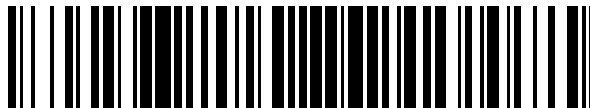


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 533**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0784** (2010.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2009 PCT/US2009/038442**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09724052 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2268794**

54 Título: **Diferenciación de células madre pluripotentes de primate a células de linaje hematopoyéticas**

30 Prioridad:

**16.07.2008 US 81242 P**

**27.03.2008 US 39835 P**

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

**22.12.2017**

73 Titular/es:

**ASTERIAS BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
6300 Dumbarton Circle  
Fremont, CA 94555, US**

72 Inventor/es:

**TSENG, SUYI;  
MAJUMDAR, ANISH, SEN;  
NISHIMOTO, KEVIN;  
REDDY, ANITA y  
LEBKOWSKI, JANE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 647 533 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

Diferenciación de células madre pluripotentes de primate a células de linaje hematopoyéticas

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con el campo de la biología de células madre.

## 10 ANTECEDENTES

10 Las células madre pluripotentes tienen la capacidad tanto de proliferarse continuamente en cultivo y, también bajo condiciones de crecimiento apropiadas, diferencias en tipos de células de linaje restringido representativas de todas las tres capas germinales primarias: endodermo, mesodermo y ectodermo (Patentes de Estados Unidos Nos. 5,843,780; 6,200,806; 7,029,913; Shamblo et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726; Takahashi et al., (2007) Cell 131(5):861; Yu et al., (2007) Science 318:5858). La definición de las condiciones de crecimiento apropiadas para los tipos celulares de linaje restringido proporcionará virtualmente un suministro ilimitado de ese tipo de célula para su uso en investigación y aplicaciones terapéuticas.

20 Sería particularmente útil poder diferenciar las células madre pluripotentes en células de linaje hematopoyético. Las células del linaje hematopoyético se desarrollan a partir de la capa del mesodermo e incluyen glóbulos blancos y rojos, que constituyen los sistemas inmunitario y circulatorio, respectivamente. Un suministro ilimitado de estas células proporcionaría las herramientas necesarias para comprender mejor el desarrollo y el funcionamiento tanto del sistema inmunitario como del circulatorio. También proporcionaría un entendimiento de las estrategias para modular las respuestas inmunitarias, tanto beneficiosas como perjudiciales.

25 El sistema inmune proporciona una respuesta inmune innata o no específica, así como una respuesta inmune adaptable o específica. La respuesta inmune adaptativa es una respuesta protectora duradera y ésta es la respuesta que la mayoría de los protocolos de vacuna intentan estimular. Los participantes celulares en la respuesta inmune adaptativa incluyen linfocitos (células T y células B), así como células dendríticas (DC). Las células T y las células B eliminan los patógenos diana reconociendo específicamente los epítopos antigénicos expresados en el patógeno.

35 Las células T tienen capacidad citotóxica que es especialmente adecuada para dirigirse a las células tumorales y las infectadas por virus. Las células B secretan anticuerpos que se enlazan a los antígenos diana y activan el sistema del complemento facilitando la opsonización y la lisis del objetivo. Ambas respuestas se caracterizan como respuestas de memoria y, por lo tanto, son protectoras durante un período de tiempo. Las DC juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Ellas presentan antígeno a los linfocitos en el contexto del complejo de histocompatibilidad principal apropiado (MHC) y, por lo tanto, proporcionan el estímulo inicial para el montaje de la respuesta inmune adaptativa. Un suministro listo de DC podría proporcionar un medio para generar una respuesta inmune terapéutica o profiláctica en un huésped.

40 Varios estudios han demostrado el potencial de las DC como vehículos para generar una respuesta inmune adaptativa (véase, por ejemplo, Mayordomo et al., (1995) Nature Med 1:1297; Celluzi et al., (1996) J. Exp. Med. 183: 283; Su et al., (1998) J. Exp. Med. 188:809) que incluyen estudios que han investigado los efectos de la irradiación de las DC (véase, por ejemplo, Cao et al. (2004) Cell Biology International 28:223; Merrick et al., (2005) British Journal Of Cancer 92:1450; Young et al. (1993) Blood 81(11):2987; Denfield et al. (2001) Journal Of Leukocyte Biology 69:548; Dudda et al. (2004) Journal of Investigative Dermatology 122:945).

50 El potencial de las células dendríticas junto con la promesa de células madre pluripotentes ha llevado a varios investigadores a intentar diferenciar las células madre pluripotentes en las DC o sus precursores (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 7,247,480; Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos.: 2002/0086005; 2003/0153082; 2006/0275901; 2006/0147432; 2006/0063255; 2006/0147432; Fairchild et al., (2005) International Immunopharmacology 5:13; Tacke et al., (2007) Nature Reviews Immunology 7:790; Senju et al., (2007) Stem Cells 25(11):2720; Sluvkin et al., (2006) J of Immunology 176:2924; Li et al., (2001) Blood 98(2):335; Kaufman et al., (2001) Proc Natl Acad Sci 98(19):10716; Chadwick et al., (2003) Blood 102(3):906; Zhan et al., (2004) Lancet 364:163; Fairchild et al., (2000) Current Biology 10:1515; Kennedy et al., (2007) Blood 109(7):2679; Ng et al., (2005) Blood 106(5):1601; Fehling et al., (2003) Development 130:4217; Lu et al., (2004) Blood 103(11):4134; Zambidis et al., (2005) Blood 106(3):860; Bandi et al., (2008) AIDS Research and Therapy 5:1; Pick et al., (2007) Stem Cells 25:2206).

60 Muchos de estos investigadores confiaron en células estromales y/o células alimentadoras para cultivar y/o diferenciar sus células madre. El uso de células alimentadoras y células estromales es incómodo, de alto coste, lento y difícil de ampliar. Algunos de estos investigadores usaron productos animales como suero animal en sus protocolos. El uso de productos animales, sin embargo, conlleva el riesgo de contaminación de las células con agentes infecciosos zoonóticos. Aún otros investigadores se confiaron en protocolos de diferenciación aleatoria o mal formulados que crearon resultados impredecibles y generalmente de bajo rendimiento del producto.

65

Existe la necesidad de células de linaje hematopoyético diferenciadas de células madre pluripotentes y de métodos para producir estas células que sean expansibles, económicas, eficientes, confiables, seguras y capaces de proporcionar un buen rendimiento del producto. Diversas realizaciones de la invención descritas en este documento satisfacen también estas necesidades y otras necesidades.

5

## RESUMEN DE LA INVENCION

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la diferenciación in vitro de células madre pluripotentes de primate (pPS) en células de linaje hematopoyético. Las células pPS pueden ser células madre pluripotentes humanas que son adecuadas para la diferenciación en células de linaje hematopoyético humano. La célula de linaje hematopoyético puede incluir, por ejemplo, una célula dendrítica inmadura (imDC), una célula dendrítica madura (mDC), una célula precursora mieloide, un monocito.

10

En ciertas otras realizaciones, la invención proporciona un método para la diferenciación in vitro de células pPS en células del mesodermo.

15

La diferenciación de células pPS en células de linaje hematopoyético puede incluir el contacto de células in vitro, por ejemplo, células pPS, con un cóctel de diferenciación que comprende una pluralidad de citocinas exógenas, y/o una pluralidad de ligandos exógenos a proteínas expresadas en la superficie celular (que incluyen, por ejemplo, ligandos exógenos a receptores de citocinas tales como un anticuerpo que se enlaza específicamente a la citocina receptor), de modo que la población celular se diferencia en una célula que tiene un fenotipo diferente, por ejemplo el fenotipo de una célula de linaje hematopoyético, mientras se mantiene esencialmente el mismo genotipo. Las citocinas exógenas adecuadas pueden incluir una pluralidad de las siguientes: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), ligando de cinasa hepática fetal (FLT3L), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 3 (IL-3).

20

25

La referencia a las células que tienen el mismo genotipo no implica que las células no puedan ser manipuladas genéticamente por la mano humana (las realizaciones que abarcan las células genéticamente alteradas se describen más adelante), o que los cambios muy pequeños (por ejemplo, menos de una fracción de un porcentaje del genoma completo) puede ocurrir espontáneamente (por ejemplo, en las regiones no codificadoras), sino más bien simplemente sugerir que el acto de diferenciar las células de las células pPS en células de linaje hematopoyético no dará lugar, por sí mismo, a un genotipo alterado. Típicamente, la identidad genética entre una célula original (célula indiferenciada) y su progenie diferenciada será similar a la identidad genética encontrada entre gemelos idénticos.

30

35

En ciertas realizaciones, el método de diferenciación in vitro de células pPS en células de linaje hematopoyético se puede practicar libre de suero. En algunas realizaciones, el método de diferenciación de células pPS en células de linaje hematopoyético puede practicarse libre de alimentador. En diversas realizaciones, el método de diferenciación de células pPS en células de linaje hematopoyético puede practicarse libre de células estromales. En ciertas realizaciones, el método de diferenciación de células pPS en células de linaje hematopoyético puede practicarse sin la adición de IL-3 exógena o la adición de un ligando exógeno al receptor de IL-3.

40

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en imDC que comprende poner en contacto las células pPS con una pluralidad de citocinas exógenas que comprenden GM-CSF y BMP-4. La pluralidad de citocinas exógenas puede incluir adicionalmente uno o más de los siguientes: VEGF, SCF, TPO, FLT3L e IL-3. En algunas realizaciones, IL-4 también se puede incluir en este cóctel de diferenciación.

45

En otras realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en mDC que comprende 1) poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende una pluralidad de citocinas exógenas y/o una pluralidad de ligandos exógenos a una proteína expresada en la superficie celular, por ejemplo, a un receptor de citocina, adecuado para diferenciar células pPS a imDC, diferenciando así las células pPS en imDC; y 2) poner en contacto las imDC con un cóctel de maduración que comprende una pluralidad de citocinas exógenas y/o ligandos exógenos a una proteína expresada en la superficie celular, por ejemplo, a un receptor de citocinas, adecuado para facilitar la maduración de las imDC a mDC diferenciando así el imDC en mDC. El cóctel de diferenciación puede comprender una pluralidad de los siguientes: GM-CSF, VEGF, BMP-4, SCF, TPO, FLT3L e IL-3. El cóctel de maduración puede comprender una pluralidad de los siguientes: factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), prostaglandina E2 (PGE2), poliinosínico: ácido policitidílico (POLY I:C), interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), CD40L y GM-CSF.

50

55

60

En una realización, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en mDC que comprende poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende BMP-4, GM-CSF, VEGF y SCF y un cóctel de maduración adecuado, por ejemplo, un cóctel de maduración que comprende GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y PGE2. En esta realización, IL-4 también se puede incluir en el cóctel de diferenciación.

65

En algunas realizaciones, la composición del cóctel de diferenciación puede permanecer igual en el transcurso de la diferenciación de células pPS a células de linaje hematopoyético. Por ejemplo, el cóctel de diferenciación puede comprender BMP-4, GM-CSF, VEGF y SCF a lo largo del curso de la diferenciación de las células pPS a imDC. En algunas realizaciones, IL-4 también se puede incluir en el cóctel de diferenciación.

5 En otras realizaciones, la composición del cóctel de diferenciación puede cambiar durante el transcurso del protocolo de diferenciación. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, el cóctel de diferenciación puede comprender 4 citocinas exógenas o 4 ligandos exógenos a proteínas de superficie celular para uno o más pasos del protocolo, mientras que en otros pasos del protocolo de diferenciación el cóctel de diferenciación puede comprender 10 3, 2 o 1 citocina(s) exógena(s) o ligando(s) exógeno(s) a una proteína de superficie celular. Por ejemplo, las células pueden ponerse en contacto primero con un cóctel de diferenciación que comprende BMP-4, VEGF y SCF (opcionalmente se puede incluir GM-CSF en este primer paso), seguido de un cóctel de diferenciación que comprende VEGF, SCF y GM-CSF, seguido de un cóctel de diferenciación que comprende SCF y GM-CSF, seguido de un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF, seguido de un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF e interleucina 4 (IL-4), diferenciando así las células pPS en imDC. El imDC puede entonces ponerse en contacto con un cóctel de maduración adecuado, por ejemplo, un cóctel de maduración que comprende IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y PGE2.

20 En aún otras realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en células que expresan uno o más de los siguientes: CD83, CD14, MHC I, MHC II, CD11c y CD11b que comprenden poner en contacto las células pPS con una pluralidad de las siguientes: GM-CSF, BMP-4, VEGF, SCF, FLT3L, TPO e IL-3 y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular.

25 En aún otras realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar in vitro una célula que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y los marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 en células que expresan uno o más de los siguientes: CD83, CD14, MHC I, MHC II, CD11c y CD11b que comprenden poner en contacto las células pPS con una pluralidad de las siguientes: GM-CSF, BMP-4, VEGF, SCF, FLT3L, TPO e IL-3 y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular.

30 En aún otras realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en células que expresan CD83 CD14, MHC I, MHC II, CD11c y CD11b, que comprende poner en contacto las células pPS con una pluralidad de citocinas exógenas que comprenden GM-CSF y BMP-4 y/o un ligando exógeno a un receptor de superficie celular. La pluralidad de citocinas exógenas puede incluir adicionalmente uno o más de los siguientes: 35 VEGF, SCF, FLT3L, TPO e IL-3 y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular. Los ejemplos de proteínas de superficie celular pueden incluir un receptor para una de las citocinas mencionadas anteriormente.

40 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en células que expresan uno o más de los siguientes: MHC-I, MHC-II, CD83, CD205, CD11b, CCR7, CD40, CD86, CD123, CD11c que comprenden poner en contacto las células pPS con 1) un cóctel de diferenciación y luego poner en contacto las células de 1) con un cóctel de maduración. El cóctel de diferenciación puede comprender una pluralidad de los siguientes: GM-CSF, BMP-4 VEGF, SCF, FLT3L, TPO, IL-4 e IL-3 y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular. El cóctel de maduración puede comprender una pluralidad de los siguientes: GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C, IFN $\alpha$  y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular. Los ejemplos de 45 proteínas de superficie celular pueden incluir un receptor para una de las citocinas mencionadas anteriormente.

50 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en células que expresan CD83 que comprende poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación y un cóctel de maduración. El cóctel de diferenciación puede comprender GM-CSF y BMP-4 y/o un ligando exógeno a un receptor de superficie celular. En algunas realizaciones, el cóctel de diferenciación puede incluir además uno o más de los siguientes: VEGF, SCF, FLT3L, TPO, IL-4 e IL-3. El cóctel de maduración puede comprender una pluralidad de los siguientes: TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C, IFN $\alpha$ , CD40L y GM-CSF. En algunas realizaciones, la célula que expresa CD83 también puede expresar uno o más de los siguientes CD86, CD14, CD11b, CD11c, CD205, MHC I y MHC II. En algunas realizaciones, el cóctel de diferenciación puede comprender ligandos exógenos a una proteína de superficie celular, tal como un receptor de citocinas.

60 En otras realizaciones más, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en una población de células que expresan CD45 y CD11c que comprende poner en contacto las células pPS con una pluralidad de citocinas exógenas que comprenden GM-CSF y BMP-4 y/o un ligando exógeno a un receptor de superficie celular. En algunas realizaciones, la pluralidad de citocinas exógenas puede incluir adicionalmente uno o más de los siguientes: VEGF, SCF, FLT3L, TPO e IL-3 y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular. Las células que expresan CD45 pueden ser células CD45<sup>hi</sup>.

65 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para diferenciar in vitro una célula que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y los

- 5 marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 dentro de una población de células que expresan CD45 y CD11c que comprende poner en contacto la célula que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y los marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 con una pluralidad de citocinas exógenas que comprenden GM-CSF y BMP-4 y/o un ligando exógeno a un receptor de superficie celular. En algunas realizaciones, la pluralidad de citocinas exógenas puede incluir adicionalmente uno o más de los siguientes: VEGF, SCF, FLT3L, TPO e IL-3 y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular. Las células que expresan CD45 pueden ser células CD45<sup>hi</sup>.
- 10 La referencia a células de diferenciación que expresan uno o más marcadores puede incluir realizaciones donde la expresión del marcador referenciado aumenta (por ejemplo, como resultado de la diferenciación) cuando se compara con una población de células iniciales (por ejemplo, una población de células precursoras con respecto a la población de células diferenciadas).
- 15 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS in vitro en mesodermo que comprende poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende una pluralidad de citocinas exógenas. El cóctel de diferenciación puede incluir una pluralidad de los siguientes: BMP-4, VEGF, SCF, FLT3L y GM-CSF y/o ligandos exógenos a una proteína de superficie celular. En una realización, el cóctel de diferenciación puede comprender BMP-4, VEGF, SCF.
- 20 En otras realizaciones, la invención proporciona un cultivo celular que comprende una primera población de células que comprende células pPS y una segunda población de células que comprende una célula de linaje hematopoyético. Las células del linaje hematopoyético pueden incluir uno o más de los siguientes: hemangioblastos, células madre hematopoyéticas, células progenitoras mieloides, células progenitoras granulomonocíticas, monocitos, imDC y mDC. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede comprender una pluralidad de citocinas y/o ligandos exógenos a proteínas de superficie celular tales como receptores de citocina. Las citocinas exógenas adecuadas pueden incluir las siguientes: GM-CSF, VEGF, BMP-4, SCF, FLT3L, IL-4, TPO, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C, IFN $\alpha$ . El cultivo celular también puede comprender CD40L exógeno. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede opcionalmente no comprender IL-3 exógena o un ligando exógeno del receptor de IL-3. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de alimentador. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede ser libre de células estromales. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de suero.
- 25 En otras realizaciones más, la invención proporciona un cultivo celular que comprende una primera población de células que comprende células pPS y una segunda población de células que comprende una DC, por ejemplo, una mDC, una imDC. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede comprender una pluralidad de citocinas exógenas. Las citocinas exógenas adecuadas pueden incluir las siguientes: GM-CSF, VEGF, BMP-4, SCF, TPO, TNF $\alpha$ , FLT3L, IL1 $\beta$ , IL-4, IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C, IFN $\alpha$ . El cultivo celular también puede comprender CD40L exógeno. En una realización, la invención proporciona un cultivo celular que comprende una primera población de células que comprende células pPS y una segunda población de células que comprende una DC, por ejemplo, una mDC, una imDC y una BMP-4 exógena y GM-CSF. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede opcionalmente no comprender IL-3 exógena o un ligando exógeno para el receptor de IL-3. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de alimentador. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede ser libre de células estromales. En diversas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de suero. En ciertas realizaciones, el cultivo celular puede irradiarse. Por ejemplo, un cultivo celular irradiado puede incluir un cultivo celular que comprende mDC. El cultivo celular irradiado también puede comprender al menos una célula pPS. En otras realizaciones, las células pueden ponerse en contacto con un agente químico adecuado para inhibir la división celular tal como un quimioterapéutico, por ejemplo, mitomicina, cisplatino.
- 30 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para inhibir la división celular en un cultivo celular que comprende poner en contacto el cultivo celular con una fuente de radiación o un agente químico, en el que el cultivo celular comprende al menos una célula pPS y mDC diferenciadas in vitro de células pPS.
- 35 En otras realizaciones más, la invención proporciona un método para hacer una preparación inmunomoduladora que comprende 1) diferenciar al menos una porción de una población de células pPS en células mDC, obteniendo así una población mixta de células que comprende mDC y al menos una célula pPS y 2) poner en contacto la población mixta de células de 1) con una fuente de radiación o un agente químico obteniendo de este modo una preparación inmunomoduladora. El método puede comprender además poner en contacto la población mixta de células que comprende mDC con un antígeno, por ejemplo, una proteína o un péptido. La población de células puede ponerse en contacto con un antígeno antes de que las células entren en contacto con la radiación. La preparación inmunomoduladora puede estimular una respuesta inmune a un antígeno.
- 40 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para hacer una preparación inmunomoduladora que comprende 1) diferenciar al menos una porción de una población de células pPS en una población que comprende células imDC, obteniendo así una población mixta de células que comprende imDC y al menos una célula pPS; 2) poner en contacto la población de células que comprende imDC con un ácido nucleico que codifica un antígeno; 3) poner en contacto la población de células de 2) con un cóctel de maduración para que el imDC madure
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

en mDC en donde la población comprende al menos una célula pPS y 4) poner en contacto la población mixta de células de 3) con una fuente de radiación o un agente químico obteniendo de ese modo una preparación inmunomoduladora. La preparación inmunomoduladora puede estimular una respuesta inmune al antígeno.

5 En otras realizaciones, la invención proporciona un método para hacer una preparación inmunomoduladora que comprende 1) diferenciar al menos una porción de una población de células pPS en una población que comprende células imDC, obteniendo así una población mixta de células que comprende mDC y al menos una célula pPS; 2) poner en contacto la población de células de 1) con un cóctel de maduración para que la imDC madure en mDC, donde la población de células comprende al menos una célula pPS 3) que pone en contacto la población de células que comprende mDC con un ácido nucleico que codifica un antígeno; y 4) poner en contacto la población mixta de células de 3) con una fuente de radiación o un agente químico obteniendo de este modo una preparación inmunomoduladora. La preparación inmunomoduladora puede estimular una respuesta inmune al antígeno.

10  
15 En otras realizaciones más, la invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una mDC mitóticamente inactivada que es la progenie in vitro de una célula pPS. La composición se puede irradiar o tratar con un agente químico adecuado para inhibir la división celular tal como un agente quimioterapéutico, por ejemplo, mitomicina, cisplatino para inactivar mitóticamente las células. En algunas realizaciones, la composición inmunomoduladora puede comprender una DC, por ejemplo una mDC o una imDC contactada con un antígeno o un ácido nucleico que codifica un antígeno antes de la irradiación. La respuesta inmunomoduladora puede ser una que estimula una respuesta inmune a un antígeno.

20  
25 En otras realizaciones, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende a) obtener una mDC diferenciada in vitro de una célula pPS; b) poner en contacto la mDC con un antígeno o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; c) poner en contacto la mDC de b) con una fuente de radiación o un agente químico adecuado para inhibir la división celular, por ejemplo, mitomicina; d) poner en contacto la mDC de c) con una célula inmunológicamente competente estimulando de ese modo una respuesta inmune al antígeno.

30  
35 En otras realizaciones, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende a) obtener una imDC diferenciada in vitro de una célula pPS; b) poner en contacto la imDC con una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; c) poner en contacto la imDC con un cóctel de maduración (como se describe aquí) de manera que la imDC madure en una mDC d) poner en contacto la mDC de c) con una fuente de radiación o un agente químico adecuado para inhibir la división celular, por ejemplo, mitomicina; e) poner en contacto la mDC de d) con una célula inmunológicamente competente estimulando de ese modo una respuesta inmune al antígeno.

40  
45 En otras realizaciones, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende a) poner en contacto una célula pPS con un cóctel de diferenciación y un cóctel de maduración de manera que el pPS se diferencia en una mDC; b) poner en contacto la mDC de a) con un antígeno o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; c) poner en contacto la mDC de b) con una célula inmunológicamente competente estimulando de ese modo una respuesta inmune al antígeno. El cóctel de diferenciación puede comprender una pluralidad de citocinas exógenas y/o una pluralidad de ligandos exógenos a proteínas de superficie celular. El cóctel de maduración puede comprender GM-CSF, BMP-4, VEGF, SCF, FLT3L, TPO, IL-4 e IL-3. El cóctel de maduración puede comprender uno o más de los siguientes: GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C, IFN $\alpha$ . En algunas realizaciones, el cultivo celular puede opcionalmente no comprender IL-3 exógena o un ligando exógeno para el receptor IL-3. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de alimentador.

50 En algunas realizaciones, el cultivo celular puede ser libre de células estromales. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de suero.

55 En otras realizaciones más, la invención proporciona un kit para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende 1) un cultivo celular que comprende células pPS y DC y 2) uno o más recipientes. Las DC pueden ser mDC o imDC. El cultivo celular puede comprender citocinas exógenas y/o ligandos exógenos a proteínas de superficie celular. Las citocinas exógenas y/o los ligandos exógenos a las proteínas de la superficie celular pueden incluir una pluralidad de los siguientes: GM-CSF, VEGF, BMP-4, SCF, FLT3L, TPO, IL-4, IL-3, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C, IFN $\alpha$ , CD40L. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede opcionalmente no comprender IL-3 exógena o un ligando exógeno al receptor de IL-3. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de alimentador. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede ser libre de células estromales. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede estar libre de suero.

60 En otras realizaciones más, la invención proporciona un kit para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende 1) una mDC irradiada que es la progenie in vitro de una célula pPS y 2) uno o más recipientes.

65 En otras realizaciones más, se describe un kit para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende 1) una mDC mitóticamente inactivada que es la progenie in vitro de una célula pPS; y 2) uno o más recipientes. La mDC puede ponerse en contacto con un agente químico adecuado para inhibir la división celular para inactivar

mitóticamente las células. Un producto químico adecuado para inhibir la división celular puede incluir mitomicinas tales como mitomicina C. Alternativamente, la mDC puede ponerse en contacto con una fuente de radiación para inactivar mitóticamente las células.

5 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un sistema para la producción de células mitóticamente inactivas presentadoras de antígenos que comprende a) una primera población celular aislada que comprende células pPS y b) una segunda población celular aislada que comprende células mitóticamente inactivadas dendríticas maduras que son la progenie in vitro de una porción de las células pPS. Las células dendríticas maduras pueden inactivarse mitóticamente por irradiación o por contacto con un agente químico. Se contempla que la primera población de células aisladas que comprende las células pPS (por ejemplo, la porción que no se usa para preparar la mDC) puede usarse para preparar más de la segunda población aislada diferenciando la primera población de células in vitro.

