

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 171**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30	(2015.01)	C12N 5/0797	(2010.01)
A61K 35/33	(2015.01)		
A61K 35/34	(2015.01)		
A61K 35/39	(2015.01)		
C12N 15/85	(2006.01)		
C12N 5/0793	(2010.01)		
C12N 5/077	(2010.01)		
C12N 5/071	(2010.01)		
C12N 5/073	(2010.01)		
C12N 5/074	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2011 PCT/US2011/040390**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11159726**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2011 E 11796321 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2580320**

54 Título: **Reprogramación de células a un nuevo destino**

30 Prioridad:

14.06.2010 US 354651 P
23.08.2010 US 376148 P
28.01.2011 US 201161437294 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2018

73 Titular/es:

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
Mail Drop TPC-8 10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

EFE, JEM, A.;
KIM, JANGHWAN;
ZHU, SAIYONG;
HILCOVE, SIMON y
DING, SHENG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 171 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

Reprogramación de células a un nuevo destino

Antecedentes de la invención

5 El corazón de los mamíferos carece de una capacidad regenerativa significativa. La generación *in vitro* de células cardíacas en cantidades suficientes para el trasplante, por lo tanto, revolucionaría el tratamiento de la enfermedad cardíaca. Un informe reciente de la transdiferenciación satisfactoria de células somáticas a un destino cardíaco *in vitro* (Ieda, M. et al., Cell 142, 375-86 (2010)) ha planteado la posibilidad de que este proceso eventualmente pueda ser utilizado para la terapia cardíaca basada en células. Sin embargo, primero se deben mejorar la velocidad y la eficacia, especialmente si el objetivo final es proporcionar una alternativa más rápida y segura a la re-diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas autólogas (iPSC) (Schenke-Layland, K. et al., Stem Cells 26, 1537-46 (2008)).

Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos para convertir una célula animal de un primer destino celular no pluripotente a un segundo destino celular no pluripotente. En algunas realizaciones, el método comprende:

15 incrementar la cantidad de al menos un factor de transcripción de reprogramación en una célula animal que tiene el primer destino celular para generar una célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje a un segundo destino celular diferente del primer destino celular; y

presentar la célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje a condiciones que inducen la diferenciación de la célula para generar una célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente.

20

La presente invención proporciona un método *in vitro* para convertir una célula animal de un primer destino celular no pluripotente a un segundo destino celular no pluripotente, comprendiendo el método:

25 incrementar la cantidad de al menos un factor de transcripción de reprogramación en una primera célula no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente para generar una célula intermedia no pluripotente introduciendo en la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 o un polipéptido c-Myc, o

30 poner en contacto la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más de un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; y

presentar la célula intermedia no pluripotente a factores diferenciadores específicos del linaje para inducir la diferenciación de la célula intermedia no pluripotente para generar una célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente, en donde (i) la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog, y (ii) la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente es una célula de linaje mesodérmico, una célula de linaje ectodérmico o una célula de linaje endodérmico.

35

El desarrollo o crecimiento de células pluripotentes se limita, p.ej., al limitar la expresión o el contacto de las células con el factor o los factores de transcripción de reprogramación, o poniendo en contacto la célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje con un inhibidor que inhibe el crecimiento de células pluripotentes. En algunas realizaciones, el inhibidor que inhibe el crecimiento de células pluripotentes es un inhibidor de JAK.

40

La célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje no expresa significativamente Nanog.

En algunas realizaciones, el método se produce en ausencia de LIF exógeno. En algunas realizaciones, la célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje no es capaz de formar un teratoma.

45 En algunas realizaciones, el método no comprende el aislamiento o la selección de células entre las etapas de incremento y presentación.

La célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje no es una célula madre pluripotente inducida.

50 En algunas realizaciones, la célula animal que tiene el primer destino celular es un fibroblasto o una célula precursora neural. En algunas realizaciones, la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente es un cardiomiocito.

En algunas realizaciones, la etapa de presentación comprende poner en contacto la célula que se diferencia en respuesta a factores diferenciadores específicos del linaje con BMP4, un agonista del canal de calcio (p.ej., BayK 8644), un agente activador de Gas, un análogo de AMPc y/o un inhibidor de GSK-3.

