

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 605**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2011** **E 11805858 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2658965**

54 Título: **Método de generación de células madre pluripotentes inducidas y células diferenciadas**

30 Prioridad:

31.12.2010 WO PCT/CN2010/002226

28.01.2011 EP 11152519

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

29.06.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN (50.0%)

Gregor Mendel-Strasse 33

1180 Wien, AT y

GUANGZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICINE AND

HEALTH (50.0%)

72 Inventor/es:

ESTEBAN, MIGUEL;

GRILLARI, JOHANNES;

GRILLARI, REGINA;

PEI, DUANQING y

ZHOU, TING

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 605 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de generación de células madre pluripotentes inducidas y células diferenciadas

La invención se refiere a células madre pluripotentes inducidas y células diferenciadas y a los métodos para generarlas.

5 **Antecedentes de la invención**

Las células madre embrionarias (CME) son células derivadas de blastocistos obtenidos a partir de la fertilización *in vitro* que tienen el potencial de auto-renovarse y de diferenciarse en cualquier tipo de célula madura de un organismo de mamífero, p. ej., ser humano (esta propiedad se conoce como "pluripotencia"). En condiciones de cultivo de tejidos específicas, las CME se pueden mantener indiferenciadas durante períodos prolongados de tiempo sin que pierdan sus características pluripotentes. Debido a estas propiedades, las CME han suscitado un enorme interés en la medicina regenerativa. Potencialmente, los tejidos derivados de las CME se podrían utilizar para el tratamiento clínico de los seres humanos (ya sea en afecciones agudas ya sea en enfermedades genéticas y degenerativas). Las CME también se podrían utilizar para el escrutinio de fármacos, por ejemplo para el estudio de la susceptibilidad específica de un tejido a los tratamientos, y para modelar enfermedades genéticas *in vitro*. Sin embargo, graves limitaciones éticas y prácticas (el riesgo de rechazo inmunitario) han obstaculizado seriamente la aplicación de las CME en la medicina clínica y, en muchos países, también en la investigación.

El reciente descubrimiento de que las células somáticas se pueden transformar en CMPi por medio de factores exógenos (este método también se ha denominado "reprogramación nuclear por factores exógenos" (Takahashi y Yamanaka, Cell 2006; 126: 663-76) tiene el potencial de cambiar el percepción actual de la medicina personalizada y también puede proporcionar valiosos modelos *in vitro* de enfermedades humanas (Yamanaka y Blau, 2010; Nature 465, 704-712; Lian et al., 2010; Thromb Haemost 104, 39-44).

Sorprendentemente, las CMPi son similares a las CME y tienen el potencial de ser utilizadas en tratamientos específicos para cada paciente, evitando así el riesgo de rechazo inmunitario. Debido a estas características, las CMPi han recibido una gran atención en todo el mundo. La generación de CMPi requiere la recolección de tejido del donante, la expansión de las células del donante *in vitro*, y la exposición de las células a un cóctel de factores exógenos que se proporcionan a la célula en forma de proteínas purificadas, extractos de proteínas, moléculas de ARN, plásmidos no integrantes, virus (p. ej., retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus Sendai), con o sin cócteles químicos y con variaciones en las condiciones de cultivo celular.

La aplicación de estos factores tiene el efecto de que las colonias con una morfología de tipo CME emergen progresivamente. Estas colonias representan colonias de CMPi que pueden ser recogidas y posteriormente expandidas y caracterizadas para verificar que su comportamiento es similar al de las CME.

Hasta el momento, las CMPi humanas se han generado utilizando células de la piel del donante (fibroblastos y queratinocitos), líquido amniótico, tejidos extra-embriónicos (placenta y cordón umbilical; (Cai et al., 2010; J Biol Chem 285, 11227-11234) sangre del cordón umbilical, membrana perióstica, tejido dental, tejido adiposo, células madre neurales, hepatocitos, células madre mesenquimales derivadas de amnios y células de sangre periférica (Ye y Cheng, 2010; Regen Med 5, 521-530; Cai et al., 2010; J Biol Chem 285, 11227-11234). La reprogramación de las células de estos tejidos se ha logrado con frecuencias variables, lo que indica que la célula de origen ("célula de donante") importa. Debido a la heterogeneidad de las células del donante actualmente utilizadas para la generación de CMPi, es difícil establecer normas para la realización de ensayos comparativos con CMPi y CME, así como para extraer conclusiones significativas a partir de los resultados de los ensayos.

El tipo de célula de donante ideal para la generación de células CMPi debe ser fácilmente accesible, fácilmente reprogramable, y universal (de cualquier edad, sexo, grupo étnico y condición corporal). Hoy en día, los fibroblastos dérmicos se encuentran entre las fuentes de células utilizadas con más frecuencia para la reprogramación, pero requieren no sólo una biopsia incómoda que necesita ser realizada en un ambiente aséptico por un especialista, sino también una expansión prolongada antes de su uso. También tienen riesgo de mutaciones de células somáticas debido a la exposición a la luz y la radiación, y el procedimiento está contraindicado en enfermedades de la piel o quemaduras graves. Recientemente, se ha informado de que tres grupos de investigación lograron la reprogramación de células de sangre periférica sin necesidad de movilización de células CD34⁺ (Loh et al., 2010; Cell Stem Cell 7, 15-19; Seki et al., 2010; Cell Stem Cell 7, 11-14; Staerk et al., 2010; Cell Stem Cell 7, 20-24). Brown et al., 2010, PLoS ONE, 2010, 5, 6, 1-9, describen la generación de CMPi derivadas de linfocitos T de sangre periférica. Dado que estos procedimientos son mínimamente invasivos, requieren una cantidad pequeña de sangre y no es necesario un cultivo celular prolongado, representan un avance significativo a pesar del hecho de que su eficacia es muy baja. Sin embargo, las principales células de donante utilizadas de acuerdo con estos informes son células T maduras que llevan reordenamientos de receptores de células T específicas, lo cual no es deseable para ciertas aplicaciones clínicas potenciales. Asimismo, las células T no llevan la información genética completa que se requiere para la diferenciación ilimitada en cualquier tipo de célula.

Además, en casos raros, la recepción/donación de sangre no está exenta de problemas éticos, por ejemplo debido a las creencias religiosas, y puede no ser factible en pacientes con enfermedades infecciosas, enfermedades de la

sangre, o inmunodepresión. En este último contexto, se deben considerar las condiciones que afectan a la coagulación (p. ej., hemofilia), la leucemia y la inmunodepresión genética o adquirida (p. ej., cáncer y SIDA).

5 En la búsqueda de una reprogramación de nuevos tejidos, también se han producido células CMPi a partir de la membrana meníngea de ratón (Qin et al., 2008; J Biol Chem, 283, 33730-33735) y de células epiteliales mamarias (Li et al., 2010; Cell Stem Cell 7, 51-63), y en los seres humanos a partir de células madre del periostio y adiposas (Esteban et al., 2010; Cell Stem Cell 6, 71-79), matriz de cordón umbilical y placenta (Cai et al., 2010; J Biol Chem 285, 11227-11234).

Compendio de la invención

10 Para acelerar el progreso hacia las futuras aplicaciones de la tecnología de CMPi, es deseable proporcionar CMPi, así como células diferenciadas de cualquier tipo celular, tejidos u organoides derivados de los mismos, a partir de células del donante que representan una fuente universal, así como células diferenciadas directamente derivadas de tales células del donante. Además, puesto que el aislamiento de las células del donante para generar CMPi de acuerdo con métodos de la técnica anterior por lo general requiere una etapa invasiva para obtener el tejido de donante de interés, los autores de la presente invención buscaron proporcionar CMPi derivadas de una fuente de células no invasiva y los métodos para producir estas células CMPi.