10 Se contempla que cualquiera de las realizaciones de la invención se puede practicar sustituyendo una o más de los siguientes subgrupos de células pPS: células madre embrionarias humanas, células germinales embrionarias humanas, células madre rhesus, células madre de tití, células madre de transferencia nuclear y/o células madre pluripotentes inducidas, todas las cuales se describen a continuación.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La Figura 1A proporciona un diagrama esquemático de un protocolo de diferenciación utilizado para diferenciar las células pPS a mDC.

25 La Figura 1B es una fotografía de una imagen de microscopía óptica de células hES cultivadas en medios X-VIVO™ 10.

La Figura 1C es un histograma de citometría de flujo que muestra el nivel de expresión de diversos marcadores encontrados en hES indiferenciadas.

30 La Figura 2 es una fotomicrografía de cuerpos embrioides y células progenitoras (panel inferior izquierdo).

Las Figuras 3A y 3B son gráficos que muestran la expresión de diversos factores de transcripción a lo largo del tiempo en un cultivo celular que experimenta diferenciación.

35 Las Figuras 3C muestran la expresión de CD34 y CD45 a lo largo del tiempo, medida por citometría de flujo en un cultivo celular que experimenta diferenciación.

La figura 3D es una fotomicrografía de un cuerpo embrioide quístico.

40 Las Figuras 3E muestran la expresión de CD13 y CD14 a lo largo del tiempo, medida por citometría de flujo en un cultivo celular que experimenta diferenciación.

45 La Figura 3F muestra la expresión de CD14 tanto en la población de CD45<sup>hi</sup> (2 paneles superiores) como en la población de CD45<sup>lo</sup> (2 paneles inferiores) medido por citometría de flujo.

La Figura 3G muestra la expresión de CD11c, CD11b, CD83, CD86 (dos paneles inferiores), HLA-I y HLA-II (panel superior derecho) en una población de CD45<sup>hi</sup> medida por citometría de flujo. El panel superior izquierdo muestra la activación de las poblaciones CD45<sup>hi</sup> y lo.

50 La Figura 4A muestra un análisis de histograma de citometría de flujo de marcadores para imDC.

La Figura 4B muestra un análisis de histograma de citometría de flujo de marcadores para mDC.

55 La Figura 4C es un gráfico que muestra la expresión del factor de transcripción en la diferenciación de cultivos celulares a lo largo del tiempo.

La Figura 4D es una fotomicrografía de un grupo de DC.

60 La Figura 4E es una fotomicrografía de DC teñida con tinción de May Grunwald.

La Figura 5A muestra la activación de las células mediante citometría de flujo para las células dendríticas (R1) (panel superior) y demuestra que la población celular activada para las células dendríticas puede absorber y procesar proteolíticamente el antígeno modelo de DQ-OVA (panel inferior).

65 La Figura 5B es un gráfico que muestra que DC puede procesar y presentar antígeno de las papeas para inducir la producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos T.

Las Figuras 6A-C son gráficos que comparan el perfil de citocina de imDC y mDC.

La Figura 6D es un gráfico que muestra la migración de DC en respuesta a MIP3 $\beta$ .

5 La Figura 7A es un gráfico que muestra que mDC puede estimular células alogénicas en una reacción de linfocito mixto (MLR).

La Figura 7B es un gráfico que muestra la estimulación de la secreción de IFN- $\gamma$  por células T efectoras en respuesta a un antígeno peptídico de CMV presentado en HLA-A2 por mDC (ES-DC).

10 La Figura 7C muestra un análisis de citometría de flujo de la proliferación de linfocitos T marcados con CFSE en respuesta a un péptido CMV presentado en HLA-A2 por mDC (ES-DC).

15 La Figura 8 es un gráfico que muestra la estimulación de la secreción de IFN $\gamma$  por células T efectoras en respuesta a un antígeno peptídico de hTERT presentado en HLA-A2 por mDC (hES-DC).

La Figura 9 muestra un análisis de citometría de flujo de la proliferación de linfocitos T marcados con CFSE en respuesta a un antígeno peptídico hTERT presentado en HLA-A2 por mDC.

20 La Figura 10 es un gráfico que compara la estimulación de una respuesta de células T específica de antígeno mediante mDC irradiado (hES-DC) frente a mDC no irradiado (hES-DC) pulsado o no pulsado con antígeno peptídico.

25 La Figura 11 es un gráfico que compara la migración de DC en respuesta al ligando quimiotáctico MIP3 $\beta$  de mDC irradiado (hES-DC) frente a mDC no irradiado (hES-DC).

La Figura 12 es un gráfico que compara los rendimientos de mDC en células hES cultivadas en medios X-Vivo-10™ o en mTeSR™.

30 La Figura 13 es un gráfico que compara la expresión del marcador de superficie de DC diferenciado in vitro de células hES y madurado en medios Cellgro™ o X-Vivo-15™.

La Figura 14 es un gráfico que compara la migración celular de mDC derivadas de hES cultivadas en Cellgro™ o X-Vivo-15™.

35 La Figura 15 es una gráfica que compara la producción de IL-12 de DC derivadas de hESC cultivadas en medios Cellgro™ o en X-Vivo-15™ con o sin la adición de IL-4 exógena al cóctel de maduración.

40 La Figura 16 es un gráfico que compara la producción de IFN $\gamma$  de células T específicas TERT coincubadas con mDCs transfectadas con GFP; mDCs transfectadas con hTERT-LAMP y células T solas (sin coincubación con células mDC).

#### DEFINICIONES

45 Aproximadamente, como se usa aquí para referirse a una cantidad o un valor, significa + o - 5% de la cantidad o valor establecidos.

50 El cultivo celular, como se usa aquí, se refiere a una pluralidad de células cultivadas in vitro a lo largo del tiempo. El cultivo celular puede originarse a partir de una pluralidad de células pPS o de una sola célula pPS y puede incluir toda la progenie de la célula o células de origen, independientemente de 1) el número de pasajes o divisiones a los que se somete el cultivo celular durante la vida del cultivo; y 2) cualquier cambio en fenotipo a una o más células dentro del cultivo durante la vida del cultivo (por ejemplo, como resultado de la diferenciación de una o más células pPS en el cultivo). Por lo tanto, tal como se usa aquí, un cultivo celular comienza con la siembra inicial de uno o más recipientes adecuados con al menos una célula pPS y finaliza cuando la última progenie superviviente del (de los) fundador(es) original se cosecha o muere. La siembra de uno o más recipientes hg $\approx$ Q de cultivo adicionales con la progenie de las células originales fundadoras también se considera parte del cultivo celular original.

60 La citocina, como se usa aquí, se refiere a una molécula secretada por una célula que afecta el comportamiento de otra célula, o de la misma célula, o ambas.

El término "cuerpos embrioides", como se usa aquí, se refiere a agrupaciones heterogéneas que comprenden células indiferenciadas, diferenciadas y parcialmente diferenciadas que aparecen cuando se permite que las células madre pluripotentes de primate se diferencien de manera inespecífica en cultivos o agregados en suspensión.

65 Como se usa aquí, "célula madre embrionaria" (ES) se refiere a células madre pluripotentes que se derivan de un blastocito antes de la diferenciación sustancial de las células en las tres capas germinales. Excepto cuando se



- 5 requiera lo contrario explícitamente, el término incluye tejido primario y líneas establecidas que tienen características fenotípicas de células ES, y progenie de tales líneas que todavía tienen la capacidad de producir células progenitoras que llevan rasgos fenotípicos de cada una de las tres capas germinales. Las células ES pueden ser células ES humanas (hES). El prototipo de "células madre embrionarias humanas" (células hES) está descrito por Thomson et al. (Science 282:1145, 1998; patente de Estados Unidos 6,200,806) e incluyen las líneas celulares establecidas de referencia descritas aquí.
- 10 Exógeno tal como se usa aquí se refiere a agentes añadidos a un sistema, tal como un cultivo celular. El agente puede ser agregado al sistema por la mano humana.
- 15 Como se usa aquí, "células alimentadoras" se refiere a células no pPS que se cocultivan con células pPS y proporcionan soporte para las células pPS. El soporte puede incluir facilitar el crecimiento y el mantenimiento del cultivo de células pPS proporcionando el cultivo de células pPS con uno o más factores celulares de modo que las células pPS se mantengan en un estado sustancialmente indiferenciado. Las células alimentadoras pueden tener un genoma diferente de las células pPS o el mismo genoma que las células pPS y pueden originarse a partir de una especie que no sea de primates, tal como un ratón, o pueden ser de origen de primates, por ejemplo, humanos. Los ejemplos de células alimentadoras pueden incluir células que tienen el fenotipo de tejido conectivo tal como células fibroblásticas murinas, fibroblastos humanos.
- 20 Como se usa aquí, "libre de alimentador" se refiere a una condición donde la composición referenciada no contiene células alimentadoras añadidas. Para aclarar, el término "libre de alimentador" abarca, entre otras cosas, situaciones en las que las células madre pluripotentes de primates son pasadas de un cultivo que puede incluir algunos alimentadores a un cultivo sin alimentadores añadidos incluso si algunos de los alimentadores del primer cultivo están presentes en el segundo cultivo.
- 25 Las células de linaje hematopoyético, como se usan aquí, se refieren a células diferenciadas in vitro de células pPS y/o su progenie y pueden incluir uno o más de los siguientes: hemangioblastos, células madre hematopoyéticas, células progenitoras linfoides comunes, linfocitos, células progenitoras mieloides comunes (CMP), células progenitoras granulomonocíticas (GMP), monocitos, macrófagos, imDC y mDC.
- 30 La célula inmunológicamente competente, como se usa aquí, se refiere a una célula que es capaz de responder a un antígeno. Las respuestas pueden incluir, por ejemplo, la proliferación celular en respuesta al antígeno, la secreción de una o más citocinas en respuesta a un antígeno, la expresión de uno o más factores de transcripción en respuesta a un antígeno. Los ejemplos de una célula inmunológicamente competente incluyen linfocitos.
- 35 La progenie in vitro de una célula madre pluripotente de primate, como se usa aquí, se refiere a una célula que se diferencia in vitro de un estado pluripotente a un estado no pluripotente, por ejemplo, una DC inmadura, una DC madura.
- 40 Como se usa aquí, "células madre pluripotentes de primate" (pPS) se refiere a células que pueden derivarse de cualquier fuente y que son capaces, en condiciones apropiadas, de producir progenie de primates de diferentes tipos de células que son derivados de todas las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células pPS pueden tener la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad y/o la capacidad de formar células identificables de las tres capas germinales en cultivo de tejidos. En la definición de células madre pluripotentes para primates se incluyen células embrionarias de diversos tipos que incluyen células madre embrionarias humanas (hES) y células germinales embrionarias humanas (hEG) (véase, por ejemplo, Shamblo et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726.); células madre embrionarias de otros primates, tales como células madre de Rhesus (véase, por ejemplo, Thomson et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844), células madre de tití (véase, por ejemplo, (1996) Thomson et al., Biol. Reprod. 55:254.), células madre creadas mediante tecnología de transferencia nuclear (Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2002/0046410), así como células madre pluripotentes inducidas (véase, por ejemplo, Yu et al. (2007) Science 318:5858); Takahashi et al., (2007) Cell 131(5):861).
- 45 Como se usa aquí, "células madre pluripotentes indiferenciadas de primate" se refiere a un cultivo celular en el que una proporción sustancial de células madre pluripotentes de primate y sus derivados en la población presentan características morfológicas de células indiferenciadas. Se entiende que las colonias de células indiferenciadas dentro de la población pueden estar rodeadas por células vecinas que están parcialmente diferenciadas.
- 50 Como se usa aquí, "genéticamente alterado", "transfectado" o "genéticamente transformado" se refiere a un proceso en el que un polinucleótido se ha transferido a una célula por cualquier medio adecuado de manipulación artificial, o donde la célula es una progenie de la célula originalmente alterada y ha heredado el polinucleótido. El polinucleótido comprenderá a menudo una secuencia transcribible que codifica una proteína de interés, que permite a la célula expresar la proteína a un nivel elevado o puede comprender una secuencia que codifica una molécula tal como siARN o ARN antisentido que afecta la expresión de una proteína (expresada por la célula no modificada o como resultado de la introducción de otra secuencia de polinucleótidos) sin que codifique por sí misma una proteína. Se dice que la alteración genética es "heredable" si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.
- 55
- 60
- 65

Libre de suero, como se usa aquí, se refiere a condiciones de crecimiento de cultivo tisular que no tienen suero animal añadido tales como suero bovino fetal, suero de ternero, suero de caballo y suplementos de reemplazo de suero no añadidos disponibles comercialmente tales como B-27. Libre de suero incluye, por ejemplo, medios que pueden comprender albúmina humana, transferrina humana e insulina humana recombinante.

Las células pPS espontáneas diferenciadas, como se usan aquí, se refieren a células pPS dentro de un cultivo celular que diferencian aleatoria y espontáneamente a un fenotipo no pPS, es decir, expresan uno o más marcadores no expresados en células pPS y/o fallan en expresar uno o más marcadores expresados en una célula pPS.

La célula estromal, tal como se usa aquí, se refiere a una célula que puede cocultivarse con otra población, por ejemplo, una población de células pPS con el fin de facilitar la diferenciación de la población de células pPS a un fenotipo deseado, por ejemplo, células de linaje hematopoyético proporcionando uno o más factores celulares. Las células estromales se pueden derivar de la médula ósea de un mamífero. Las células OP9 y S17 son ejemplos de células estromales.

Libre de células estromales, como se usa aquí, significa que las células estromales, o los medios condicionados por células estromales no se agregan ni al cultivo de células pPS indiferenciadas ni a un cultivo de células pPS que son diferenciadoras para las células de linaje hematopoyético.

MHC-I y HLA-I se usan indistintamente, al igual que MHC-II y HLA-II.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos mejorados para la diferenciación in vitro de células pPS en células de linaje hematopoyético. Por lo tanto, ciertas realizaciones de la invención proporcionan condiciones definidas que requieren un número mínimo de factores exógenos (tales como citocinas) adecuados para diferenciar células pPS en células de linaje hematopoyético tales como DC (incluyendo imDC y mDC). En algunas realizaciones, la invención proporciona el contacto de las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende un número mínimo de citocinas exógenas, por ejemplo, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3 citocinas exógenas que generan de esta forma células de linaje hematopoyético. En una realización, las condiciones definidas pueden proporcionar un cóctel de diferenciación que comprende no más de cuatro citocinas exógenas añadidas, por ejemplo, BMP-4, GM-CSF, SCF y VEGF. En otras realizaciones, las condiciones definidas pueden proporcionar para un cóctel de diferenciación que comprende no más de tres citocinas exógenas añadidas, por ejemplo, a) BMP-4, GM-CSF, SCF; b) BMP-4, GM-CSF, VEGF. En algunas realizaciones, un ligando para el receptor de citocina respectivo puede sustituirse por la citocina respectiva y/o proporcionarse además de la citocina respectiva. En realizaciones en las que las células hematopoyéticas son imDC, el cóctel de diferenciación puede comprender además IL-4. El imDC puede contactarse adicionalmente con un cóctel de maduración para producir mDC.

En algunas realizaciones, la invención proporciona condiciones de cultivo simplificadas para diferenciar células pPS a células de linaje hematopoyético tales como DC. Las condiciones de cultivo simplificadas pueden incluir diferenciar células pPS a DC en un cultivo tisular que está libre de suero, libre de alimentador, libre de células estromales y opcionalmente no requiere la adición de IL-3 exógena. La diferenciación de pPS a células de linaje hematopoyético se puede realizar cultivando en una placa directamente el pPS en una superficie sólida adecuada evitando así la necesidad de formar un cuerpo embriode (EB). Estas condiciones de cultivo simplificadas eliminan el riesgo de exposición a agentes infecciosos y también proporcionan un método más rápido y de menos coste para obtener cantidades de células imDC que son suficientes para aplicaciones terapéuticas y de investigación.

#### Métodos de diferenciación de células pPS

El material inicial para diferenciar células pPS en células de linaje hematopoyético incluye células pPS que se han cultivado libres de suero, libres de alimentador y libres de células estromales. Se han descrito las condiciones para cultivar células pPS libres de alimentador y libres de suero, ver por ejemplo, Xu et al., (2001) Nat Biotechnol 19:971; Li et al., (2005) Biotechnol Bioeng 91:688. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso cultivar las células pPS bajo condiciones que sean adecuadas para la formación de agregados celulares, por ejemplo, cuerpos embrioides (EB). La formación de EBs se ha descrito previamente, véanse, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2006/0063255 y la Publicación de PCT No. WO 01/51616. Las células pPS brevemente indiferenciadas se pueden cosechar mediante tratamiento con colagenaza, disociarse en grupos o tiras de células, y pasar a placas de cultivo celular no adherentes como agregados. Las células pPS cosechadas pueden incluir algunas células diferenciadas espontáneamente. Se contempla que el número de células diferenciadas espontáneamente puede disminuir con el tiempo a medida que las células forman EBs y luego se diferencian en células de linaje hematopoyético. Los agregados pueden alimentarse con un medio adecuado, por ejemplo, X-VIVO 10; X-VIVO 15. Las células pPS se pueden cultivarse libres de alimentador, libres de suero y libres de células estromales tanto antes como después de la formación del EB.

En otras realizaciones, la etapa de formación de EB puede omitirse. De este modo, las células pPS pueden sembrarse directamente en placas sobre un soporte adecuado, tal como un matraz o pozo de cultivo tisular, y cultivarse en un medio que comprende un cóctel de diferenciación.

5 En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para diferenciar células pPS en células de linaje hematopoyético y/o células mesodermo. Las células del linaje hematopoyético pueden incluir imDC. En algunas realizaciones, la invención proporciona un cóctel de diferenciación que comprende una pluralidad de citocinas añadidas exógenamente adecuadas para diferenciar células pPS a células de linaje hematopoyético, por ejemplo, BMP-4 y GM-CSF. Los ejemplos de cócteles de diferenciación pueden incluir cualquiera de los siguientes: a) BMP-4, GM-CSF, VEGF, SCF, FLT3L, TPO e IL-3; b) BMP-4, GM-CSF, VEGF, SCF y FLT3L; c) BMP-4, GM-CSF, VEGF y SCF; d) BMP-4, GM-CSF, SCF; y e) BMP-4, GM-CSF, VEGF. En ciertas realizaciones, se puede usar IL-4 además de las citocinas mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, se pueden usar ligandos para uno o más receptores de citocinas en lugar de, o además de, la citocina.

15 También se ha descubierto que pueden obtenerse diversas células de linaje hematopoyético ajustando la cantidad de tiempo que las células están expuestas al cóctel de diferenciación. En algunas realizaciones de la invención, las células pPS cultivadas durante aproximadamente 5 días con un cóctel de diferenciación con el fin de diferenciar las células en un cultivo que comprende células mesodermo. En otra realización de la invención, las células pPS se cultivan durante aproximadamente 10 días con un cóctel de diferenciación con el fin de diferenciar las células en un cultivo que comprende células madre hematopoyéticas. En otra realización más de la invención, las células pPS se cultivan durante aproximadamente 15 días con un cóctel de diferenciación con el fin de diferenciar las células en un cultivo que comprende una célula progenitora mieloide común. En otra realización más de la invención, las células pPS se cultivan durante aproximadamente 20 días con un cóctel de diferenciación con el fin de diferenciar las células en un cultivo que comprende células progenitoras granulomonocíticas. En otra realización más de la invención, las células pPS se cultivan durante aproximadamente 25 días con un cóctel de diferenciación con el fin de diferenciar las células en un cultivo que comprende monocitos. En una realización adicional de la invención, las células pPS se cultivan durante aproximadamente 30 días con un cóctel de diferenciación con el fin de diferenciar las células en un cultivo que comprende imDC.

30 Algunas realizaciones de la invención proporcionan la maduración de imDC a mDC poniendo en contacto la imDC con un cóctel de maduración adecuado que comprende una pluralidad de citocinas exógenas. El cóctel de maduración puede comprender GM-CSF. Los ejemplos de cócteles de maduración adecuados incluyen cualquiera de los siguientes: a) GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  y PGE2; b) GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2 y CD40L; c) GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , PGE2, POLY I:C e IFN $\alpha$ ; d) GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , POLY I:C e IFN $\alpha$ ; e) GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , POLY I:C, IFN $\alpha$  y CD40L; f) TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2 e IL-6; g) GM-CSF, IL-1 $\beta$ , PGE2 e IFN $\gamma$ ; h) GM-CSF, TNF $\alpha$ , PGE2 e IFN $\gamma$ ; i) GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  y CD40L. En algunas realizaciones, se pueden usar otros ligandos para uno o más receptores de citocinas en lugar de, y/o además de, la citocina. Se pueden usar otros métodos, conocidos en la técnica, para madurar imDC a mDC. Los ejemplos incluyen poner en contacto imDC con lipopolisacárido (LPS), poner en contacto la imDC con oligonucleótidos que contienen CpG, inyectar la imDC en un área de inflamación dentro de un objeto.

El imDC se puede cultivar en presencia del cóctel de maduración, durante al menos aproximadamente 12-15 horas, durante al menos aproximadamente 1 día, durante al menos aproximadamente 2 días, durante al menos aproximadamente 3 días para producir mDC. En algunas realizaciones, la imDC se puede cultivar en presencia del cóctel de maduración durante aproximadamente 24 horas para producir mDC. En otras realizaciones, la imDC se puede cultivar en presencia del cóctel de maduración durante aproximadamente 48 horas para producir mDC.

mDC puede expresar uno o más marcadores tales como CD83, CD86, MHC I y MHC II, pero no CD 14 y puede tener propiedades funcionales similares a DC maduras que se diferencian in vivo. Las propiedades funcionales pueden incluir la capacidad de procesar y presentar antígeno a una célula inmunológicamente competente. El procesamiento y la presentación del antígeno pueden incluir, por ejemplo, la proteólisis de una proteína diana, así como la expresión y el procesamiento de un ácido nucleico que codifica un antígeno diana. La mDC también puede tener la capacidad de migrar dentro del tejido periférico y linfoide. Por lo tanto, se puede inducir la migración de mDC diferenciado de las células pPS de acuerdo con la invención en respuesta a un estímulo apropiado tal como MIP3 $\beta$ . La mDC puede secretar una o más citocinas tales como una o más citocinas proinflamatorias. Las citocinas de ejemplo secretadas por DC de acuerdo con la invención pueden incluir IL-12, IL-10 e IL-6.

Diversas realizaciones de la invención descrita aquí proporcionan métodos para diferenciar células pPS en DC. Se contempla que los métodos pueden comprender además inactivar mitóticamente diversos tipos de células incluyendo las células pPS no deseadas en una población diferenciada, así como células hechas de acuerdo con los métodos descritos más adelante (por ejemplo, cualquier célula del linaje hematopoyético, incluyendo mDC e imDC).

Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención pueden comprender poner en contacto las células DC con un antígeno de proteína o péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno y poniendo en contacto las DC, por ejemplo, un mDC, con una fuente de radiación o un agente químico adecuado para inhibir la división celular. La exposición de la mDC a una fuente de radiación o al agente químico puede ser deseable cuando las mDC están

contenidas en una población de células que comprende al menos una célula pPS. Irradiando las células o tratando las células con el agente químico inhibirá la división celular, mientras se mantiene la funcionalidad de la mDC.

5 Además, tratar las células con una fuente de radiación o un agente químico puede minimizar cualquier efecto indeseable derivado de la presencia de células pPS en la población.

10 En alguna realización, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS en mesodermo que comprende poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende una pluralidad de citocinas exógenas tales como BMP-4, VEGF, SCF y opcionalmente GM-CSF y cultivar las células durante al menos un día diferenciando así las células pPS en mesodermo. En algunas realizaciones, las células pueden cultivarse durante al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días con el cóctel de diferenciación diferenciando así las células pPS en mesodermo.

15 En ciertas realizaciones, las células pPS pueden cultivarse con un cóctel de diferenciación durante aproximadamente 5 días con el fin de diferenciar las células pPS en mesodermo. En algunas realizaciones, el cóctel de diferenciación puede comprender opcionalmente además uno o más de los siguientes: FLT3L, TPO, IL-4 e IL-3.

20 Las células mesodermo pueden expresar uno o más factores o marcadores expresados por células mesodermo. Por ejemplo, la expresión aumentada del factor de transcripción asociado al mesodermo, Brachyury, junto con la expresión disminuida del factor de transcripción asociado a pPS Oct4 y Tra-160 puede ser indicativo de la diferenciación de las células pPS a las células mesodermo. Permitir que el cultivo continúe creciendo en presencia del cóctel de diferenciación puede facilitar una diferenciación adicional de las células mesodermo, por ejemplo, en células de linaje hematopoyético. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el cultivo celular se puede hacer crecer en presencia del cóctel de diferenciación durante un período de tiempo adecuado para diferenciar las células más allá de las células mesodermo y en otras células de linaje hematopoyético. Por ejemplo, las células pueden hacerse crecer al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días con el cóctel de diferenciación descrito aquí diferenciando así las células pPS en células madre hematopoyéticas. Las células pueden expresar uno o más marcadores expresados por células madre hematopoyéticas. Marcadores adecuados pueden incluir CD45, CD34 y HoxB4. En aún otras realizaciones, las células pueden hacerse crecer al menos aproximadamente 22 días, al menos aproximadamente 23 días, al menos aproximadamente 24 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 26 días, al menos aproximadamente 27 días, al menos aproximadamente 28 días, con el cóctel de diferenciación descrito aquí, diferenciando así las células pPS en monocitos. Las células pueden expresar uno o más marcadores expresados por monocitos. Marcadores adecuados pueden incluir CD 14, CD45 y CD11c. En aún otras realizaciones, las células pueden hacerse crecer al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 23, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 31 días, al menos aproximadamente 32 días, al menos aproximadamente 33 días, con el cóctel de diferenciación descrito aquí, diferenciando así las células pPS en imDC. Las células pueden expresar uno o más marcadores expresados por imDC. Marcadores adecuados pueden incluir CD86, CD83 y MHC II.

