado o fragmentado usando una enzima de restricción que corta dentro del SCM para permitir que las secuencias exógenas se ligen al vector. El término "ligadura" hace referencia al proceso para formar enlaces de fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser contiguos entre sí o no. Los expertos en la materia de la tecnología recombinante conocen bien las técnicas que involucran enzimas de restricción y reacciones de ligadura.

iv. Sitios de corte y empalme

La mayoría de las moléculas de ARN eucariota transcritas soportarán un corte y empalme del ARN para retirar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucariotas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme dadores y/o aceptores para asegurar el procesamiento adecuado del transcrito para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Chandler y col., 1997).

v. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención comprenderán, generalmente, al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" comprende las secuencias de ADN involucradas en una terminación específica de un transcrito de ARN a través de una ARN polimerasa. Así, en ciertas realizaciones, se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. Puede ser necesario un terminador *in vivo* para lograr niveles deseables de mensajes.

En sistemas eucariotas, la región del terminador también puede comprender secuencias específicas de ADN que permiten una escisión de sitio específico del nuevo transcrito para exponer un sitio de poliadenilación. Esto señala a una polimerasa endógena especializada que agregue un tramo de alrededor de 200 restos de A (poliA) en el extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen más estables y son traducidas con mayor eficacia. Así, en otras realizaciones que involucran eucariotas, se prefiere que ese terminador comprenda una señal para la escisión del ARN y se prefiere más que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje. Los elementos de sitio de poliadenilación y/o terminador pueden servir para mejorar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura desde el casete en otras secuencias.

Los terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador de transcripción conocido descrito en el presente documento o conocido por los expertos en la materia, incluso, pero sin limitaciones, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tales como, por ejemplo, las secuencias de terminación viral o terminador de hormona de crecimiento bovina, tal como, por ejemplo, el terminador de SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser una falta de secuencia que puede transcribirse o trasladarse, tal como debido a un truncamiento de secuencia.

vi. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente en la expresión eucariota, normalmente se incluye una señal de poliadenilación para efectuar una poliadenilación apropiada del transcrito. No se considera que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y puede emplearse cualquiera de dichas secuencias. Realizaciones de preferencia incluyen la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina, conveniente y que se sabe que funciona bien en varias células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

vii. Orígenes de replicación

Con el fin de propagar un vector en una célula hospedadora, este puede contener uno o más sitios de origen de replicación (con frecuencia denominados "ori"), por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico correspondiente a oriP de VEB tal cual se describió con anterioridad o un oriP modificado por ingeniería genética con una función similar o

elevada en la programación de diferenciación, que es una secuencia de ácido nucleico específica en la que se inicia la replicación. Como alternativa, puede emplearse un origen de replicación de otros virus de replicación extracromosómica tal cual se describió con anterioridad o una secuencia de replicación autónoma (SRA).

5 viii. Marcadores de selección y cribado

En ciertas realizaciones de la invención pueden identificarse células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable en la célula, lo que permite una fácil identificación de células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positiva es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativa es uno en el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a fármacos.

Usualmente, la inclusión de un marcador de selección de fármaco ayuda en la clonación y en la identificación de transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basada en la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores de cribado tales como PVF, cuya base es el análisis colorimétrico. Como alternativa, pueden usarse enzimas de cribado como marcadores de selección negativa tales como la timidina cinasa (*tk*) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). El experto en la materia también sabrá cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis FACS. El marcador usado no es considerado importante, siempre que sea capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores de selección y cribado son conocidos para el experto en la materia. Una característica de la presente invención incluye el uso de marcadores de selección y cribado para seleccionar células libres de vector después de que los factores de programación de diferenciación hayan efectuado un estado deseado de diferenciación alterada en esas células.

30 C. Entrega de vector

La introducción de un vector de reprogramación en células somáticas con la actual invención puede usar cualquier método adecuado para entregar ácido nucleico para transformar una célula, tal como se describió en el presente documento o como lo sabrá el experto en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitaciones, la entrega directa de ADN tal como por transfección *ex vivo* (Wilson y col., 1989; Nabel y col., 1989), por inyección (Patentes de Estados Unidos n.º 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859, cada una incorporada por referencia al presente documento), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, 1985; la Patente de Estados Unidos n.º 5.789.215, incorporada por referencia al presente documento); por electroporación (Patente de Estados Unidos n.º 5.384.253, incorporada por referencia al presente documento; Tur-Kaspa y col., 1986; Potter y col., 1984), por precipitación de fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposoma (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); por bombardeo de microproyectil (Solicitudes PCT n.º WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de Estados Unidos n.º 5.610.042, 5.322.7835, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880, y cada una incorporada por referencia al presente documento); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; Patentes de Estados Unidos n.º 5.302.523 y 5.464.765, cada una incorporada por referencia al presente documento); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de Estados Unidos n.º 5.591.616 y 5.563.055, cada una incorporada por referencia al presente documento); por transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirlullah y col., 1993; Patentes de Estados Unidos n.º 4.684.611 y 4.952.500, cada una incorporada por referencia al presente documento); por incorporación de ADN mediado por desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985) y cualquier combinación de dichos métodos. Mediante la aplicación de técnicas como estas, pueden transformarse de forma estable o temporal organela/s, célula/s, tejido/s u organismo/s.

55 i. Transfección mediada por liposoma

En cierta realización de la invención, puede atraparse un ácido nucleico en un complejo lipídico tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes de lípidos soportan un auto-reordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contempla un ácido nucleico que forma complejo con Lipofectamine (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen). La cantidad de liposomas usada puede variar según la naturaleza del liposoma así como también la célula usada, por ejemplo, puede contemplarse ADN de vector de alrededor de 5 a alrededor de 20 µg por cada 1 a 100 millones de células.

La entrega de ácido nucleico mediada por liposoma y la expresión de ADN exógeno *in vitro* han sido muy exitosas

(Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987). Se ha demostrado la posibilidad de entrega mediada por liposoma y de expresión de ADN exógeno en embriones de pollo cultivados, células de hepatoma y HeLa (Wong y col., 1980).

En ciertas realizaciones de la invención, un liposoma puede formar complejo con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve el ingreso celular del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda y col., 1989). En otras realizaciones, un liposoma puede formar complejo o puede emplearse junto con proteínas cromosómicas no histonas nucleares (HMG-1) (Kato y col., 1991). En aun otras realizaciones, un liposoma puede formar complejo o puede emplearse junto con ambos, VHJ y HMG-1. En otras realizaciones, un vehículo de entrega puede comprender un ligando y un liposoma.

ii. Electroporación

En ciertas realizaciones de la presente invención, se introduce un ácido nucleico en una célula vía electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alta tensión. Las células receptoras pueden hacerse más susceptibles a la transformación por enrollamiento mecánico. Asimismo, la cantidad de vectores usada puede variar según la naturaleza de las células usadas, por ejemplo, puede contemplarse ADN de vector de alrededor de 5 a alrededor de 20 µg por cada 1 a 100 millones de células.

La transfección de células eucariotas usando electroporación ha resultado bastante exitosa. Se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con genes de inmunoglobulina kappa humana (Potter y col., 1984), y se han transfectado hepatocitos de rata con gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa y col., 1986) de esta manera.

iii. Fosfato de calcio

En otras realizaciones de la presente invención, se introduce un ácido nucleico en células usando precipitación de fosfato de calcio. Se han transfectado células humanas KB con ADN adenovirus 5 (Graham y Van Der Eb, 1973) usando esta técnica. Asimismo, de esta manera, se transfectaron células L(A9) de ratón, C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, 1987), y se transfectaron hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores (Rippe y col., 1990).

iv. DEAE-dextrano

En otra realización, se entregó un ácido nucleico en una célula usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos indicadores en células de eritroleucemia y mieloma de ratón (Gopal, 1985).

VII. Factores de reprogramación

La generación de células MPi es crucial para los factores de reprogramación usados para la inducción. Podrían usarse los siguientes factores o su combinación en los métodos desvelados en la presente invención. En ciertos aspectos, se incluirán los ácidos nucleicos que codifican Sox y Oct (particularmente Oct3/4) en el vector de reprogramación. Por ejemplo, uno o más vectores de reprogramación pueden comprender casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Nanog y opcionalmente, Lin28, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Klf4 y opcionalmente C-myc o L-myc, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, y opcionalmente Esrrb, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Nanog, Lin28, Klf4, ya sea C-myc o L-myc, y opcionalmente antígeno T grande de SV40. Los ácidos nucleicos que codifican estos factores de reprogramación pueden estar comprendidos en el mismo casete de expresión, en diferentes casetes de expresión, el mismo vector de reprogramación, o vectores de reprogramación diferentes.

Oct4 y ciertos miembros de la familia de genes Sox (Sox1, Sox2, Sox3 y Sox15) han sido identificados como reguladores transcripcionales cruciales involucrados en el proceso de inducción cuya ausencia impide la inducción. Sin embargo, se han identificado genes adicionales, incluso ciertos miembros de la familia Klf (Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5), la familia Myc (C-myc, L-myc y N-myc), Nanog y Lin28, para aumentar la eficacia de la inducción.

Oct 4 (Pou5f1) es uno de la familia de factores de transcripción de octámero ("Oct") y cumple una función crucial para mantener la pluripotencia. La ausencia de Oct4 en células Oct4+, tales como blastómero y células madre embrionarias, conduce a una diferenciación espontánea de trofoblasto, y la presencia de Oct4 da origen, así, a la pluripotencia y la diferenciación potencial de células madre embrionarias. Otros varios genes de la familia "Oct", incluso los familiares cercanos de Oct4, Oct1 y Oct6, fracasan en suscitar la inducción, lo que demuestra la exclusividad de Oct4 para el proceso de inducción.

La familia de genes Sox está asociada con el mantenimiento de la pluripotencia, similar a Oct4, aunque está asociada con células madre multipotentes y unipotentes en oposición a Oct4, que está exclusivamente expresada en células madre pluripotentes. Si bien Sox2 fue el gen inicial usado para la inducción de reprogramación, se ha descubierto que otros genes de la familia Sox funcionan también en el proceso de inducción. Sox1 rinde células MPi con una eficacia similar a Sox2, y los genes Sox3, Sox15 y Sox18 también generan células MPi, aunque con una eficacia menor.

En células madre embrionarias, Nanog, junto con Oct4 y Sox2, es necesario para promover la pluripotencia. Por lo tanto, fue sorprendente cuando Yamanaka y col. informaron que Nanog era innecesario para la inducción aunque Thomson y col. ha informado que es posible generar células MPi con Nanog como uno de los factores.

Lin28 es una proteína de unión a ARNm expresada en células madre embrionarias y células de carcinoma embrionario asociada con la diferenciación y la proliferación. Thomson y col. demostraron que es un factor en la generación de MPi, aunque es innecesario.

Klf4 de la familia de genes Klf fue inicialmente identificado por Yamanaka y col. y confirmado por Jaenisch y col. como un factor para la generación de células MPi de ratón y Yamanaka y col. demostraron que es un factor para la generación de células MPi humanas. Sin embargo, Thompson y col. informaron que Klf4 era innecesario para la generación de células MPi humanas y que, de hecho, fracasó en generar células MPi humanas. Se descubrió que Klf2 y Klf4 son factores capaces de generar células MPi, y los genes relacionados Klf1 y Klf5 también lo eran, aunque con una eficacia menor.

La familia de genes Myc son proto-oncogenes implicados en el cáncer. Yamanaka y col. y Jaenisch y col. demostraron que C-myc es un factor implicado en la generación de células MPi de ratón y Yamanaka y col. demostraron que era un factor implicado en la generación de células MPi humanas. Sin embargo, Thomson y col. y Yamanaka y col. informaron que C-myc era innecesario para la generación de células MPi humanas. El uso de la familia de genes "Myc" en la inducción de células MPi es preocupante por la posibilidad de las células MPi como tratamientos clínicos, dado que 25 % de los ratones trasplantados con células MPi inducidas con C-myc desarrollaron teratomas mortales. Se han identificado N-myc y L-myc para inducir en vez de C-myc con una eficacia similar.

Puede usarse el antígeno grande de SV40 para reducir o evitar la citotoxicidad que puede producirse cuando se expresa C-myc.