15 El documento WO2008/153685 describe un método para producir un cultivo de células progenitoras de la orina (CMO), proporcionando una muestra de orina y después aislando células progenitoras de la orina de la muestra. Las células progenitoras tienen el potencial de diferenciarse aún más a otros tipos de células.

20 Para obtener un cultivo de células diferenciadas, el documento WO2010/065239 sugiere aislar células madre a partir de la orina y luego diferenciarlas a ciertos tipos de células.

Es común a estos métodos que la diferenciación de las células de orina obtenidas sólo permita un número limitado de tipos de células.

25 Un objeto de la invención es proporcionar un método para obtener, a partir de una fuente de células obtenidas de forma no invasiva, células pluripotenciales con una capacidad de diferenciación que es ilimitada con respecto al tipo de célula generada en última instancia.

30 Para resolver el problema subyacente de la invención, los autores de la presente invención consideran los criterios que deben ser cumplidos por una fuente de células ideal para ser aislada a partir de individuos y luego reprogramadas a CMPi (que se pueden diferenciar en cualquier tipo específico de célula) o diferenciadas directamente ("transdiferenciadas", es decir, diferenciadas directamente, sin la etapa intermedia de la generación de CMPi) a tipos específicos de células, tejidos u organoides: las células deben ser fácilmente accesibles con un riesgo asociado nulo o mínimo, deben estar disponibles en cantidades suficientes, presentes universalmente tanto en machos como en hembras (sin restricción alguna en cuanto a la preocupación ética, la raza, la edad o el estado de salud o enfermedad), y deben ser susceptibles de reprogramación con una buena eficiencia. Los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que las células somáticas, es decir, las células diferenciadas terminalmente, a partir de una fuente no invasiva como la orina, pueden reprogramarse de manera eficaz a CMPi o células específicas o linajes de células de interés.

La descripción se refiere a un método para generar células diferenciadas de interés a partir de células de donantes de otro tipo de células, que comprende

- 40 i) la expansión de las células a partir de una fuente de células obtenidas de un donante de una manera no invasiva, en donde dicha fuente de células se selecciona entre orina, heces, saliva, pelo, secreción nasal, cerumen, fluido lacrimal o del tracto vaginal, y
- ii) la generación de células diferenciadas a partir de dichas células expandidas por medio de
- 45 a) reprogramación de dichas células para que se conviertan en CMPi y a continuación diferenciación de las CMPi a células de interés, o por medio de
- b) reprogramación directa de dichas células para que se conviertan en una célula diferenciada de interés.

De acuerdo con una realización preferida, dichas células de donantes obtenidas en la etapa i) son células exfoliadas del tracto urinario que están presentes en la orina (en lo sucesivo, estas células se denominan "células de orina").

50 En lo sucesivo, las CMPi derivadas de células de orina se denominan "CMPOi" (si no se indica de otro modo, por ejemplo, con respecto a la utilización de CMPOi, este término también abarca las CMPi obtenidas de otras células de donante obtenidas de forma no invasiva).

En la realización de acuerdo con la cual la fuente de células es la orina, la etapa i) se puede realizar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, ésta por lo general comprende las subetapas

- a) recogida de la orina de un donante,
- b) aislamiento de células exfoliadas de la orina, y
- c) expansión de dichas células exfoliadas.

5 Las células exfoliadas ii) pueden ser cualquier tipo de célula que se encuentre en la orina que sea susceptible de reprogramación.

De acuerdo con ciertas realizaciones, las células exfoliadas son células epiteliales, por ejemplo, células tubulares renales como células epiteliales tubulares proximales humanas exfoliadas (HEPTEC).

10 De acuerdo con otras realizaciones, las células exfoliadas son células fibroblastoides. De acuerdo con otras realizaciones más, las células exfoliadas son células de tipo progenitor, células de tipo endotelial, células de tipo musculatura lisa o células de tipo intersticial como describen Zhang et al., 2008; J Urol 180, 2226-2233).

Las células ii) también pueden ser células cancerosas exfoliadas, p. ej. células de cáncer renal o de cáncer de vejiga.

15 Después de la recogida de orina, las células de orina se centrifugan y el tipo de célula de interés, p. ej., células orfibroblastoides HEPTEC, se enriquecen haciendo crecer las células en un medio que favorezca su crecimiento, evitando de ese modo el crecimiento de las células de un tipo celular no deseado.

20 Tales medios se conocen de la bibliografía y/o se encuentran disponibles en el mercado. A modo de ejemplo, los medios que satisfacen específicamente los requisitos de las células epiteliales incluyen, pero no se limitan a Medio Basal Epitelial Renal (REBM) y SingleQuot Kit CC-4127 REGM, ambos disponibles de Lonza, medio EpiGRO de Millipore, Medio Basal de Células Epiteliales Renales (ATCC), otros medios para las células epiteliales de las vías respiratorias incluyendo medios para células epiteliales de las vías respiratorias o mamarias, p. ej., como los disponibles de Lonza, ATCC, o Cellapplications, o una combinación de los mismos. Del mismo modo, el medio o los medios basados en el descrito por Wieser et al., 2008 (Am J Physiol Renal Physiol 295, F1365-1375).

Un ejemplo de un medio adecuado para el enriquecimiento de las células fibroblastoides de la orina es FGM®-2 Fibroblast Growth Medium, también disponible de Lonza.

25 Además de células de orina, que son las células de donante preferidas para ser utilizadas en el método de la invención, otras células que se han obtenido de un individuo donante en una forma no invasiva se pueden expandir y reprogramar para que se conviertan en CMPi, o directamente se diferencien a un tipo de célula de interés, p. ej. células obtenidas de heces, saliva, cabello, secreción nasal, cerumen, fluido lacrimal o del tracto vaginal. Los métodos para aislar y expandir tales células son conocidos en la técnica, p. ej. para las células exfoliadas de colon en las heces (Bandaletova et al., 2002. Apmis 110, 239-246), o a partir de células de la papila dérmica del cabello (Warren et al., 1992; J Invest Dermatol 98, 693-699).

30 Otra fuente de células útil es el líquido que, durante la hemodiálisis, se inserta en la cavidad peritoneal para el intercambio de sustancias con la sangre a través de los vasos sanguíneos en el peritoneo, lo que permite que la sangre sea filtrada de una manera "similar" a la del riñón. Este líquido se puede recoger y se sabe que contiene muchas células.

"Reprogramación" [(etapa ii), realización a)] es un término reconocido en el campo para la transformación de células somáticas en células CMPi por medio de factores exógenos.

40 En los experimentos de la presente invención, la reprogramación de células de orina a CMPOi se realizó utilizando vectores retrovirales que liberan los cuatro factores de reprogramación Sox2, Oct4, Klf4 y c-Myc ("factores de Yamanaka" o "cóctel de Yamanaka"), como han descrito originalmente Takahashi y Yamanaka, 2006; Cell 126: 663-76).

En principio, se puede utilizar cualquier método de reprogramación que sea capaz de transformar las células del donante, células de orina en particular, en CMPi, en particular CMPOi.

45 La reprogramación se puede conseguir mediante uno o más factores seleccionados entre un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox. Además, la combinación de factores puede comprender uno o más productos génicos de un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, junto con una citoquina. La citoquina puede ser al menos una de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de células madre (SCF).

Preferiblemente, estos factores se insertan en vectores de expresión no virales que se introducen en una célula somática.

50 Si las CMPOi, o las células diferenciadas de las mismas, están destinadas a la aplicación terapéutica, se utilizan métodos que no emplean oncogenes y/o no implican la integración del ADN que codifica el factor de reprogramación en el ADN genómico del individuo.