40 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS en células de linaje hematopoyético que comprende poner en contacto las células pPS con uno o más cócteles de diferenciación de modo que las células pPS se diferencian en uno o más tipos de células de linaje hematopoyético. El método puede estar compuesto por múltiples etapas en las que una o más de las etapas da como resultado la diferenciación de tipos celulares intermedios de linaje hematopoyético. La invención contempla no solo la ejecución de todas las etapas expuestas a continuación, sino también la ejecución de una o más etapas individuales con el fin de obtener un tipo de célula deseada intermedia o precursora de linaje hematopoyético.

50 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS en mesodermo que comprende 1) poner en contacto las células pPS con un primer cóctel de diferenciación que comprende BMP-4, VEGF, SCF y opcionalmente GM-CSF, diferenciando así células pPS en células mesodermo. Las células se pueden cultivar con este cóctel de diferenciación durante aproximadamente 1-5 días. En realizaciones adicionales, las células mesodermo del paso 1) pueden ponerse en contacto con un segundo cóctel de diferenciación que comprende VEGF, SCF, GM-CSF, diferenciando así las células mesodermo en células madre hematopoyéticas. Las células se pueden cultivar con este cóctel de diferenciación durante aproximadamente 1-5 días. En realizaciones adicionales, la célula madre hematopoyética se puede diferenciar adicionalmente en una célula progenitora mielóide común (CMP) poniendo en contacto la célula madre hematopoyética con un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF. Para esta etapa, el cóctel de diferenciación puede comprender además SCF. Las células se pueden cultivar con este cóctel de diferenciación durante aproximadamente 1-10 días. En algunas realizaciones, la CMP se puede diferenciar adicionalmente en una célula progenitora granulocítica/monocítica (GMP) común poniendo en contacto la CMP con un tercer cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF. Las células se pueden cultivar con este cóctel de diferenciación durante aproximadamente 1-5 días. En realizaciones adicionales, el GMP se puede diferenciar adicionalmente en monocitos poniendo en contacto el GMP con un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF. Las células se pueden cultivar con este cóctel de diferenciación durante aproximadamente 1-10 días. En aún otras realizaciones, los monocitos pueden diferenciarse adicionalmente en imDC poniendo en contacto los monocitos con un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF e IL-4. Las células se pueden

cultivar con este cóctel de diferenciación durante aproximadamente 1-5 días. En realizaciones adicionales, la imDC se puede madurar en mDC poniendo en contacto la imDC con cualquiera de los cócteles de maduración descritos más adelante. Las células pueden cultivarse con el cóctel de maduración desde aproximadamente 12-72 horas. En algunas realizaciones, las células se pueden cultivar con el cóctel de maduración durante aproximadamente 24 horas. En otras realizaciones, las células pueden cultivarse con el cóctel de maduración durante aproximadamente 48 horas.

En otras realizaciones más, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS en imDC que comprende poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende lo siguiente: 1) BMP-4 que varía desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; y 2) GM-CSF que varía desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml.

En otras realizaciones más, la invención proporciona un método para diferenciar células pPS en imDC que comprende poner en contacto las células pPS con un cóctel de diferenciación que comprende lo siguiente: 1) BMP-4 que varía desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; 2) VEGF que varía desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; 3) SCF que varía desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml; y 4) GM-CSF que varía desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para enriquecer una población de células progenitoras mieloides que comprende aislar una población alta de CD45+ de un cultivo celular que comprende una población de células CD45+ alta y una población de células CD45+ baja. En una realización adicional, la invención proporciona un método para aislar una célula progenitora de granulocitos que comprende aislar una población baja de CD45+ de un cultivo celular que comprende una población de células CD45+ alta y una población de células CD45+ baja. Alto y bajo son términos relativos. Por lo tanto, una población de células CD45+ baja puede referirse a células que tienen expresión de CD45 aproximadamente 1-2 órdenes de magnitud por encima del fondo, mientras que las células CD45+ alta pueden referirse a células que tienen expresión de CD45 mayor que 2 órdenes de magnitud por encima del fondo, medido usando cualquier ensayo conocido en la técnica, por ejemplo inmunofluorescencia medida usando un detector de fluorescencia, por ejemplo, clasificador de células activado por fluorescente (FACS). El aislamiento de la población de células diana puede realizarse usando cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, las poblaciones celulares pueden aislarse usando un (FACS) disponible comercialmente. En algunas realizaciones, las células pueden aislarse basándose en la intensidad fluorescente de un marcador teñido con un ligando marcado. El ligando marcado puede unirse directamente a la célula o indirectamente a la célula en virtud de otro ligando unido a la célula por la mano humana. Las poblaciones celulares pueden aislarse en función del tamaño y la densidad en función de la dispersión directa y lateral en un clasificador de células. Como ejemplo, las poblaciones CD45+ alta y CD45+ baja pueden separarse usando un clasificador celular con base en tamaño y granularidad.

Las combinaciones de citocinas útiles para llevar a cabo diversas realizaciones de la invención se pueden usar a cualquier concentración de trabajo final adecuada para lograr el efecto deseado. Por ejemplo, BMP-4 puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 120 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; desde aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 50 ng/ml de BMP-4. El VEGF puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 120 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; desde aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 50 ng/ml de VEGF. GM-CSF puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 120 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; desde aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 50 ng/ml de GM-CSF. SCF puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 350 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 300 ng/ml; de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml; desde aproximadamente 15 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 20 ng/ml de SCF. FLT3L puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 350 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 300 ng/ml; desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml; desde aproximadamente 15 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 20 ng/ml de FLT3L. IL-3 se puede usar a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 40 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 25 ng/ml de IL-3. La TPO puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde

- aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 20 ng/ml de TPO. IL-4 se puede usar a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 120 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; desde aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 50 ng/ml de IL-4.
- En algunas realizaciones de la invención, se puede usar un cóctel de maduración que comprende una pluralidad de citocinas para madurar imDC a mDC. Las concentraciones de trabajo finales adecuadas de los componentes de citocina del cóctel de maduración pueden incluir cualquier concentración que madure efectivamente de imDC a mDC. Por ejemplo, puede usarse IFN $\gamma$  a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml; desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 15 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 25 ng/ml de IFN $\gamma$ . En otras realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 10 ng/ml de IFN $\gamma$ . El TNF $\alpha$  puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml; desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml; desde aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml; desde aproximadamente 30 ng/ml a aproximadamente 80 ng/ml; desde aproximadamente 40 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 10 ng/ml de TNF $\alpha$ . IL-1 $\beta$  puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml, desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml; desde aproximadamente 8 ng/ml a aproximadamente 75 ng/ml; desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ . PGE2 puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 0,1 ug/ml a aproximadamente 150 ug/ml; desde aproximadamente 0,5 ug/ml a aproximadamente 100 ug/ml; desde aproximadamente 0,8 ug/ml a aproximadamente 75 ug/ml; desde aproximadamente 1 ug/ml a aproximadamente 50 ug/ml. En algunas realizaciones de la invención, se puede usar aproximadamente 1  $\mu$ g/ml de PGE2. Poly I:C puede usarse a una concentración que varía desde aproximadamente 1 ug/ml a aproximadamente 50 ug/ml, desde aproximadamente 5 ug/ml a aproximadamente 40 ug/ml desde aproximadamente 10 ug/ml a aproximadamente 30 ug/ml, forma aproximadamente 15 ug/ml a aproximadamente 25 ug/ml. En algunas realizaciones de la invención, se pueden usar aproximadamente 20  $\mu$ g/ml de poly I:C.
- En ciertas realizaciones, la invención proporciona la diferenciación de células pPS en células de linaje hematopoyético en las que al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 99% de las células expresan uno o más marcadores o factores que se expresan por las células de linaje hematopoyético.
- Cultivos celulares que comprenden células madre pluripotentes de primate y su progenie diferenciada
- En ciertas realizaciones, la invención proporciona un cultivo celular que comprende una primera población de células que comprende células pPS y una segunda población de células que comprende células de linaje hematopoyético y/o células de mesodermo. Las células de linaje hematopoyético y/o las células de mesodermo pueden surgir en el cultivo como resultado de condiciones de crecimiento específicas que favorecen la diferenciación de células pPS en un tipo de célula diana, por ejemplo, células mesodermo, células precursoras mieloides, monocitos, células dendríticas y similares. Las condiciones de crecimiento pueden incluir proporcionar uno o más cócteles de diferenciación (como se describe más abajo) y en algunas realizaciones un cóctel de maduración (como se describe más adelante). El cultivo celular puede estar libre de uno o más de los siguientes: células alimentadoras, células estromales, suero animal y/o sustituciones séricas disponibles comercialmente tales como B27 e IL-3 exógena.
- En algunas realizaciones, la segunda población de células puede comprender células de mesodermo. En el embrión en desarrollo, el mesodermo se localiza entre el ectodermo y el endodermo. El tejido conectivo, hueso, cartílago, músculo, células del linaje hematopoyético, sangre y vasos sanguíneos, linfáticos, órganos linfoides, notocorda, pleura, pericardio, peritoneo, riñones y gónadas, todos se originan del mesodermo. Las células del mesodermo pueden expresar diversos marcadores que incluyen la expresión del factor de transcripción brachyury. Los niveles de expresión de brachyury pueden aumentar de aproximadamente tres a seis veces en comparación con las células pPS antes de la diferenciación a las células mesodermo. Otros marcadores para mesodermo pueden incluir gooseoid. Gooseoid es un miembro de la subfamilia bicoide de la familia de proteínas asociadas (PRD) homeobox. La proteína codificada actúa como un factor de transcripción y puede ser autorreguladora.

En otras realizaciones, las células de linaje hematopoyético pueden comprender células de hemangioblasto. Las células hemangioblasto tienen la capacidad de diferenciarse aún más en células linfoides de diversos tipos, células mieloides de varios tipos, así como células endoteliales. Los hemangioblastos pueden expresar CD34 y CD133. Loges et al., (2004). *Stem Cells and Development* 13 (1):229. Otros marcadores para hemangioblastos incluyen Flk-1 que es un receptor de dominio de inserto de cinasa.

En otras realizaciones más, las células de linaje hematopoyético pueden comprender células madre hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula encontrada en la sangre, incluidas las células linfoides (cuya progenie incluye células T y linfocitos B) y células mieloides (cuya progenie incluye granulocitos de diversos tipos, monocitos, macrófagos, DC, megacariocitos, plaquetas, eritroblastos y eritrocitos). Los marcadores para células madre hematopoyéticas pueden incluir CD34+, CD59+, Thy1/CD90+, CD38<sup>lo/-</sup>, C-kit/CD117<sup>lo</sup>. En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje de células que expresan al menos un marcador asociado con células madre hematopoyéticas varía desde aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, desde aproximadamente 5% a aproximadamente 17%, desde aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En algunas realizaciones de la invención, aproximadamente el 15% de las células en el cultivo celular expresan al menos un marcador asociado con células madre hematopoyéticas.

En realizaciones adicionales, las células de linaje hematopoyético pueden comprender células progenitoras mieloides comunes. Las células progenitoras mieloides pueden, bajo condiciones de crecimiento apropiadas, diferenciarse en diversas células mieloides que incluyen granulocitos, monocitos, macrófagos, DC, células progenitoras de megacariocitos/eritrocitos. Los marcadores para las células progenitoras mieloides pueden incluir CD13, CD34, IL-3R $\alpha$  (CD123) y CD45RA. En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje de células que expresan al menos un marcador asociado con células progenitoras mieloides varía desde aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, desde aproximadamente 5% a aproximadamente 45%, desde aproximadamente 6% a aproximadamente 38%. En algunas realizaciones de la invención, aproximadamente el 35% de las células en el cultivo celular expresan al menos un marcador asociado con células progenitoras mieloides.

En otras realizaciones más, las células de linaje hematopoyético pueden comprender células progenitoras granulomonocíticas. Las células progenitoras granulomonocíticas pueden, bajo condiciones apropiadas, diferenciarse en granulocitos, monocitos, macrófagos y DC. Los marcadores para células progenitoras granulomonocíticas pueden incluir CD64 (EP0708336).

En realizaciones adicionales, las células de linaje hematopoyético pueden comprender monocitos. Bajo condiciones de crecimiento apropiadas, los monocitos pueden diferenciarse en células DC, macrófagos y granulocitos. Los marcadores para monocitos pueden incluir CD14, CD45<sup>hi</sup>, CD11a, CD11b y CD15. La morfología de monocitos puede incluir la presencia de un gran núcleo bilobulado. En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje de células que expresan al menos un marcador asociado con monocitos varía desde aproximadamente 1% a aproximadamente 75%, desde aproximadamente 5% a aproximadamente 70%, desde aproximadamente 10% a aproximadamente 65%. En algunas realizaciones de la invención, aproximadamente el 65% de las células en el cultivo celular expresan al menos un marcador asociado con monocitos.

En aún otras realizaciones, las células de linaje hematopoyético pueden comprender imDC. Las imDC tienen la capacidad de absorber y procesar el antígeno. Bajo condiciones de crecimiento apropiadas, la imDC puede experimentar maduración para convertirse en mDC adecuada para la presentación de antígenos a una célula inmunológicamente competente. Los marcadores para imDC pueden incluir CD11c<sup>hi</sup>, CD11b, MHC I, MHC II<sup>lo</sup>, CD14<sup>lo</sup>, CD205<sup>lo</sup> y CD83<sup>lo</sup>. En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje de células que expresan al menos un marcador asociado con imDC varía desde aproximadamente 10% a aproximadamente 99%, desde aproximadamente 20% a aproximadamente 99%. En ciertas realizaciones de la invención al menos aproximadamente 90%, aproximadamente 80%, aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50% aproximadamente 40% aproximadamente 30%, aproximadamente 20%, aproximadamente 10% de las células en el cultivo celular expresan al menos un marcador asociado con imDC.

En otras realizaciones más, las células de linaje hematopoyético pueden comprender mDC. El mDC puede tener la capacidad de migrar en respuesta a un estímulo apropiado, por ejemplo, MIP3 $\beta$  y presentar antígeno a una célula inmunológicamente competente tal como un linfocito T. La mDC puede tener una morfología distintiva que incluya la presencia de proyecciones ramificadas o dendritas que emanan fuera de la célula. Los marcadores para mDC pueden incluir CD83, CCR7, CD11c<sup>hi</sup>, CD205, CD86, CD40, MHC I, MHC II y CD14<sup>lo</sup>. En ciertas realizaciones de la invención, el porcentaje de células que expresan al menos un marcador asociado con mDC varía desde aproximadamente 10% a aproximadamente 99%, desde aproximadamente 20% a aproximadamente 99%. En ciertas realizaciones de la invención al menos aproximadamente 90%, aproximadamente 80%, aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, aproximadamente 30%, aproximadamente 20%, aproximadamente 10%, de las células en el cultivo celular expresan al menos un marcador asociado con mDC.

Los marcadores específicos de tejido pueden detectarse usando técnicas inmunológicas adecuadas, como inmunocitometría de flujo o adsorción por afinidad para marcadores de superficie celular, inmunocitoquímica (por ejemplo, de células fijas o secciones de tejido) para marcadores intracelulares o de superficie celular, análisis de

5 inmunoprecipitación Western de extractos celulares e inmunoensayo ligado a enzimas, para extractos celulares o productos secretados en el medio. Se dice que la expresión de un antígeno por una célula es detectable por anticuerpos si una cantidad significativamente detectable de anticuerpo se enlazará al antígeno en un ensayo de inmunocitoquímica o citometría de flujo estándar, opcionalmente después de la fijación de las células, y opcionalmente usando un anticuerpo secundario marcado.

10 La expresión de productos génicos específicos de tejido también puede detectarse a nivel de ARNm mediante análisis de inmunoprecipitación Northern, análisis de hibridación inmunoprecipitación en punto o mediante reacción en cadena de la polimerasa iniciada por transcriptasa inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos de la secuencia en métodos de amplificación estándar usando datos de secuencia públicamente disponibles (GenBank). La expresión de marcadores específicos de tejido detectados a nivel de proteína o ARNm se considera positiva si el nivel es al menos aproximadamente 2 veces superior, más de aproximadamente 10 o aproximadamente 50 veces superior al de una célula madre pluripotente indiferenciada de primate.

15 La expresión de productos génicos específicos de tejido también puede detectarse a nivel de ARNm por análisis de inmunoprecipitación Northern, análisis de hibridación inmunoprecipitación en punto o por reacción en cadena de la polimerasa iniciada por transcriptasa inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos de secuencia en métodos de amplificación estándar. Véase la Patente de Estados Unidos No. 5,843,780 para más detalles. Los datos de secuencia para los marcadores particulares enumerados en esta descripción pueden obtenerse de bases de datos públicas tales como GenBank. Se dice que la expresión al nivel de ARNm es "detectable" según uno de los ensayos descritos en esta divulgación si la realización del ensayo en muestras de células de acuerdo con procedimientos estándar en un experimento controlado típico da como resultado un producto de amplificación o hibridación claramente discernible. La expresión de marcadores específicos de tejido como son detectados a nivel de proteína o ARNm se considera positiva si el nivel es al menos aproximadamente 2 veces, más de aproximadamente 10 o aproximadamente 50 veces superior al de una célula madre pluripotente indiferenciada de primate.

30 Una vez que se han identificado los marcadores en la superficie de las células del fenotipo deseado, se pueden usar para inmunoselección para enriquecer aún más la población mediante técnicas tales como inmunoanálisis o FACS mediado por anticuerpos.

Irradiación de DC diferenciada de células pPS

35 La invención contempla métodos para irradiar poblaciones de células que comprenden mDC o imDC diferenciadas in vitro de células pPS, es decir, son la progenie in vitro de células pPS, así como cultivos celulares irradiados que comprenden mDC o imDC diferenciados in vitro de células pPS. Otras realizaciones de la invención contemplan preparaciones inmunomoduladoras irradiadas y métodos para preparar las mismas, así como métodos para estimular una respuesta inmune utilizando una población celular irradiada que comprende mDC. Todavía otras realizaciones de la invención contemplan kits que comprenden mDC irradiada.

40 Irradiando mDC diferenciada de células pPS inhibe cualquier división celular adicional disminuyendo de ese modo cualquier riesgo, tal como la formación de teratomas, planteado por células (por ejemplo, células pPS) que no se han diferenciado completamente en mDC. La mDC irradiada puede mantener propiedades funcionales asociadas con DC no irradiadas tales como DC derivadas de PBMC, y por lo tanto la mDC irradiada puede ser capaz de procesar y presentar antígeno a una célula inmunológicamente competente y hacer que esa célula responda al antígeno presentado. La mDC irradiada también puede mantener la capacidad de migrar en respuesta a estímulos quimiotácticos. Además, la mDC irradiada también puede continuar expresando marcadores típicamente encontrados en mDC, por ejemplo, mDC derivada de PBMC. Estos marcadores pueden incluir HLA-II, HLA-I y CD83.

50 Se contempla además que la mDC de acuerdo con la invención se puede poner en contacto con un antígeno o un ácido nucleico que codifica un antígeno antes de la exposición a una fuente de radiación.

55 En algunas realizaciones, puede ponerse en contacto un mDC con antígeno, por ejemplo, una proteína o un péptido y luego se irradia. En otras realizaciones, puede ponerse en contacto un mDC, por ejemplo, sometido a electroporación o se puso en contacto usando cualquier otro medio de transfección adecuado, con un ácido nucleico tal como una molécula de ARN y luego se irradió. En algunas realizaciones, las células pueden ponerse en contacto con el ácido nucleico y luego dejarse reposar durante aproximadamente 24 horas (por ejemplo, a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%). Las células pueden colocarse entonces en un medio crio adecuado (por ejemplo, uno que comprende DMSO) y luego congelarse a aproximadamente -80 °C. Las células congeladas pueden luego irradiarse (por ejemplo, en hielo seco) y luego almacenarse congeladas (por ejemplo, en nitrógeno líquido) hasta que se requiera un uso adicional.

60 Se puede usar cualquier fuente de radiación adecuada para irradiar mDC de acuerdo con la invención. En una realización, la fuente de radiación puede ser una fuente de radiación ionizante. Como ejemplo, una radiografía puede proporcionar una fuente adecuada de radiación. Otros tipos de radiación que pueden ser adecuados incluyen la irradiación UV, por ejemplo, irradiación gamma

65



La población celular que comprende mDC diferenciada in vitro de células pPS puede irradiarse durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, tal que la división celular se inhibe. Parámetros tales como la dosificación de radiación, el tamaño de la población celular y el tiempo de exposición pueden optimizarse empíricamente y luego probarse cultivando células después de la radiación y determinando si las células continúan o no dividiéndose. La determinación de la división celular se puede lograr contando las células manualmente usando un hemacitómetro. Alternativamente, se puede usar un contador celular automatizado.

Cuando la fuente de radiación es una radiografía, una dosis de radiación adecuada puede oscilar entre aproximadamente 300 rad a aproximadamente 3.500 rad; desde aproximadamente 400 rad a aproximadamente 3.000 rad; desde aproximadamente 500 rad a aproximadamente 2.500 rad; desde aproximadamente 500 rad a aproximadamente 2.000 rad; desde aproximadamente 400 rad a aproximadamente 1.500 rad. En una realización, se aplican aproximadamente 2.000 rad a una población de células que comprende mDC. En otra realización, se aplican aproximadamente 1.500 rad a una población de células que comprende mDC. En una realización adicional, se aplican aproximadamente 1.000 rad a una población de células que comprende mDC. En otra realización más, se aplican aproximadamente 500 rad a una población de células que comprende mDC.

Cuando la fuente de radiación es irradiación UV, una dosis adecuada puede variar desde aproximadamente 10 J/m<sup>2</sup> a aproximadamente 3.000 J/m<sup>2</sup>; desde aproximadamente 20 J/m<sup>2</sup> a aproximadamente 2.000 J/m<sup>2</sup>; desde aproximadamente 25 J/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1.500 J/m<sup>2</sup>; desde aproximadamente 30 J/m<sup>2</sup> a aproximadamente 500 J/m<sup>2</sup>; desde aproximadamente 50 J/m<sup>2</sup> a aproximadamente 200 J/m<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, pueden usarse aproximadamente 50 J/m<sup>2</sup>. En otras realizaciones, pueden usarse aproximadamente 100 J/m<sup>2</sup>. En otras realizaciones, pueden usarse aproximadamente 200 J/m<sup>2</sup>. En aún otras realizaciones, se pueden usar aproximadamente 300 J/m<sup>2</sup>. En otras realizaciones más, pueden usarse aproximadamente 500 J/m<sup>2</sup>.

Donde la fuente de radiación es un rayo X, las células pueden suspenderse en un medio o regulador adecuado antes de la exposición a la fuente de radiación. Un medio adecuado incluiría cualquier medio comercialmente disponible para cultivar o diferenciar células madre. Como ejemplo, se puede usar medio AIM V (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un regulador adecuado puede incluir cualquier regulador isotónico, por ejemplo, PBS. El volumen de los medios utilizados dependerá del tamaño de la población de células a irradiar. Para una población de células que varía desde aproximadamente 3,0 x 10<sup>5</sup> a aproximadamente 4,0 x 10<sup>5</sup>, un volumen adecuado puede variar desde aproximadamente 5-20 ml de medio o regulador. En una realización, se pueden usar aproximadamente 15 ml de medio o regulador.

Donde la fuente de radiación es una luz ultravioleta, las células pueden crecer unidas a un sustrato tal como un matraz de cultivo tisular y expuestas a la fuente de radiación. Las células pueden mantenerse en un regulador o medio adecuado durante la exposición a la radiación.

En una realización, se irradia una población de células que varía desde aproximadamente 3,0x10<sup>5</sup> células a aproximadamente 4,0x10<sup>5</sup> células con aproximadamente 2.000 rad de una fuente de rayos X. En otra realización, se irradia una población de células que varía desde aproximadamente 3,0x10<sup>5</sup> células a aproximadamente 4,0x10<sup>5</sup> células con aproximadamente 1.500 rad de una fuente de rayos X. En otra realización más, se irradia una población de células que varía desde aproximadamente 3,0x10<sup>5</sup> células a aproximadamente 4,0x10<sup>5</sup> células con aproximadamente 1.000 rad de una fuente de rayos X. En otra realización más, se irradia una población de células que varía desde aproximadamente 3,0x10<sup>5</sup> células a aproximadamente 4,0x10<sup>5</sup> células con aproximadamente 500 rad de una fuente de rayos X. Las células pueden estar compuestas de mDC diferenciadas in vitro de células pPS.

También se contempla que un agente químico adecuado para inhibir la división celular pueda sustituirse por la fuente de radiación. De este modo, las poblaciones celulares que comprenden mDC diferenciadas in vitro de células pPS pueden ponerse en contacto con un agente químico adecuado para inhibir la división celular. Los ejemplos de productos químicos adecuados incluyen agentes quimioterapéuticos tales como mitomicina C y cisplatino. Otros productos químicos adecuados pueden incluir uno o más de los siguientes: arabinósido, fluoro-desoxiuridina y uridina.