5 En algunas realizaciones, la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente tiene un destino de célula neural. En algunas realizaciones, la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente tiene un destino de célula pancreática.

10 En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct, un polipéptido Klf y un polipéptido Sox2. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct, un polipéptido Klf y un polipéptido Myc. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct y un polipéptido Klf. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct y un polipéptido Sox2. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación comprenden un polipéptido Oct y un polipéptido Myc.

15 En algunas realizaciones, el tiempo desde el inicio de la etapa de incremento hasta la generación de la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente no es mayor de 25, 24, 23, 22 o 21 días. En algunas realizaciones, el tiempo desde el inicio de la etapa de incremento hasta la generación de la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente no es mayor de 20, 19, 18, 17 o 16 días. En algunas realizaciones, el tiempo desde el inicio de la etapa de incremento hasta la generación de la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente no es mayor de 15, 14, 13, 12 u 11 días. En algunas realizaciones, el tiempo desde el inicio de la etapa de incremento hasta la generación de la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente oscila entre 8 y 22 días (es decir, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 días), entre 9 y 22 días (es decir, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 días), entre 10 y 22 días (es decir, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 días), entre 10 y 25 días (es decir, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 días), entre 10 y 20 días (es decir, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 días), entre 7 y 20 días (es decir, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 días), entre 7 y 22 días (es decir, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 días), o entre 7 y 25 días (es decir, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 días).

En algunas realizaciones, las condiciones que inducen la diferenciación son condiciones químicamente definidas.

30 Se describe un método que se realiza al menos parcialmente *in vivo*. En algunos aspectos, se realiza la etapa de incremento *in vivo*. En algunos aspectos, la etapa de presentación ocurre al inducir la etapa de incremento en una célula en un contexto celular *in vivo* de manera que las señales endógenas hacen que la célula tenga el segundo destino celular no pluripotente.

En realizaciones de la invención, el método se lleva a cabo *in vitro*.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para diferenciar una célula animal a un cardiomiocito. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula animal con un inhibidor de GSK-3 y/o una proteína BMP (p.ej., BMP4) en condiciones para la generación de un cardiomiocito.

En algunas realizaciones, la célula animal es una célula animal no humana. En algunas realizaciones, la célula animal es una célula humana.

En algunas realizaciones, las condiciones son condiciones químicamente definidas.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para transdiferenciar una célula animal a un cardiomiocito.

La presente invención proporciona un método de transdiferenciación *in vitro* de una célula animal a un cardiomiocito, que comprende:

45 introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2, para generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog; y

50 poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de GSK-3, un agonista del canal de calcio, un agente de activación de Gas, un análogo de AMPc y/o una proteína BMP en condiciones para la generación del cardiomiocito;

diferenciando de ese modo la célula intermedia no pluripotente a cardiomiocito.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto la célula animal no pluripotente con un inhibidor de JAK. En algunas realizaciones, la célula animal no pluripotente se pone en contacto con el

inhibidor de JAK antes de poner en contacto la célula con el inhibidor de GSK-3, el agonista del canal de calcio (p.ej., BayK 8644), el agente activador de G α s, el análogo de AMPc y/o la proteína BMP (p.ej., BMP4). En algunas realizaciones, poner en contacto la célula animal no pluripotente con el inhibidor de JAK comprende cultivar la célula animal no pluripotente en presencia del inhibidor de JAK. En algunas realizaciones, la célula animal no pluripotente se cultiva en presencia del inhibidor de JAK durante un período de aproximadamente uno a aproximadamente nueve días (p.ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días).