Por lo tanto, los métodos preferidos de la invención para la generación de CMPOi o células diferenciadas de las mismas, con fines terapéuticos no emplean lentivirus o retrovirus o utilizan virus modificados de tal manera que el riesgo de integración genómica de los transgenes y los efectos secundarios no deseables asociados con dicha integración se reducen al mínimo o se anulan completamente. Además, también se debe considerar que la integración del transgén asume el riesgo de mutagénesis de inserción, que puede estar asociada con la tumorigenicidad en el paciente tratado.

Los métodos preferidos para la generación de CMPOi para aplicación terapéutica son aquellos que evitan la integración genómica de los genes de reprogramación (revisado por Sun et al., 2010; Cell Cycle 9: 5, 880-885) y/o que evitan oncogenes como Klf4 o c-Myc, p. ej.,

- 10 ○ utilizando lentivirus escindibles por recombinasa Cre (Soldner et al., 2009; Cell 136: 964-77);
- utilizando Oct4, SOX2, y NANOG solos, omitiendo c-Myc y Klf4 (Li y et al., 2010; Cell Reprogram. Jun 12(3): 237-47);
- 15 ○ logrando la derivación de células CMPi humanas libres de transgén y libres de virus mediante el uso de vectores episomales basados en oriP/EBNA1 (antígeno nuclear 1 de Epstein-Barr) que codifican los factores de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 y SV40LT (Yu et al., 2009; Science 324: 797-801);
- utilizando una técnica de reprogramación libre de virus empleando vectores de expresión de transposón piggyBac que llevan un transgén policistrónico de los factores de Yamanaka (Woltjen et al., 2009, Nature 458: 766-70); ADN minicircular no viral (Jia et al., 2010; Nat Methods Mar 7(3): 197-9);
- 20 ○ métodos basados en proteínas recombinantes, p. ej. tratamiento de las células con los cuatro factores de Yamanaka en forma de proteínas recombinantes conjugadas con un péptido de penetración celular (cpp) (Kim et al., 2009; Cell Stem Cell 4: 472-6); exponiendo las células a un cóctel de factores exógenos que se proporcionan a la célula en forma de proteínas purificadas, extractos de proteínas con o sin tratamiento químico previo (Cho et al., 2010; Blood 116, 386-395; Han et al., 2010; PLoS One. 19 Ago; 5(8): e12297; Solanki y Lee, 2010; Chembiochem 11, 755-757).
- 25 ○ añadiendo moléculas pequeñas, p. ej. ácido valproico, un inhibidor de la histona desacetilasa (Huangfu et al., 2008; Nat Biotechnol. 26: 795-7; Huangfu et al., 2008; Nat Biotechnol 26:1269-1275); u otras numerosas moléculas pequeñas, p. ej., inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), de la ruta MEK-ERK e inhibidores de la ruta TGFβ para aumentar la eficacia o reemplazar algunos de los factores de reprogramación (Lin et al., 2009; Nat Methods 6: 805-8; Li et al., 2009; Cell Stem Cell. 4: 16-9; Shi et al., 2008; Cell Stem Cell. 2: 525-8; Ichida et al., 2009; Cell Stem Cell. 5: 491-503); o añadir vitamina C (Esteban et al., 2010; Cell Stem Cell 6, 71-79);
- 30 ○ añadiendo ARN de interferencia pequeños (ARNip), p. ej. ARNip de p53, para mejorar la eficacia de la reprogramación de los factores de Yamanaka (Zhao et al., 2008; 3: Cell Stem Cell 475-9);
- 35 ○ añadiendo micro ARN (miARN) a los cócteles de reprogramación (p. ej. Wilson et al., 2009; Stem Cells Dev. 18: 749-58; Judson et al., 2009; Nat Biotechnol Mayo; 27(5): 459-461).
- 40 ○ suministrando ARNm o ARNm modificado, que codifica factores de reprogramación (Yakubov et al., 2010; Biochem. Biophys Res Commun 394, 189-193), por medio de lo cual, en el caso de la modificación, ésta es tal que aumenta la traducción y/o la estabilidad, p. ej. como describen Kowalska et al., 2008, RNA. Jun 2008; 14(6): 1119-1131.

La seguridad y/o eficacia de la reprogramación se pueden optimizar aún más cambiando el medio de cultivo de tejidos o el entorno, p. ej. sustitución de un medio que contiene suero por Knock Out Serum Replacement (KSR, Invitrogen), o cambiando el entorno (p. ej. baja oxigenación utilizando incubadoras específicas en las que se puede controlar la concentración de oxígeno).

- 45 La optimización se puede lograr p. ej. mediante la realización de experimentos en serie de una población de células de orina expandidas dada. A modo de ejemplo, se pueden hacer crecer células de orina de numerosos individuos en diferentes medios (p. ej. medio para células epiteliales o fibroblastos) antes de la infección con los retrovirus que produce los factores exógenos, con el fin de seleccionar poblaciones de células que sean reprogramadas más fácilmente. Después de la infección, se emplean diferentes cócteles de medios (con los cambios en diferentes momentos específicos), que contienen suero o libres de suero, y con o sin la adición de productos químicos (véase más arriba) para ver en qué condiciones se puede lograr una eficacia óptima. Asimismo, las células se pueden infectar con diferentes combinaciones de factores, por ejemplo los 4 factores de Yamanaka con o sin Nanog (u otros factores p. ej. microARN). También se puede analizar con cuántas rondas de infección (1, 2 ó 3 rondas) se pueden obtener los mejores resultados. Cuando las células se dividen en células de alimentación, se pueden utilizar diferentes tipos de capas de alimentación, p. ej., fibroblastos de ratón, fibroblastos humanos, amniocitos, membrana amniótica, etc.
- 50
- 55

La reprogramación directa de la célula de donante, sin generar primero una CMPi, para que se convierta en una célula diferenciada de interés [etapa ii, realización b)] también se conoce como "transdiferenciación", que representa el cambio de una célula o tejido de un estado diferenciado a otro (Vierbuchen y Wernig, 2011, Nat Biotechnol 2011; 29(10): 892-907.

5 En esta realización, los factores de transcripción específicos del tipo de células se expresan en exceso utilizando vectores virales, vectores basados en plásmidos etc. como factores para la reprogramación de CMPi.

Para la transdiferenciación directa de las células de orina (u otras células obtenidas de manera no invasiva) a neuronas, se pueden utilizar los 3 factores *Ascl1*, *Brn2*, y *Myt1l* como se describe para la conversión de fibroblastos humanos en neuronas (Vierbuchen et al., 2010; Nature 463, 1035-1041), o de hepatocitos en neuronas, según lo descrito por Marro et al., 2011, Stem Cell. 4 Oct; 9(4): 374-82.

10 Efe et al., 2011, Nat Cell Biol. Mar 2011; 13(3): 215-22, describen un método por el que los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) pueden ser reprogramados directamente para contraer de manera espontánea parches de cardiomiocitos diferenciados.

15 Para la conversión de las células de donante de orina en cardiomiocitos, se puede utilizar un método que se ha llevado a cabo con éxito para obtener cardiomiocitos de mesodermo, utilizando *Gata4*, *Tbx5*, y *Baf60c* (Takeuchi et al., 2009; Nature 459, 708-711).

La transdiferenciación a células hematopoyéticas se puede realizar mediante el uso de la expresión en exceso de *Oct4* solo (Szabo et al., 2010; Nature 468, 521-526).