#### Sistemas para producir células dendríticas

En ciertas realizaciones, la invención contempla un sistema para la producción in vitro de células dendríticas maduras que comprende a) una primera población celular aislada que comprende células pPS y b) una segunda población celular aislada que comprende células dendríticas maduras que son la progenie in vitro de una porción de la primera población de células.

En otras realizaciones, la invención contempla un sistema para la producción de células presentadoras de antígenos mitóticamente inactivas que comprende a) una primera población celular aislada que comprende células pPS y b) una segunda población celular aislada que comprende células dendríticas maduras mitóticamente inactivadas que son la progenie in vitro de una porción de la primera población de células aisladas.

La mDC se puede diferenciar in vitro de una porción de las células pPS y una porción de la primera población celular aislada que comprende las células pPS se puede mantener en reserva, y se usa para hacer más de la segunda población aislada al diferenciar la primera población de células in vitro. El sistema contempla que la primera población de células que comprende células pPS puede incluir una parte de la población que puede diferenciarse en DC usando los métodos descritos aquí, y una porción de la población que puede reservarse para uso futuro, por ejemplo, mantenido en cultivo en un estado indiferenciado o congelado (en un medio adecuado) en alícuotas y almacenado a -80 °C o en nitrógeno líquido. Debido a que las células pPS son capaces de replicarse en cultivo en un estado indiferenciado (pluripotente) indefinidamente, el sistema proporciona un medio para producir un suministro ilimitado de DC diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos aquí. Además, debido a que la DC, por ejemplo, imDC diferenciada in vitro de las células pPS también puede replicarse en cultivo. El sistema proporciona una segunda población que es capaz de producir DC adicional. Por lo tanto, el sistema proporciona un medio para producir continuamente grandes cantidades de un producto uniforme, como una DC. El sistema también puede incluir realizaciones en las que una o ambas poblaciones están mitóticamente inactivadas como se describe más abajo.

Los marcadores característicos y la morfología tanto de la primera población de células que comprende células pPS como la de la segunda población de células que comprenden células DC se describen aquí. Las células DC pueden estar cargadas con mDC con un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno tumoral tal como hTERT. Las células DC pueden irradiarse de acuerdo con la invención con el fin de inactivar mitóticamente las células y así disminuir cualquier riesgo potencial de células pPS que pueden estar presentes en la segunda población de células que comprende las DC. En ciertas realizaciones al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% de la mDC puede expresar uno o más marcadores elegidos entre CD83, CD86, MHC II y CCR7.

#### Kits

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un kit para estimular una respuesta inmune. En una realización, el kit puede comprender un cultivo celular que comprende células pPS y DC, y uno o más recipientes. Opcionalmente, el kit puede comprender uno o más de los siguientes: a) instrucciones para estimular una respuesta inmune; b) instrucciones para cultivar las DC; c) un cóctel de maduración, donde las DC provistas son imDC; c) uno o más recipientes de cultivo adecuados; d) uno o más antígenos para estimular una respuesta inmune; e) una o más células inmunológicamente competentes; y f) reactivos adecuados para medir la respuesta inmune estimulada. El kit puede usarse para estimular una respuesta inmune in vitro o in vivo. La DC puede ser imDC o mDC. En algunas realizaciones, la DC puede proporcionarse congelada. Las células pueden congelarse en nitrógeno líquido y almacenarse a aproximadamente -140 °C. Alternativamente, la DC puede empaquetarse y almacenarse en refrigeración, por ejemplo, a aproximadamente 4 °C. El cóctel de maduración se puede suministrar premezclado o con cada uno de sus componentes envasados por separado. El antígeno se puede proporcionar como una proteína o péptido o como un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN que codifica el antígeno. El kit también puede proporcionar instrucciones para cargar la DC con el antígeno. La carga se refiere a poner en contacto la DC con el antígeno de manera que se presente a una célula inmunológicamente competente. El kit puede comprender además instrucciones para hacer crecer la DC en cultivo, para poner en contacto la DC con el antígeno, para poner en contacto la DC con células inmunológicamente competentes. Los reactivos adecuados para detectar una respuesta inmune estimulada pueden incluir <sup>3</sup>H timidina para medir la proliferación celular, anticuerpos para citocinas secretadas durante una respuesta inmune a un antígeno tal como IL-2, IFN.

En otra realización, el kit puede comprender una mDC irradiada diferenciada in vitro de una célula pPS y uno o más recipientes. Opcionalmente, el kit puede comprender uno o más de los siguientes: a) instrucciones para estimular una respuesta inmune; b) uno o más antígenos precargados para estimular una respuesta inmune; c) una o más células inmunológicamente competentes; y d) reactivos adecuados para medir la respuesta inmune estimulada. El kit puede usarse para estimular una respuesta inmune in vitro o in vivo. El antígeno precargado se puede proporcionar como una proteína o péptido o como un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN que codifica el antígeno. La carga se refiere a poner en contacto la DC con el antígeno de manera que se presente a una célula inmunológicamente competente. Los reactivos adecuados para detectar una respuesta inmune estimulada pueden incluir <sup>3</sup>H timidina para medir la proliferación celular, anticuerpos para citocinas secretadas durante una respuesta inmune a un antígeno tal como IL-2, IFN. En otras realizaciones, la invención proporciona un kit, como se describió anteriormente, donde la mDC tratada químicamente puede ser sustituida por la mDC irradiada. La mDC tratada químicamente puede ser mDC que se ha puesto en contacto con un agente químico adecuado para inhibir la división celular. Los agentes químicos adecuados pueden incluir mitomicinas tales como mitomicina C.

#### Usos de células de linaje hematopoyético diferenciadas con ES

Esta invención proporciona un método para producir grandes cantidades de células del linaje hematopoyético y/o mesodermo. Estas poblaciones de células se pueden utilizar para una serie de importantes propósitos de investigación, desarrollo y comerciales.

## Cribado

5 Las células de esta invención pueden usarse comercialmente para cribar para factores (tales como disolventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos, oligonucleótidos) o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan las características de tales células y sus diversas progenies. Las características pueden incluir características fenotípicas o funcionales de las células.

10 En algunas aplicaciones, las células pPS (indiferenciadas o diferenciadas) se utilizan para cribar factores que promueven la maduración en precursores hematopoyéticos en etapa tardía, o células diferenciadas terminalmente, o para promover la proliferación y el mantenimiento de tales células en cultivos a largo plazo. Por ejemplo, los factores de maduración candidatos o factores de crecimiento se prueban agregándolos a las células en diferentes pozos, y luego determinando cualquier cambio fenotípico que resulte, de acuerdo con criterios deseables para un cultivo posterior y el uso de las células.

15 Otras aplicaciones de cribado de esta invención se relacionan con la prueba de compuestos farmacéuticos por su efecto sobre células de linaje hematopoyético y/o células mesodermo. El cribado puede realizarse ya sea porque el compuesto está diseñado para tener un efecto farmacológico en las células, o porque un compuesto diseñado para tener efectos en otras partes puede tener efectos secundarios no deseados en las células de este tipo de tejido.

20 Otras aplicaciones para la criba podrían incluir compuestos para criba de efectos cancerígenos u otros efectos tóxicos. El cribado puede realizarse usando cualquiera de las células precursoras o células diferenciadas terminalmente de la invención con el fin de determinar si el compuesto diana tiene un efecto beneficioso o perjudicial sobre la célula diana.

25 El lector se refiere en general al libro de texto estándar *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997. La evaluación de la actividad de compuestos farmacéuticos candidatos generalmente implica combinar las células de esta invención con el compuesto candidato, ya sea solo o en combinación con otros fármacos. El investigador determina cualquier cambio en la morfología, fenotipo marcador o actividad funcional de las células que sea atribuible al compuesto (en comparación con células no tratadas o células tratadas con un compuesto inerte), y luego correlaciona el efecto del compuesto con el cambio observado.

30 La citotoxicidad puede determinarse en primer lugar por el efecto sobre la viabilidad celular, la supervivencia, la morfología y la expresión de ciertos marcadores y receptores. Los efectos de un fármaco en el ADN cromosómico se pueden determinar midiendo la síntesis o reparación del ADN. La incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina o BrdU, especialmente en momentos no programados en el ciclo celular, o por encima del nivel requerido para la replicación celular, es consistente con un efecto de fármaco. Los efectos no deseados también pueden incluir ratas inusuales de intercambio de cromátidas hermanas, determinadas por la propagación en metafase. El lector se refiere a A. Vickers (pp 375-410 en *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997) para una mayor elaboración.

40 Donde se observa un efecto, la concentración del compuesto puede titularse para determinar la dosis efectiva media (ED<sub>50</sub>).

## Modulación de una respuesta inmune

45 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune a un antígeno que comprende poner en contacto una célula de acuerdo con la invención, por ejemplo, una DC diferenciada de células pPS, con un antígeno. El antígeno puede estar compuesto por una proteína o péptido o, alternativamente, puede estar compuesto por un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN. Donde el antígeno es una proteína o un péptido, la célula dendrítica tomará la proteína o péptido y la procesará para su presentación en el contexto del MHC. Normalmente, el procesamiento incluye proteólisis para que el antígeno se ajuste en la ranura MHC. Donde el antígeno es una proteína, la célula DC puede ser una imDC. Donde el antígeno es un fragmento peptídico de una proteína de longitud completa, la DC puede ser una mDC. Donde el antígeno es un ácido nucleico, la invención contempla usar cualquier medio conocido en la técnica para transportar el ácido nucleico a través de la membrana celular para su administración al citoplasma. En una realización, las células pueden electroporarse para permitir que el ácido nucleico cruce la membrana celular. En algunas realizaciones en las que la electroporación se usa para poner en contacto la célula con un antígeno, una célula adecuada puede ser una imDC. En otras realizaciones en las que la electroporación se usa para poner en contacto la célula con un antígeno, una célula adecuada puede ser una mDC. Las células se pueden electroporar usando Gene Pulse Xcell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con los siguientes parámetros: 300V, 150uF y 100Ohms. Los niveles de expresión de proteínas pueden determinarse mediante citometría de flujo o métodos de inmunoprecipitación Western. Donde la célula electroporada es una imDC, las células se pueden poner en contacto con un cóctel de maduración como se describe aquí de manera que la imDC madure en mDC.

65 En otra realización, se puede usar un vector viral para transportar el ácido nucleico que codifica el antígeno en la célula, por ejemplo, una mDC, una imDC. Donde se usa un vector viral para contactar la célula con un antígeno, una célula adecuada puede ser imDC. Los ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores adenovirales y

vectores virales de viruela. En otras realizaciones, los reactivos de transfección disponibles comercialmente pueden usarse para transportar el ácido nucleico que codifica el antígeno a la célula. Los ejemplos adecuados incluyen formulaciones de lípidos catiónicos tales como Lipofectamine®.

5 La invención contempla usar antígenos de cualquier fuente. Por lo tanto, el antígeno puede ser un antígeno tumoral tal como la transcriptasa inversa de teleomerasa humana (hTERT) o un antígeno expresado por un agente infeccioso tal como un virus, una bacteria o un parásito.

10 La mDC puede ponerse en contacto entonces, in vivo o in vitro, con una célula inmunológicamente competente tal como un linfocito. La respuesta inmune del linfocito se puede monitorear midiendo la proliferación celular de la célula inmunológicamente competente (por ejemplo, mediante la incorporación de <sup>3</sup>H timidina) y/o la producción de citocina (por ejemplo, IL-2, IFN, IL-6, IL-12) mediante mDC o la célula inmunológicamente competente. Estos estudios pueden ser útiles para adaptar el tipo y el alcance de la respuesta inmune al antígeno. Estos estudios también pueden ser útiles para seleccionar el mejor epítipo del antígeno para obtener la respuesta inmune más apropiada.

15 La respuesta inmune puede ser estimulada in vitro o in vivo utilizando un modelo animal apropiado.

20 Para determinar la idoneidad de las composiciones celulares para la administración terapéutica, las células pueden probarse primero en un modelo animal adecuado. Los modelos animales adecuados pueden incluir un ratón con un sistema inmune humanizado. Véase, por ejemplo, Goldstein (2008) AIDS Res Ther 5(1):3. La mDC cebada con un antígeno específico se puede administrar a un animal para determinar si el animal puede o no montar una respuesta inmune específica al antígeno. El animal y la DC se pueden emparejar o emparejar parcialmente en el locus MHC I.

25 La dosificación, administración y formulación del antígeno y de las células se pueden estudiar para adaptar la respuesta inmune al antígeno y se puede controlar la migración de las células administradas dentro del sistema linfático. El alcance de la respuesta inmune se puede caracterizar en términos de producción de citocinas así como de proliferación de linfocitos en respuesta al antígeno. El animal se puede monitorear para una respuesta de anticuerpos contra el antígeno así como para cualquier reacción inmune atípica, por ejemplo, hipersensibilidad, reacción autoinmune. El anticuerpo generado se puede aislar para usar como reactivo de investigación o agente terapéutico.

30

35 Se sabe que imDC induce tolerancia específica a antígeno, véase, por ejemplo, Cools et al., (2007) J Leukoc Biol 82 (6): 1365. Por lo tanto, imDC, como se describe aquí, puede usarse para inducir tolerancia dentro de un sujeto. Las células imDC pueden ponerse en contacto con un antígeno, por ejemplo, una proteína o un antígeno peptídico o un ácido nucleico que codifica un antígeno como se describió anteriormente. Las células pueden administrarse luego a un sujeto para inducir tolerancia en el sujeto. Alternativamente, la imDC se puede madurar en mDC y usarse para estimular una respuesta inmune.

#### Reconstitución de células hematopoyéticas

40 Las células de linaje hematopoyético preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para reconstituir una o más poblaciones de células hematopoyéticas en un sujeto. Como ejemplo, las células progenitoras mieloides pueden usarse para mejorar uno o más síntomas asociados con la citopenia mediante la reconstitución de una población celular que es deficiente. Por ejemplo, los progenitores mieloides pueden usarse para mejorar el estado de un sujeto con un bajo recuento de plaquetas o bajo recuento de eritrocitos. Como otro ejemplo, pueden usarse células de linaje hematopoyético, tales como células precursoras mieloides para mejorar uno o más síntomas de un sujeto con un defecto genético, tal como un defecto relacionado con un factor de coagulación. De este modo, las células fabricadas de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden usarse para aumentar el nivel de un factor de coagulación tal como el factor VIII o el factor IX. En otras realizaciones, las células del linaje hematopoyético pueden usarse para reconstituir una población de linfocitos, por ejemplo, una población de linfocitos CD4 en un paciente con VIH.

50

#### Administración a humanos

55 Las mDC producidas de acuerdo con la invención son funcionalmente comparables con mDC aislado de PBMC. Por ejemplo, el mDC de la invención puede tomar el proceso y presentar el antígeno; estimular la proliferación de células T en respuesta a la presentación de un antígeno específico y puede inducir la citólisis antígeno específica mediada por células T de células diana. Adicionalmente, la funcionalidad de mDC de acuerdo con la invención se mantiene incluso después de la irradiación. La mDC de la invención puede proporcionar así una fuente de DC para la administración a un sujeto humano con el fin de estimular una respuesta inmune a un antígeno específico a la vez que se minimiza el riesgo de exposición a células indiferenciadas y agentes patógenos.

60

65 La mDC de acuerdo con esta invención se puede administrar a un sujeto humano para estimular una respuesta inmune en el sujeto. Antes de la administración, la imDC se puede contactar con un antígeno de interés y luego madurar en mDC. El antígeno puede internalizarse y procesarse de manera que se presente en la superficie de la célula en el contexto de MHC I y/o MHC II y, por lo tanto, puede estimular una respuesta inmune específica al antígeno. En algunas realizaciones, la respuesta inmune específica puede tener un efecto terapéutico. En otras

realizaciones, la respuesta inmune puede proporcionar un efecto profiláctico. En otras realizaciones más, la respuesta inmune específica puede proporcionar una fuente de células específicas de antígeno tales como células T citotóxicas o linfocitos B o anticuerpos que reconocen específicamente el antígeno. La administración de las células de acuerdo con la invención puede ser por inyección intravenosa, intradérmica o intramuscular. En otras realizaciones, las células pueden administrarse por vía subcutánea. Las células pueden formularse con un regulador apropiado, tal como PBS y/o un excipiente apropiado. Las células pueden formularse con un adyuvante adecuado.

Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Para los principios generales en la formulación médica, el lector puede consultar: Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; y Hematopoietic Stem Cell Therapy, E.D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. La elección del excipiente celular y cualquier elemento acompañante de la composición se adaptará de acuerdo con la ruta y el dispositivo utilizado para la administración.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden envasar opcionalmente en un recipiente adecuado con instrucciones escritas para un propósito deseado, tal como la reconstitución de la función celular de linaje hematopoyético para mejorar una enfermedad o para estimular una respuesta inmune.

Otros usos

Las células de esta invención se pueden usar para preparar una biblioteca de ADNc relativamente no contaminada con ADNc expresado preferiblemente en células de otros linajes. Por ejemplo, las células de linaje hematopoyético se recolectan por centrifugación a 1.000 rpm durante 5 minutos, y luego se prepara ARNm y se transcribe de forma inversa. Los patrones de expresión de las células de linaje hematopoyético se pueden comparar con otros tipos de células, por ejemplo, células pPS, mediante análisis de micromatriz, revisado generalmente por Fritz et al., (2000) Science 288:316. Debido a que las células son de manera virtual genéticamente idénticas a la línea celular pPS original a partir de la cual se diferencian, proporcionan un sistema particularmente adecuado para estudiar genes implicados en la diferenciación y maduración de células de linaje hematopoyético. Por ejemplo, pueden prepararse bibliotecas de ácido nucleico de la línea celular original y la progenie hematopoyética y puede emplearse la hibridación sustractiva para aislar genes importantes en la diferenciación y maduración de las células de la progenie.

Las células diferenciadas de esta invención también pueden usarse para preparar anticuerpos que son específicos para marcadores de células de linaje hematopoyético. Los anticuerpos policlonales pueden prepararse inyectando un animal vertebrado con células de esta invención en una forma inmunogénica. La producción de anticuerpos monoclonales se describe en tales referencias estándar como Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, patentes de los Estados Unidos números 4,491,632, 4,472,500 y 4,444,887, y Methods in Enzymology 73B:3 (1981).

Células madre pluripotentes de primate

La presente invención proporciona métodos para diferenciar células pPS en células de linaje hematopoyético. Las células pPS incluyen cualquier célula pluripotente de primate. Una célula pluripotente puede, bajo condiciones de crecimiento apropiadas, formar al menos un tipo de célula de cada una de las tres capas germinales primarias: mesodermo, endodermo y ectodermo. Las células pPS pueden originarse a partir de tejido preembrionario, embrionario o fetal o células maduras diferenciadas. Alternativamente, una línea celular pPS establecida puede ser una fuente adecuada de células para poner en práctica la invención. Típicamente, las células pPS no se derivan de una fuente maligna. Las células pPS formarán teratomas cuando se implantan en un ratón inmunodeficiente, por ejemplo, un ratón SCID.

Bajo el microscopio, las células madre pluripotentes de los primates aparecen con altas proporciones nucleares/citoplasmáticas, nucleolos prominentes y una formación de colonias compactas con uniones celulares poco discernibles. Las células madre pluripotentes de primates típicamente expresan los antígenos embrionarios específicos de etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81.

Las células madre embrionarias humanas indiferenciadas también expresan típicamente el factor de transcripción Oct-3/4, Cripto, receptor de péptido liberador de gastrina (GRP), proteína similar a podocalixina (PODXL), transcriptasa inversa nanog y telomerasa, por ejemplo, hTERT (Estados Unidos 2003/0224411 A1), como se detectó mediante RT-PCR.

Las células pPS que pueden usarse en cualquiera de las realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias tales como células madre embrionarias humanas (hES). Las células madre embrionarias se pueden aislar a partir de blastocistos de una especie de primates (Patente de los Estados Unidos 5,843,780, Thomson et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844,). Las células hES pueden prepararse a partir de células de blastocisto humano usando, por ejemplo, las técnicas descritas en la patente de Estados Unidos 6,200,806;

Thomson et al., (1998) *Science* 282:1145; Thomson et al. (1998) *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133 ff. y Reubinoff et al., (2000) *Nature Biotech.* 18:399.

5 Otros tipos de células madre pluripotentes de primates incluyen, pero no se limitan a, células primitivas de tipo ectodermo (EPL), descritas en el documento WO 01/51610 y células germinales embrionarias humanas (hEG) (Shamblott et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726).

10 Las células pPS adecuadas para uso en cualquiera de las realizaciones de la invención también incluyen células madre pluripotentes de primate inducidas (iPS). Las células iPS se refieren a células que están genéticamente modificadas, por ejemplo, por transfección con uno o más vectores apropiados, de manera que alcanzan el fenotipo de una célula pPS. Las características fenotípicas logradas por estas células reprogramadas incluyen morfología que se asemeja a células madre aisladas de un blastocito, expresión de antígeno de superficie, expresión génica y actividad de telomerasa que son todas células similares derivadas de blastocito. Las células iPS pueden tener la capacidad de diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada una de las capas germinales primarias: 15 ectodermo, endodermo y mesodermo. Las células iPS también pueden formar teratomas cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes, por ejemplo, ratones SCID. (Takahashi et al., (2007) *Cell* 131(5):861; Yu et al., (2007) *Science* 318:1917).

20 Las células madre embrionarias usadas en la invención se pueden elegir de líneas de células madre embrionarias establecidas o se pueden obtener directamente a partir de tejido embrionario primario. Se ha establecido un gran número de líneas de células madre embrionarias que incluyen, pero no se limitan a, H1, H7, H9, H13 o H14 (referencia Thompson); hESBGN-01, hESBGN-02, hESBGN-03 (BresaGen, Inc., Athens, GA); HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6 (de ES Cell International, Inc., Singapur); HSF-1, HSF-6 (de la Universidad de California en San Francisco); I 3, I 3,2, I 3,3, I 4, I 6, I 6,2, J 3, J 3,2 (derivado en el Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel); UCSF-1 y UCSF-2 (Genbacev et al., (2005) *Fertil. Steril.* 83 (5): 1517); líneas HUES 1-17 (Cowan et al., (2004) *NEJM* 350(13):1353); y línea ACT-14 (Klimanskaya et al., (2005) *Lancet*, 365 (9471):1636).

25 En ciertas realizaciones, las células pPS usadas en la presente invención pueden haberse derivado de una manera libre de alimentación (véase, por ejemplo, Klimanskaya et al., (2005) *Lancet*, 365(9471):1636). En ciertas realizaciones, el pPS puede cultivarse antes de su uso en un ambiente libre de suero. 30

Condiciones de cultivo para células madre pluripotentes de primates

35 Las células pPS pueden cultivarse usando una variedad de sustratos, medios y otros suplementos y factores conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un sustrato adecuado puede incluir una matriz que comprende uno o más de los siguientes: laminina, colágeno, fibronectina, vitronectina, proteoglicano sulfato de heparina. En algunas realizaciones, la matriz puede comprender un extracto soluble de la membrana basal de un sarcoma de EHS murino que está disponible comercialmente como Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA). En otras realizaciones, la matriz puede comprender una más proteína de matriz aislada de origen humano, humanizado o murino, por ejemplo, CELLstart™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células madre pluripotentes de primate se pueden propagar de forma continua en cultivo, usando condiciones de cultivo que promueven la proliferación e inhiben la diferenciación. El medio ejemplar se puede preparar con DMEM al 80% (como Knock-Out DMEM, Gibco), 20% de suero bovino fetal definido (FBS, Hyclone) o reemplazo sérico (Estados Unidos 2002/0076747 A1, Life Technologies Inc.), aminoácidos no esenciales al 1 %, 1 mM de L-glutamina y 0,1 mM de β-mercaptoetanol. Otros medios 45 adecuados incluyen medios definidos libres de suero tales como X-VIVO™ 10 (Lonza, Walkersville, MD).

50 En ciertas realizaciones, las células pPS se pueden mantener en un estado indiferenciado sin células alimentadoras añadidas (véase, por ejemplo, (2004) Rosler et al., *Dev. Dynam.* 229:259). Los cultivos libres de alimentador se soportan típicamente por un medio nutritivo que contiene factores que promueven la proliferación de las células sin diferenciación (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6,800,480). En ciertas realizaciones, pueden usarse medios acondicionados que contienen tales factores. Los medios acondicionados se pueden obtener cultivando los medios con células que secretan dichos factores. Las células adecuadas incluyen fibroblastos embrionarios de ratón primario irradiados (~4.000 rad), fibroblastos de ratón telomerizados, o células similares a fibroblastos derivadas de células madre pluripotentes de primate (Patente de Estados Unidos 6,642,048). El medio puede acondicionarse sembrando los alimentadores en un medio libre de suero tal como KO DMEM suplementado con un reemplazo sérico al 20% y 4 ng/ml de bFGF. El medio que se ha acondicionado durante 1-2 días se complementa con bFGF adicional, y se usa para soportar el cultivo de células pPS durante 1-2 días (véase, por ejemplo, el documento WO 01/51616; Xu et al., (2001) *Nat. Biotechnol.* 19: 971, 2001).