Pueden sustituirse las proteínas de reprogramación usadas en la presente invención por homólogos de proteínas con aproximadamente las mismas funciones de reprogramación. También podrían usarse ácidos nucleicos que codifican esos homólogos para la reprogramación. Se prefieren las sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, por ejemplo, aspártico-glutámico como aminoácidos polares ácidos; lisina/arginina/histidina como aminoácidos polares básicos; leucina/isoleucina/metionina/valina/alanina/glicina/prolina como aminoácidos hidrófobos o no polares; serina/treonina como aminoácidos hidrófilos polares o sin carga. La sustitución de aminoácidos conservadora también incluye agrupamientos basados en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos con cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que el reemplazo de una leucina por una isoleucina o una valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado no ejercerá un efecto significativo en las propiedades del polipéptido resultante. Si un cambio de aminoácidos da como resultado un polipéptido funcional puede determinarse fácilmente con un ensayo de la actividad específica del polipéptido.

VIII. Selección y diferenciación de células MPi

En ciertos aspectos de la invención, después de introducir los factores de reprogramación en células progenitoras hematopoyéticas, las células serán cultivadas tal como se describió con anterioridad (opcionalmente seleccionadas para la presencia de elementos de vector como marcador de selección positiva o cribado para concentrar células transfectadas). Los vectores de reprogramación pueden expresar factores de reprogramación en estas células y se replican y particionan junto con la división celular. Como alternativa, las proteínas de reprogramación podrían ingresar en estas células y su progenie por medio de relleno que contenga las proteínas de reprogramación. Estos factores de reprogramación reprogramarán el genoma de células somáticas para establecer un estado pluripotente de auto-sustentación, y con el tiempo, después de la retirada de la selección positiva de la presencia de vectores, se perderán los elementos genéticos exógenos gradualmente, sin necesidad de agregar proteínas de reprogramación suplementarias.

Estas células madre pluripotentes inducidas podrían seleccionarse a partir de una progenie derivada de estas células de sangre periférica basadas en características de células madre embrionarias dado que se espera que sean sustancialmente idénticas a células madre embrionarias pluripotentes. También podría emplearse una etapa de selección negativa adicional para acelerar o colaborar en la selección de células MPi esencialmente libres de elementos genéticos exógenos realizando una prueba sobre la ausencia de ADN de vector de reprogramación o usando marcadores de selección, tales como indicadores.

A. Selección de las características de células madre embrionarias

Las CMPi generadas con éxito a partir de estudios previos fueron significativamente similares a las células madre pluripotentes aisladas naturalmente (tales como las células madre embrionarias humanas y de ratón, CMEh y CMEr, respectivamente) en los siguientes aspectos, conformando así la identidad, autenticidad y pluripotencia de las CMPi respecto de células madre pluripotentes aisladas naturalmente. Así, podrían seleccionarse células madre pluripotentes inducidas generadas a partir de los métodos desvelados en la presente invención basado en una o más de las siguientes características de las células madre embrionarias.

i. Propiedades biológicas celulares

Morfología: las CMPi son morfológicamente similares a las CME. Cada célula puede tener forma circular, nucleolos dobles o un gran nucleolo y escaso citoplasma. Las colonias de CMPi también podrían ser similares a las de las CME. Las CMPi humanas forman colonias de límites definidos, planas y densamente pobladas similares a las CMEh y las CMPi de ratón forman colonias similares a las CMEr, colonias menos planas y más agrupadas que las de las CMEh.

Propiedades de desarrollo: el tiempo de duplicación y la actividad mitótica son las piedras angulares de las CME, ya que las células madre deben auto-renovarse como parte de su definición. Las CMPi podrían ser mitóticamente activas, auto-renovarse activamente, proliferar y dividirse a una velocidad igual a las CME.

Marcadores de células madre: Las CMPi pueden expresar marcadores antigénicos de superficie celular expresados en CMEh. Las CMPi humanas expresaron los marcadores específicos de CMEh, incluyendo, pero sin limitaciones, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E y Nanog. Las CMPi de ratón expresaron SSEA-1 pero no SSEA-3 ni SSEA-4, de forma similar a las CME.

Genes de célula madre: las CMPi pueden expresar genes expresados en CME no diferenciadas, incluyendo Oct4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4 y TITEh.

Actividad de la telomerasa: las telomerasas son necesarias para sostener la división celular no restringida por el límite de Hayflick de ~divisiones celulares. Las CMEh expresan una alta actividad de la telomerasa para sostener la auto-renovación y la proliferación, y las CMPi también demuestran una alta actividad de la telomerasa y expresan TITEh (transcriptasa inversa de telomerasa humana), un componente necesario en el complejo de la proteína telomerasa.

Pluripotencia: las CMPi serán capaces de diferenciarse de una manera similar a las CME en tejidos completamente diferenciados.

Diferenciación neutra: las CMPi podrían diferenciarse en neuronas, expresando tubulina β III, tirosina hidroxilasa, AADC, DAT, ChAT, LMX1B y MAP2. La presencia de enzimas asociadas a la catecolamina puede indicar que las CMPi, como las CMEh, pueden ser diferenciables en neuronas dopaminérgicas. Los genes asociados con células madre se regularán negativamente después de la diferenciación.

Diferenciación cardíaca: las CMPi podrían diferenciarse en cardiomiocitos que comenzarían a latir espontáneamente. Los cardiomiocitos expresan cTnT, MEF2C, MYL2A, MYHCp y NKX2.5. Los genes asociados con células madre se regularán negativamente después de la diferenciación.

Formación de teratoma: las CMPi inyectadas en ratones inmunodeficientes pueden formar espontáneamente teratomas después de cierto tiempo, tal como nueve semanas. Los teratomas son tumores de múltiples linajes que contienen tejido derivado de tres capas germinales, el endodermo, el mesodermo y el ectodermo; a diferencia de otros tumores, este es normalmente de un solo tipo de célula. La formación de teratoma es una prueba destacada para la pluripotencia.

Cuerpo embrioide: Las CMEh en cultivo forman espontáneamente estructuras esféricas tipo embrionarias denominadas "cuerpos embrioides", que consisten en un núcleo de CMEh mitóticamente activas y de diferenciación y una periferia de células completamente diferenciadas de las tres capas germinales. Las CMPi también forman cuerpos embrioides y tienen células periféricas diferenciadas.

Inyección de blastocistos: Las CMEh residen dentro de la masa celular interna (embrioblasto) de los blastocistos, y en el embrioblasto, se diferencian en el embrión mientras que la capa del blastocisto (trofoblasto) se diferencia en tejidos extraembrionarios. El trofoblasto hueco es incapaz de formar un embrión vivo, y así, es necesario que las células madre embrionarias dentro del embrioblasto se diferencien y formen el embrión. Las CMPi inyectadas con micropipeta en un trofoblasto para generar un blastocisto transferido a hembras receptoras pueden dar como resultado crías de ratones quiméricos vivos: ratones con derivados de CMPi incorporadas en todo el cuerpo con 10 %-90 y quimerismo.

ii. Reprogramación epigenética

Desmetilación del promotor: la metilación es la transferencia de un grupo metilo a una base de ADN, normalmente la transferencia de un grupo metilo a una molécula de citosina en un sitio CpG (secuencia adyacente de citosina/guanina). La metilación amplia de un gen interfiere con la expresión evitando la actividad de proteínas de expresión o enzimas de reclutamiento que interfieren con la expresión. Así, la metilación de un gen lo silencia eficazmente evitando la transcripción. Los promotores de genes asociados con la pluripotencia, inclusive Oct4, Rex1 y Nanog, pueden desmetilarse en CMPI, mostrando su actividad promotora y la expresión y promoción activa de genes asociados con la pluripotencia en CMPI.

Desmetilación de histona: las histonas son proteínas de compactación que están estructuralmente ubicadas en secuencias de ADN que pueden afectar su actividad a través de varias modificaciones relacionadas con la cromatina. Las histonas H3 asociadas con Oct4, Sox2 y Nanog pueden desmetilarse para activar la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog.

B. Selección de característica libre de restos

Un vector de reprogramación tal como un vector basado en oriP en la presente invención podría replicarse extracromosómicamente y perder su presencia en células hospedadoras después de generaciones. Sin embargo, una etapa de selección adicional de células de progenie esencialmente libres de elementos de vectores exógenos puede facilitar este proceso. Por ejemplo, puede extraerse una muestra de célula de progenie para evaluar la presencia o la pérdida de elementos de vectores exógenos conocidos en la materia (Leight y Sugden, 2001).

Un vector de reprogramación puede comprender, además, un marcador de selección, más específicamente, un marcador de selección negativa, tal como un gen que codifique una timidina cinasa para seleccionar células de progenie esencialmente libres de un marcador de selección como este. El gen de timidina cinasa tipo 1 del virus del herpes simple humano (HSVtk) actúa como un marcador mortal condicional en células de mamífero. La enzima codificada por HSVtk es capaz de fosforilar ciertos análogos de nucleósidos (por ejemplo, ganciclovir, un fármaco antiherpético), convirtiéndolos así en inhibidores de replicación de ADN tóxicos. Un enfoque alternativo o complementario es evaluar la ausencia de elementos genéticos exógenos en células de progenie, usando métodos convencionales, tales como RT-PCR, PCR, FISH (hibridación fluorescente *in situ*), matriz de genes o hibridación (por ejemplo, transferencia de Southern).

C. Diferenciación de células MPI

Pueden usarse varios enfoques con la presente invención para diferenciar células MPI en linajes celulares incluyendo, pero sin limitaciones, células hematopoyéticas, miocitos (por ejemplo, cardiomiocitos), neuronas, fibroblastos y células epidérmicas, y tejidos u órganos derivados de los mismos. Métodos a modo de ejemplo de diferenciación hematopoyética de células MPI pueden incluir, por ejemplo, métodos descritos por la Solicitud de Estados Unidos n.º 61/088.054 y 61/156.304, ambas incorporadas por referencia al presente documento en su totalidad, o métodos basados en cuerpos embrioides (CE) (Chadwick y col., 2003; Ng y col., 2005). También pueden usarse métodos de diferenciación de fibronectina para diferenciación de linajes sanguíneos, tal como lo ejemplifican Wang y col., 2007. Métodos a modo de ejemplo de diferenciación cardíaca de células MPI pueden incluir métodos de cuerpos embrioides (CE) (Zhang y col., 2009), métodos de células estromales OP9 (Narazaki y col., 2008) o métodos químicos/factor de crecimiento (véanse las publicaciones de patentes de Estados Unidos n.º 20080038820, 20080226558, 20080254003 y 20090047739, todas incorporadas por referencia al presente documento en su totalidad).

IX. Ejemplos

Los siguientes ejemplos son incluidos como ejemplos de referencia. Los expertos en la materia sabrán apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor descubrió que funcionan bien en la práctica de la invención, y de esta manera, puede considerarse que constituyen modos de preferencia para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún se obtiene un resultado similar o parecido sin alejarse del espíritu ni del alcance de la invención.

Ejemplo de referencia 1

Generación de células MPI a partir de células progenitoras hematopoyéticas

Tal como lo muestra la Fig. 1, se procesó sangre periférica normal no movilizada de pacientes para recolectar CMSP y se la purificó para enriquecer en células que expresan CD34. Luego, se sembraron esas células para permitir la expansión y se las transfeció dentro de aproximadamente 1 semana de la siembra. Después, se las dejó durante un periodo de un día de incubación posterior a la transfección seguido de un periodo de recuperación de aproximadamente 1-2 días y se las pasó a 100 % de medio de reprogramación. Cuando se hicieron evidentes las células unidas y las colonias sueltas, se pasó gradualmente el medio a TESR2 para soportar la formación de células MPI.

Ejemplo de referencia 2

Optimización de la generación de células MPi a partir de células progenitoras hematopoyéticas usando vectores de reprogramación policistronicos

Se recolectó sangre completa humana en recipientes Vacutainer (intervalo de volúmenes a ser incluidos aquí de 150 ml).

Se separaron CMSP de la sangre completa humana y se las congeló o bien se las procesó de inmediato para aislar las células CD34.

Se aplicaron anticuerpos dirigidos contra CD34 a las CMSP procesadas a partir de sangre periférica y se las separó manual o automáticamente.

Se determinó la pureza por citometría de flujo (Accuri; Ann Arbor, MI, EE. UU.) para detectar el porcentaje de células que expresan CD34 y el marcador más general, CD45, para detectar todos los progenitores hematopoyéticos. La pureza de las fracciones separadas había oscilado de 20-96 % positivo para la expresión de CD34.