20 El escrutinio de factores que transdiferencian células de orina a neuronas, queratinocitos, fibroblastos, cardiomiocitos, células de hígado, riñón, sangre, etc. se puede llevar a cabo de una manera similar a los protocolos de transdiferenciación descritos anteriormente y al protocolo inicial de Yamanaka (Takahashi y Yamanaka, 2006). Basándose en el abundante conocimiento acerca de los factores de transcripción específicos de los linajes, tales factores se pueden someter a ensayo combinados (como en los artículos descritos anteriormente) por su potencial para transdiferenciar directamente células derivadas de orina combinadas con las condiciones de cultivo que se utilizan comúnmente para mantener y cultivar el tipo de célula específica de interés. También se pueden llevar a cabo experimentos en serie de acuerdo con los principios descritos anteriormente para la optimización de la eficacia de reprogramación para optimizar la eficacia transdiferenciación.

25 Aunque el método de la invención se utiliza preferiblemente para la producción de CMPOi o células diferenciadas a partir de células de donante humano, también se puede aplicar a las células de otros mamíferos (p. ej. mono, caballo, perro, gato, cerdo, rata y ratón).

30 La producción de células diferenciadas de interés, ya sea directamente ya sea a través de CMPOi intermedias, a partir de células exfoliadas de orina, proporciona un método fácil de reproducir, universal para la generación de células de tipo CME de alta calidad. Esto tiene la ventaja de que la recolección de las células del donante se puede realizar en cualquier lugar y por cualquier persona, siempre que se tomen las medidas mínimas de higiene, así como a partir de cualquier ser humano, independientemente de su edad, sexo o afección. Además, el líquido perfundido al peritoneo para la sustitución de la falta de la función renal en pacientes con insuficiencia renal que requieren diálisis o pacientes después de operaciones de la vejiga que no producen orina, puede ser utilizado como una fuente de células para la reprogramación o transdiferenciación.

35 El método de la invención proporciona una oportunidad única para comparar los métodos de reprogramación en todo el mundo y avanzar en el campo hacia la aplicación clínica de células CMPi seguras.

En principio, las CMPOi, o las CMPi obtenidas por el método de la invención a partir de otras células de donante obtenidas de forma no invasiva, se pueden utilizar para los mismos fines que las CMPi conocidas en la técnica generadas a partir de otros tipos de células.

40 Las características ventajosas de las CMPOi las hacen útiles tanto desde el punto de vista de la investigación como comercial, este último, p. ej. proporcionando CMPOi, o células, linajes de células, organoides o tejidos, derivados de las mismas, de un individuo sano o de un paciente con una enfermedad), p. ej. a efectos de escrutinio.

Las CMPOi se pueden utilizar para generar células para la reparación o sustitución de tejidos a la vez que evitan los problemas éticos e inmunológicos que son inherentes al uso de células CM.

45 Las CMPOi de la invención, los tejidos u organoides derivados de los mismos, respectivamente, son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes con quemaduras graves, a los que se proporcionará piel artificial, obtenida a partir de células diferenciadas, derivadas de células de orina, ya sea directamente o a través de CMPOi.

50 Para el tratamiento de enfermedades de la sangre, las CMPOi o las células diferenciadas obtenidas a partir de ellas, o las células obtenidas por transdiferenciación directa de las células de orina, pueden ser infundidas a pacientes que padecen leucemia p. ej. leucemia inducida por mutación somática.

En el tratamiento de la hemofilia, las CMPOi corregidas genéticamente se pueden utilizar para el trasplante autólogo, y en el caso de las enfermedades que disminuyen la cantidad de células inmunitarias como por ejemplo, el VIH, se pueden utilizar CMPOi convertidas en células hematopoyéticas para reponer la población de células inmunitarias por medio de infusión. En la anemia de células falciformes, también se pueden utilizar CMPi con genes corregidos (Hanna et al., 2007; Science 318, 1920-1923).

Las CMPOi (o CMPi obtenidas a partir de otras células de donante obtenidas de manera no invasiva) se pueden utilizar, como las CMPi conocidas en la técnica, en la terapia de enfermedades degenerativas, en las que un tipo específico de célula o tejido es destruido o tiene un mal funcionamiento y el cuerpo es incapaz de reponerlo. En las afecciones degenerativas, p. ej. la enfermedad de Parkinson, el tratamiento con CMPOi proporciona al sitio afectado células indiferenciadas que luego se pueden utilizar para la reparación del daño en los tejidos. De ese modo, la terapia con CMPOi volverá a introducir nuevas células o tejidos sanos para satisfacer la misma función. Las CMPOi también tienen el potencial de ser utilizadas para desarrollar órganos enteros nuevos que sean compatibles con el paciente y reduzcan las posibilidades de rechazo de trasplantes, ya que son células autólogas, es decir, células derivadas de células de donante del paciente a tratar, p. ej. en el caso de la diabetes, se pueden generar agrupaciones de tipo islote que segregan insulina a partir de células de tipo CMPi (Tateishi et al., 2008; Am J Physiol Renal Physiol 295, F1365-1375).

Las CMPOi también se pueden utilizar (como fue revisado para las CMPi por Lau et al., 2009; F1000 Biol Rep 1: 84) para la generación de líneas celulares específicas de enfermedades que son útiles como modelos de enfermedad y/o para el escrutinio de candidatos a fármacos *in vitro* y/o para corregir defectos genéticos por medio de terapia génica. La generación de células diferenciadas terminalmente (p. ej. hepatocitos o cardiomiocitos) a partir de CMPOi (u obtenidas por medio de transdiferenciación directamente a partir de las células de la orina), por ejemplo, permitirá la detección y el perfilado adicional de los compuestos sobre el respectivo linaje celular, con el objetivo de definir la especificidad del paciente (para la medicación personalizada) o la aplicabilidad general de un compuesto. A modo de ejemplo, como describen Dimos et al. 2008 (Science 29 Ago; 321 (5893): 1218-2). Las CMPOi se pueden utilizar como un modelo para la forma familiar de la esclerosis lateral amiotrófica; o como un modelo, o para el tratamiento, respectivamente, de otras enfermedades genéticas, según lo descrito por Park et al., 2008 (Cell 5 Sep; 134 (5): 877-8), que produjeron células CMPi a partir de pacientes con 10 enfermedades genéticas diferentes, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la diabetes de tipo 1, la distrofia muscular de Duchenne y Becker, la inmunodeficiencia combinada grave relacionada con el déficit de adenosina desaminasa, el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond, la enfermedad de Gaucher tipo III, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Down, y el estado de portador del síndrome de Lesch-Nyhan. Asimismo, se pueden generar modelos basados en células humanas de atrofia muscular espinal y enfermedad de Parkinson de manera similar a la descrita por Ebert et al.; 2009 (Nature 15 Enero; 457 (7227): 277-8 y Soldner et al., 2009 (Cell 6 Marzo; 136 (5): 964-77), o se pueden utilizar CMPOi derivadas de células de un paciente con beta-talasemia homocigota de una manera similar a la descrita por Ye et al., 2009 (Proc Natl Acad Sci USA 16 Junio; 106 (24): 9826-3) para CMPi derivadas de fibroblastos de la piel, que se diferenciaron a continuación a células hematopoyéticas productoras de hemoglobina. Tales CMPOi, tras una modificación genética, podrían producir células hematopoyéticas autólogas que funcionarían normalmente. Las CMPOi también se pueden utilizar para corregir los defectos genéticos en pacientes con anemia de Fanconi, según lo descrito por Raya et al., 2009 (Nature 2 Jul; 460 (7251):53), que obtuvieron células CMPi a partir de fibroblastos dérmicos recolectados de pacientes con anemia de Fanconi, corregidos utilizando vectores lentivirales que codificaban FANCA y FANCD2, y, posteriormente, obtuvieron células somáticas que estaban fenotípicamente libres de la enfermedad.