60 Alternativamente, se puede usar medio fresco o no acondicionado, que se ha complementado con factores adicionales (como un factor de crecimiento de fibroblastos o forskolina) que promueven la proliferación de las células en una forma no diferenciada. Como ejemplo existe un medio base como X-VIVO™ 10 (Lonza, Walkersville, MD) o QBSF™-60 (Quality Biological Inc. Gaithersburg, MD), complementado con bFGF a 40-80 ng/ml, y que contiene opcionalmente SCF (15 ng/ml), o ligando de Flt3 (75 ng/ml) (véase, por ejemplo, Xu et al., (2005) *Stem Cells* 23(3): 315). Estas formulaciones de medio tienen la ventaja de soportar el crecimiento celular a 2-3 veces la velocidad en otros sistemas (véase, por ejemplo, el documento WO 03/020920). En algunas realizaciones, las células pPS tales 65

como las células hES se pueden cultivar en un medio que comprende bFGF y TGF $\beta$ . Las concentraciones adecuadas de bFGF incluyen aproximadamente 80 ng/ml. Las concentraciones adecuadas de TGF $\beta$  incluyen aproximadamente 0,5 ng/ml. Se pueden usar otras formulaciones de medios comercialmente disponibles en ciertas realizaciones de la invención. Las formulaciones de medios adecuadas pueden incluir X-VIVO™ 15 (Lonza, Walkersville, MD); mTeSR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA); hTeSR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA), StemPro™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y Cellgro™ DC (Mediatech, Inc., Manassas, VA).

En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes de primates se pueden cultivar en placas a >15.000 células cm<sup>-2</sup> (óptimamente 90.000 cm<sup>-2</sup> a 170.000 cm<sup>-2</sup>). Típicamente, la digestión enzimática se puede detener antes de que las células se dispersen por completo (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos con colagenasa IV).

Los grupos de ~10 a 2.000 células pueden luego ser cultivadas en placa directamente sobre un sustrato adecuado sin una mayor dispersión. Alternativamente, las células se pueden cosechar sin enzimas antes de que la placa llegue a confluencia incubando las células durante aproximadamente 5 minutos en una solución de EDTA 0,5 mM en PBS o simplemente separando mecánicamente las células deseadas de la placa, tal como raspado o aislamiento con una pipeta fina. Después del lavado desde el recipiente de cultivo, las células pueden cultivarse en placa en un nuevo cultivo sin más dispersión. En una ilustración adicional, las células madre embrionarias humanas confluentes cultivadas en ausencia de alimentadores se pueden eliminar de las placas incubando con una solución de tripsina al 0,05% (peso/vol) (Gibco®, Carlsbad, CA) y 0,05 mM de EDTA durante 5-15 minutos a 37 °C. Las células restantes en la placa se pueden eliminar y las células se pueden triturar en una suspensión que comprende células individuales y pequeños racimos, y luego se cultivan en placa a densidades de 50.000 a 200.000 células cm<sup>-2</sup> para promover la supervivencia y limitar la diferenciación.

En ciertas realizaciones, las células pPS se pueden cultivar en una capa de células alimentadoras. Los fibroblastos alimentadores de referencia se pueden derivar de tejido embrionario o fetal (Thomson et al., (1998) Science 282: 1145). En ciertas realizaciones, esas células alimentadoras pueden derivarse de una fuente humana o murina. Se pueden aislar células alimentadoras humanas a partir de diversos tejidos humanos o derivar por diferenciación de células madre embrionarias de referencia en células fibroblásticas (véase, por ejemplo, el documento WO01/51616). En ciertas realizaciones, las células alimentadoras humanas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos placentarios (véase, por ejemplo, Genbacev et al., (2005) Fertil. Steril. 83(5):1517), células epiteliales de trompas de Falopio (véase, por ejemplo, Richards et al., 92002) Nat. Biotechnol., 20:933), fibroblastos de prepucio (véase, por ejemplo, Amit et al., (2003) Biol. Reprod. 68:2150), células endometriales uterinas (véase, por ejemplo, Lee et al., (2005) Biol. Reprod. 72(1):42).

En la práctica de la presente invención, existen diversas superficies sólidas que pueden usarse en el cultivo de células. Esas superficies sólidas incluyen, pero no se limitan a, placas de cultivo celular estándar comercialmente disponibles tales como placas de 6 pozos, 24 pozos, 96 pozos o 144 pozos. Otras superficies sólidas incluyen, pero no están limitadas a, microportadores y discos. En ciertas realizaciones, los microportadores son perlas. Esas perlas vienen en diversas formas, tales como perlas microportadoras Cytodex Dextrano con grupos de carga positiva para aumentar la unión de las células, perlas recubiertas de gelatina/colágeno para la unión de las células y perlas microportadoras macroporosas con diferentes porosidades para la unión de las células. El Cytodex dextrano, recubierto de gelatina y las perlas microportadoras macroporosas están disponibles comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO o Solohill Engineering Inc., Ann Arbor, MI). En ciertas realizaciones, las perlas tienen un tamaño de 90-200  $\mu$ m con un área de 350-500 cm<sup>2</sup>. Las perlas pueden estar compuestas de una variedad de materiales tales como, pero no limitados a, vidrio o plástico. En ciertas realizaciones, los discos pueden usarse en biorreactores de tanque agitado para la unión de las células. Los discos son vendidos por compañías como New Brunswick Scientific Co, Inc. (Edison, NJ). En ciertas realizaciones, los discos son discos Fibra-cel, que son discos de poliéster/polipropileno. Un gramo de estos discos proporciona un área de superficie de 1.200 cm<sup>2</sup>.

La superficie sólida adecuada para cultivar células pPS puede estar hecha de una variedad de sustancias que incluyen, pero no se limitan a, vidrio o plástico tal como poliestireno, policloruro de vinilo, policarbonato, politetrafluoroetileno, melinex o termanox. En ciertas realizaciones de la invención, las superficies sólidas pueden ser de forma tridimensional. Se describen superficies sólidas tridimensionales como ejemplos, por ejemplo, en el documento US20050031598.

En ciertas realizaciones, las células están en una suspensión de células individuales durante los métodos de la invención. La suspensión de células individuales se puede realizar de varias maneras, que incluyen, pero no se limitan a, cultivo en un matraz giratorio, en un matraz de agitación o en un fermentador. Los fermentadores que se pueden usar incluyen, entre otros, Celligen Plus (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, NJ), y el STR o el reactor Stirred Tank (Applikon Inc., Foster City, CA). En ciertas realizaciones, los biorreactores pueden perfundirse continuamente con medios o usarse en un modo de lote alimentado. Los biorreactores vienen en diferentes tamaños, incluidos 2,2 L, 5 L, 7,5 L, 14 L o 20 L.

## Técnicas generales

Para la elaboración adicional de técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el médico puede referirse a libros de texto y revisiones estándar en biología celular, cultivo de tejidos, embriología e inmunología.

Con respecto al cultivo de tejidos y células y las células madre embrionarias, el lector puede referirse a cualquiera de las numerosas publicaciones disponibles en la técnica, por ejemplo, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem cells: A Practical Approach* (E.J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P.M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro* (M.V. Wiles, *Meth. Enzymol.* 225:900, 1993); *Properties and Uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P.D. Rathjen et al., *Reprod. Fertil. Dev.* 10:31, 1998; y R.I. Freshney, *Culture of Animal Cells*, Wiley-Liss, New York, 2000). Con respecto a la biología de células de linaje hematopoyético, el lector puede consultar cualquier libro de texto de inmunología, por ejemplo, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (Janeway et al., 2001 Garland Publishing).

Cuando se derivan de una línea establecida de células madre pluripotentes de primates, las poblaciones celulares y células aisladas de esta invención se pueden caracterizar por tener el mismo genoma que la línea de la que se derivan. Esto significa que el ADN cromosómico será esencialmente idéntico por análisis RFLP o de SNP entre las células madre pluripotentes de primates y las células de progenie diferenciadas (suponiendo que las células no han sido genéticamente manipuladas por la mano humana). Se entiende que las alteraciones mínimas, por ejemplo, en regiones no codificantes son posibles, sin embargo, la identidad genética entre la línea de células pPS y la progenie respectiva será comparable a la observada en gemelos idénticos.

## Alteración genética de células diferenciadas

Se puede hacer que las células de esta invención contengan una o más alteraciones genéticas mediante ingeniería genética de las células, ya sea antes o después de la diferenciación (documento de Estados Unidos 2002/0168766 A1). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células pueden procesarse para aumentar su potencial de replicación alterando genéticamente las células para expresar la transcriptasa inversa de telomerasa, ya sea antes o después de que progresen a células de linaje de desarrollo restringidas o células diferenciadas terminalmente (documento de Estados Unidos 2003/0022367 A1).

Las células de esta invención también pueden alterarse genéticamente con el fin de mejorar su capacidad para participar en la modulación de una respuesta inmune, o para administrar un gen terapéutico a un sitio de administración. Se diseña un vector usando la secuencia de codificación conocida para el gen deseado, unido operativamente a un promotor que es panespecífico o específicamente activo en el tipo de célula diferenciada. Alternativamente, el promotor puede ser un promotor inducible que permita la expresión cronometrada de la alteración genética. Por ejemplo, las células pueden manipularse genéticamente para expresar una citocina que modula una respuesta inmune ya sea mejorando la respuesta o atenuando la respuesta.

En los siguientes ejemplos, todos los experimentos que utilizan células de embriones humanos (hES) se realizaron usando líneas celulares hES establecidas.

## Ejemplos

Ejemplo de referencia 1: Diferenciación de células hES a mDC variando el cóctel de diferenciación

En este ejemplo, las células pPS se diferenciaron en mDC cultivando primero las células pPS con un cóctel de diferenciación para obtener imDC y luego cultivando adicionalmente las imDC con un cóctel de maduración. El cóctel de diferenciación comprendía citocinas exógenas que variaban a lo largo del experimento a medida que las células se diferenciaban a la etapa de imDC. (Figura 1a). La línea celular ES humana H1 (Thomson et al., (1998) *Science* 282:1145) se cultivó libre de alimentador en medios definidos libres de suero carentes de productos derivados de animales (Xu et al., (2001) *Nat Biotechnol* 19:971; Li et al., (2005) *Biotechnol Bioeng* 91:688) (Figuras 1b). Las células también se cultivaron libres de células estromales durante todo el protocolo de diferenciación y maduración.

Las células hES se cultivaron bajo condiciones permisivas para formar cuerpos embrioides (EBs). Brevemente, las células H1 se trataron con colagenasa D (Invitrogen, Carlsbad, CA), se enjuagaron una vez con 1 X PBS y se rasparon suavemente de la placa con un raspador celular (Corning Life Sciences, Corning, NY). Las células se cultivaron en placas de fijación ultra bajas de 6 pozos (Corning Life Sciences, Corning, NY) a 3 millones de células/pozo en medio X-VIVO 15 (Lonzo, Walkersville, MD) suplementado con 1 mM de Na-piruvato (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1X aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 5 x 10<sup>-5</sup> M de 2-Mercaptoetanol (Sigma, St Louis, MO), y 10 mM de HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA) y permitieron formar cuerpos embrioides. Se añadieron los siguientes factores de crecimiento al medio: SCF (20 ng/ml), VEGF (50 ng/ml), BMP-4 (50 ng/ml) y GM-CSF (50 ng/ml). Todos los factores de crecimiento se compraron de R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis MN). Cada pozo contenía 4 ml de medio. Las células se alimentaron cada dos a tres días con un cambio de medios de 1:3.



El día 5 se eliminó la BMP-4 del cóctel del factor de crecimiento, en el día 10 se eliminó el VEGF del cóctel del factor de crecimiento, y en el día 15 se retiró la SCF del cóctel del factor de crecimiento (Figura 1A). En alrededor de d17-d25 fueron visibles células progenitoras hematopoyéticas brillantes redondas (Figura 2). Cuando eran visibles en los pozos aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1 millón de células progenitoras brillantes flotantes, fueron cosechadas, centrifugadas y sembradas en las placas de fijación ultra bajas originales de 6 pozos y cultivadas en X-VIVO 15 (Lonzo, Walkersville, MD) con GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (50 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) para generar imDC. Los EBs originales se trasladaron a nuevas placas de fijación ultra bajas de 6 pozos durante aproximadamente 40-50 días y se alimentaron con medios que comprendían GM-CSF (50 ng/ml) cada 2-3 días (cambio de medios 1:3) y continuaron produciendo células hematopoyéticas brillantes que fueron cosechadas y luego cultivadas y diferenciadas con GM-CSF e IL-4 para producir imDC adicional.

El análisis de citometría de flujo en las células hES se realizó de la siguiente manera: las células se resuspendieron en 50 µl de regulador de flujo (PBS + BSA al 0,1% + 2 mM de EDTA) y se bloquearon usando un anticuerpo anti FC receptor (Miltenyi, Aurburn, CA) durante 10 minutos a 4 °C y luego se añadieron anticuerpos al marcador diana (los anticuerpos se proporcionan a continuación en la Tabla I). Después de la incubación durante 20 minutos a 4 °C, las células se lavaron 2X en regulador de flujo y 5 minutos antes del análisis de muestra se añadieron 2 µl de 7ADD (0,25 µg/1x10<sup>6</sup> células) (BD Bioscience, San Jose, CA) por muestra para evaluar la viabilidad celular. Los datos de muestra se recolectaron usando un FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA), y se analizaron usando el software FlowJo® (Treestar, Ashland, OR). Para la tinción intracelular Oct-4 las células se fijaron usando un regulador de fijación intracelular (eBioscience, San Diego, CA) y se hicieron permeables usando un regulador de permeabilización (eBioscience, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se esperaba, las células expresaron Oct-4 y SSEA-4 ambos marcadores de células hES. Además, las células también expresaban Flt-1 y Flk-1, ambos receptores para VEGF, así como también CD117, el receptor para SCF. CD116, el receptor GM-CSF, no se detectó (Figura 1C).

Las imDC se analizaron mediante citometría de flujo (como se describió anteriormente) para los siguientes marcadores: CD14, HLA-I, HLA-II, CD83, CD205 y CD11b. Se encontró que las células eran positivas para HLA-I, HLA-II, CD83 y CD11b (Figura 4A). Después de 4-6 días estas DC inmaduras se centrifugaron y resuspendieron en medio X-VIVO 15 que comprende las siguientes citocinas IFN-γ (25 ng/ml), IL-1-β (10 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml), PGE2 (1 µg/ml) y GM-CSF (50 ng/ml) (el cóctel de maduración). Las células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas adicionales para generar DC maduras. Las mDC se analizaron mediante FACs (como se describió anteriormente) y se encontró que expresaban los siguientes marcadores: HLA-I, HLA-II, CD40, CD86, CD83, CD205, CD11c<sup>hi</sup> y CCR7. Las células fueron negativas para CD14 (Figura 4B). CD83 es un marcador para la maduración de células dendríticas. CCR7 es un receptor de quimiocinas involucrado en la migración de DC. El perfil de expresión fue comparable al DC derivado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células también se analizaron mediante PCR cuantitativo en tiempo real para la expresión de los siguientes factores de transcripción: NF-κB, CIITA y Spi-B (Figura 4C). Se ha demostrado que Spi-B se expresa en DC derivado de PBMCs (Schotte et al., (2003) Blood 101(3):1015; Rissoan et al., (2002) Blood 100(9):3295; Schotte et al., (2004) J. Exp. Med. 200(11):1503; Chicha et al., (2004) J. Exp. Med. 200 (11):1519. NF-κB se asocia con la expresión de moléculas coestimuladoras y es necesario para el proceso de activación de DC. CIITA es un regulador maestro de la expresión de HLA-II.

Las células se analizaron morfológicamente y se encontró que tenían una morfología típica de DC (Figura 4D). Para estudiar más a fondo la morfología de la mDC, las células se tiñeron con tinción de May-Grunwald. Las células se lavaron con 1X PBS, se resuspendieron en 50 µl de 1X PBS y se añadieron sobre portaobjetos de vidrio preparados con el aparato cytopspin. Diez ul de la suspensión celular se aplicaron al portaobjetos. Los portaobjetos se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos usando un ShandonCytospin3 (Thermo Scientific, Waltham MA).

Después, las células se tiñeron con solución de tinción May Grunwald (Sigma, St Louis, MO) durante 5 minutos a 25 °C, se lavaron 3X con dH<sub>2</sub>O y se secaron al aire durante la noche. El área de muestra se cubrió con Permount® (Sigma, St Louis, MO), se aplicó un cubreobjetos de vidrio y se dejó secar el portaobjetos durante la noche. Las imágenes se tomaron con un microscopio vertical con un objetivo plano de 100x y un objetivo Plan-Neofluar de 40x (Zeiss, Peabody, MA). Los resultados mostrados en la Figura 4E demostraron que la mDC tenía una morfología típica de una célula dendrítica aislada a partir de PBMCs que incluía proyecciones ramificadas o dendritas que emanaban fuera de la célula. Las células también se analizaron mediante citometría de flujo (como se describió anteriormente) para CD19, CD3, CD235a y CD41 (indicativo de células B, células T, eritrocitos y plaquetas, megacariocitos, respectivamente), pero se descubrió que no eran detectables para todos estos marcadores. Se encontró que la preparación tenía 5-20% de granulocitos y 5-20% de células progenitoras. La población de células varió desde aproximadamente 50% a aproximadamente 90% de DC.

Ejemplo 2: Análisis del curso temporal de cultivos celulares diferenciadores

Para caracterizar las poblaciones de células precursoras que surgen durante el proceso de diferenciación de pPS a imDC, el cultivo celular descrito en el Ejemplo de Referencia 1 se evaluó a lo largo del tiempo para la expresión del factor de transcripción usando RT PCR y PCR cuantitativa en tiempo real (como se describe más adelante) y por

citometría de flujo (como se describió anteriormente) a lo largo del tiempo para la expresión de marcadores de superficie celular.

- 5 Se cosecharon células diana de PCR cuantitativo en tiempo real y se aisló el ARN total siguiendo el protocolo estándar de Qiagen RNeasy® Mini Prep (Qiagen, Valencia, CA). Se usó Qiagen QiaShredder (Qiagen, Valencia, CA) para homogeneizar el lisado. Los ARNs aislados se almacenaron a -80 °C. Para la síntesis de ADNc, se trataron muestras de 1 µg de ARN con DNasa (Ambion, Austin TX) para eliminar cualquier impureza de ADN genómico de la preparación de ARN. La PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó usando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) para producir ADNc. El producto de ADNc se diluyó 1:5 en agua y se usó como molde para la cuantificación en tiempo real del Umbral del Ciclo (CT) de PCR Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras se ejecutaron en el Sistema de Detección de Secuencia Applied BioSystems 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos se analizaron para el nivel de expresión relativa mediante la normalización de la señal diana contra la señal diana en el día 0. Las figuras 3a y 3b proporcionan los resultados. Para el día 5, la expresión de Oct-4 disminuyó 20 veces. El aumento de cinco veces de brachyury en el día 5 indicó que las células se habían diferenciado en mesodermo. Flk-1 se encuentra en las células madre hematopoyéticas. La expresión incrementada de Flk-1 sugirió la diferenciación de una población de células hemogénicas. La expresión de Tie-2 sugirió la diferenciación de los hemangioblastos. Los hemangioblastos están compuestos por células con potencial hematopoyético y endotelial.
- 10
- 15
- 20 La Figura 3b muestra los niveles de expresión de factores de transcripción adicionales a lo largo del tiempo. El aumento de los niveles de expresión de tanto de HoxB4 como de Gata2 sugirió que las células se han diferenciado en una población de células hematopoyéticas. HoxB4 desempeña un papel en la renovación y supervivencia de células madre hematopoyéticas (Antonchuk et al., (2002) Cell 109(1):39. Gata2 es un factor de transcripción hematopoyético precoz que también se expresa en GMP.
- 25
- La citometría de flujo se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los anticuerpos usados en todos los experimentos de citometría de flujo se enumeran a continuación en la Tabla I.

Tabla I.

SSEA-4	R&D Systems
4-Oct	Santa Cruz Biotechnology
CD117	BD Bioscience
Flt-1	R&D Systems
RD-KDR	R&D Systems
CD116	BD Bioscience
CD19	BD Bioscience
CD3	eBioscience
CD11b	BD Bioscience
CD11c	BD Bioscience
CD13	BD Bioscience
CD15	BD Bioscience
CD34	BD Bioscience
CD38	BD Bioscience
CD40	BD Bioscience
CD44	BD Bioscience
CD45	BD Bioscience
CD80	BD Bioscience
CD86	BD Bioscience
CD83	BD Bioscience
HLA-I	BD Bioscience
HLA-II	BD Bioscience
CD205	BD Bioscience

CD303	Miltenyi
CD123	BD Bioscience
CCR7	BD Bioscience

Las Figuras 3c y 3d muestran los resultados del estudio de citometría de flujo para la expresión de CD45 y CD34 a lo largo del tiempo. La expresión de CD34 en el día 5 fue indicativa de hematopoyesis temprana. Para el día 5, la morfología del cultivo había adquirido la apariencia de un cuerpo embrionario quístico (Figura 3e). Para el día 15 era evidente la expresión de CD45, un marcador de células panhematopoyéticas. Al mismo tiempo, el factor de transcripción PU.1 se detectó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Figura 3b). La expresión de PU.1 se encuentra en células hematopoyéticas tempranas y su nivel de expresión aumenta a medida que las células se diferencian en células dendríticas (Guerriero et al., (2000) Blood 95(3):879; Nutt et al., (2005 JExp. Med. 201(2): 221). La expresión del marcador de linaje mielóide CD13 se hizo aparente el día 15 (Figura 3F). Esto sugirió que para cuando se eliminó SCF del cóctel de diferenciación las células ya habían entrado en el linaje hematopoyético y mielóide. El marcador de monocito CD14 se expresó el día 20 (Figura 3F). Tanto la expresión de CD13 como de CD14 aumentó con el tiempo (Figura 3F).

Para el día 20, se hizo evidente que había dos poblaciones de CD45<sup>+</sup> en el cultivo: CD45<sup>hi</sup> y CD45<sup>lo</sup> (Figura 3G). La expresión de CD14 aumentó con el tiempo en la población de CD45<sup>hi</sup>. Para el día 32, el 65% de las células expresaron CD14 y CD45. La expresión de CD14 no se observó en la población de CD45<sup>lo</sup> (Figura 3G). La población CD45<sup>hi</sup> se correlacionó con células en el portal de células monocíticas/dendríticas llamada (R1) mientras que la población CD45<sup>lo</sup> se correlacionó con el portal de células progenitoras de granulocitos llamada (R2) en la dispersión frontal frente a la gráfica de dispersión lateral (Figura 3G). La población de CD45<sup>hi</sup> se caracterizó aún más en el día 32 del protocolo de diferenciación y se encontró que era positiva para CD11c, CD11b, HLA-I, HLA-II<sup>lo/neg</sup> y CD86 (Figura 3H), lo que sugiere que las células eran imDC. CD86 es una molécula coestimuladora involucrada en la activación de células T, mientras que CD83 es marcador de mDC. La falta de expresión de CD83 indicó que las células no eran mDC.

#### Ejemplo 3: procesamiento y presentación de antígenos

Para probar la capacidad de la imDC derivada de hES para procesar antígeno, la tinción fluorescente, DQ-OVA (Invitrogen, Carlsbad, CA), se disolvió a 1 mg/ml en PBS y se añadió a 100 µg/ml a imDC derivada de hES como es descrito en el ejemplo de referencia 1. La proteína se marcó con una tinción BODIPY-F1 insensible al pH. La tinción se autodesactiva cuando la proteína está intacta, pero presenta una fluorescencia de color verde brillante cuando la proteína se desnaturaliza o se somete a proteólisis. Las células se incubaron a 37 °C o a 4 °C (como control de la fluorescencia de fondo) y se lavaron 2X con regulador de flujo. Los datos fueron recolectados con FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) en FL1. Se encontró que las células tratadas son fluorescentes indicando que la proteína había sido proteolizada por la imDC, mientras que las células de control no lo hacían (Figura 5a).

Se realizó un ensayo funcional a continuación para determinar si las DC fabricadas de acuerdo con el método del Ejemplo 1 eran capaces de estimular la secreción de linfocitos específicos de antígenos de IFN $\gamma$ , un sello distintivo de la respuesta inmune adaptativa. La proteína de las paperas se usó como antígeno estimulante (Biodesign, Saco, ME). La proteína se añadió a 100 µg/ml durante 1 hora a imDC derivada de hES como se describe en el Ejemplo 1. El cóctel de maduración IFN- $\gamma$  descrito anteriormente (25 ng/ml), IL-1- $\beta$  (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), PGE2 (1 µg/ml) y GM-CSF (50 ng/ml) se añadió a continuación. Después de 24 horas, se recolectaron DC maduras, ya sea sin tratar o tratadas con proteína de las paperas, y se lavaron 2X con medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las DC se cultivaron en placa a 1x10<sup>4</sup> células/pozo junto con 1x10<sup>5</sup> PBMCs/pozo (Cellular Technologies LTD, Shaker Heights, OH) se usaron placas IFN $\gamma$  ELISPOT para la lectura (Millipore Corp. Bedford, MA). Las placas ELISPOT se recubrieron con anti-IFN $\gamma$  Ab (Mabtech, Mariemont, OH) a 10 µg/ml durante la noche (16-24 horas). La placa de ensayo se colocó a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 16-24 horas, y se desarrolló siguiendo las instrucciones proporcionadas por Mabtech. Las manchas se contaron usando un Analizador CTL (Cellular Technology Limited, Decatur, IL). Los resultados presentados en la Figura 5B demuestran una diferencia de 3 veces en la producción de IFN $\gamma$  por las mDC de la invención con respecto al control no tratado.