Se congelaron o se incubaron de inmediato las células enriquecidas para la expresión de CD34 con ADNasal (U/ml) durante 10 minutos a 37 °C. Esta etapa asegura la eliminación del ADN liberado cuando las células se lisan por las tensiones facilitadas por descongelamiento, purificación, etc. y limita el apelmazamiento de las células. Se centrifugaron las células y se retiró el sobrenadante que contenía la ADNasa. Luego, se dejó recuperar a las células durante una noche.

Las células de expresión de CD34 son expansibles usando medio enriquecido con citocina. Se descubrió en este Ejemplo que el medio enriquecido con citocina solo es suficiente para expandir el número total de células en al menos 3 casos independientes.

Medio enriquecido con citocina: 300 ng/ml de cada uno: trombopoyetina (TPO), Flt3 y factor de células madre (SCF). 100 ng/ml de Interleucina 6 (IL6) y 10 ng/ml de Interleucina 3 (IL3). El medio basal consiste en albúmina de suero bovino (ASB), insulina humana recombinante, transferrina humana saturada con hierro, 2-mercaptoetanol, MDM de Iscove y suplementos adicionales (definidos como Libres de matriz en las FIGS. 2A-2C). En una realización de preferencia, la ASB puede omitirse completamente. Además, se usan componentes totalmente definidos en este medio. Como alternativa, puede usarse StemSpan H3000 (Stem Cell Technologies, número de catálogo 9850) suplementado con las concentraciones detalladas con anterioridad de TPO libre de contenido animal, Flt3, SCF, IL6 e IL3.

Las células de expresión de CD34 son expansibles usando medio enriquecido con citocina acoplado con fragmentos de fibronectina. Se observó en este Ejemplo que las células CD34+ pueden expandirse aún más en presencia de un fragmento humano recombinante de fibronectina. Se trata de 574 aminoácidos (63 kDa) y contiene un dominio de unión celular central (repetición de tipo III, 8, 9, 10), un dominio II de unión a heparina de alta afinidad (repetición de tipo III, 12, 13, 14) y sitio CS1 dentro de la región IIICS alternativamente cortada y empalmada de fibronectina humana (comercializada por RetroNectin®, Takara). Se mezclaron los fragmentos de fibronectina con PBS en 5 ug/ml y se los depositó sobre placas de cultivo de tejido sin tratar (definido como Notchen las FIGS. 2A-2C).

Las células de expresión de CD34 son expansibles usando medio enriquecido con citocina acoplado con fragmentos de fibronectina y ligando de Notch-1 manipulado inmovilizado (Delta 1ext-IgG, DLL1). Delaney y col. demuestran una expansión de células CD34+ de más de 100 veces a partir de sangre de cordón umbilical usando ligando de Notch-1 (Delaney y col., 2010). Se descubrió en este Ejemplo que las células CD34+ derivadas de sangre periférica también son expansibles en presencia de ligando de Notch-1 usando un enfoque similar. (Definido como Notch+ en las FIGS. 2A-2C). El ligando es un péptido humano que representa el dominio extracelular de proteína tipo delta recombinante 1 (DLL1; aa 1-545) fusionado al extremo C de la porción Fc de la inmunoglobulina G.

Expansión de células CD34+ sin matriz o ligando de Notch-1 Se sembraron esencialmente células a 6×10^3 por cada pocillo (placas de 24 pocillos) o 1×10^5 por pocillo (placas de 6 pocillos), se las alimentó 4 días después y se las transfectó 6 días después a la expansión. Las FIGS. 2A-2C demuestran el número de veces de la expansión a lo largo del tiempo, la velocidad de desarrollo de la población total y el declive natural de la expresión de CD34 durante ese marco temporal.

En el día 6 posterior a la expansión se recolectaron las células de la condición libre de matriz y se las transfectó con una combinación de plásmidos que contenían el oriP-replicón. Los factores de reprogramación expresados a partir de estos plásmidos pueden incluir cualquier combinación de lo siguiente: Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, C-myc o L-myc, klf4, y antígeno T grande de SV40 (FIG. 3). Se usó el dispositivo Lonza Nucleofector para transfección en una cubeta o la versión de transporte de 96 pocillos para transfectar de 2.5×10^4 a 1.5×10^6 células. La Tabla 1 siguiente muestra resultados representativos posteriores a la transfección usando un plásmido basado en oriP que codifica PVFe en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de sangre que incluyen células CD34+. La tabla refleja los resultados

de una transfección de muestra usando números crecientes de PH de entrada expandidas a partir de sangre periférica. Se transfectaron las células con un plásmido de control que carecía de los casetes de expresión para los factores de reprogramación. Se determinó la eficacia de la transfección (% PVF+) calculando el porcentaje de la población que no tiene una tinción positiva para yoduro de propidio (YP).

Tabla 1 - Resultados de la transfección

	Número de células transfectadas		
	5,5x10 ⁵	7,5x10 ⁵	1,2x10 ⁶
% PVF+	43	38	37
% YP-	21	22	27

Después de la transfección, se volvieron a suspender las células en el mismo medio rico en citocina usado para la expansión y se las incubó durante una noche para su recuperación. Al día siguiente, se centrifugaron las células y se renovó el medio con medio rico en citocina y se prepararon las placas receptoras.

Preparación de placa de reprogramación receptora. 24 horas después de la transfección, se recubrieron placas de 6 pocillos sin tratar con RetroNectin® (10 ug/pocillo).

48 horas después de la transfección, se lavaron las placas con PBS, se bloquearon con 2 % de ASB y se las lavó nuevamente. Opcionalmente, puede omitirse la etapa de bloqueo con 2 % de ASB para condiciones de cultivo exentas de contenido animal. Se llevó al volumen las células transfectadas con medio de reprogramación (Tabla 2) para sembrar 2 ml de células sobre placas receptoras preparadas usando una densidad comprendida entre 3x10⁴ y 3x10⁵ células por pocillo.

Tabla 2 - Medio de reprogramación

Componentes	Proveedor	Concent. final
StemSpan	StemCellTechnologies	
suplemento N-2 (100x)	Invitrogen	1x
suplemento B-27 (50x)	Invitrogen	1x
NEAA (100x)	Invitrogen	1x
Glutamax (100x)	Invitrogen	0,5x
β-mercaptoetanol	Sigma	1,7 µl
PD0325901	StemGent	0,5 µM
CHIR99021	StemGent	3 µM
A-83-01	StemGente	0,5 µM
HA-100	StemGent	10 µM
FGF de pez cebra	producción propia	100 ng/ml

Alimentación de cultivos de reprogramación. Se alimentaron las células día por medio. Para la primera alimentación, se agregaron 2 ml de medio a cada pocillo, y no se retiró el medio. Para las alimentaciones siguientes, se retiraron con cuidado 2 ml de cada pocillo y se los reemplazó por medio fresco. Las células comenzaron a unirse 24 horas después de ser colocadas en placa y comenzaron a formarse colonias sueltas alrededor de la semana 1. Se pasaron los cultivos a TESR2 (StemCell Technologies) sin moléculas pequeñas a los aproximadamente 7-10 días. Esto representará un cambio gradual dado que quedarán 2 ml del medio anterior. Si se han formado suficientes colonias jóvenes, puede retirarse más medio de los pocillos para que la mayor parte del medio presente sea fresco. Las colonias de CMPi circulares rodeadas por células diferenciadas no reprogramadas emergieron aproximadamente 20 días después de la transfección. Las células que rodeaban las colonias de CMPi representan células sanguíneas que se han adherido a la matriz o células parcialmente reprogramadas que han comenzado a diferenciarse. Con el uso de inhibidores de señalización de molécula pequeña, se anidaron con frecuencia colonias de CMPi reales (Tra1- 81 positivo) dentro de áreas sin CMPi más sueltas o debajo de células más diferenciadas.

La FIG. 4 muestra mapas esquemáticos de plásmidos de reprogramación basados en OriP que contienen mensajes policistónicos (combinación de Conjunto 1 y Conjunto 2). Se expandieron las células purificadas a partir de CMSP durante 3 o 6 días. Se transfectó un intervalo de números de células de entrada con un plásmido basado en oriP/ANEB-1 de control que expresa PVF. Se transfectaron las CMSP expandidas el día 3 y 6 a partir de donante GG con los plásmidos de reprogramación tal cual se describió con anterioridad.

Se evaluó la eficacia de la transfección de números menores de células enriquecidas en CD34 derivadas de CMSP recolectadas por leucoforesis calculando el porcentaje de células viables que expresan PVF detectadas por citometría de flujo. También se determinó la viabilidad identificando la fracción de células negativas a azul tripano el día posterior a la transfección dividido por el número total de células de entrada y estaba aproximadamente 30 % dentro de un intervalo de 1x10⁴ a 1x10⁵ células de entrada (los datos no se muestran). La eficacia de la transfección fue de 30 % cuando el número de células de entrada varió de 1x10⁴ a 3x10⁴ y aproximadamente 40 % cuando varió de 6x10⁴ a 1x10⁵ células (FIG. 5A). Se expandieron células purificadas a partir de CMSP durante 3 o 6 días y se transfectaron de 6x10⁴ a 1x10⁵ células con el plásmido de control que expresa PVF. La eficacia de la transfección fue dos veces mayor

cuando se realizaron transfecciones en células expandidas durante 3 días en vez de 6 días cuando la expresión de CD34 fue mayor (FIG. 5B). Además, más de 90 % de las células transfectadas el día 3 coexpresó PVF y CD34 mientras que solo 18 % de la población transfectada el día 6 co-expresó ambos marcadores (FIG. 5C). Sin embargo, los 6 días de expansión sí aumentaron el número global de células para transfección. Estos resultados fundamentan la noción de que las condiciones seleccionadas para este protocolo favorecen la transfección de células que expresan CD34 con respecto a otros tipos de células en la población.

Los fragmentos de proteínas recombinantes que contenían los dominios activos de fibronectina humana (RetroNectin) o vitronectina soportaron sistemáticamente la formación de CMPi mejor que otros evaluados. La eficacia de la formación de colonias en placas recubiertas con RetroNectin mejoró significativamente cuando se las usó en combinación con medio StemSpamSFEM, N2, B27 y un cóctel de moléculas pequeñas que incluía PD0325901, CHIR99021, A-83-01 y HA-100 (FIG. 5D). Se muestra un solo pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene colonias de tinción positiva para la actividad de fosfatasa alcalina (FIG. 5D, panel i). La cabeza de flecha blanca señala la colonia ampliada en el panel ii que también tiene una coloración positiva para la expresión de Tra1 - 81, panel iii.

Para optimizar los números de células de entrada se realizaron ensayos de reprogramación usando el Conjunto de plásmidos 2 en un intervalo de números de células de entrada expandidas durante 6 días (donante GG) (FIG-5E).

Podría usarse L-myc en vez de C-myc con una eficacia de reprogramación potencialmente mayor. Tal como lo muestra la FIG. 5F, se expandieron las células de expresión de CD34 purificadas de cuatro donantes diferentes durante 6 días y se las transfectó usando la combinación de plásmidos que expresa C-myc (Conjunto 1) o L-myc (Conjunto 2) como comparación y se comparó el número total de CMPi resultantes de cada uno.

Para lograr un cultivo exento de sustancias xenógenas sin necesidad de componente animal en el suplemento B-27, se demostró que el suplemento B-27 podría omitirse completamente en el medio de reprogramación según la FIG. 6.