Las CMPOi también se pueden utilizar como las CMPi generadas por Lee et al., 2009 (Nature 17 Sep; 461 (7262): 402), que generaron células CMPi a partir de pacientes con disautonomía familiar (FD), re-diferenciaron las células CMPi y utilizaron el modelo *in vitro* para escrutar los fármacos candidatos.

Otro ejemplo de una enfermedad para la que las CMPOi tienen un gran valor potencial como modelo de enfermedad, es el síndrome de Prader Willi (Yang et al., 2010; J Biol Chem 285, 40303-40311). Otros ejemplos de enfermedades genéticas para las cuales la terapia génica que utiliza CMPOi tiene un gran potencial son la Epidermolisis bullosa (p. ej. mediante la reprogramación del ARNm de K14, tal como describen Wally et al., 2010. Hum Mol Genet 19, 4715-4725; Wally et al., 2008; J Invest Dermatol 128, 568-574). En general, la terapia génica basada en la modificación genética de CMPOi tiene el mayor potencial para el tratamiento de enfermedades causadas por trastornos de genes individuales; hasta la fecha, se han descrito aprox. 4000 de tales enfermedades genéticas.

En los modelos de enfermedad anteriores que utilizan células diferenciadas terminalmente, tales células pueden, de forma alternativa, ser obtenidas a partir de CMPOi, ser obtenidas por medio de reprogramación directa de las células del donante. Para el propósito de la presente invención "reprogramación directa" se utiliza como sinónimo de "transdiferenciación", según se define en la presente memoria.

Si las células del donante son células de cáncer, p. ej. células de cáncer renal o de vejiga, que representan presumiblemente las primeras etapas de cáncer, las CMPOi o células diferenciadas de las mismas son útiles como modelos para el respectivo cáncer.

La terapia génica comprende la inserción, alteración, o anulación de uno o más genes dentro de las células de un individuo, para corregir un efecto genético que causa una enfermedad. Hasta el momento, principalmente se han

considerado para el tratamiento las enfermedades monogénicas, que son causadas por mutaciones en genes individuales. La forma más común de terapia génica implica la inserción de genes funcionales en una localización genómica no especificada con el fin de reemplazar un gen mutado. Una mutación también se puede corregir directamente.

- 5 Para las aplicaciones de la terapia génica, las células modificadas genéticamente son CMPOi o células diferenciadas derivadas de las mismas (u obtenidas por reprogramación directa de las células del donante); alternativamente, aunque menos preferidas, las células del donante expandidas pueden ser modificadas genéticamente antes de la reprogramación. En el alcance de la invención, las células modificadas genéticamente se van a utilizar predominantemente en la terapia génica somática. Dado que la corrección de los defectos genéticos se realiza in vitro antes de la re-infusión o el trasplante de las CMPOi o células diferenciadas derivadas de las mismas (u obtenidas por reprogramación directa de las células del donante), el riesgo de transferencia de genes a la línea germinal se minimiza. Las células corregidas se infundirán o trasplantarán como células diferenciadas derivadas de CMPOi (o directamente se transdiferenciarán sin reprogramación previa de CMPI) con el fin de complementar o reemplazar tejidos y órganos no funcionales. El gen de corrección se puede introducir en las células de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, p. ej. por medio de vectores virales (modificados para reducir al mínimo el riesgo de reactivación), incluyendo retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, lentivirus, virus Herpes simplex, mediante el uso de vectores basados en plásmidos, o incluso ADN desnudo.

La corrección de los defectos de los genes se puede llevar a cabo de muchas maneras, p. ej., mediante el suministro de ADN que codifica el gen que funciona correctamente, la modificación para disminuir la expresión del gen mutado mediante la liberación de ARNhc o miARN, mediante el uso de proteínas en dedos de zinc para llevar a cabo una modificación para inactivar un gen o recombinaciones, o mediante el uso de vectores que permiten eventos trans-empalme.

Se puede prever que, debido a la forma no invasiva de obtención de las células del donante, puede haber una alta aceptación por parte de los individuos sanos para tener, de antemano y de forma profiláctica, CMPOi preparadas y almacenadas derivadas de su propia orina, así como linajes celulares derivados, organoides o tejidos como piel artificial, lo que permitirá una utilización más rápida en el caso de la aparición de una enfermedad grave o una lesión, como una quemadura.

Los fibroblastos, queratinocitos o piel artificial generados a partir de CMPOi (Bilousova et al., 2010; J Invest Dermatol 9 Dic), p. ej. derivados de las células de los donantes de los individuos con diferentes tipos de piel, también pueden ser útiles para los ensayos en la industria cosmética.

Las CMPOi pueden ser también útiles para la clonación de animales, especialmente mamíferos, p. ej. caballos de carreras o animales domésticos).

Breve descripción de las figuras

Figura 1

- 35 Diapositivas teñidas con hematoxilina/eosina de teratomas que comprenden derivados complejos de las 3 capas germinales producidas con 2 clones de CMPOi representativos

Figura 2

- 40 A: Contraste de fases y fotografías de inmunofluorescencia de células de tipo neuronal producidas siguiendo un protocolo referido a partir de un clon de CMPOi representativo.
 B: Se diferenció un clon de CMPOi representativo a células de tipo cardiomiocito utilizando un protocolo referido. Contraste de fase, tinción de PAS y fotografías de inmunofluorescencia.
 C: Se diferenció un clon de CMPOi representativo a células de tipo hepatocito utilizando un protocolo referido. Contraste de fase, tinción de PAS y fotografías de inmunofluorescencia.
 D: Potenciales de acción medidos en cardiomiocitos derivados de un clon de CMPOi representativo.

45 EJEMPLO Materiales y métodos *Microscopía de inmunofluorescencia*

Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche, se lavaron, se bloquearon y se permeabilizaron en solución de bloqueo (PBS que contenía suero normal de cabra al 3% y Triton X-100 al 0,2%) durante 30 minutos. A continuación, se incubaron con anticuerpos primarios en solución de bloqueo a 4°C durante la noche, se lavaron dos veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces y se tiñeron con DAPI (Sigma) durante 5 minutos, y a continuación para la observación y la fotografía utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 Spectral (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Antes de la inmunofluorescencia, las zonas de latido se cortaron con tijeras, se recogieron en un tubo de 1,5 ml con PBS con bajos niveles de calcio, y se dejaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Estos grupos de células se transfirieron a tampón de enzima que contenía de 0,5 a 1 mg/mL de colagenasa 2 y se incubaron a 37° durante 30-40 minutos. La digestión se terminó con DMEM/F12 de Ham 1:1 (Hyclone), 10% de suero bovino fetal (FBS; PAA), SingleQuot Kit CC-4127 REGM (Lonza). Las muestras se

centrifugaron a continuación y el sedimento se resuspendió en DMEM/F12 de Ham 1:1 (Hyclone), 10% de suero bovino fetal (FBS; PAA), SingleQuot Kit CC-4127 REGM (Lonza). Las suspensiones celulares se cultivaron sobre cubreobjetos recubiertos de gelatina y se cultivaron a 37° durante al menos 2 días antes de la fijación y la inmunofluorescencia.