5

En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos para transdiferenciar una célula animal a una célula progenitora neural. La presente invención proporciona un método para transdiferenciar una célula animal a una célula progenitora neural, comprendiendo el método:

10 introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2, para generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog; y

15 poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con FGF2, FGF4 y EGF en condiciones para la generación de la célula progenitora neural;

diferenciando de ese modo la célula intermedia no pluripotente a la célula progenitora neural.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto la célula animal no pluripotente con un inhibidor de Wnt, un inhibidor de JAK, o tanto un inhibidor de Wnt como un inhibidor de JAK. En algunas realizaciones, la célula animal no pluripotente se pone en contacto con el inhibidor de Wnt, el inhibidor de JAK o tanto el inhibidor de Wnt como el inhibidor de JAK antes de poner en contacto la célula con FGF1, FGF4 y EGF.

20

Se describen métodos de transdiferenciación de una célula animal a una célula del epitelio pigmentado de la retina. En algunas realizaciones, el método comprende:

25 introducir en una célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc; o poner en contacto una célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc;

30 poner en contacto la célula con FGF2, FGF4 y EGF en condiciones para la generación de una célula progenitora neural; y

poner en contacto la célula progenitora neural con un inhibidor de TGF β y un inhibidor de GSK-3 para generar la célula del epitelio pigmentado de la retina; diferenciando de ese modo la célula a la célula del epitelio pigmentado de la retina.

También se describen métodos para transdiferenciar una célula animal a una célula neuronal positiva para tirosina hidroxilasa (TH). En algunas realizaciones, el método comprende:

35

40 introducir en una célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc; o poner en contacto una célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc; y

poner en contacto la célula con FGF8 y SHH en condiciones para la generación de la célula neuronal positiva para TH; diferenciando de ese modo la célula a la célula neuronal positiva para TH.

Se describen métodos de transdiferenciación de una célula animal a una célula de linaje pancreático. En algunas realizaciones, el método comprende:

45 (1) introducir en una célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc; o poner en contacto una célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc; y

50

(2) en condiciones para la generación de la célula del linaje pancreático,

(a) poner en contacto la célula con un miembro de la familia TGF β /Activina/Nodal y un inhibidor de JAK;

(b) poner en contacto la célula de la etapa (2) (a) con un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5, BMP4, bFGF y RA; y

(c) poner en contacto la célula de la etapa (2) (b) con nicotinamida;

diferenciando de ese modo la célula a la célula del linaje pancreático.

5 En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos para transdiferenciar una célula animal a una célula de endodermo definitiva inducida (iDE). La presente invención proporciona un método para transdiferenciar una célula animal a una célula de endodermo definitiva inducida (iDE), comprendiendo el método:

10 introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc, para generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog; y

15 poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de HDAC y un miembro de la familia de TGFβ/Activina/Nodal en condiciones para la generación de la célula iDE;

diferenciando de ese modo la célula intermedia no pluripotente a la célula iDE.

20 En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos para transdiferenciar una célula animal a una célula beta pancreática. La presente invención proporciona un método para transdiferenciar una célula animal a una célula beta pancreática, comprendiendo el método:

25 (1) introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; para generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog;

30 (2) poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de HDAC y un miembro de la familia de TGFβ/Activina/Nodal en condiciones para la generación de una célula de iDE; y

(3) en condiciones para la generación de la célula beta pancreática,

(a) poner en contacto la célula iDE con FGF7, RA, un inhibidor de la ruta Hedgehog, un inhibidor de BMP y un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5;

35 (b) poner en contacto la célula de la etapa (3) (a) con EGF y un inhibidor de Notch; y

(c) poner en contacto la célula de la etapa (3) (b) con bFGF y nicotinamida;

diferenciando de ese modo la célula intermedia no pluripotente a la célula beta pancreática.

40 En algunas realizaciones, la etapa (3) del método comprende adicionalmente el contacto con extensina 4. En algunas realizaciones, la etapa (3) (c) comprende adicionalmente poner en contacto la célula de la etapa (3) (b) con la extensina 4.

Definiciones

"Destino celular" según se utiliza en la presente memoria se emplea como se entiende generalmente en el campo de la biología celular y se refiere al último estado diferenciado que ha asumido una célula.