#### Ejemplo 4: producción de citocinas

Se realizó un análisis cualitativo de matriz de citocinas usando el kit Matriz de Citocina Humana III y V (Raybiotech, Norcross, GA) tanto en imDC como en mDC obtenidas de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se descubrió que las mDC producen las siguientes citocinas proinflamatorias: IL-6, IL-7, IL-8 e IL-10. Se cree que la IL-7 es importante para la supervivencia de las células T. IL-8 se cree que es un estímulo quimiotáctico. Las citocinas IL-6, IL-10 e IL-12 se cuantificaron usando la matriz citométrica de perlas BD (BD Biosciences, San Jose, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de las DC inmaduras y maduras derivadas de hES se recolectaron y concentraron utilizando

tubos de centrifuga Amicon Ultra-15 de 10.000 NMWL (Millipore, Bedford, MA). Los sobrenadantes se añadieron a conjuntos de perlas flex de IL-6, IL-10 e IL-12 humanos (BD Biosciences, San Jose, CA), y se incubaron durante 1 hora a 25 °C. Se añadió reactivo de detección de anticuerpos conjugado a PE (BD Biosciences, San Jose, CA) y se incubó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 1X, se resuspendieron en regulador de lavado (BD Biosciences, San Jose, CA), y se recolectaron mediante citometría de flujo con un FACSCaliber™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). Las concentraciones de citocinas se determinaron usando el software de matriz FCAP (BD Biosciences, San Jose CA). Los resultados presentados en la Figura 6A demuestran que niveles significativos de las tres citocinas fueron producidas por las mDC.

5

10 Ejemplo 5: análisis quimiotáctico de mDC

Se añadió medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las cámaras superior e inferior de placas Transwell de 24 pozos que contienen inserciones de tamaño de poro de 8,0 µm (Corning, Corning, NY), y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%. Después de eliminar el medio de cada pozo, se añadieron 0,6 ml de AIM-V con o sin la quimiocina MIP3β (100 ng/ml) a la cámara inferior. Las DC maduras derivadas de hES (como se describe en el ejemplo de referencia 1) se cultivaron y lavaron 2 veces en medio AIM-V. Las células se resuspendieron en medio AIM-V a 2,0x10<sup>6</sup> células/ml y se añadieron 0,1 ml a la cámara superior. La placa Transwell se incubó durante 2 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. El número de células que migraron a la cámara inferior se determinó usando un hemacitómetro. Los resultados presentados en la Figura 6D demostraron que los mDC de acuerdo con la invención migran en respuesta a MIP3β.

15

20

Ejemplo 6: capacidad inmunoestimuladora de las células dendríticas

Se realizaron varios ensayos para caracterizar la capacidad de las mDC producidas de acuerdo con el método del Ejemplo de Referencia 1 para estimular una respuesta inmune. Primero, se realizó un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) para demostrar que las mDC tenían la capacidad de estimular una alorespuesta ingenua fuerte.

25

Las DC derivadas de PBMC se prepararon aislando las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de las preparaciones de la capa leucocitaria de donante fresco y sano. Las PBMC se adhirieron a matraces de cultivo tisular en medio AIM-V durante 2 horas y luego se lavaron con PBS tibio para eliminar las células no adherentes. Las células adherentes restantes, formadas principalmente por monocitos, se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 6 días con interleucina 4 humana recombinante (rhIL-4) (R&D Systems, Minneapolis MN) y GM-CSF recombinante humano (rhGM-CSF) (R&D Systems, Minneapolis MN) a 1.000 U/ml para generar imDC. Las imDC se maduraron entonces durante 24 horas en medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 800 U/ml de rhGM-CSF, 10 ng/ml de TNFα, 10 ng/ml de IL-1-β y 10 ng/ml de IL-6 y 1,0 ug/ml de PGE2 (R&D Systems, Minneapolis MN).

30

35

Para el ensayo de MLR se aislaron PBMCs de las capas leucocitarias obtenidas de voluntarios sanos (Banco de Sangre de Stanford) centrifugando las células sobre un gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Buckinghamshire, Reino Unido). Las células aisladas se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen, Carlsbad, CA) con FBS al 10% (Clonotech, Mountain View, CA) y penicilina/estreptomina al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA). En una placa con fondo en U de 96 pozos (Becton Dickinson, San Jose, CA), se mezclaron 5x10<sup>4</sup> PBMCs y diferentes números de células estimuladoras irradiadas (2.000 rads para hESCs, DC derivadas de monocitos y DC derivadas de hES) en una placa con fondo en U de 96 pozos (Becton Dickinson, San Jose, CA) e incubadas en CO<sub>2</sub> al 5% y 37 °C durante cinco días. A continuación, las células se sometieron a un pulso con 1 uCi de <sup>3</sup>H timidina por pozo durante 18 horas con CO<sub>2</sub> al 5% y 37 °C. Las células se cultivaron en un UniFilter-96 GF/C (PerkinElmer, Waltham, MA) usando un Cosechador Filtermate (Perkin Elmer, Waltham, MA) y se contó la incorporación de <sup>3</sup>H timidina usando un contador de centelleo TopCount (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los resultados demostraron que la mDC producida de acuerdo con el Ejemplo 1 tenía una buena actividad estimulante alogénica (Figura 7A).

40

45

50

A continuación, se investigó la capacidad de la mDC para estimular células T efectoras específicas de antígeno. Se usó el péptido CMV pp65 (secuencia de aminoácidos 495-503) para demostrar la presentación del antígeno DC a los linfocitos CD8+. Se usaron respondedores de PBMC caracterizados que comprenden linfocitos CD8, que reconocen específicamente el péptido pp65. Los linfocitos T CD8 y la DC comparten un alelo HLA-A2 común. Para la presentación de antígenos específicos de CMV, se resuspendieron las DC derivadas de PBMC-DC maduras y hES en 150 µl de medio AIM-V libre de suero (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 10 µg/ml de péptido pp65 de CMV o no complementado. Las células se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 horas, y luego se lavaron 2X con medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cultivaron en placa DCs en una placa ELISPOT a 1x10<sup>4</sup> células/100 ul/pozo en una proporción de respuesta a estimulador de 10:1. Los respondedores de PBMC caracterizados, específicos para CMV, (Cellular Technologies Limited, Decatur, IL) se descongelaron en un baño de agua a 37 °C, se lavaron dos veces, se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se sembraron a 1x10<sup>5</sup> células /100 ul/pozo en placas ELISPOT (Millipore, Bedford MA). Las placas ELISPOT se recubrieron con anti-IFNγ Ab (Mabtech, Mariemont, OH) a 10 ug/ml durante la noche (16-24 horas). La placa de ensayo se colocó a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 16-24 horas, y se desarrolló siguiendo las instrucciones proporcionadas por Mabtech. Las manchas se contaron usando un Analizador CTL (Cellular Technology Limited, Decatur, IL). Los resultados, que se muestran en

55

60

65

la Figura 7b, demostraron que las mDC (ES-DC marcado en la figura) fueron capaces de estimular la producción de IFN $\gamma$  que era comparable a PBMC-DC.

5 A continuación, se examinó la capacidad de mDC para estimular la expansión de las células T in vitro. Una línea de células T CMV (67% de especificidad) (Prolimmune, Bradenton, FL) se descongeló a 37 °C y se lavó 2X con 1.640 medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) + FBS al 5% (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 1 mM de Napirovato, aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 5x10<sup>-5</sup> M de 2-mercaptoetanol y HEPES. Las células T se incubaron luego a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 horas. Se disolvió 5M de solución madre CFSE CellTrace (Invitrogen, Carlsbad, CA) inmediatamente antes de su uso en DMSO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células T se resuspendieron en PBS precalentado/BSA al 0,1% a 1x10<sup>6</sup>/ml. La tinción se añadió a las células a una concentración final de 2uM y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La tinción Celltrace se inactivó mediante la adición de 5X medio de cultivo enfriado con hielo. Las células se lavaron 2X antes de configurar el ensayo.

15 Las DC derivadas de hES se prepulsaron con 10  $\mu$ g/ml de péptido CMV495-503 pp65 (Anaspec, San Jose, CA) (> 95% de pureza mediante HPLC) durante 2 horas a 37 °C y se lavaron 2X antes de cultivar en placa a 2x10<sup>4</sup>/pozo en una placa con fondo en U de 96 pozos Falcon™ (BD, San Jose, CA). Las células T marcadas con CFSE se cultivaron en placa a 2x10<sup>5</sup> células/pozo. El día 5, las células se cosecharon y se tiñeron con 5  $\mu$ l de pentámero específico CMV495-503 marcado con APC (Prolimmune, Bradenton, FL) por millón de células a 25 °C durante 10 minutos. Esto reconoció células T específicas para el péptido CMV 495-503. Esto permitió la activación de FACS en esta población específica de células para el análisis de CFSE. Las células se lavaron 2X con regulador de flujo, se tiñeron con 7AAD durante 5 minutos antes de ejecutar las muestras en el FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). Las células muertas se excluyeron del análisis por 7AAD. La dilución de la etiqueta de tinción (múltiples picos) es indicativa de la proliferación de células T. Como se muestra en la Figura 7C, la DC fabricada de acuerdo con el Ejemplo 1 (ES-DC en la figura) produjo proliferación de células T comparable a PBMC-DC. Los linfocitos T CD8 y las células dendríticas compartían un alelo HLA-A2 común.

Ejemplo 7: Comparación de cócteles de diferenciación

30 Las condiciones de cultivo para cultivar y diferenciar células hES a imDC y mDC se realizaron como se describe en el Ejemplo de referencia 1, excepto que el cóctel de diferenciación usado se cambió para comparar cócteles de diferenciación que comprenden una diversidad de citocinas exógenas. Se probaron diversas combinaciones de 7, 5, 4 y 3 citocinas (factores de crecimiento) para determinar su capacidad de diferenciar células hES a imDC. La Tabla II proporciona detalles con respecto a experimentos en los que el cóctel de diferenciación comprendía 7, 5 y 4 citocinas exógenas (los signos más indican la presencia del factor/los signos menos indican que el factor no se usó).

35 Los números en la mitad inferior de la tabla indican los porcentajes de cada marcador celular obtenido con el cóctel correspondiente indicado directamente por encima de los porcentajes. La Tabla III proporciona detalles en los que el cóctel de diferenciación comprendía 4 y 3 citocinas exógenas (los signos más indican la presencia del factor/los signos menos indican que el factor no se usó). La configuración con respecto a los porcentajes de marcadores obtenidos en relación con los cócteles correspondientes se indica en la mitad inferior de la tabla, donde los porcentajes corresponden al cóctel que se muestra arriba de los datos numéricos. Las tablas IV-VI proporcionan detalles sobre la composición del cóctel de diferenciación (como se describe en las tablas II y III) en el transcurso del experimento ("X" indica que el factor estuvo presente durante el período especificado) (se usa "d" en estas tablas como abreviatura de "día").

45 Las imDC se maduraron a mDC usando dos cócteles de maduración diferentes. En los experimentos descritos en la Tabla II, se usó un cóctel de maduración que comprende GM-CSF, I1-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CD40L e IFN $\alpha$ . En los experimentos descritos en la Tabla III, se usó un cóctel de maduración que comprendía TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  y PGE2. La Tabla VII proporciona la concentración y la fuente de cada una de las citocinas (factores de crecimiento) probadas.

50 Tabla II: Experimento de reducción del factor de crecimiento

	BMP-4	+	+	+
	GM-CSF	+	+	+
	VEGF	+	+	+
	SCF	+	+	+
	Flt3-L	+	+	-
	TPO	+	-	-
	IL-3	+	-	-

ES 2 647 533 T3

Tiempo	Marcador	% positivo			
d20	CD45	67,2 ± 6,71	72,1 ± 5,2	71,2 ± 7,46	
	CD11c	39,2 ± 6,49	42,9 ± 6,33	36,7 ± 7,23	
	CD14	23,1 ± 8,15	23,7 ± 8,4	25,3 ± 8,7	
d30	CD45	89,6 ± 1,29	91,7 ± 0,73	86,5 ± 2,94	
	CD11c	82,7 ± 1,67	83,1 ± 1,39	72,5 ± 4,61	
	CD14	22,2 ± 3,74	25,4 ± 4,56	26,8 ± 4,15	
iDC	CD86	65,5 ± 3,9	67,4 ± 4,29	71,7 ± 3,02	
	CD83	37,8 ± 1,74	47,6 ± 2,55	45,3 ± 3,51	
	MHC II	34,2 ± 7,5	31 ± 4,78	25,6 ± 6,03	
mDC	CD86	63,9 ± 4,51	73,4 ± 4,48	74,9 ± 2,58	
	CD83	63,3 ± 3,8	69,8 ± 5,09	71 ± 3,83	
	MHC II	43,3 ± 5,23	46,6 ± 6,08	34,5 ± 7,26	
	CCR7	44,7 ± 5,32	56,7 ± 6,41	57 ± 4,79	
rendimiento <sup>#</sup>					
10 <sup>3</sup> células/pozo*		335 ± 92	385 ± 7,1	666 ± 182	
% células positivas de la población total. La media es n=4 con error estándar de la media. *Se hicieron diferenciaciones en placas de 6 pozos de fijación ultra baja. #media de n=2.					

Tabla III. Experimento de reducción del factor de crecimiento

	BMP-4	+	-	+	+	+	
	GM-CSF	+	+	-	+	+	
	VEGF	+	+	+	-	+	
	SCF	+	+	+	+	-	
Tiempo	Marcador	% positivo					
d20	CD34	26,5	11,3	1,3 ± 0,17	±	20,8 ± 16,5	18,4 ± 11,4
	CD45	76,4	10,9	1,2 ± 0,54	7,6 ± 6,4	30,1 ± 27,2	54,2 ± 25,7
	CD11c	42,1	20,8	1,5 ± 0,74	1,9 ± 0,4	4,2 ± 2,7	27,8 ± 23,4
d30	CD45	70,7	10,8	0,7 ± 0,4	12 ± 7,1	51 ± 23	77,3 ± 6
	CD11c	69,6	5,9	0,7 ± 0,4	9 ± 4,5	46,7 ± 21,4	65,4 ± 5,9
	CD14	23	5,8	0,8 ± 0,6	8,3 ± 5	20,8 ± 11	27,6 ± 7,9
% células positivas de la población total. *Se hicieron diferenciaciones en placas de 6 pozos de fijación ultra baja La media es n=3 con error estándar de la media							

Tabla IV.

	7 factores de crecimiento						
	BMP-4	IL-3	VEGF	TPO	SCF	flt3L	GM-CSF
d0-5	x	x	x	x	x	x	x
d6-10			x	x	x	x	x
d11-15					x	x	x
d16 en adelante						x	x

5

Tabla V.

	5 factores de crecimiento					4 factores de crecimiento			
	BMP-4	VEGF	SCF	flt3L	GM-CSF	BMP-4	VEGF	SCF	GM-CSF
d0-5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
d6-10		x	x	x	x		x	x	x
d11-15			x	x	x			x	x
d16 en adelante				x	x				x

Tabla VI.

	3 factores de crecimiento			3 factores de crecimiento			3 factores de crecimiento			3 factores de crecimiento		
	BMP-4	VEGF	GM-CSF	BMP-4	SCF	GM-CSF	BMP-4	VEGF	SCF	VEGF	SCF	GM-CSF
DO-5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D6-10		x			x	x		x	x	x	x	x
D11-15			x		x	x			x		x	x
D16 en adelante			x			x						x

10

Tabla VII: Reactivos

Factores de crecimiento	Fabricación	Catálogo	Concentración Usada
rhBMP-4	R&D Systems	314-BP	50 ng/ml
rhSCF	R&D Systems	255-SC-050	20 ng/ml
rhGM-CSF	R&D Systems	215-GM-050	50 ng/ml
rhFLT3L	R&D Systems	308-FKN-025	20 ng/ml
rhVEGF	R&D Systems	293-VE-050	50 ng/ml
rhIL-4	R&D Systems	204-IL-010	50 ng/ml
rhTNF-alpha	R&D Systems	210-TA-010	10 ng/ml
rhIFN-gamma	R&D Systems	285-IF-100	20 ng/ml
rhIL-3	R&D Systems	203-IL-050	25 ng/ml
MIP-3B	Pepro Tech	300-29B	100 ng/ml
rhCD40L	R&D Systems	617-CL-050/CF	100 ng/ml
rhIFN-alpha	R&D Systems	11101-2	10 ng/ml
IL-1beta	R&D Systems	201-LB-005	10 ng/ml

Ejemplo 8: comparación del cóctel de maduración

Las células pPS diferenciadas a imDC de acuerdo con diversas realizaciones de la invención se maduraron a mDC usando diferentes combinaciones de citocinas/factores. Una concentración celular de  $0,05 \times 10^6$  células/pozo se cultivaron en placas de 96 pozos y se cultivaron durante 24 horas en medio X VIVO-15 complementado con diversas combinaciones de citocinas/factores como se expone en la Tabla VIII. Las concentraciones de los factores usados fueron como se indica anteriormente en la Tabla VII. Para Poly I:C se usó 10 ug/ml; para PGE2 se usó 1 µg/ml; para iL-6, se usó 10 ng/ml. Todos los cócteles de maduración probados contenían 50 ng/ml de GM-CSF. Los niveles de IL-12 e IL-10 de sobrenadantes a las 24 horas se midieron usando la Matriz de Perlas Citométricas BD™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) como indicativo de maduración de imDC a mDC. Los resultados sugirieron que tan poco como solo cuatro citocinas exógenas podrían estimular la maduración de imDC a mDC.

Tabla VIII.

	cóctel de maduración							pg/ml	
	TNFα	IL1β	IFNγ	PGE2	POLY I:C	IFNα	CD40L	IL-12	IL-10
1	-	-	-	-	-	-	-	0,0	35,8
2	+	+	+	+	-	-	-	1,9	118,4
3	+	+	+	+	-	-	+	2,6	104,8
4	+	+	+	+	-	+	-	1,4	219,8
5	+	+	+	+	-	+	+	1,9	206,3
6	+	+	+	-	-	+	-	0,0	155,6
7	+	+	+	-	+	+	+	1,9	202,8

El experimento se repitió usando una concentración celular de  $0,2 \times 10^6$  células/pozo en placas de 6 pozos, pero esta vez se probó un panel diferente de citocinas. Las concentraciones de citocinas fueron las siguientes: 10 ng/ml de TNFα; 10 ng/ml de IL-1β; 20 ng/ml de IFN γ; 1 ug/ml de PGE2; 10 ng/ml de IL-6. Los sobrenadantes se concentraron utilizando tubos de centrifuga Amicon Ultra-15 de 10.000 NMWL (Millipore Corp, Bedford, MA) y se analizaron después de una exposición de 48 horas a los diversos cócteles de maduración para la producción de IL-12 e IL-6 como indicativo de maduración de DC. Como en el experimento anterior, todos los cócteles de maduración también contenían 50 ng/ml de GM-CSF. También se incluyeron como control positivo las DC derivadas de monocitos generadas a partir de PBMCs humanas. Los resultados se presentan en la Tabla IX a continuación.

Tabla IX.

Cóctel de Maduración					Citocina (pg/ml)		Tipo de célula
IFN-γ	TNF-α	IL-1β	PGE2	IL-6	IL-12	IL-6	
-	-	-	-	-	2,0	96,3	es-iDCs
+	+	+	+	-	11,6	38.729,2	es-mDCs
-	+	+	+	+	2,2	53.438,0	es-mDCs
+	-	+	+	-	3,4	9.796,6	es-mDCs
+	+	-	+	-	1,7	195,3	es-mDCs
-	+	+	+	+	16,5	64.856,8	Mo-mDCs

Ejemplo 9: Generación de líneas celulares T hTERT

Las PBMCs se aislaron a partir de capas leucocitarias HLA-A2+ de donantes humanos sanos utilizando los métodos de separación Ficoll Plaque-Plus (GE Healthcare Bioscience AB, Piscataway, NJ). Para generar imDC, los monocitos de PBMCs HLA-A2+ se aislaron utilizando microesferas CD14+ (Miltenyi, Auburn, CA) y se transfirieron a medios AIM-V libres de suero (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contienen rhGM-CSF (1.000 U/ml) (Berlex, Richmond, CA) y rhIL-4 (1.000 U/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN), y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 5 días.

Las DC se maduraron durante 24 horas añadiendo un cóctel de citocinas que comprendía TNFα (10 ng/ml) (R&D Systems), IL1β (10ng/ml) (R&D systems), IL-6 (10ng/ml) (R&D systems), y PGE2 (1ug/ml) (R&D systems). Se



cosecharon mDC, se lavaron 2X en medio AIM-V, se resuspendieron en 200 ul de medio AIM-V y se pulsaron con 540 péptido hTERT, un 9mer que comenzaba con el aminoácido 540 de la proteína hTERT (100ug/ml) (AnaSpec Inc, San Jose, CA) durante 2 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%.

5 Se aislaron células T CD8+ autólogas a partir de PBMCs al agotar las células que no son CD8+ usando un kit de separación magnética de células T CD8+ (Miltenyi, Aurburn, CA). Las células CD8+ se resuspendieron en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10% (Valley Biomedical, Winchester, VA) y se transfirieron a placas de 24 pozos a una concentración de 1,0-2,0x10<sup>6</sup> células/ml. Se añadieron DC pulsadas con 540 hTERT a los pozos a una proporción de estimulador a respondedor de 1:10 y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, se añadieron IL-7 humana recombinante (10ng/ml) (R&D systems) e IL-2 (10U/ml) (R&D systems) al cultivo.

15 Las reestimulaciones péptidas hTERT 540 se realizaron cada 7-10 días. Para la reestimulación se usaron PBMC autólogas para presentar el antígeno. Se transfirieron PBMCs autólogas a placas de 24 pozos a una concentración de 2,0-3,0x10<sup>6</sup> células/pozo que contenía medio AIM-V libre de suero y péptido hTERT 540 (10 µg/ml). Las PBMC se mantuvieron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 horas para promover la unión de las células a la placa. Las células no adherentes se eliminaron con lavados 2X con medio AIM-V. Las PBMCs adherentes se pulsaron durante 2 horas adicionales con péptido hTERT 540 (10ug/ml) y luego se irradiaron a 2.000 rads.

20 Se cosecharon células T CD8+ a partir de las DC pulsadas con cebador inicial hTERT 540, se lavaron 1X y se transfirieron a pozos que contenían células PBMC adherentes irradiadas pulsadas con hTERT 540. Se añadió IL-12 (10 ng/ml) (R&D systems) al cultivo. Al día siguiente, se añadieron IL-7 humana recombinante (10 ng/ml) y/o IL-2 (10 U/ml) al cultivo. Cada 3-4 días, se retiró la mitad del medio y se añadió medio fresco que contenía IL-7 y/o IL-2 cuando fue apropiado. Se llevaron a cabo al menos 3 reestimulaciones usando PBMC irradiadas autólogas adherentes pulsadas con hTERT 540.

25 El porcentaje de células T CD8+ específicas positivas hTERT 540 se determinó tiñendo células con pentámero 540 marcado con APC (Prolimmune, Bradenton, FL) y CD8 FITC antihumano Ab conjugado (Proimmune, Bradenton, FL) usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) Las células CD8+ específicas de TERT se recolectaron mediante citometría de flujo usando un FACSCaliber™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) y se usaron en experimentos posteriores.

Ejemplo 10: ensayo ELISpot IFN $\gamma$  de líneas de células T hTERT 540

35 mDC derivadas de hES (Referencia (Ejemplo 1) se resuspendieron en 200 ul de medio AIM-V libre de suero (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se pulsaron con péptido hTERT 540 (100 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. La mDC no pulsada sirvió como control. Las mDC derivadas de hES no pulsadas sirvieron como control. Las mDC se lavaron 2X en medio AIM-V, se resuspendieron en medio AIM-V y se cultivaron en placa con líneas de células T hTERT 540 en una proporción estimulador respondedor de 1:10 en placas ELISpot recubiertas con anti-IFN- $\gamma$  Ab (10ug/ml) (Mabtech, Mariemont, OH). La placa de ensayo se colocó a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 16-24 horas, y se desarrolló siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las manchas se contaron utilizando un Analizador CTL (Cellular Technology Limited, Decatur, IL). Los resultados se muestran en la figura 8 y demuestran que mDC diferenciada de hES estimula una respuesta específica de células T a un antígeno hTERT.

Ejemplo 11: Proliferación de líneas de células T 540 hTERT

45 Las líneas de células T 540 hTERT se resuspendieron en PBS/BSA al 0,1% precalentado a 1,0 x 10<sup>6</sup> /ml. Se añadió CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las células a una concentración final de 2 uM y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La tinción se detuvo mediante la adición de medio AIM-V preenfriado que contenía FBS al 10% (Cloneteck, Mountain View, CA). Las células se lavaron 2X antes de configurar el ensayo. Las DC maduras derivadas de hES (Referencia (Ejemplo 1) se pulsaron con 10 µg/ml de péptido 540 hTERT (Anaspec, San Jose, CA) durante 2 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% y se lavaron 2X en medio AIM-V antes de cultivar en placas a 2x10<sup>4</sup> /pozo en una placa de fondo en U de 96 pozos Falcon™ (BD, San Jose, CA). Líneas de células T 540 hTERT marcadas con CFSE se cultivaron en placas a 2x10<sup>5</sup> células/pozo. La mDC derivada de hES no pulsada sirvió como control. El día 4, las células se cosecharon y se tiñeron con reactivo pentámero 540 conjugado a APC (Prolimmune, Bradenton, FL). Las células se lavaron 2X con regulador FACS y se tiñeron con 7AAD antes de la recolección usando un FACSCaliber™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). El análisis se realizó utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Los resultados se presentan en la Figura 9 y demuestran que las mDC diferenciadas de células hES pueden presentar antígeno hTERT en el contexto de HLA-A2 y estimular proliferación de células T antígeno específicas.