5 *Diferenciación específica de tejido y mediciones electrofisiológicas*

La diferenciación neuronal, de hepatocitos y cardiomiocitos se realizó como se ha descrito (Pankratz et al., 2007, Stem Cells 25, 1511-1520; Song et al., 2009, Cell Res 19, 1233-1242; Zwi et al., 2009, Circulation 120, 1513-1523). N2 y B27 se adquirieron de Invitrogen, la heparina se adquirió de Sigma, el EGF se adquirió de R & D Systems. La activina A y la oncostatina M se adquirieron de R & D Systems (Minneapolis, MN, USA), BMP2, FGF4, HGF y KGF de PeproTech (Rocky Hill, USA), y la dexametasona de Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA). La tinción con ácido peryódico Schiff (PAS), hepatoZYME-SPF, en RPMI 1640 se realizó utilizando un kit adquirido de Polysciences (Warrington, USA). La caracterización electrofisiológica de los cardiomiocitos derivados de CMPi (día 23) se realizó utilizando el método de fijación de membrana ("patch clamp") de células enteras convencional para registrar los fenotipos potenciales de acción (HEKA Instruments Inc., Southboro, MA) (Chan et al., 2009 J Cardiovasc Electrophysiology 20, 1048-1054). Se prepararon las pipetas del parche a partir de tubos de vidrio de borosilicato de 1,5 mm de pared fina utilizando un extractor de micropipeta Sutter P-97 y tuvieron resistencias típicas de 3-5 MΩ cuando se cargaron con una solución interna que contenía (mM): aspartato K⁺ 110, KCl 20, MgCl₂ 1, Na-GTP 0,1, Mg-ATP 5, Na₂-fosfogreatina 5, EGTA 5, HEPES 10, y se ajustó el pH a 7,3 con KOH. La solución de baño de Tyrode externa consistió en (mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 1, KH₂PO₄ 0,4, CaCl₂ 1,8, glucosa 10, HEPES 5, y se ajustó el pH a 7,4 con NaOH. La actividad eléctrica espontánea se midió mientras los cardiomiocitos derivados de CMPi se quedaron pasivos sin entrada de corriente. Se registraron veinte potenciales de acción consecutivos a partir de los cardiomiocitos derivados de CMPi con descargas espontáneas para asegurar formas de onda estables para el análisis. Los datos fueron corregidos para los potenciales de unión líquida de +15,9 mV. Se detectaron elevaciones transitorias de calcio con formación de imágenes de calcio focales utilizando un protocolo descrito previamente (Ng et al., 2010; J Mol Cell Cardiol 48, 1129-1137). Brevemente, se cargaron cardiomiocitos aislados derivados de CMPi con Fluo-3 AM 5 μM (Invitrogen) durante 25 minutos a 37°C en solución de Tyrode que contenía (mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 1, KH₂PO₄ 0,4, CaCl₂ 1,8, glucosa 10, HEPES 5 a pH 7,4. Las elevaciones transitorias de calcio se registraron con un sistema de formación de imágenes confocal (Olympus Fluoview System versión 4,2 FV300 TIEMPO) montado sobre un microscopio Olympus vertical (IX71) y a continuación se cuantificaron como cambios de intensidad de fluorescencia restada del fondo normalizados a la fluorescencia en el momento inicial restada del fondo. Los datos se introdujeron en el soporte lógico Felix 32 (Photon Technology International) para el análisis.

i) Recogida de orina y expansión de las células

Se esterilizaron los recipientes apropiados (hasta 500 ml) antes de la recolección de orina. Solamente se recogió la porción central del flujo de orina en los recipientes estériles. El volumen normal de las muestras fue de 150 a 200 ml. Las muestras de orina se transfirieron a continuación a una campana de cultivo de tejido en tubos de 50 mL y estos tubos se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado cuidadosamente dentro de una campana de cultivo de tejido, dejando aproximadamente 1 mL o menos de la orina en el tubo. Los sedimentos se resuspendieron individualmente y todos los tubos de 50 mL derivados de una recogida de muestras se agruparon en un único tubo de 50 mL. Se añadieron alrededor de 10 mL de PBS que contenía anfotericina B y penicilina/estreptomina. Las muestras se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante, dejando sólo alrededor de 0,2 mL de muestra. Se añadió alrededor de 1 mL de medio principal para volver a suspender el sedimento celular. La receta de medio primario contenía DMEM/F12 de Ham 1:1 (Hyclone), 10% de suero bovino fetal (FBS; PAA), SingleQuot Kit CC-4127 REGM (Lonza), anfotericina B, y penicilina/estreptomina. Las células se transfirieron a placas de 12 pocillos recubiertas con L-gelatina en 1 mL de medio principal. Los 2 primeros días se añadieron unos pocos cientos de mL de medio principal para retener la concentración de los antibióticos y mantener alto el nivel de nutrición. Los siguientes días se cambió el medio con cuidado por medio REBM (Medio Basal Renal Epitelial, Lonza) que contenía SingleQuot Kit CC-4127 REGM (Lonza) (la combinación de los dos se refiere como medio de células de orina), el procedimiento no se llevó a cabo completamente para permitir la presencia de factores secretados por las células de orina y evitar un estrés innecesario. Las células/colonias visibles aparecieron de manera rutinaria después de 3-6 días. El primer cambio de medio completo se hizo después de que se observaran las primeras células/colonias. Las células se dividieron sobre una superficie más grande con la ayuda de tripsina al 0,25% que contenía EDTA 1 mM cuando el cultivo creció hasta la confluencia. Este y otros procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health. Se generaron RPTEC como describen Wieser et al., 2008, Am J Physiol Renal Physiol 295, F1365-1375, y se mantuvieron en medio de células de orina. Los fibroblastos se obtuvieron a partir de fibroblastos de la piel adquiridos de Coriell Cell Repository y se mantuvieron en DMEM (Invitrogen) + 10% (vol/vol) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone).

A primera vista, los cultivos de células de orina consistían principalmente en las células escamosas (probablemente provenientes de la uretra) y algunas células sanguíneas (eritrocitos en su mayoría), pero después de 2-3 días estas células desaparecieron y fueron sustituidas por colonias pequeñas (3 por muestra de promedio) que crecieron rápidamente. Estas colonias se correspondían con 2 morfologías principales: tipo 1 o tipo 2, de acuerdo con los informes anteriores sobre el aislamiento de células de la orina (Dorrenhaus et al., Arch Toxicol 2000; 74, 618-

626.). Las células de tipo 1 tendían a ser más redondeadas y crecían estrechamente unidas a las células vecinas, lo que sugiere un fenotipo epitelial. Las células de tipo 2 eran moderadamente más alargadas y tendían a crecer un poco más dispersas. En algunas recolecciones de muestras todas las colonias correspondían a 1 de los 2 tipos, pero en otros se mezclaban. Estos cultivos celulares se agruparon al alcanzar una alta densidad y se dividieron para su caracterización adicional o su reprogramación paralela. Los enriquecidos en células de tipo 1 presentaban uniones célula a célula bien formadas positivas para E-cadherina y beta catenina (marcadores de unión adherente), y ZO-1 (proteína 1 Zonula Occludens; un marcador de unión estrecha), como se evaluó mediante microscopía de inmunofluorescencia. También eran positivos para el filamento intermedio queratina 7, un marcador epitelial, y el marcador de los túbulos proximales renales CD13. Además, la distribución de la actina era cortical más que en fibras de tracción. La PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) también apoyó un origen epitelial predominante, como lo demuestra el análisis de E-cadherina, ocludina y claudina 1 (proteínas de unión estrecha), y el transportador de la familia 2 de portadores de soluto de los túbulos proximales renales SLC2A1. Se utilizaron células epiteliales proximales renales (RPTEC; Wieser et al., 2008; Am J Physiol Renal Physiol 295, F1365-1375) y fibroblastos de la piel como controles positivos y negativos, respectivamente, para la inmunofluorescencia y la qPCR. Los cultivos enriquecidos en células de tipo 2 mostraron un patrón de inmunofluorescencia bastante similar, pero la intensidad fue más leve y la distribución más desigual; los resultados de la qPCR fueron igualmente comparables. En ambos casos, se observó poca tinción para los marcadores de tipo fibroblástico fibronectina y vimentina.