Se mostró que la cantidad de expresión de CD34 se correlaciona con la eficacia de la reprogramación (FIGS. 7A-7B). El aislamiento de las células de expresión de CD34 a partir de CMPi crea una etapa adicional en el proceso; por lo tanto, fue importante determinar si de hecho existía una correlación entre la eficacia de expresión de CD34 y la de reprogramación usando el método detallado en el presente documento. El siguiente conjunto de experimentos confirmó esta correlación. En primer lugar, se consideraron a las poblaciones de células hospedadoras exentas de niveles detectables de linfocitos T, B y NK en los días 3 y 6 de la expansión por citometría de flujo usando anticuerpos dirigidos a CD3, CD19 y CD56 (n=9, los datos no se muestran). En segundo lugar, la población de células sin CD34 que consistía en 45 % de CD3, 10 % de CD19, 20 % de CD56 no fue capaz de producir CMPi usando el protocolo exento de células alimentarias del presente documento (FIG. 7A, ii) como lo hacen las contrapartes purificadas para la expresión de CD34 en paralelo (n=3, FIG. 7A, i). En tercer lugar, se purificaron las células de expresión de CD34 de donantes adicionales, se las transfectó en días diferentes de expansión que coincidieron con niveles reducidos de expresión de CD34 y se las reprogramó. La eficacia de la reprogramación fue menor que el porcentaje de expresión de CD34 reducido en los cuatro donantes (FIG. 7B). Por ejemplo, el donante 3096 exhibió más de 90 CMPi por cada 1×10^5 células de entrada cuando se las transfectó después de 3 días de expansión respecto de 1 CMPi por cada 1×10^5 cuando se expandieron durante otros 10 días cuando los niveles de expresión de CD34 son más de un tercio más bajos. Este resultado corrobora las observaciones anteriores del presente documento demostrando mejores eficacias de transfección en 3 días respecto de 6 días de expansión en donde el porcentaje de CD34 es mayor. En resumen, estos datos fundamentan la noción de que la cantidad de expresión de CD34 dentro de una población de células hematopoyéticas se correlaciona con su capacidad de reprogramarse usando el método exento de células alimentarias detallado en el presente documento.

La cantidad de veces de expansión de células que expresan CD34 cultivadas en condiciones completamente definidas o normales se detalla en la FIG. 8A. La capacidad de generar CMPi usando un método completamente definido de reprogramación minimizará aún más la variación y facilitará la producción de CMPi de calidad clínica. Se purificó un gran agrupamiento de células de expresión de CD34 y se las mezcló de múltiples donantes para asegurar el número de células requerido para múltiples pruebas. Se expandieron con éxito unas células purificadas en medios completamente definidos en una magnitud de 113 ± 11 veces en comparación con 83 ± 32 veces para células en condiciones normales después de 6 días de expansión. El número absoluto de células que expresan CD34 es similar entre las dos poblaciones cuando se multiplica por el porcentaje de la población que expresa CD34 por citometría de flujo a pesar de la diferencia de 30 veces entre las dos condiciones. Por ejemplo, 42 ± 13 % de la población expandida en condiciones normales expresó CD34 y 26 ± 16 % expresó CD34 usando condiciones completamente definidas. La imagen en la FIG. 8B representa un pocillo de una placa de 6 pocillos que contiene colonias con tinción positiva para fosfatasa alcalina después de la reprogramación de células expandidas enriquecidas para expresión de CD34 con reactivos sin contenido animal, completamente definidos.

Se propagaron múltiples clones de MPI de 26 donantes usando los métodos detallados en el presente documento y se seleccionó un subconjunto de clones para una caracterización adicional. Los clones exhibieron un cariotipo normal y se evaluó algunos en múltiples pases para confirmar su integridad genética en el tiempo. Los clones también expresaron los marcadores de superficie celular comunes Tra1-81 y SSEA-4 tal como se determinó por citometría de flujo así como también genes endógenos que indican pluripotencia incluyendo DNT3B, REX1, *TERT*, UTF1, Oct4,

Sox2, Nanog, Lin28, Klf4 y C-myc. También se confirmó que los clones estaban libres de ADN de plásmido extra-cromosómico e integrado. Se verificó la pérdida gradual de plásmidos transfectados con oriP recolectando CMPi en varios números de pases y se sometió a PCR con un límite de detección en 1 copia por cada célula y la pérdida fue detectable dentro de un intervalo promedio de 7 a 10 pases. Curiosamente, la pérdida de oriP fue evidente en los pases posteriores a 10 cuando se separaron las CMPi con EDTA en vez de dispasa. Además, tampoco hubo amplificación de segmentos de genes que indiquen el gen de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) o reordenamientos de receptores de linfocito T posteriores al análisis por PCR en el conjunto de muestras de CMPi evaluadas. La falta de dichos reordenamientos fundamenta la afirmación de que las células hospedadoras se originan a partir de un precursor hematopoyético y que el protocolo favorece selectivamente la producción de CMPi a partir de progenitores hematopoyéticos en vez de tipos de linfocitos T o B más diferenciados. Se evaluaron varios clones de CMPi de un solo donante para observar la competencia para formar neuronas. Además, cinco clones de MPI de tres donantes diferentes también formaron teratomas después de la inyección en ratones inmunodeficientes (SCID). Curiosamente, la presencia de ADN transfectado residual no pareció impedir la capacidad de formar teratomas dado que los clones de dos donantes no perdieron el ADN plásmido hasta el pase 15 y 18 respectivamente después de la inyección en ratones para los estudios de teratoma.

Todos los métodos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin una experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y los métodos de la presente invención han sido descritos en términos de realizaciones de preferencia, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variantes a los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin alejarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que se relacionen tanto química como fisiológicamente pueden ser sustituidos por los agentes descritos en el presente documento mientras se logren resultados iguales o similares. Todos dichos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la materia se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal cual se define en las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

Las referencias, en la medida en que proporcionan detalles de procedimientos a modo de ejemplo u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento, son las siguientes:

Patente de Estados Unidos n.º 4.714.680
 Patente de Estados Unidos n.º 5.478.838
 Patente de Estados Unidos n.º 5.728.581
 Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202
 Patente de Estados Unidos n.º 4.684.611
 Patente de Estados Unidos n.º 4.952.500
 Patente de Estados Unidos n.º 5.302.523
 Patente de Estados Unidos n.º 5.322.783
 Patente de Estados Unidos n.º 5.384.253
 Patente de Estados Unidos n.º 5.464.765
 Patente de Estados Unidos n.º 5.538.877
 Patente de Estados Unidos n.º 5.538.880
 Patente de Estados Unidos n.º 5.550.318
 Patente de Estados Unidos n.º 5.563.055
 Patente de Estados Unidos n.º 5.563.055
 Patente de Estados Unidos n.º 5.580.859
 Patente de Estados Unidos n.º 5.589.466
 Patente de Estados Unidos n.º 5.591.616
 Patente de Estados Unidos n.º 5.610.042
 Patente de Estados Unidos n.º 5.656.610
 Patente de Estados Unidos n.º 5.702.932
 Patente de Estados Unidos n.º 5.736.524
 Patente de Estados Unidos n.º 5.780.448
 Patente de Estados Unidos n.º 5.789.215
 Patente de Estados Unidos n.º 5.925.565
 Patente de Estados Unidos n.º 5.928.906
 Patente de Estados Unidos n.º 5.935.819
 Patente de Estados Unidos n.º 5.945.100
 Patente de Estados Unidos n.º 5.981.274
 Patente de Estados Unidos n.º 5.994.624
 Solicitud de Estados Unidos 12/478.154 (Publicación de Estados Unidos 2010/0003757)
 Solicitud de Estados Unidos 61/058.858 (Publicación de Estados Unidos 2010/0003757)
 Solicitud de Estados Unidos 61/088.054 (Publicación de Estados Unidos 2010/0041054)
 Solicitud de Estados Unidos 61/156.304 (Publicación de Estados Unidos 2010/0279403)
 Solicitud de Estados Unidos 61/258.120 (Publicación de Estados Unidos 2011/0104125)

- Publicación de Estados Unidos 2003/0211603
 Publicación de Estados Unidos 2007/0238170
 Publicación de Estados Unidos 2008/0038820
 Publicación de Estados Unidos 2008/0226558
 5 Publicación de Estados Unidos 2008/0254003
 Publicación de Estados Unidos 2009/0047739
 Publicación de Estados Unidos 2002/0076976
 Publicación de Estados Unidos 2003/0059913
 Publicación de Estados Unidos 2003/0087919
 10 Publicación de Estados Unidos 2004/0002507
 Publicación de Estados Unidos 2004/0002508
 Publicación de Estados Unidos 2004/0014755
 Publicación de Estados Unidos 2004/0039796
 Publicación de Estados Unidos 2005/0192304
 15 Publicación de Estados Unidos 2005/0209261
 Publicación de Estados Unidos 2008/004287
 Publicación de Estados Unidos 2007/0116680
- Aasen y Belmonte, *Nat. Protoc.*, 5(2): 371-382, 2010.
 20 Abboud y col., *Blood*, 58: 1148-1154, 1981.
 Adams, J. *Viol.*, 61(5): 1743-1746, 1987.
 Aiyar y col., *EMBO J.*, 17(21): 6394-6403, 1998.
 Akkina y col., *J. Virol.*, 70(4): 2581-2585, 1996.
 Alexander y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU.*, 85: 5092-5096, 1988.
 25 Altmann y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 103(38): 14188-14193, 2006.
 Andrews y col., En: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*, Robertson (Ed.), IRL Press, 207-246, 1987.
 Aravind y Landsman, *Nucleic Acids Res.*, 26(19): 4413-4421, 1998.
 Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
 30 Baer y col., *Biochemistry*, 39: 7041-7049, 2000.
 Baer y col., *Nature*, 310(5974): 207-211, 1984.
 Bain y col., *Biochem. J.*, 408(3): 297-315, 2007.
 Bennett y col., *J. Biol. Chem.*, 277: 34, 2002.
 Bertrand y col., *J. Mol. Biol.*, 333(2): 393-407, 2003.
 35 Bingham, *Cell*, 90(3): 385-387, 1997.
 Biswas y col., *Annals NY Acad. Sci.*, 590: 582-583, 1990. Biswas y col., *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2228-2233, 1991.
 Bochkarev y col., *Cell*, 84(5): 791-800, 1996.
 Bode y col., *Biol. Chem.*, 381: 801-813, 2000.
 Bode y col., *Gene Ther. Mol. Biol.*, 6: 33-46, 2001.
 40 Bode y col., *Science*, 255(5041): 195-197, 1992.
 Carbonelli y col., *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1): 75-82, 1999.
 Chadwick y col., *Blood*, 102(3): 906-15, 2003.
 Chandler y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 94(8): 3596-601, 1997.
 Chang y col., *Frontiers in Bioscience*, 12: 4393-4401, 2007.
 45 Chaudhuri y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 98(18): 10085-10089, 2001. Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8): 2745-2752, 1987.
 Chin y col., *Molecular Brain Res.*, 137(1-2): 193-201, 2005.
 Chow y col., *Cytometry Commun. Clinical Cytometry*, 46: 72-78, 2001.
 Christ y col., *Haematologica*, 92(9): 1165-72, 2007.
 50 Cocea, *Biotechniques*, 23(5): 814-816, 1997.
 DaCosta y col., *Molec. Pharmacol.*, 65(3): 744-752, 2004.
 Davies y col., *Biochem J.*, 351: 95-105, 2000.
 de Gouville y col., *Drug News Perspective*, 19(2): 85-90, 2006.
 deFelipe, *Prog. Brain Res.*, 136: 215-38, 2002.
 55 Delaney y col., *Nat. Med.*, 16(2): 232-236, 2010.
 Dhar y col., *Cell*, 106(3): 287-296, 2001.
 Downey y col., *J. Biol. Chem.*, 271(35): 21005-21011, 1996.
 Eliasson y Jonsson, *J. Cell Physiol.*, 222(1): 17-22, 2010.
 English y col., *Trends in Pharmac. Sci.*, 23(1): 40-45, 2002.
 60 Ercolani y col., *J. Biol. Chem.*, 263: 15335-15341, 1988. Ermakova y col., *J. Biol. Chem.*, 271(51): 33009-33017, 1996.
 Evans, y col., En: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Devita y col. (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
 Fauser y col., *Stem Cells*, 1: 73-80, 1981
 65 Fechtmeier y col., *Proc Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 84: 8463-8467, 1987.
 Fernandes y col., *Nature Cell Biology*, 6: 1082-1093, 2004.