60 Ejemplo 12: capacidad inmunoestimuladora de mDC irradiado

65 Las células dendríticas maduras se diferenciaron in vitro de células pPS de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de referencia 1. Para abordar los efectos de la irradiación en células dendríticas diferenciadas in vitro de células hES (hESC-DCs), se comparó la capacidad de las hESC-DCs irradiadas y no irradiadas para estimular las respuestas efectoras específicas de antígenos de las células T. Se usó el péptido CMV pp65 (secuencia de aminoácidos 495-503) para demostrar la presentación del antígeno hESC-DC a los linfocitos CD8+. Los

respondedores de PBMC caracterizados (Cellular Technology Limited, Decatur, IL), que contienen células T CD8+ que reconocen el complejo de pp65 a HLA-A2 se usaron como las células respondedoras. Para la presentación del antígeno específico de pp65, se resuspendieron hESC-DC maduras en 150 µl de medio AIM-V libre de suero (Invitrogen, Carlsbad, CA) ya sea complementado con 10 µg/ml de péptido pp65 o sin complementar. Las células se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 horas, y luego se lavaron 2 veces con medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una parte de los hESC-DCs pp65 pulsados y sin pulsar se irradiaron con rayos X a 2.000 rad durante 4 minutos y 14 segundos utilizando el sistema de inspección de rayos X Torrex 150D (EG&G Astrophysics Research Corporation, Long Beach, CA). Las hESC-DCs irradiadas y no irradiadas se cultivaron en una placa ELISPOT a 1x10<sup>4</sup> células/100 ul/pozo a una proporción respondedor a estimulador de 10:1. Los respondedores de PBMC caracterizados se descongelaron en un baño de agua a 37 °C, se lavaron dos veces, se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron a 1x10<sup>5</sup> células/100 ul/pozo en placas ELISPOT (Millipore, Bedford MA). Las placas ELISPOT se recubrieron con anti-IFN $\gamma$  Ab (Mabtech, Mariemont, OH) a 10 ug/ml durante la noche (16-24 horas). Las placas de ensayo se colocaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 16-24 horas, y se desarrollaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por Mabtech. Las manchas se contaron usando un Analizador CTL (Cellular Technology Limited, Decatur, IL). Los resultados, mostrados en la Figura 10, demuestran que las hESC-DCs irradiadas mantienen la capacidad de estimular la producción de IFN $\gamma$  de una manera específica de antígeno.

#### Ejemplo 13: migración quimiotáctica de mDC irradiada

Las células dendríticas maduras se diferenciaron de acuerdo con el mismo protocolo utilizado en el Ejemplo 12. La capacidad de mDC irradiado y no irradiado (hESC-DCs) para migrar en presencia del ligando quimiotáctico MIP3 $\beta$  (MIP3b en la Figura 11) usando un ensayo Transwell in vitro fue investigado. Se añadió medio AIM-V (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las cámaras superiores e inferiores de las placas Transwell de 24 pozos que contienen inserciones de poros de 8,0 µm (Corning, Corning, NY), y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% para equilibrar la membrana. Se cosecharon las mDCs y se lavaron 2 veces en medio AIM-V. Las células se resuspendieron en medio AIM-V a 1,5x10<sup>6</sup> células/ml y una porción de estas células se irradió con rayos X a 2.000 rad usando el sistema de inspección de rayos X Torrex 150D (EG&G Astrophysics Research Corporation, Long Beach, CA). Después de la eliminación del medio del transwell, se añadió 0,6 µg de AIM-V con o sin la quimiocina MIP3 $\beta$  (100 ng/ml) a la cámara inferior. Se añadió un volumen de 0,1 ml de mDCs irradiadas o no irradiadas (0,15x10<sup>6</sup> células) a la cámara superior. La placa transwell se incubó durante 2 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%. El número de células que migraron a la cámara inferior se determinó usando un hemacitómetro. Los resultados presentados en la Figura 11 demostraron que la irradiación no afectaba la capacidad de los mDCs para migrar en respuesta a MIP3 $\beta$ .

#### Ejemplo 14: Comparación del rendimiento celular de medios comercialmente disponibles

Se investigó el efecto sobre el rendimiento de células mDC de dos medios comercialmente disponibles, medios libres de suero mTeSR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) y XVIVO-10™ (Lonza, Walkersville, MD). Se realizaron métodos de cultivo y diferenciación H1 hESCs como se describe en el Ejemplo de referencia 1. Se comparó el número de DCs maduras en cada cosecha entre hESCs que se originaron de cultivos XVIVO-10 o mTeSR, Figura 12. Se realizaron un total de 3 cosechas desde la diferenciación inicial. Si bien ambos medios produjeron con éxito mDCs diferenciadas in vitro de hES, los resultados sugieren que hESCs cultivadas en mTeSR proporcionan mejores rendimientos celulares que XVIVO-10.

#### Ejemplo 15: maduración de DCs derivadas de hESC cultivadas en medios comercialmente disponibles

Las DCs maduras poseen la capacidad de estimular respuestas de células T; por lo tanto, es deseable optimizar el proceso de maduración para las DCs derivadas de hESC. (Véase, por ejemplo, Chiara et al, 2007). Diferenciamos H1 hESCs como se describe en el Ejemplo de referencia 1, pero usamos medios de DC de Cellgro durante los pasos para generar DC derivadas de hESC inmaduras y maduras. Después de 24 horas de maduración, las células se cosecharon y se evaluó la presencia de un fenotipo de DC maduro con base en: 1) expresión del marcador de superficie celular, 2) migración y 3) expresión de IL-12.

La citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 2 se usó para analizar la expresión de la superficie celular de marcadores asociados a DC: MHC clase II, CD83, CD86 y CCR7. Las DCs derivadas de hESC maduras cultivadas en medios Cellgro™ DC tenían tanto un porcentaje positivo de células elevadas (%) como niveles de expresión (MFI) de MHC clase II, CD83 y CCR7 en comparación con DCs cultivadas en XVIVO-15™, Figura 13. El % de las células que expresan los niveles de CD86 se mantuvieron sin cambios, pero la intensidad de fluorescencia media (MFI) fue mayor usando el medio de DC Cellgro™. Estos datos sugieren que los medios de DC de Cellgro promueven la generación de un fenotipo de superficie de DC madura más robusta.

A continuación, se estudió la eficacia de migración de las DCs maduras derivadas de hESC cultivadas en medios DC de Cellgro™ y XVIVO-15™ usando un ensayo Transwell como se describe en el Ejemplo 5. Las DCs derivadas de hESC cultivadas en XVIVO-15™ requieren maduración por al menos 48 horas de maduración para una migración efectiva. Por el contrario, las DCs maduras derivadas de hESC cultivadas y maduras en medios DC Cellgro™ tienen una capacidad incrementada para migrar en respuesta a MIP3 beta en comparación con XVIVO-15™ a las 24

horas (Figura 14). Estos datos sugieren que las DC derivadas de hESC cultivadas en medios DC Cellgro™ tienen una migración mejorada a las 24 horas después de la maduración.

5 IL-12 ayuda a promover una respuesta inmune tipo Th1; por lo tanto, sería útil optimizar la expresión de IL-12 a partir de DCs maduras derivadas de hESC. Los niveles de expresión de IL-12 se detectaron como se describe en el Ejemplo 4. Las DCs maduras derivadas de hESC cultivadas en DC Cellgro™ tenían niveles de expresión de IL-12 más elevados (3,4 veces) en comparación con DCs cultivadas con XVIVO-15™ (Figura 15). La adición de IL-4 al cóctel de maduración puede potenciar la expresión de IL-12 a partir de las DCs (véase, por ejemplo, Ebner et al., (2001) J. Immunology 166:633). IL-4 aumentó la expresión de IL-12 a partir de ambas condiciones del medio, pero  
 10 las DCs maduras derivadas de hESC cultivadas en medio DC Cellgro™ tenían niveles marcadamente más altos de producción de IL-12 (5,6 veces), (Figura 15). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las DCs maduras derivadas de hESC cultivadas en medios DC Cellgro™ tienen la capacidad de expresar IL-12 a niveles más elevados que las DC cultivadas en XVIVO-15™.

15 Ejemplo 16: Estimulación de líneas de células T 540 hTERT mediante DCs derivadas de hESC transfectadas con ARN que codifican hTERT-LAMP.

H1 hESCs se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de referencia 1, excepto que mTeSR™ se usó para cultivar hESCs y DCs Cellgro™ para generar DCs inmaduras y maduras derivadas de hESC.  
 20 Entre 2,0-4,0e6 DCs maduras derivadas de hESC se electroporaron con ARN que codifica hTERT-LAMP o GFP en cubetas de 0,4 cm (Biorad, Hercules, CA) usando un pulsador de genes Biorad Xcell (Biorad, Hercules, CA) usando los siguientes parámetros: 300V , 150uF y 100Ω. Las células electroporadas se lavaron 1X en medio DC Cellgro™, y las células se transfirieron al medio de maduración durante 6 horas adicionales. DCs maduras derivadas de hESC electroporadas con GFP- y hTERT-LAMP ARN, fueron recolectadas y coincubadas con líneas de células T hTERT  
 25 540 para detectar la expresión IFNγ como se describe en los ejemplos 9 y 10. Los resultados demostraron que las DCs maduras derivadas de hESC electroporadas con hTERT-LAMP ARN estimularon niveles aumentados de IFNγ de líneas de células T hTERT 540 específicas en comparación con las células DCs derivadas de hESC transfectadas con GFP-ARN, (Figura 16). Estos datos sugieren que las DCs derivadas de hESC tienen la capacidad de procesar y presentar antígeno hTERT.  
 30

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro de diferenciar células madre pluripotentes de primate (pPS) en células dendríticas inmaduras que comprende: (a) poner en contacto las células madre pluripotentes de primate con un cóctel de diferenciación que comprende factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), diferenciando así las células pPS en células progenitoras hematopoyéticas, y (b) poniendo en contacto las células progenitoras hematopoyéticas de la etapa (a) con un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF e interleucina 4 (IL-4), diferenciando así las células progenitoras hematopoyéticas en células dendríticas inmaduras.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto las células madre pluripotentes de primate con uno o más de los siguientes: factor de células madre (SCF), ligando de cinasa de hígado fetal (FLT3L), trombopoyetina (TPO) e interleucina 3 (IL-3).
3. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre pluripotentes de primate son células madre embrionarias humanas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la diferenciación de las células madre pluripotentes de primate en células dendríticas inmaduras se realiza en condiciones libres de suero.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo de las células madre pluripotentes de primate y la diferenciación de las células madre pluripotentes de primate en células dendríticas inmaduras se realiza libre de alimentador.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la diferenciación de las células madre pluripotentes de primate en células dendríticas inmaduras se realiza libre de células estromales.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende además madurar las células dendríticas inmaduras poniendo en contacto las células dendríticas inmaduras con un cóctel de maduración.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el cóctel de maduración comprende uno o más de los siguientes: factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina  $1\beta$  (IL1 $\beta$ ), interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), prostaglandina E2 (PGE2), poliinosínico: ácido policitídílico (POLY I:C), interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), ligando de CD40 (CD40L) y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF).
9. El método de la reivindicación 7, que comprende además poner en contacto la célula dendrítica madura con un antígeno.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el antígeno es una molécula de ácido nucleico.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN.
12. El método de la reivindicación 9, en el que el antígeno es un péptido.
13. El método de la reivindicación 9 que comprende además poner en contacto la célula dendrítica madura con una fuente de radiación.
14. Un método in vitro para diferenciar las células madre pluripotentes de primate en células dendríticas inmaduras que comprende:
  - (a) poner en contacto las células pPS con proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de células madre (SCF) para diferenciar las células madre pluripotentes de primate en mesodermo;
  - (b) poner en contacto el mesodermo de (a) con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de células madre (SCF) y GM-CSF para diferenciar el mesodermo en células madre hematopoyéticas;
  - (c) poner en contacto las células madre hematopoyéticas de (b) con SCF y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) para diferenciar las células madre hematopoyéticas en monocitos; y
  - (d) poner en contacto los monocitos con el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) y la interleucina 4 (IL-4) para diferenciar los monocitos en células dendríticas inmaduras.
15. Un método in vitro para diferenciar una célula que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y los marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 en una célula que expresa CD11c que comprende: (a) poner en contacto la célula

- que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y los marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 con un cóctel de diferenciación que comprende: GM-CSF y BMP-4, diferenciando así la célula que expresa SSEA3, SSEA4 y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 en una célula que expresa CD45, y (b) poner en contacto la célula que expresa CD45 de la etapa (a) con un cóctel de diferenciación que comprende GM-CSF e IL-4, diferenciando así la célula que expresa CD45 en una célula que expresa CD11c.
- 5
16. El método de la reivindicación 15, que comprende además poner en contacto la célula que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 con VEGF, durante el paso (a).
- 10
17. El método de la reivindicación 15, que comprende además poner en contacto la célula que expresa el antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3), el antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA4) y los marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 con SCF, durante el paso (a).
- 15