ii) Generación y expansión de CMPOi

Se reprogramaron muestras de 12 adultos jóvenes de origen Chino o de raza Caucásica, 7 correspondiente a hombres y 5 a mujeres. Las células de orina en los pases 2-3 fueron transducidas con retrovirus que producían Sox2, Klf4, Oct4 y c-Myc (Cai et al 2010; J Biol Chem 285, 11227 a 11234; Esteban et al., 2010; Cell Stem Cell 6, 71-79): Los plásmidos retrovirales que producían los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc humanos se adquirieron de Addgene (Cambridge, MA, USA). Los sobrenadantes virales se recogieron en 2 días consecutivos comenzando 48 horas después de la transfección. Las células de orina en los pases 2-4 se trataron con tripsina y se sembraron en placas de seis pocillos. Se añadieron 60.000 células por pocillo. Las células se infectaron con los sobrenadantes virales generados por transfección de células 293T (utilizando Lipofectamine 2000, Invitrogen) con vectores retrovirales pMXs (Addgene) que contenían los ADNc de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc humanos. Se realizaron dos rondas de infección sucesivamente (12 horas cada una). Se añadió polibreno (Sigma) para aumentar la eficacia de la infección. Después de la segunda ronda de infección (la eficacia de infección estaba cerca de 100%, como se demuestra por la transducción de control con vectores que expresan GFP), el medio de cultivo de tejido de las células transducidas se cambió por medio de células de orina, y se renovó cada día. Los días 3 ó 4, se trataron con tripsina las células y se contó su número. De manera rutinaria, se sembraron 50.000 células sobre una capa de alimentadores en una placa de cultivo de 10 cm y se utilizó un medio de CME humanas (F12 [Invitrogen] + KSR al 20% [Reemplazo de Suero para modificación genética para inactivación de un gen, Invitrogen] + 10 ng/mL de factor crecimiento de fibroblastos básico + aminoácidos no esenciales [Invitrogen], L-glutamina, y beta mercaptoetanol), que se renovó todos los días. El día 5, el medio se cambió por medio de CME humanas + ácido valproico 1 mM (VPA; Sigma) o mitad de medio de CME + mitad de medio dFBS (que consistía en DMEM con alto contenido de glucosa [Invitrogen] + suero bovino fetal definido humano al 20% [FBS, Hyclone] + VPA. El VPA solamente se mantuvo desde el día 5 al 12. El medio se cambió por medio mTesR1 (Stemcell), y se renovó todos los días hasta el último día del experimento. A partir del día 16, las colonias que eran lo suficientemente grandes y que se podían identificar como de tipo CME humanas (esto es, morfología plana con bordes definidos y grandes núcleos que contenían nucléolos prominentes), pudieron ser succionadas mecánicamente y expandidas en medio de CME humanas sobre alimentadores o sobre medio mTesR1 en Matrigel.

iii) Caracterización de CMPOi

La tinción de AP, la integración del transgén, la cariotipificación y la secuenciación con bisulfato se realizaron como describen Cai et al., 2010; J Biol Chem 285, 11227-11234; Esteban et al., 2010; Cell Stem Cell 6, 71-79.

El análisis STR se realizó utilizando un Applied Biosystems Genetic Analyzer (ABI3130, ABI). El ADN genómico fue extraído utilizando DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y el ARN total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen, Paisley, USA). La qPCR se realizó con un Thermal Cycler Dice™ Real Time System (ABI7300, ABI, Foster, California, USA) y SYBR Green Premix EX Taq™ (Takara, Shiga, Japón); la beta actina se utilizó para la normalización y todos los artículos se midieron por triplicado. Se prepararon micromatrices de ADN utilizando Human HT-12 V4.0 Expression Beadchip de Illumina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los chips se escanearon utilizando Illumina BeadChip Reader y los datos se analizaron utilizando Illumina BeadStudio Application. Para los teratomas, se inyectaron por vía subcutánea o por vía intramuscular 2×10^6 CMPOi en la pata trasera derecha de ratones NOD-SCID inmunocomprometidos. Los tumores fueron extirpados 8-10 semanas después, se fijaron y se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Para la diferenciación EB, se trataron las CMPOi sobre el alimentador con dispasa (Invitrogen) y se recogieron por medio de raspado. Después de la centrifugación, los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de CME humanas sin bFGF y se cultivaron durante 8 días en placas de no adherentes. Los EB fueron transferidos a continuación a placas recubiertas con gelatina para permitir la diferenciación de otros 8 días antes del procesamiento para el análisis de inmunofluorescencia.

La caracterización del cultivo primario y las CMPOi resultantes mostraron que, de manera rutinaria, aparecían pequeñas colonias en los días 9-16, variando esto entre los donantes, sin patrón perceptible. Muchas de estas colonias adoptaban progresivamente una morfología de tipo CME humanas y se recogían a partir del día 16 a 25. La eficiencia de reprogramación también varió entre los donantes, pero en general era bastante alta, oscilando entre 0,1% y 4%. Las CMPOi también se produjeron a partir de un individuo varón de 65 años de edad, la eficiencia de reprogramación fue menor (0,01%), pero aún significativamente mayor que la referida para las células de sangre periférica. Por otra parte, era posible congelar y descongelar las células de orina de varios donantes antes de la transducción, y esto no alteraba la eficacia de reprogramación. Las células de orina también podrían estar infectadas en pases posteriores aunque con una caída menor de la eficacia.

Después de la expansión de colonias, las CMPOi se caracterizaron por medio de procedimientos convencionales, incluyendo la tinción con fosfatasa alcalina (AP), y mostraron colonias de células claramente positivas con fuerte tinción AP visualizadas por la tinción oscura de toda la colonia. Estas colonias presentaron una tinción positiva adicional en la tinción por inmunofluorescencia indirecta para los marcadores ME TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, SSEA-3 y SSEA-4. Además, se observó la qPCR para los genes CME endógenos más el silenciamiento de estos transgenes. Las micromatrices de ADN demostraron una expresión génica global cercana a CME H9, ya que las unidades de fluorescencia arbitrarias de las micromatrices de las células ME representadas frente a las de las CMPOi muestran una pendiente lineal con un ángulo de 45°. El análisis de repetición en tándem individual (STR) de las células de orina de donantes y de CMPOi mostró un origen coincidente en todos los casos. Si las circunstancias eran tales, esto último excluye la contaminación poco probable y reprogramación de células de un compañero sexual.

Después de la expansión de colonias, las CMPOi se caracterizaron por procedimientos convencionales, incluyendo la tinción con fosfatasa alcalina y mostraron colonias de células claramente positivas con fuerte tinción AP visualizadas por la tinción oscura de toda la colonia, mientras que las células no transfectadas no mostraban ninguna tinción para la fosfatasa alcalina. Estas mostraron un cariotipo normal después de la integración del transgén en el ADN genómico, y presentaron una tinción positiva adicional en la tinción de inmunofluorescencia indirecta para los marcadores ME TRA-1-60, Tra-1-81, Nanog, SSEA-3 y SSEA-4. Por otra parte, se observó la qPCR para los genes endógenos de las CME, más el silenciamiento de estos transgenes (que se muestran en la siguiente Tabla; hTERT indica la transcriptasa inversa de la telomerasa humana). Los valores se refieren a las células de orina de donantes; las CME H9 fueron utilizadas como control). Las micromatrices de ADN demostraron una expresión génica global cercana a CME H9 ya que las unidades de fluorescencia arbitrarias de las micromatrices de las células ME representadas frente a las de las CMPOi muestran una pendiente lineal con un ángulo de 45°. La secuenciación con bisulfito mostró una extensa desmetilación en los promotores proximales Oct4 y Nanog en 2 clones de CMPOi representativos del mismo donante. El análisis de repeticiones en tándem individuales (STR) de las células de orina de donantes y las CMPOi mostró un origen coincidente y las micromatrices de ADN demostraron perfil de expresión génico global próximo a las CME H9.