- Fischer y col., *J. Virol.*, 71: 5148-5146, 1997.
- Fraley y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 76: 3348-3352, 1979. Frame y col., *Biochemical J.*, 359: 1-16, 2001.
- Frappier y O'Donnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 88(23): 10875-10879, 1991.
- Gahn y Schildkraut, *Cell*, 58(3): 527-535, 1989.
- 5 Gahn y Sugden, *J. Virol.*, 69(4): 2633-2636, 1995.
- Garrick y col., *Nat. Genet.*, 18: 56-59, 1998.
- Gellibert y col., *J. Med. Chem.*, 49(7): 2210-2221, 2006.
- Ghosh y Bachhawat, En: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu y col. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- 10 Golde y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 77: 593-596, 1980. Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985.
- Gould y col., *Intl. J. Neuropsychopharmacology*, 7: 387-390, 2004.
- Gould y col., *Pharmacological Res.*, 48: 49-53, 2003.
- Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52: 456-467, 1973. Harb y col., *PLoS One*, 3(8):e3001, 2008.
- Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3): 1094-1099, 1985.
- 15 Haugland, En: *Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 1992-1994.
- Hegde y col., *Nature*, 359(6395): 505-512, 1992.
- Hess y col., *Blood*, 104(6): 1648-55, 2004.
- Hung y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 98(4): 1865-1870, 2001. Inman y col., *Molec. Pharmacol.*, 62(1): 65-74, 2002.
- 20 Jenke y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 101 (31), 11322-11327, 2004.
- Julien y col., *Virology*, 326(2): 317-328, 2004.
- Kadaja-Saarepuu y col., *Oncogene*, 27(12): 1705-1715, 2008.
- Kaeppeler y col., *Plant Cell Reports* 9: 415-418, 1990.
- Kaminska y col., *Acta Biochimica Polonica*, 52(2): 329-337, 2005.
- 25 Kanda y col., *Mol. Cell. Biol.*, 21(10): 3576-3588, 2001.
- Kaneda y col., *Science*, 243: 375-378, 1989.
- Karin y col., *Cell*, 36: 371-379, 1989.
- Kato y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364, 1991. Keller y col., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7(6): 862-9, 1995.
- Kennedy y Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 23(19): 6901-6908, 2003.
- 30 Kennedy y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 100: 14269-14274, 2003.
- Kim y col., *J. Biol. Chem.*, 275(40): 31245-31254, 2000.
- Kim y col., *J. Virol.*, 66: 3879-3882, 1992.
- Kim y col., *Virology*, 239(2): 340-351, 1997.
- Kim y col., *Xenobiotica*, 38(3): 325-339, 2008.
- 35 Kirchmaier y Sugden, *J. Virol.*, 69(2): 1280-1283, 1995.
- Kirchmaier y Sugden, *J. Virol.*, 72(6): 4657-4666, 1998.
- Klein y col., *Neoplasia*, 8: 1-8, 2006.
- Kleinman y col., *J. Biometer. Sci. Polymer Edn.*, 5: 1-11, 1993. Langle-Rouault y col., *J. Virol.*, 72(7): 6181-6185, 1998.
- 40 Leight y Sugden, *Mol. Cell Bio.*, 21: 4149-61, 2001.
- Levenson y col., *Hum. Gene Ther.*, 9(8): 1233-1236, 1998.
- Levitskaya y col., *Nature*, 375(6533): 685-688, 1995.
- Levitskaya y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 94(23): 12616-12621, 1997. Lindner y Sugden, *Plasmid*, 58: 1-12, 2007.
- 45 Loh y col., *Blood*, 113(22): 5476-5479, 2009.
- Ludwig y col., *Nat. Biotechnol.*, 24(2): 185-187, 2006b.
- Ludwig y col., *Nat. Methods*, 3(8): 637-46, 2006a. Lusic, *Blood*, 57: 13-21, 1981.
- Macejak y Sarnow, *Nature*, 353: 90-94, 1991.
- Mackey y Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 19(5): 3349-3359, 1999.
- 50 Mackey y col., *J. Virol.*, 69(10): 6199-6208, 1995.
- Maniatis y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. Manzini y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 103(47): 17672-17677, 2006.
- Marechal y col., *J. Virol.*, 73(5): 4385-4392, 1999.
- Martin y col., *Nature Immunology*, 6: 111-184, 2005.
- 55 Mattingly y col., *J. Pharmacol. Experimen. Therap.*, 316: 456-465, 2006.
- Middleton y Sugden, *J. Virol.*, 66(1): 489-495, 1992.
- Nabel y col., *Science*, 244(4910): 1342-1344, 1989.
- Nanbo y Sugden, *EMBO J.*, 26: 4252-62, 2007.
- Narazaki y col., *Circulation*, 118(5): 498-506, 2008.
- 60 Ng y col., *Development*, 132(5): 873-84, 2005.
- Ng, *Nuc. Acid Res.*, 17: 601-615, 1989.
- Nicola y col., *Blood*, 54: 614-627, 1979.
- Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982.
- Nicolau y col., *Methods Enzymol.*, 149: 157-176, 1987.
- 65 Niller y col., *J. Biol. Chem.*, 270(21): 12864-12868, 1995.
- Noble y col., *Proc. Natl. Acad. Science, EE. UU.*, 102: 6990-6995, 2005.

Okabe, J. Cell. Phys., 110: 43-49, 1982.
 Omirulleh y col., Plant Mol. Biol., 21(3): 415-428, 1993. Solicitud PCT WO 2005/123902
 Solicitud PCT PCT/US94/08574
 Solicitud PCT PCT/US94/09760
 5 Solicitud PCT PCT/US94/10501
 Solicitud PCT WO 2003/062227
 Solicitud PCT WO 2007/113505
 Solicitud PCT WO 2008/006583
 Solicitud PCT WO 2008/094597
 10 Solicitud PCT WO 2010/0003757
 Solicitud PCT WO 94/09699
 Solicitud PCT WO 95/06128
 Solicitud PCT WO 98/30679
 Solicitud PCT WO 99/20741
 15 Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180): 320-325, 1988.
 Piechaczek y col., Nucleic Acids Res., 27(2): 426-428, 1999.
 Potrykus y col., Mol. Gen. Genet., 199(2): 169-177, 1985.
 Potter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81: 7161-7165, 1984.
 Quitsche y col., J. Biol. Chem., 264: 9539-9545, 1989.
 20 Rawlins y col., Cell, 42(3): 859-868, 1985.
 Reisman y Sugden, Mol. Cell. Biol., 6(11): 3838-3846, 1986.
 Reisman y col., Mol. Cell. Biol., 5(8): 1822-1832, 1985.
 Richards y col., Cell, 37: 263-272, 1984.
 Rinehart y col., J. Clinical Oncol., 22: 4456-4462, 2004.
 25 Ring y col., Diabetes, 52: 588-595, 2003.
 Rippe y col., Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990.
 Ritzi y col., J. Cell Sci., 116(Pt 19): 3971-3984, 2003.
 Ryan y col., J. Gen. Virol., 78:(Pt 4): 699-723, 1997.
 Sambrook y col., En: Molecular cloning: a Laboratory manual, 2.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
 30 Spring Harbor, NY, 1989.
 Schaarschmidt y col., EMBO J., 23(1): 191-201, .2004.
 Schaffer y col., Gene, 302(1-2): 73-81, 2003.
 Schepers y col., EMBO J., 20(16): 4588-4602, 2001.
 Scymczak y col., Nat. Biotechnol., 22(5): 589-94 2004.
 35 Sears y col., J. Virol., 77(21): 11767-11780, 2003.
 Sears y col., J. Virol., 78(21): 111487-11505, 2004.
 Shire y col., J. Virol., 73(4): 2587-2595, 1999.
 Su y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 88(23): 10870-19874, 1991.
 Sugden y Warren, J. Virol., 63(6): 2644-2649, 1989.
 40 Sun y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 106(37): 15720-15725, 2009.
 Sutherland y col., Exp. Hematol., 20: 590, 1992.
 Suzuki y col., Cancer Res., 67(5): 2351-2359, 2007.
 Takahashi y col., Cell, 126(4): 663-676, 2006.
 Takahashi y col., Cell, 131: 861, 2007.
 45 Tojo y col., Cancer Science, 96(11): 791-800, 2005,
 Tur-Kaspa y col., Mol. Cell Biol., 6: 716-718, 1986.
 Vodyanik y col., Blood, 108(6): 2095-105, 2006.
 Wagman, Current Pharmaceutical Design, 10: 1105-1137, 2004.
 Wang y col., Mol. Cell. Biol., 26(3): 1124-1134, 2006.
 50 Wang y col., Nat. Biotechnol., 25(3): 317-8, 2007.
 Watanabe y col., Nat. Neurosci., 8(3): 288-96, 2005.
 Wilson y col., Science, 244: 1344-1346, 1989.
 Wong y col., Gene, 10: 87-94, 1980.
 Wrzesinski y col., Clinical Cancer Res., 13(18): 5262-5270, 2007.
 55 Wu y Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
 Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987.
 Wu y col., J. Virol., 76(5): 2480-2490, 2002.
 Wysokenski y Yates, J. Virol., 63(6): 2657-2666, 1989.
 Yates y Guan, J. Virol., 65(1): 483-488, 1991.
 60 Yates y col., J. Virol., 74(10): 4512-4522, 2000.
 Yates y col., Nature, 313: 812-815, 1985.
 Yates y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81: 3806-3810, 1984. Yates, Cancer Cells, (6)197-205, 1988.
 Ye y col., Blood, 114(27): 5473-5480, 2009.
 Yin y col., Science, 301(5638): 1371-1374, 2003.
 65 Ying, Nature, 453: 519-23, 2008.
 Yoshida y col., Cell Stem Cell, 5(3): 237-41, 2009.

Yu y col., Science, 318: 1917, 2007.

Yu y col., Science, 324: 797, 2009.

Zhang y col., Angew. Chem., Int. Ed., 48: 2542-2545, 2009.

Zhang y col., Bioorganic Med. Chem. Letters; 10: 2825-2828, 2000.

5 Zhou y col., EMBO J., 24(7): 1406-1417, 2005

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para producir células MPi humanas a partir de células progenitoras hematopoyéticas, comprendiendo el método las etapas de:

a) cultivar una población celular de células de sangre periférica humana que comprende células progenitoras hematopoyéticas en condiciones de expansión para favorecer la expansión de dichas células progenitoras hematopoyéticas;

b) introducir elementos genéticos episómicos exógenos que expresan factores de reprogramación de MPi en dichas células progenitoras hematopoyéticas expandidas;

c) opcionalmente, cultivar dichas células en una condición que comprende un medio de reprogramación que comprende un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptor de TGF- β , un inhibidor de miosina II ATPasa y/o un inhibidor de señalización de cinasa asociada a Rho (ROCK);

y

d) cultivar dichas células progenitoras hematopoyéticas expandidas en un cultivo exento de células alimentadoras o en un medio acondicionado por células alimentadoras, produciendo así células MPi humanas a partir de dichas células progenitoras hematopoyéticas,

en el que estas etapas se realizan en un cultivo exento de sustancias xenógenas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de células es de uno o más individuos cuyas células no han sido movilizadas con factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) aplicado extrínsecamente.

3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de expansión comprenden un medio de expansión que comprende una o más citocinas incluyendo factor de células madre (SCF), ligando de Flt-3 (Flt3L), trombopoyetina (TPO), interleucina 3 (IL-3) o interleucina 6 (IL-6).

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de expansión en la etapa a) comprenden una matriz extracelular definida.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones en la etapa a) tienen, o el cultivo en la etapa d) tiene hasta 7 % de tensión de oxígeno.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los factores de reprogramación son Sox, Oct, Nanog, Lin-28, Klf4, Cmyc, antígeno T grande de SV40 o una de sus combinaciones.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los elementos genéticos episómicos exógenos tienen uno o más casetes policistrónicos.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo en la etapa d) comprende una matriz extracelular definida.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz extracelular definida

i) tiene un solo tipo de péptido de matriz extracelular y/o

ii) es un fragmento de fibronectina humana.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio en una o más de las etapas está químicamente definido.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además: e) seleccionar las células de MPi.