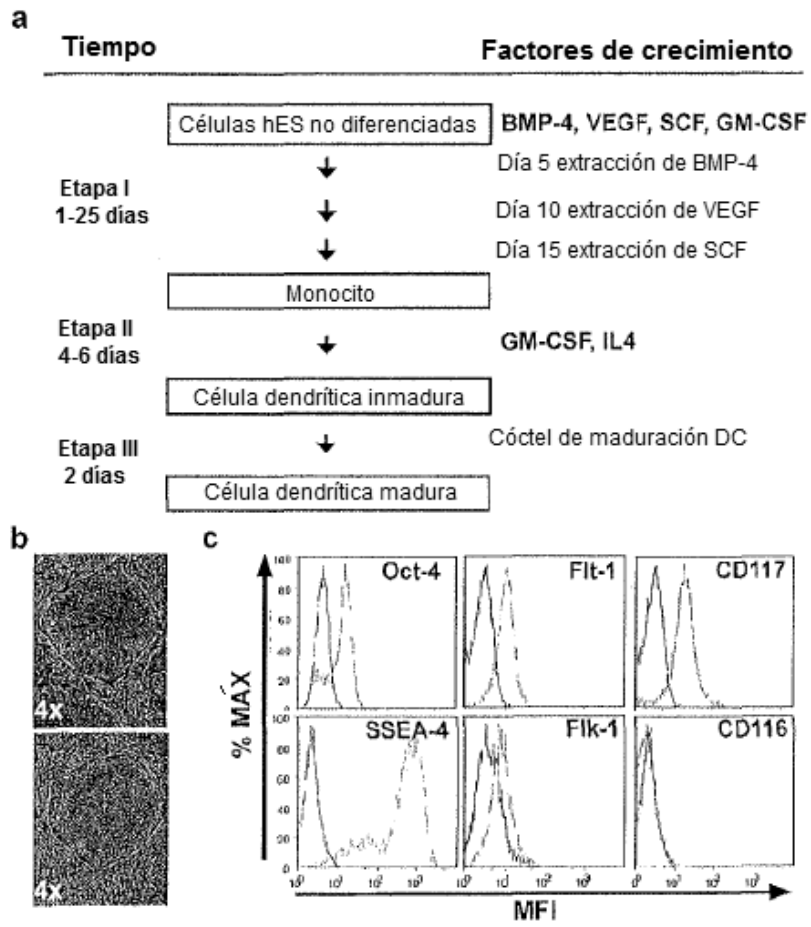


Figura 1

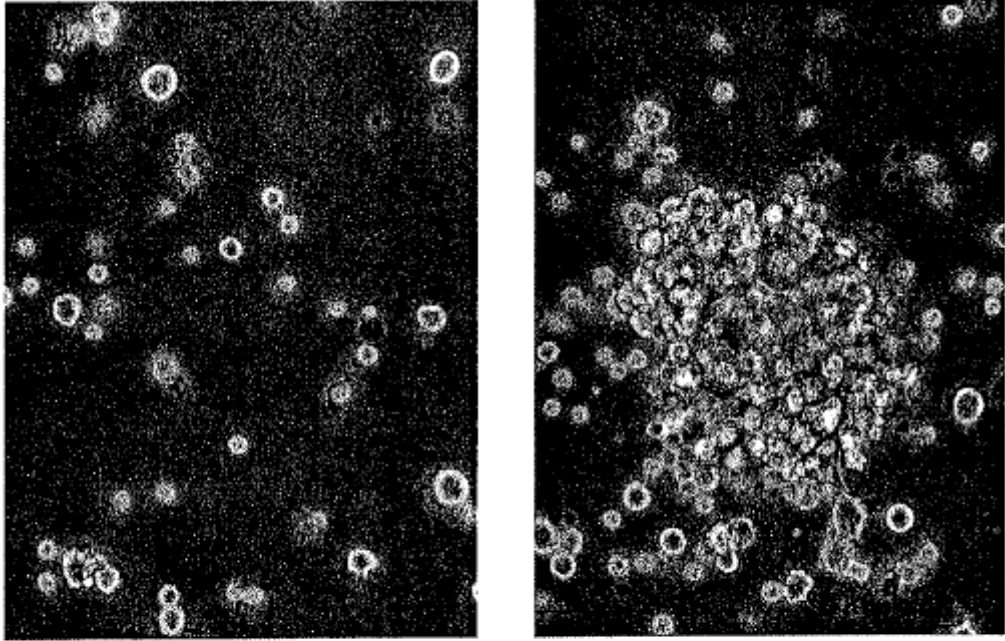


FIG. 2

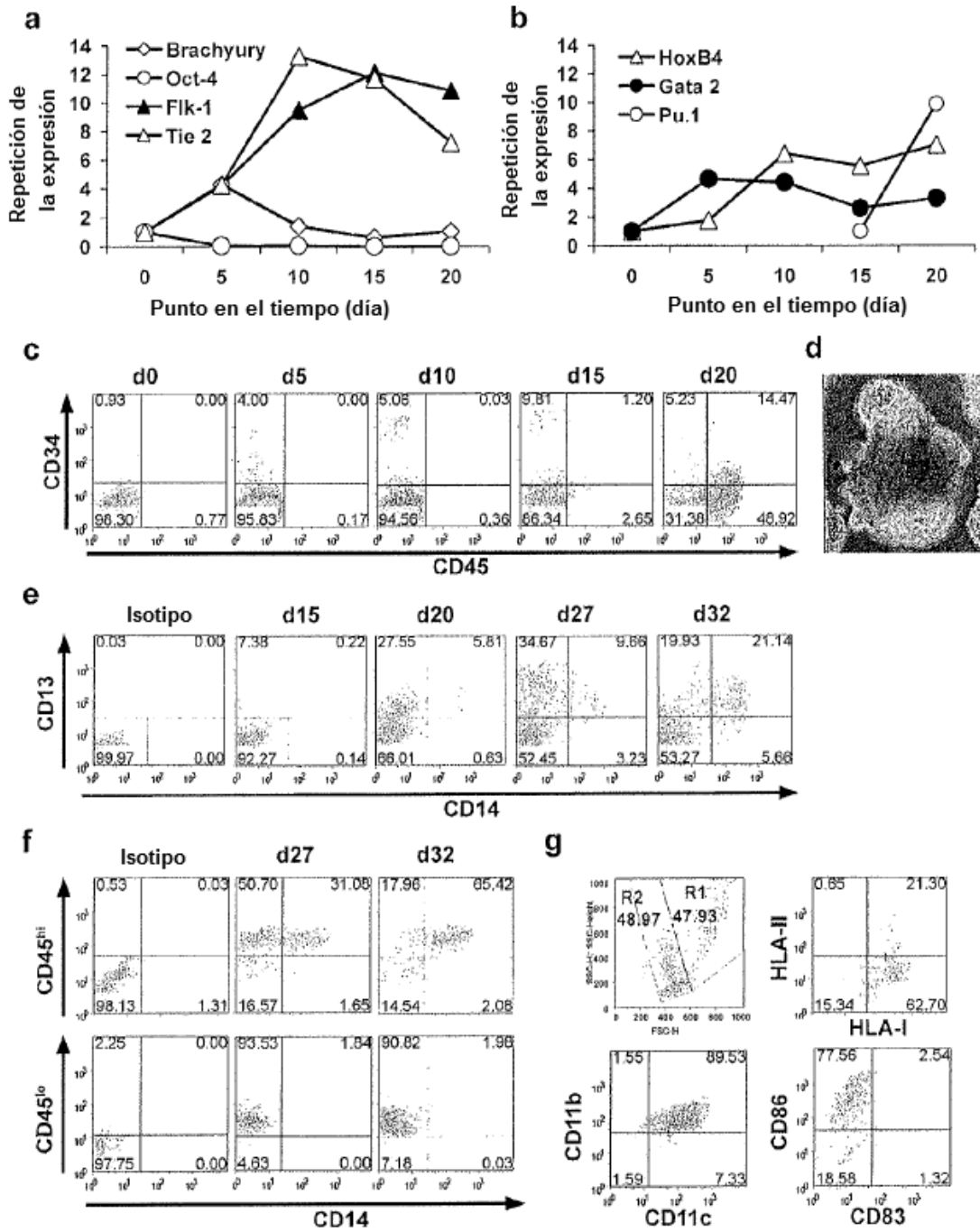


Figura 3



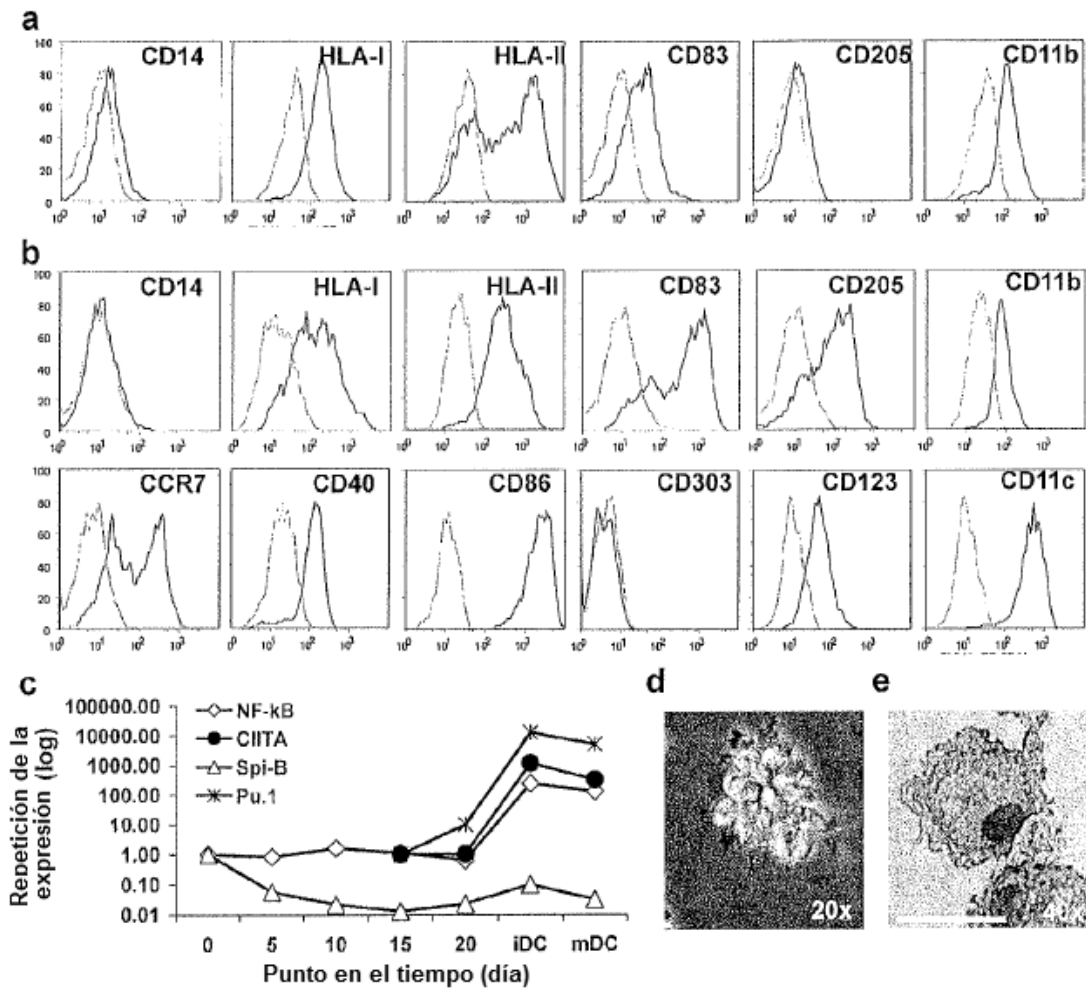


Figura 4

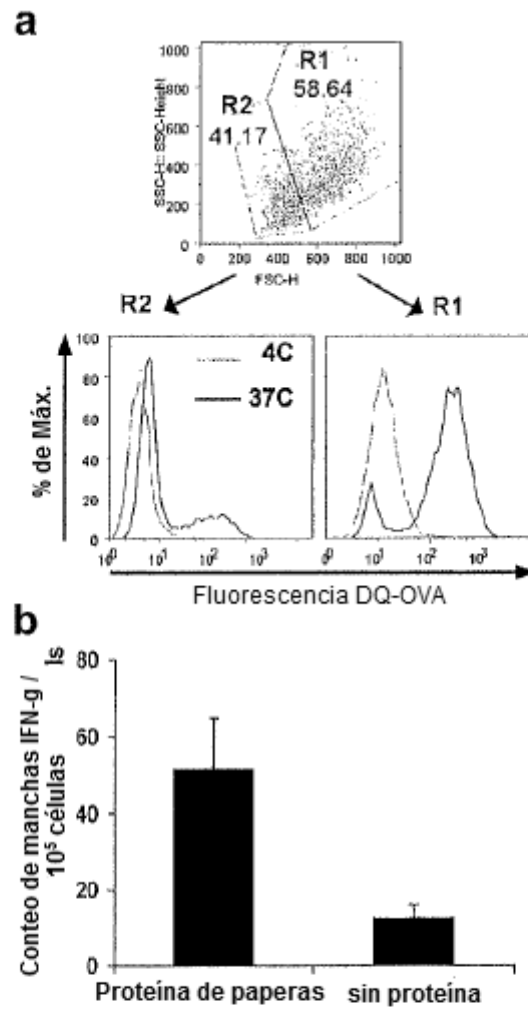


Figura 5

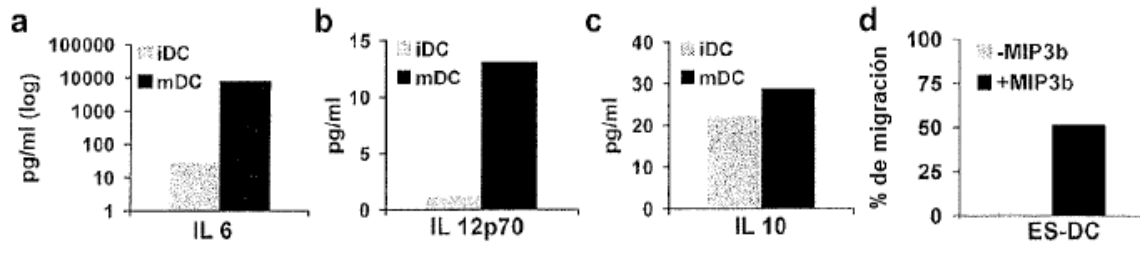


Figura 6

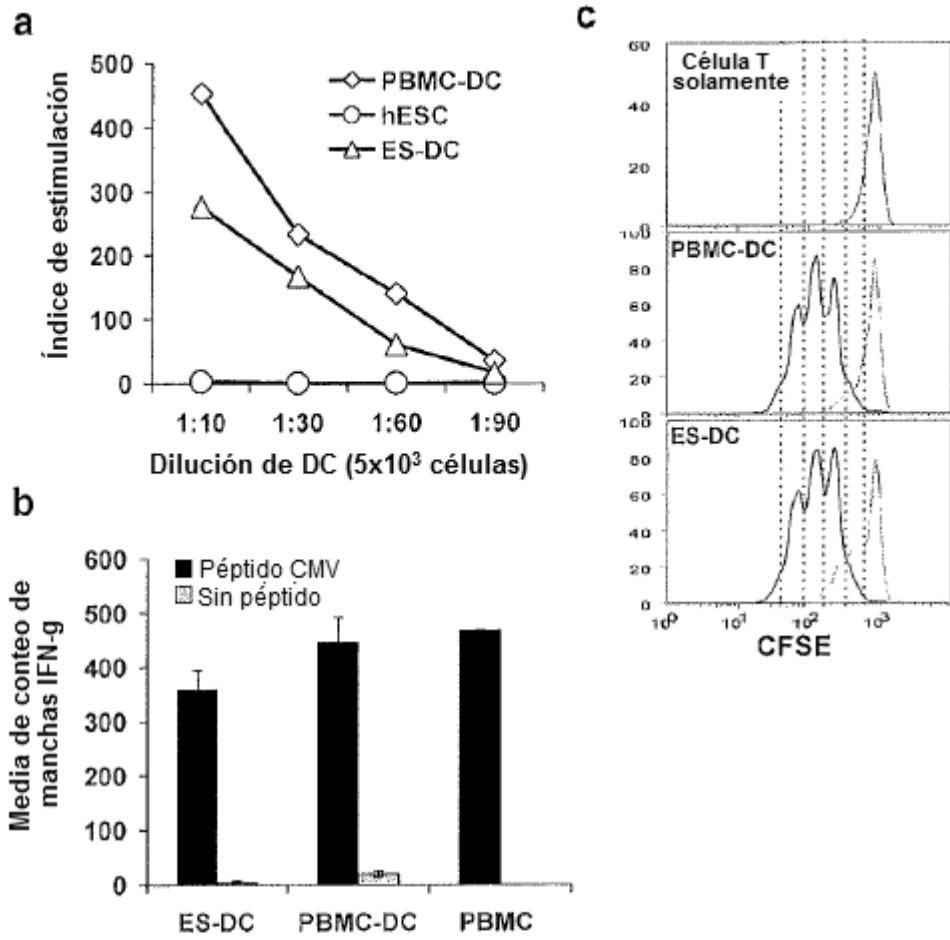


Figura 7

**Antígeno hTERT presente en HLA-A2 de hESC-DC madura y estimula secreción de IFN-g por las células T**

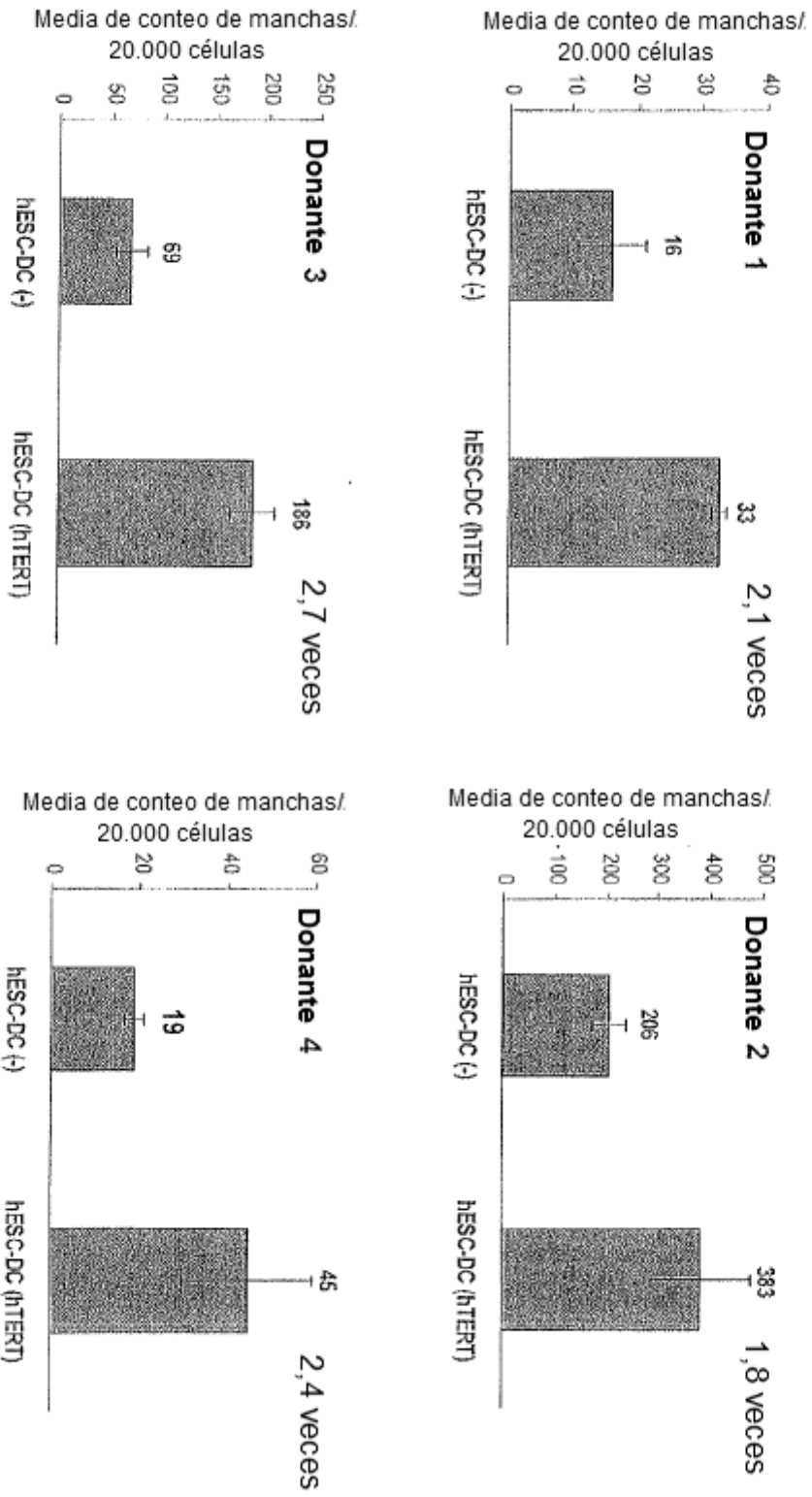


Figura 8

## Antígeno hTERT presente en HLA-A2 de hESC-DC madura y estimula la proliferación de células T

La proliferación se midió usando dilución de tinción CFSE y pentámero de hTERT que identifica células específicas de antígeno

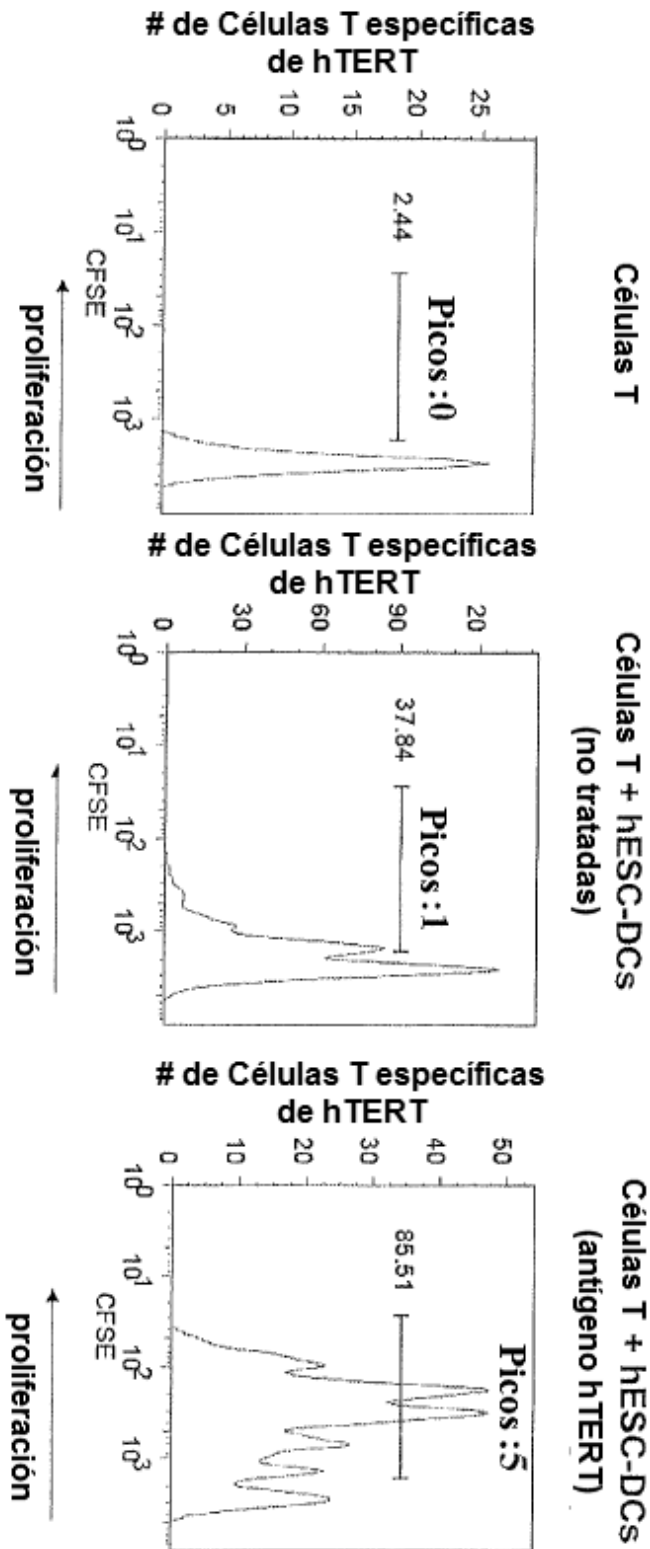


Figura 9

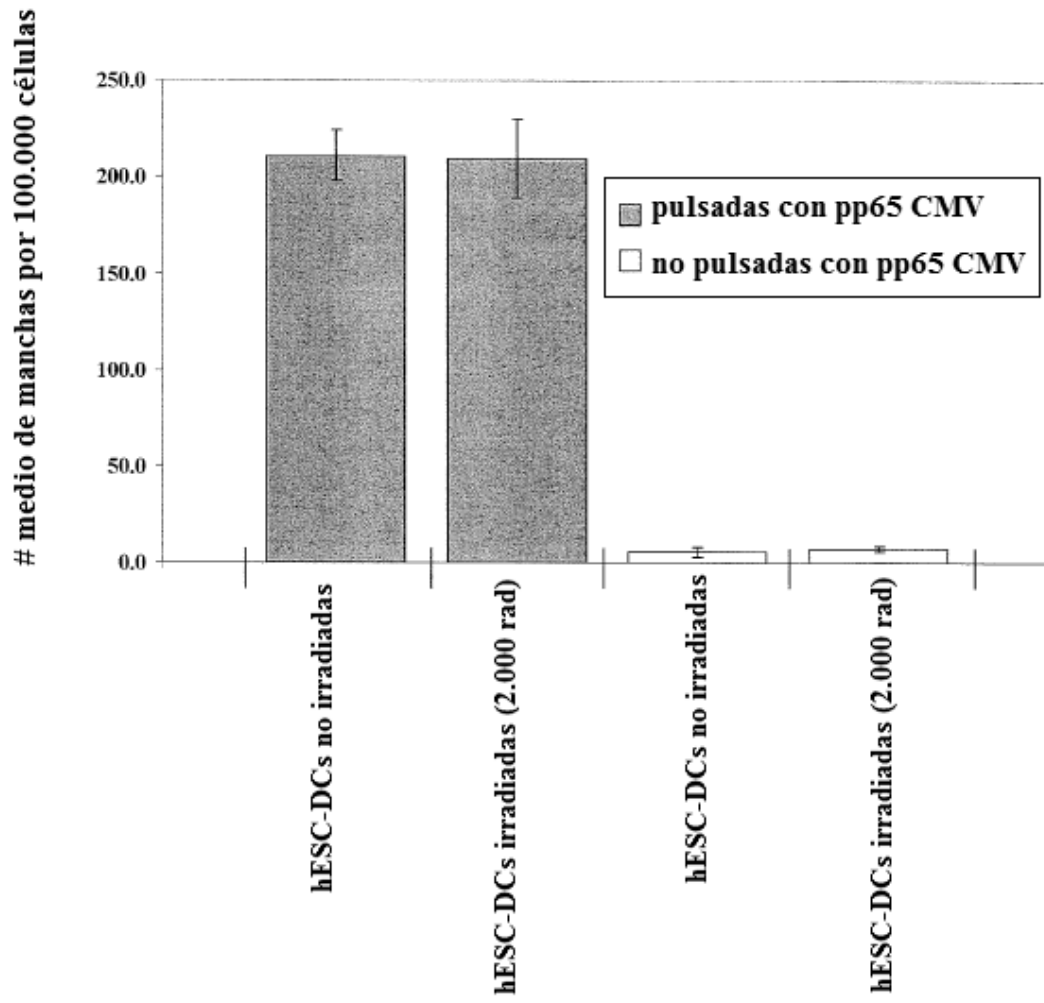


Figura 10

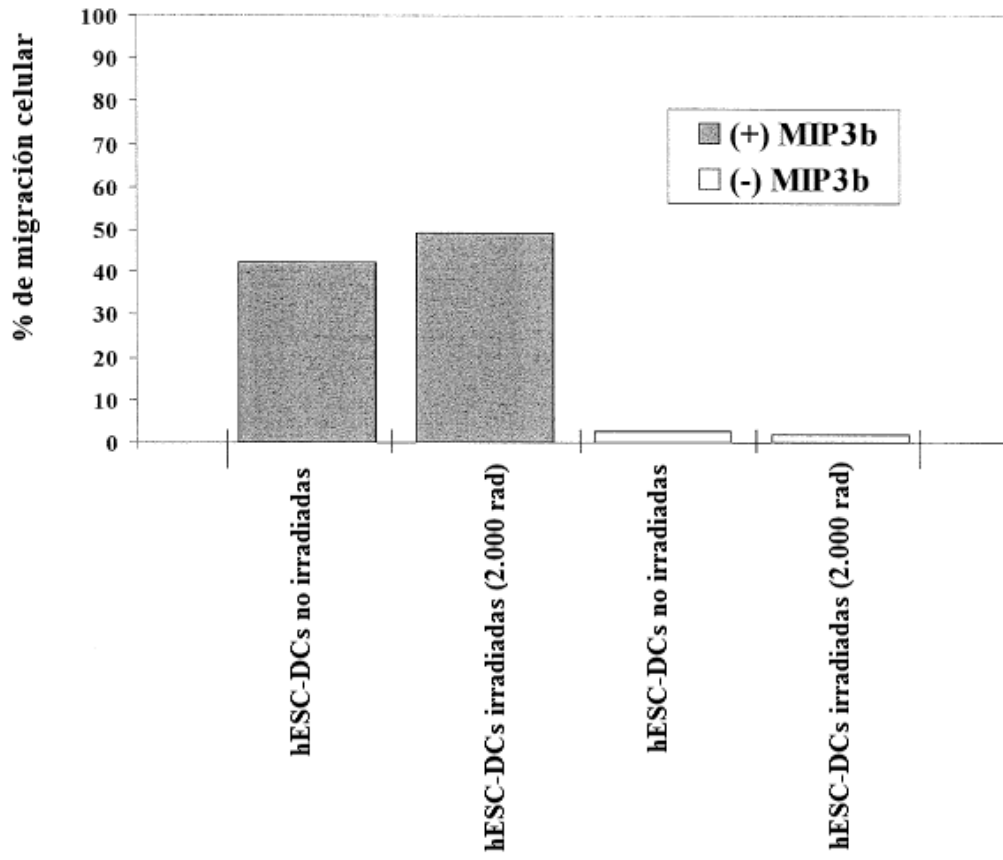


Figura 11



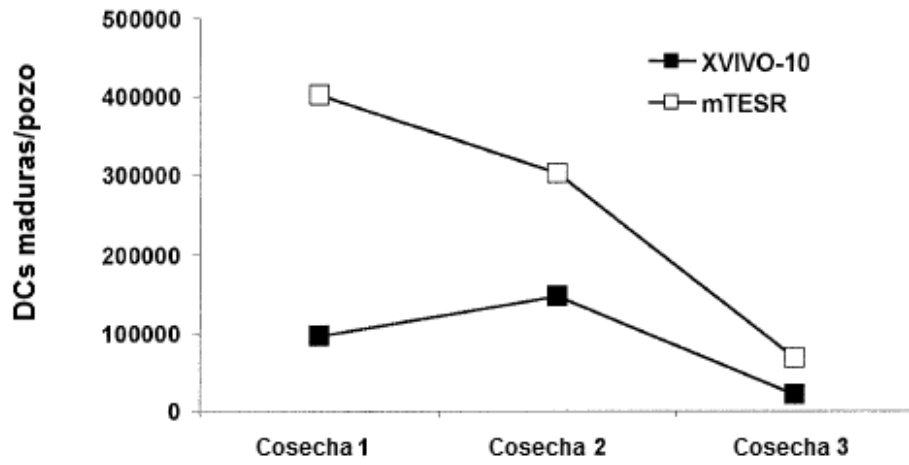


Figura 12

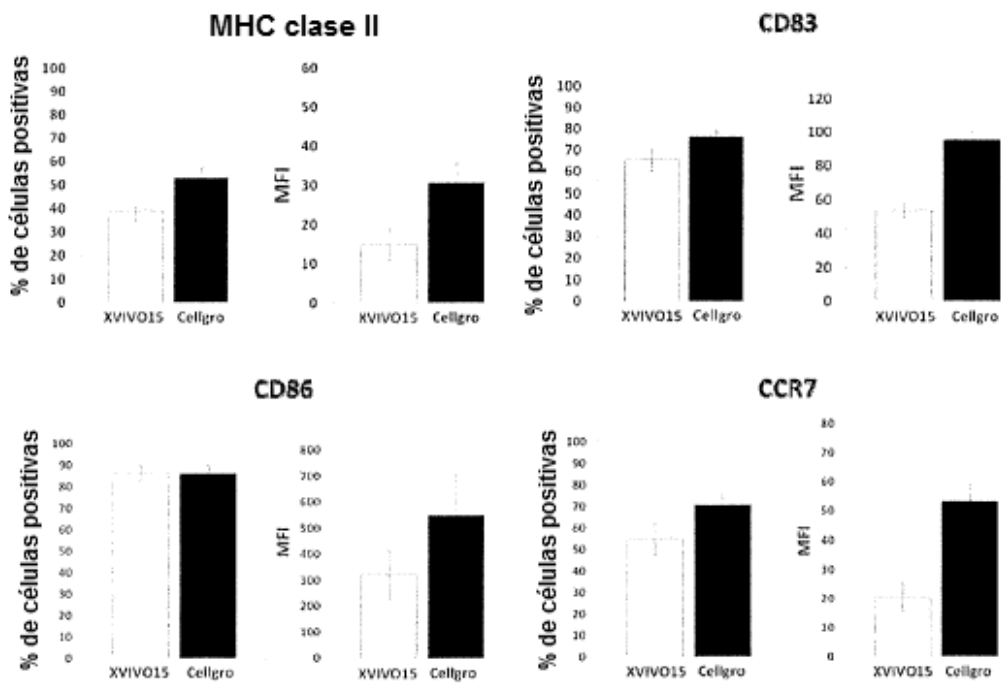


Figura 13

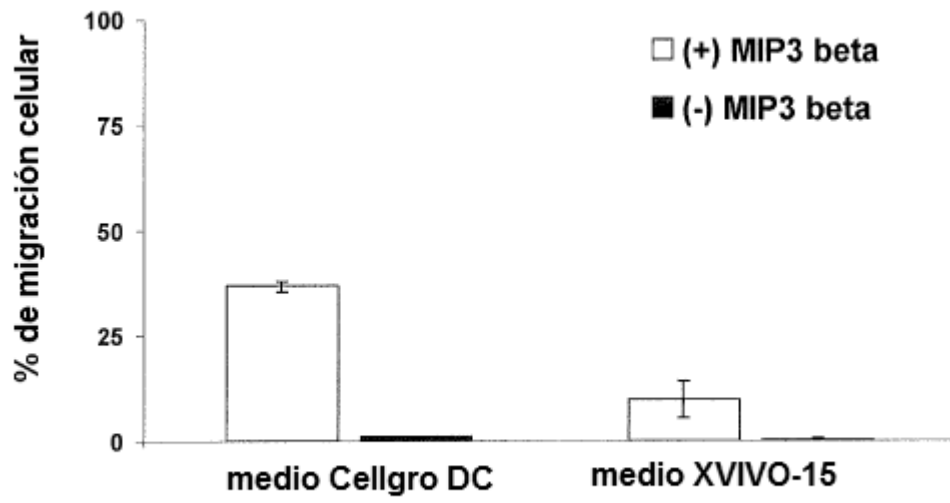


Figura 14

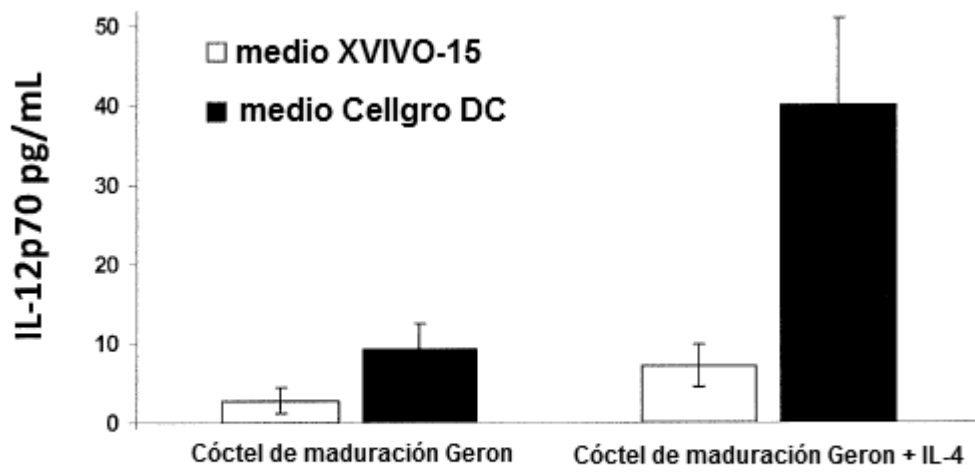


Figura 15

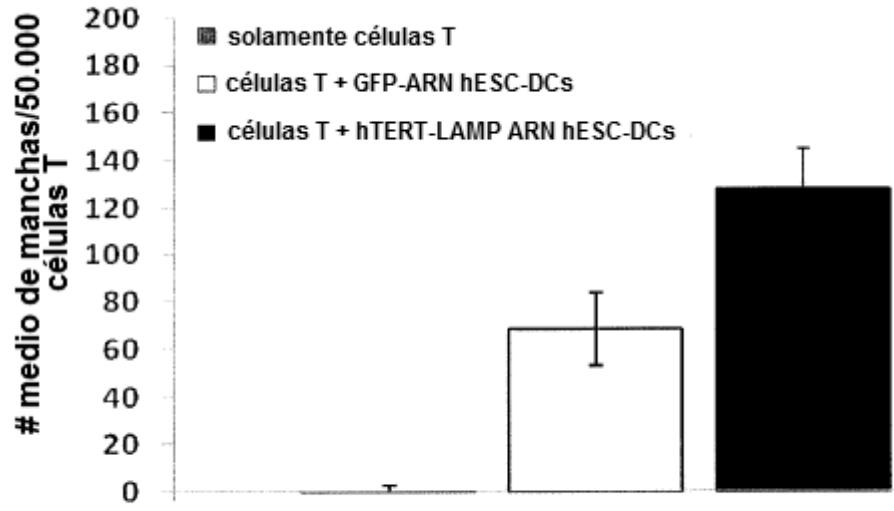


Figura 16