	Células de donantes	UC-c0406 CMPi C1P5	UC-c0406 CMPi C4P7	UC-S0730 CMPi 2P4	UC-S0730 CMPi C3P4	UC-GZ0816 CMPi C3P3	UC-ZGZ0816 CMPi C4P2	CME H9
OCT4	1	110,43	120,98	101,28	91,59	153,20	108,96	269,94
SOX2	1	992,36	1331,22	4195,71	3884,33	1651,03	1133,96	1587,38
NANOG	1	1178,53	856,14	111,00	113,12	1128,93	1172,23	402,32
hTERT	1	11,964,73	14,498,34	1311,36	1263,01	10,149,00	7608,26	9768,02

iv) Demostración del potencial de multi-diferenciación de las CMPOi

Para demostrar que las CMPOi son pluripotentes, se llevó a cabo la diferenciación no específica a través de la formación de teratoma (Figura 1) y cuerpo embrioide (EB). En ambos casos, se observó la aparición de derivados de las capas 3 germinales, y los teratomas contenían en cambio estructuras bastante complejas sin signo obvio de necrosis o invasión de la cápsula del tumor (Figura 1). A continuación, se llevó a cabo la diferenciación de CMPOi dirigida a linajes neuronales (células madre neurales, neuronas y astrocitos) (Figura 2A), cardiomiocitos (Figura 2B) y hepatocitos (Figura 2B); se detectó la acumulación de glucógeno con tinción de ácido peryódico de Schiff, que fue verificada por microscopía de inmunofluorescencia para los marcadores adecuados y también la qPCR (sólo para los hepatocitos y cardiomiocitos). Cabe señalar que se produjo la diferenciación neural para 12 CMPOi correspondientes a 11 donantes, hepatocitos para 4 clones de 3 donantes, y cardiomiocitos para 14 clones de 11 donantes. Un video mostró una alta proporción de EB con latido espontáneo (entre 30-75%). Del mismo modo, la medición de la electrofisiología de los potenciales de acción (Figura 2D) y los aumentos transitorios de calcio (propiedades electrofisiológicas de cardiomiocitos de dos clones mostraron un comportamiento similar a los cardiomiocitos humanos producidos a partir de las CME humanas o CMPi derivadas de fibroblastos).

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar células diferenciadas de interés a partir de células de donantes de otro tipo de células, que comprende
 - i) expansión de las células de orina somáticas exfoliadas de la orina y
 - 5 ii) generación de células diferenciadas a partir de dichas células expandidas mediante la reprogramación de dichas células para que se conviertan en células madre pluripotentes derivadas de orina inducidas (CMPOi) y la diferenciación de dichas CMPOi a dichas células de interés.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células de orina exfoliadas se han obtenido a partir de un individuo enfermo o sano y se seleccionan entre células epiteliales, fibroblastoides o cancerosas.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha reprogramación se realiza por medio de una mezcla de factores de reprogramación exógenos que comprenden factores seleccionados entre un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha reprogramación se realiza por medio de una mezcla de factores de reprogramación exógenos que comprenden factores seleccionados entre Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc y Nanog.
- 15 5. El método de la reivindicación 3 ó 4, en donde dicha reprogramación implica la expresión de factores de reprogramación por las células sin integración genómica y/o sin expresión de oncogenes.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicha reprogramación comprende adicionalmente la aplicación de moléculas pequeñas, ARN de interferencia pequeños o microARN que aumentan la eficacia o reemplazan uno o más de dichos factores de reprogramación.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células son células humanas.
8. Un método para generar células madre derivadas de orina pluripotentes inducidas (CMPOi), que comprende
 - i. la expansión de células de orina somáticas exfoliadas y
 - ii. la reprogramación de dichas células expandidas para que se conviertan en CMPOi.
- 25 9. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de modificar genéticamente las CMPOi, o células diferenciadas derivadas de las mismas, para que porte una molécula de ácido nucleico que corrija un defecto causalmente implicado en una enfermedad genética.
10. El uso de células de orina somáticas exfoliadas para la generación de células madre pluripotentes inducidas.
11. El uso de células de orina somáticas exfoliadas para la generación de células diferenciadas de interés, en donde dichas células diferenciadas se han obtenido mediante la reprogramación de células de orina somáticas exfoliadas para que se conviertan en células madre pluripotentes inducidas (CMPi) y a continuación diferenciando dichas CMPi a las células de interés.
- 30

Fig. 1

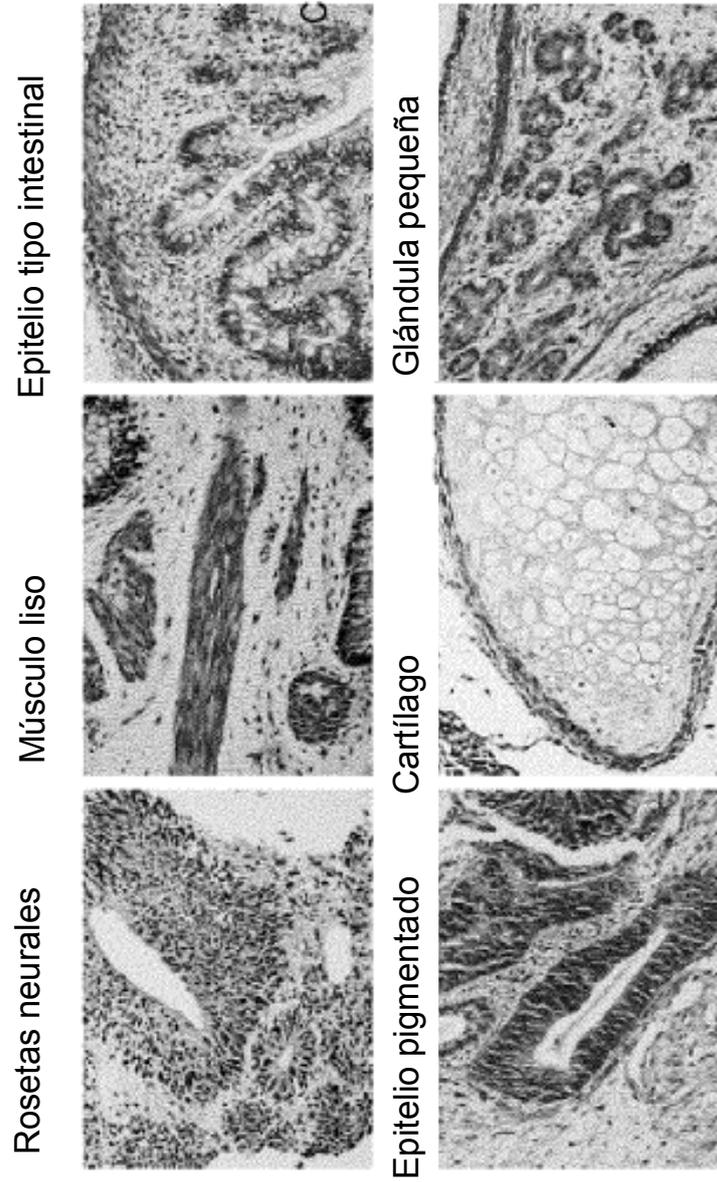


Fig. 2