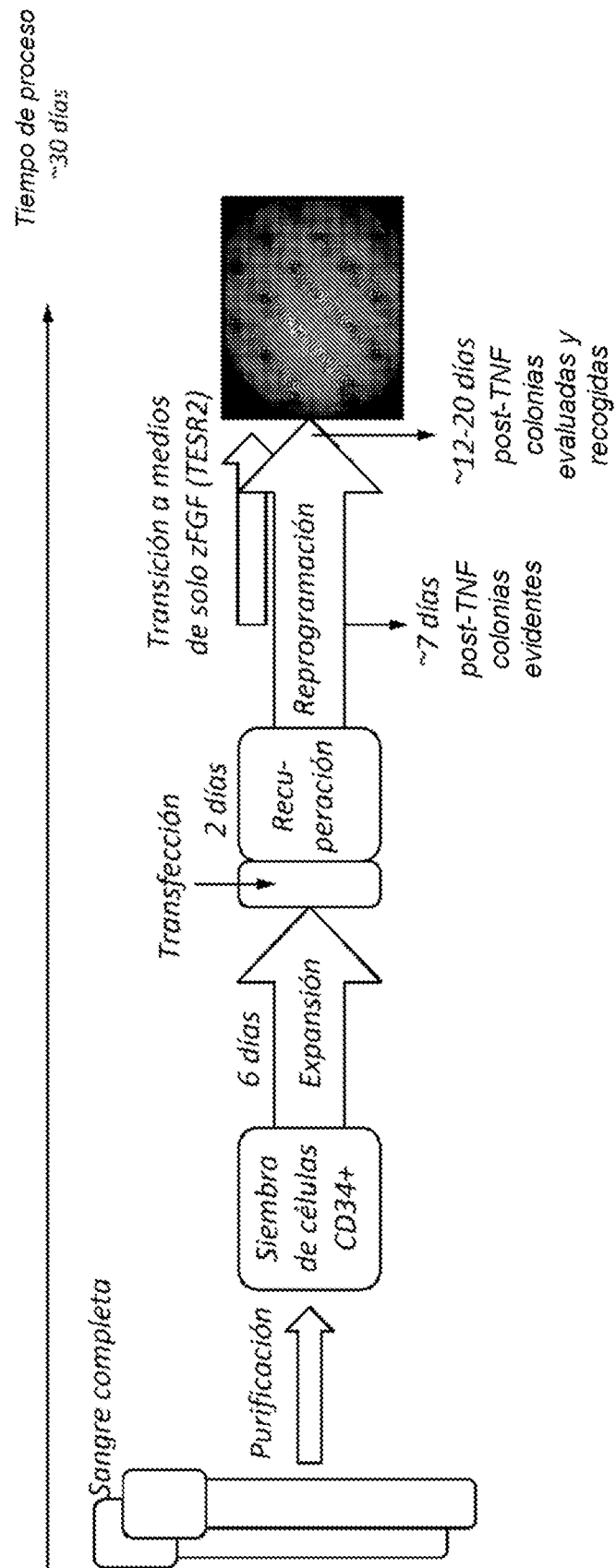


FIG. 1

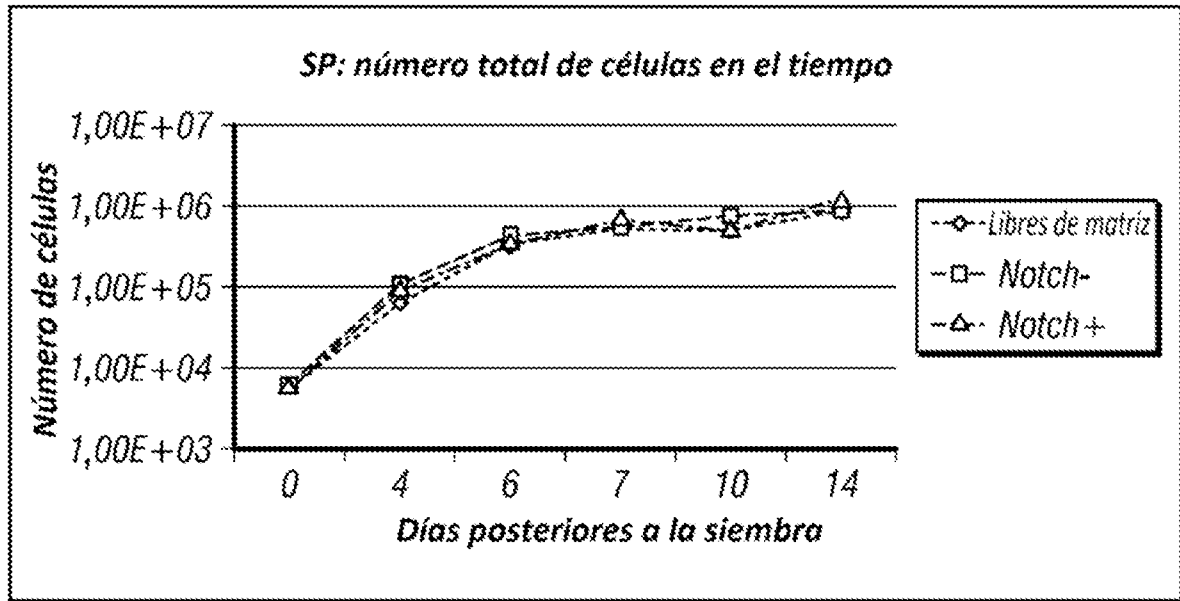


FIG. 2A

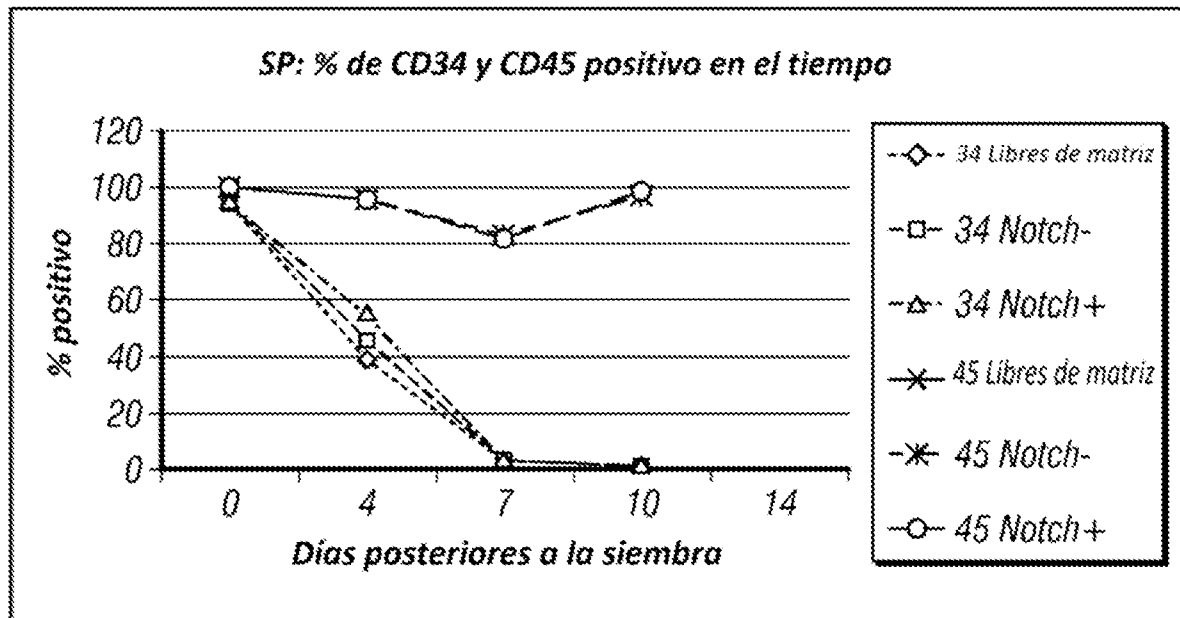


FIG. 2B

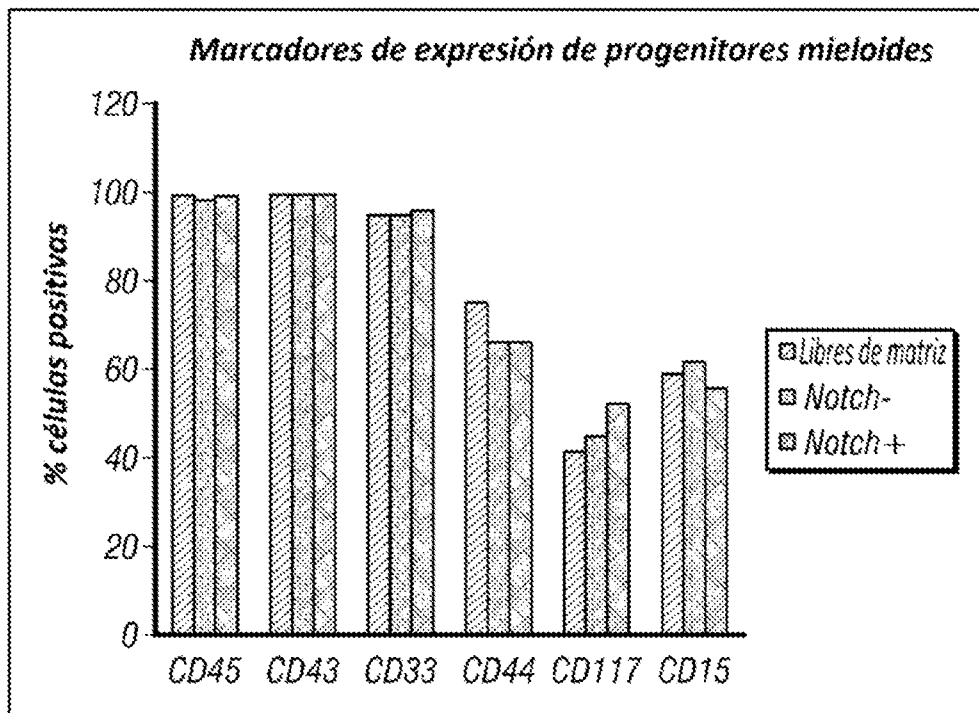