45 Un "polipéptido Oct" se refiere a cualquiera de los miembros naturales de la familia de factores de transcripción Octaméricos, o variantes de los mismos que mantienen la actividad del factor de transcripción, similar (al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de actividad) en comparación con el miembro de familia de origen natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN del miembro de familia de origen natural, y pueden comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Los polipéptidos Oct ilustrativos incluyen, Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, Oct-7, Oct-8, Oct-9 y Oct-11, p.ej., Oct3/4 (al que se hace referencia en la presente memoria como "Oct4") que contiene el dominio POU, una

50 secuencia de 150 aminoácidos conservada entre Pit-1, Oct-1, Oct-2 y uric-86. Véase, Ryan, A.K. y Rosenfeld, M.G.

Genes Dev. 11, 1207 - 1225 (1997). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Oct de origen natural, tal como los enumerados anteriormente o tales como los enumerados en el número de acceso Genbank NP_002692.2 (Oct4 humano) o NP_038661.1 (Oct4 de ratón). Los polipéptidos Oct (p.ej., Oct3/4) puede ser de ser humano, de ratón, de rata, bovino, porcino o de otros animales. En general, se utilizará la misma especie de proteína con las especies de células que se manipulan.

Un "polipéptido Klf" se refiere a cualquiera de los miembros naturales de la familia de factores de tipo Krüppel (Klfs), proteínas en dedo de zinc que contienen secuencias de aminoácidos similares a las del regulador del patrón embrionario de *Drosophila* Krüppel, o variantes de los miembros de origen natural que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de actividad) en comparación con el miembro de la familia de origen natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN del miembro de la familia de origen natural, y pueden comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Véase, Dang, D.T., Pevsner, J. y Yang, V.W. Cell Biol. 32, 1103-1121 (2000)) Los miembros de la familia de Klf ilustrativos incluyen, Klf1, Klf2, Klf3, Klf4, Klf5, Klf6, Klf7, Klf8, Klf9, Klf10, Klf11, Klf12, Klf13, Klf14, Klf15, Klf16 y Klf17. Klf2 y Klf4 resultaron ser factores capaces de generar células iPS en ratones, y los genes relacionados Klf1 y Klf5 también lo hicieron, aunque con una eficacia reducida. Véase, Nakagawa, et al., Nature Biotechnology 26: 101-106 (2007)) En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Klf que se produce de manera natural, tales como los enumerados anteriormente o tales como los enumerados en el número de acceso Genbank CAX16088 (Klf4 de ratón) o CAX14962 (Klf4 humano). Los polipéptidos Klf (p.ej., Klf1, Klf4 y Klf5) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se utilizará la misma especie de proteína con las especies de células que se manipulan. En la medida en que se describe en la presente memoria, un polipéptido Klf se puede reemplazar por un polipéptido receptor beta relacionado con estrógenos (Essrb). Por lo tanto, se pretende que para cada realización de polipéptido Klf descrita en la presente memoria, se describa igualmente una realización correspondiente que utiliza Essrb en lugar de un polipéptido Klf4.

Un "polipéptido Myc" se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de la familia Myc (Véase, por ejemplo, Adhikary, S. y Eilers, M. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 635-645 (2005)), o variantes de los mismos que mantienen actividad del factor de transcripción similar (dentro de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de actividad) en comparación con el miembro de la familia natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro de la familia que se produce de forma natural, y pueden comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Los polipéptidos Myc ilustrativos incluyen, p.ej., c-Myc, N-Myc y L-Myc. En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Myc de origen natural, tales como los enumerados anteriormente o tales como los enumerados en el número de acceso Genbank CAA25015 (Myc humano). Los polipéptidos Myc (p.ej., c-Myc) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se utilizará la misma especie de proteína con las especies de células que se manipulan.