FIG. 2C

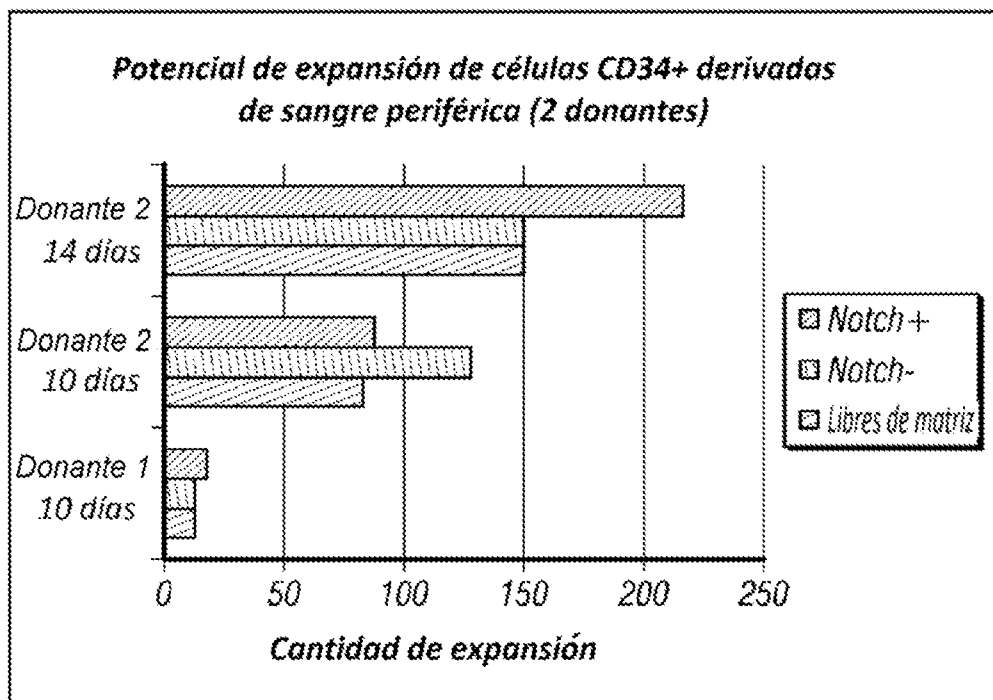


FIG. 2D

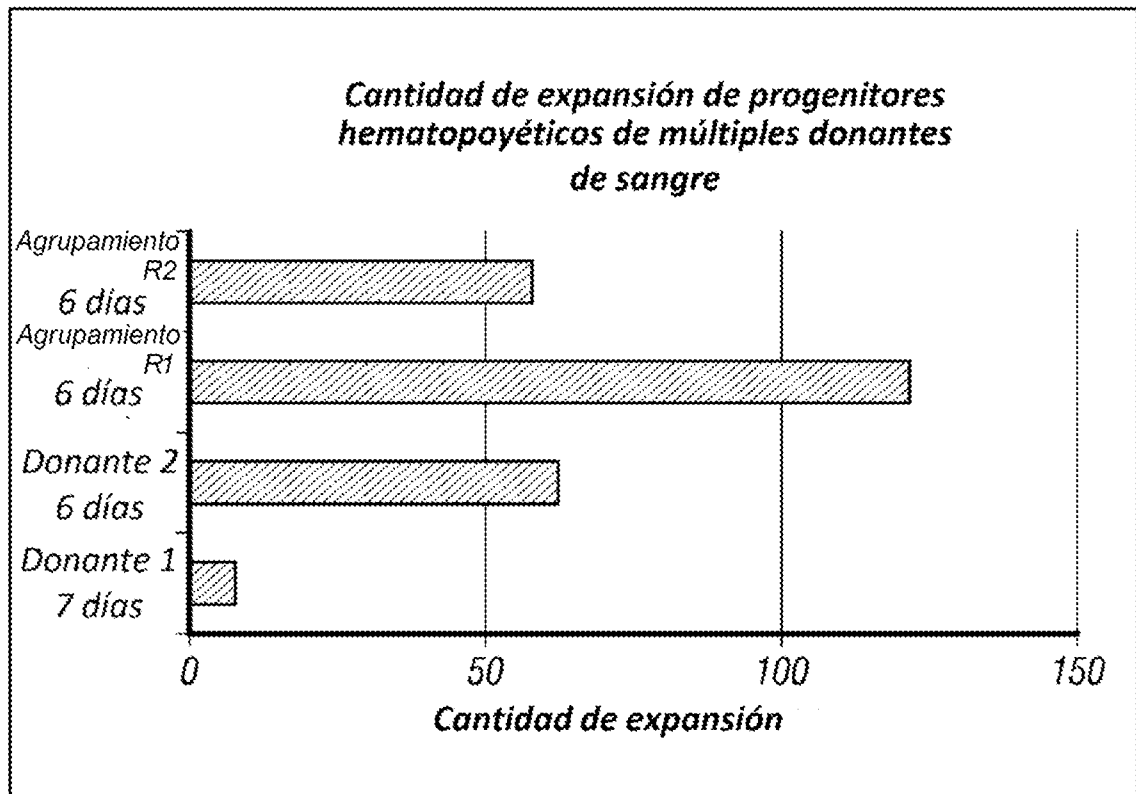


FIG. 2E

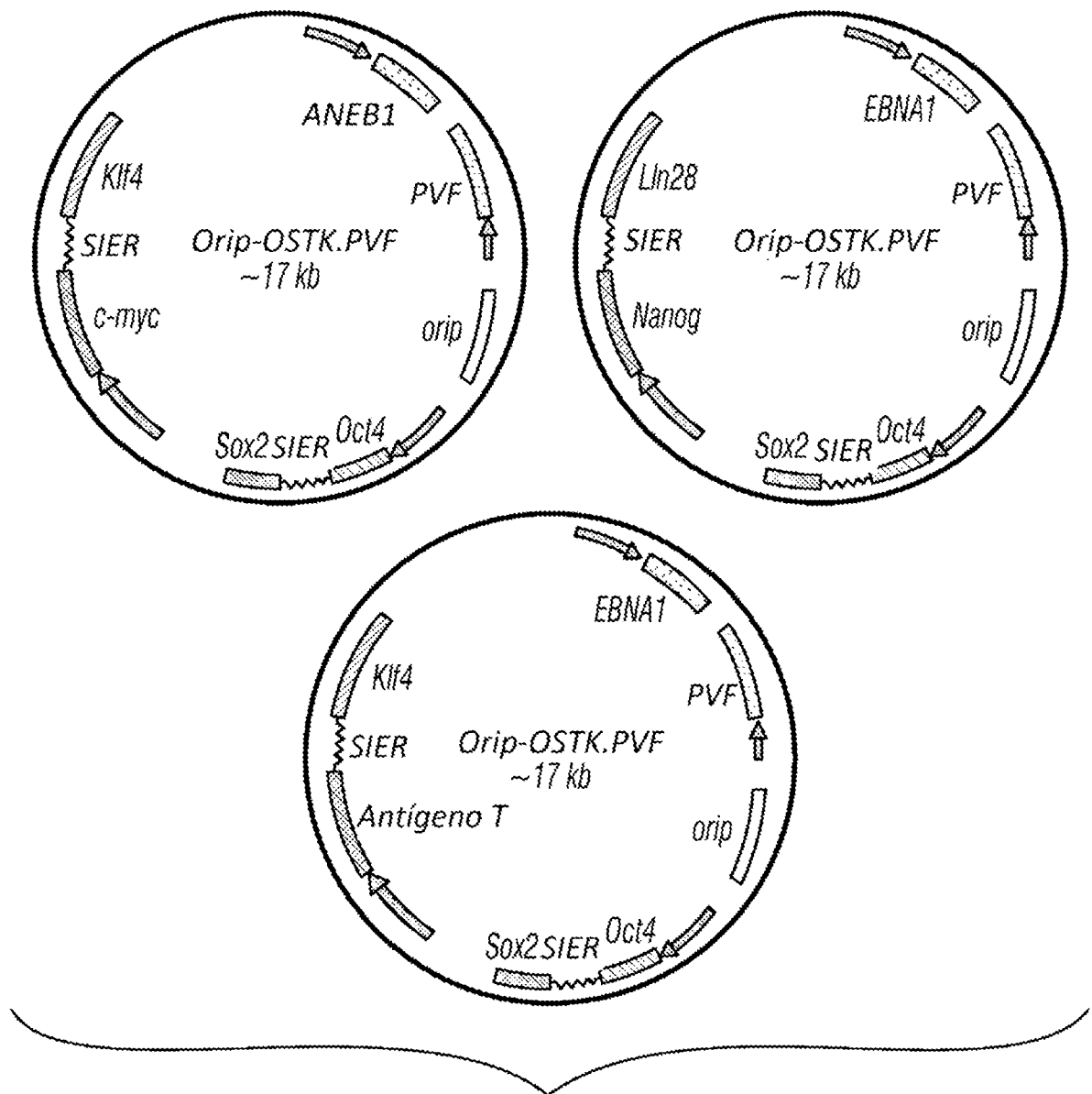
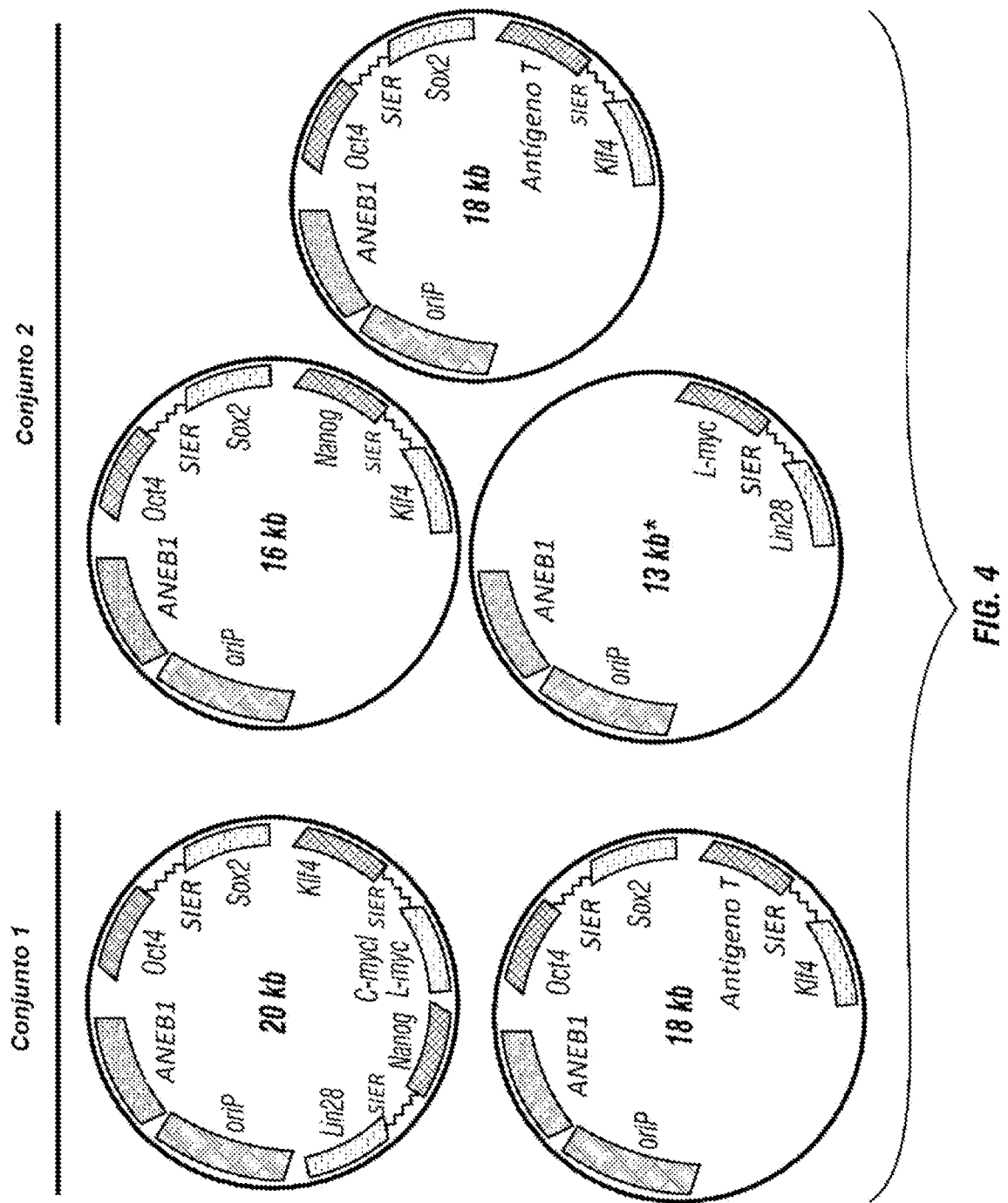


FIG. 3



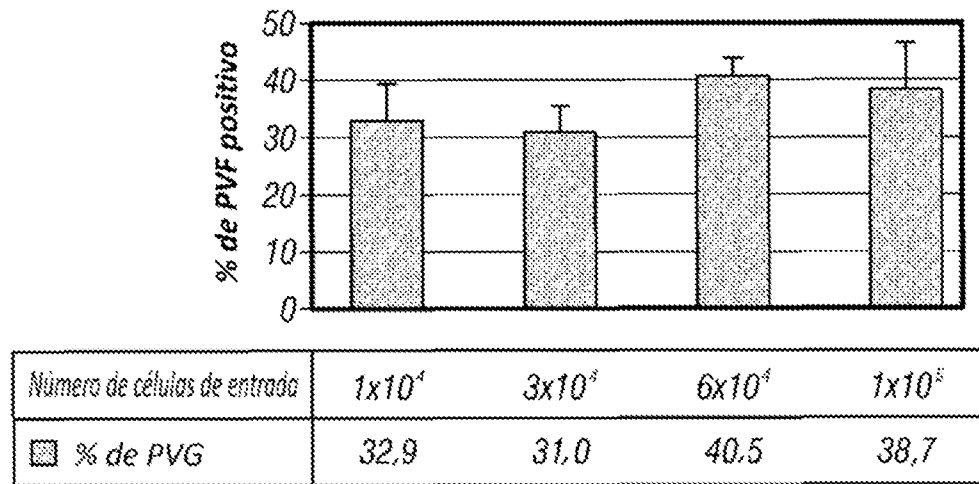


FIG. 5A

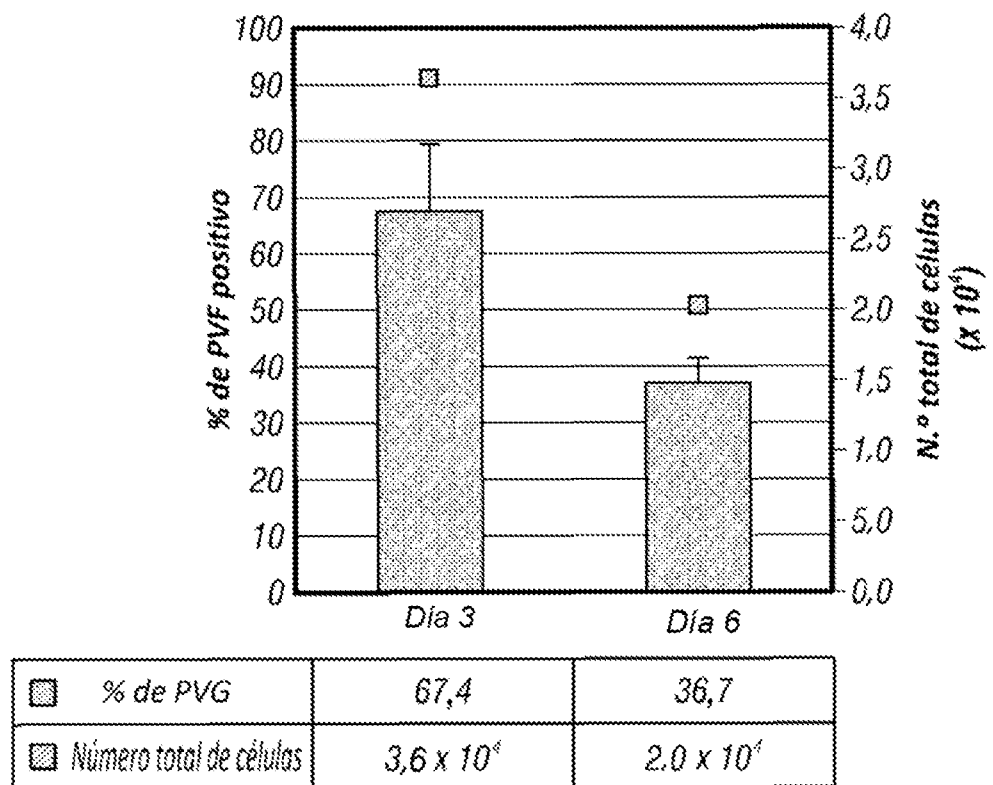


FIG. 5B

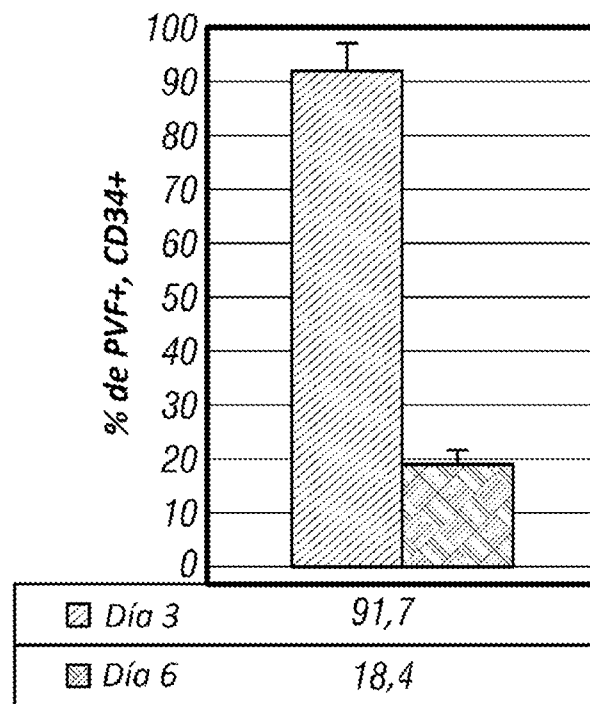


FIG. 5C

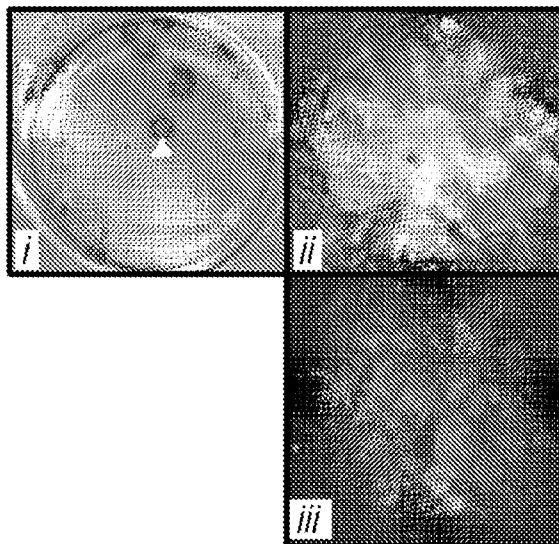


FIG. 5D

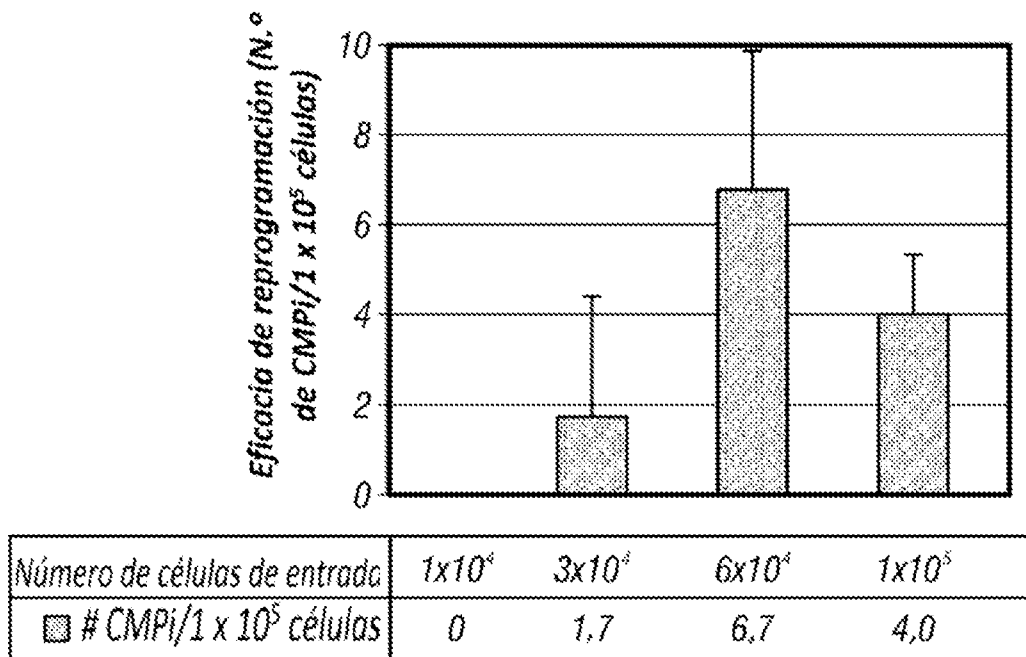


FIG. 5E

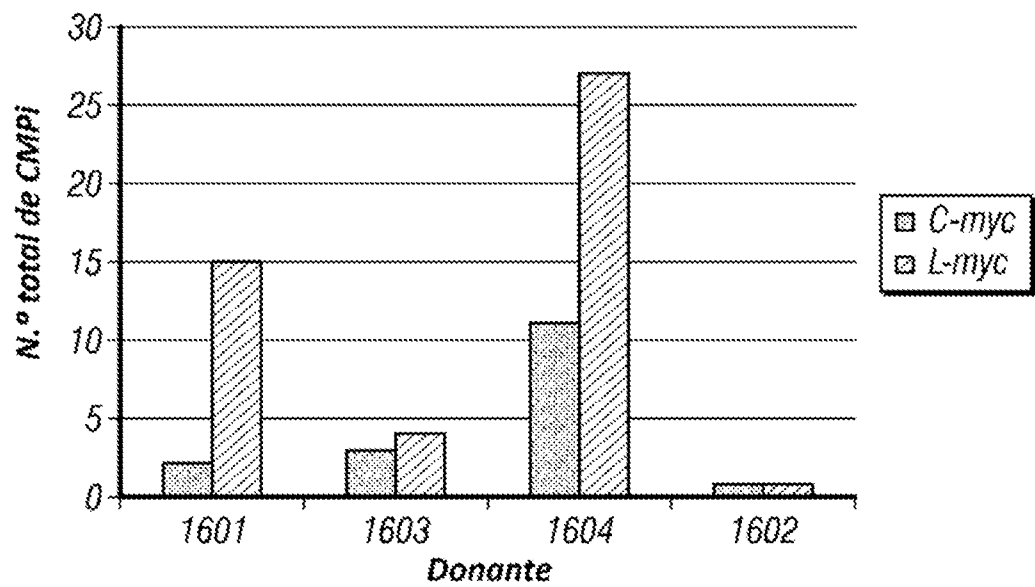


FIG. 5F

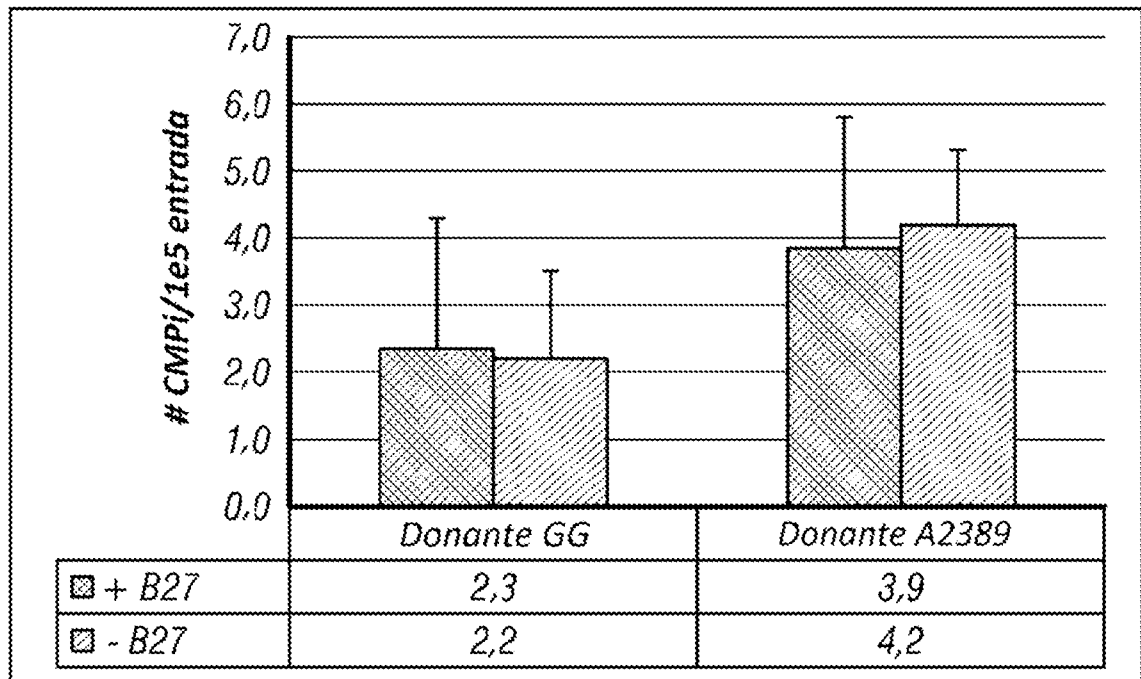


FIG. 6

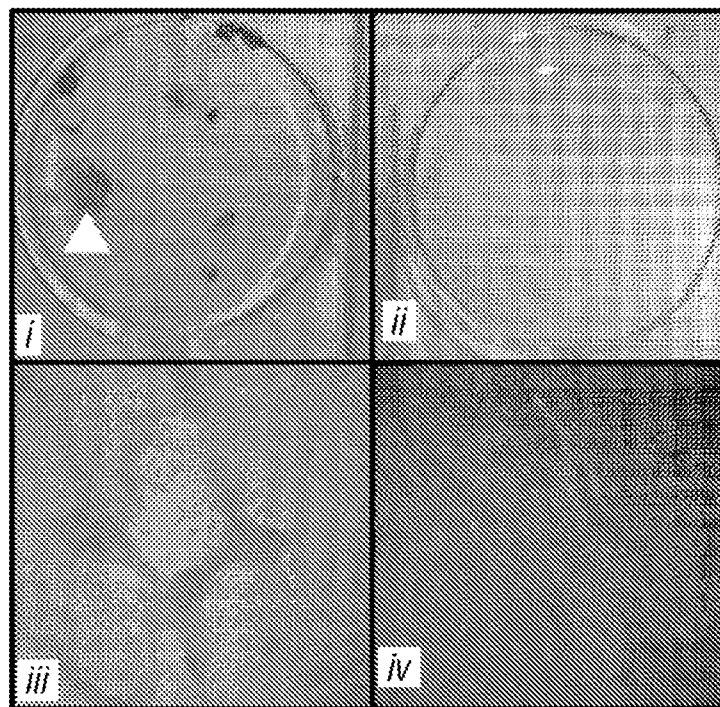


FIG. 7A