Un "polipéptido Sox" se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de los factores de transcripción HMG-box (Sox) relacionados con SRY, caracterizados por la presencia del dominio del grupo de alta movilidad (HMG) o variantes de los mismos que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de actividad) en comparación con el miembro de familia natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN del miembro de la familia de origen natural, y puede comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Véase, p.ej., Dang, D.T., et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 32: 1103-1121 (2000). Los polipéptidos Sox ilustrativos incluyen, p.ej., Sox1, Sox-2, Sox3, Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, Sox8, Sox9, Sox10, Sox11, Sox12, Sox13, Sox14, Sox15, Sox17, Sox18, Sox-21 y Sox30. Se ha demostrado que Sox1 produce células iPS con una eficacia similar a Sox2, y también se ha demostrado que los genes Sox3, Sox15 y Sox18 generan células iPS, aunque con algo menos de eficacia que Sox2. Véase, Nakagawa, et al., Nature Biotechnology 26: 101-106 (2007). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Sox de origen natural tales como los enumerados anteriormente o tales como los enumerados en el número de acceso Genbank CAA83435 (Sox2 humano). Los polipéptidos Sox (p.ej., Sox1, Sox2, Sox3, Sox15 o Sox18) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se utilizará la misma especie de proteína con las especies de células que se manipulan.

Un polinucleótido "recombinante" es un polinucleótido que no está en su estado nativo, p.ej., el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la naturaleza, o el polinucleótido se encuentra en un contexto distinto al que se encuentra naturalmente, p.ej., separado de las secuencias de nucleótidos con las que normalmente se encuentra en proximidad en la naturaleza, o secuencias de nucleótidos adyacentes (o contiguas) a las que normalmente no se encuentra próximo. Por ejemplo, la secuencia en cuestión se puede clonar en un vector,

o se puede recombinar de otro modo con uno o más ácidos nucleicos adicionales.

"Cassette de expresión" se refiere a un polinucleótido que comprende un promotor u otra secuencia reguladora unida operablemente a una secuencia que codifica una proteína.

5 Los términos "promotor" y "secuencia de control de expresión" se utilizan en la presente memoria para referirse a una matriz de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Según se utiliza en la presente memoria, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que se pueden localizar tanto como a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen promotores constitutivos e inducibles. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está activo bajo la regulación ambiental o de desarrollo. El término "unido operablemente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión al factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

20 Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", según se utilizan en la presente memoria, son aquellos que se originan a partir de una fuente extraña a la célula anfitriona particular, o, si procede de la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. Por lo tanto, un casete de expresión heterólogo en una célula es un casete de expresión que no es endógeno a la célula anfitriona particular, por ejemplo uniéndose a secuencias de nucleótidos de un vector de expresión en lugar de ADN cromosómico, estando conectado a un promotor heterólogo, estando conectado a un gen informador, etc.

25 Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y a sus polímeros en forma de hebra sencilla o de doble hebra. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a la nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

30 A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta también abarca variantes modificadas conservativamente de la misma (p.ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605 - 2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Celda. Sondas 8: 91-98 (1994)).

35 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

40 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que más tarde se modifican. p.ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p.ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p.ej., norleucina) o cadenas principales de péptidos modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína.

55 "Variantes modificadas conservativamente" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias concretas de ácidos nucleicos, las variantes modificadas conservativamente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales

5 variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

10 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, agrega o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes conservativamente modificadas son además de, y no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 15 1) Alanina (A), Glicina (G);
 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
 3) Asparragina (N), Glutamina (Q);
 4) Arginina (R), Lisina (K);
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
 20 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
 7) Serina (S), Treonina (T); y
 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

25 "Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de la expresión o de la actividad se utilizan para hacer referencia a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* para la expresión o actividad de una proteína diana descrita, p.ej., ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, p.ej., inhiben la expresión o se unen a, bloquean total o parcialmente la estimulación o la actividad del inhibidor de la proteasa, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan negativamente la actividad de la proteína diana descrita, p.ej., los antagonistas. Los activadores son agentes que, p.ej., inducen o activan la expresión de una proteína diana descrita o se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, mejoran la activación o la actividad inhibitora de la proteasa, sensibilizan o regulan positivamente la actividad de la proteína diana descrita (o polinucleótido codificante), p.ej., agonistas. Los moduladores incluyen ligandos, antagonistas y agonistas naturales y sintéticos (p.ej., pequeñas moléculas químicas, anticuerpos y similares que funcionan como agonistas o antagonistas). Tales ensayos para inhibidores y activadores incluyen, p.ej., aplicar los supuestos compuestos moduladores a las células que expresan la proteína diana descrita y después determinar los efectos funcionales sobre la actividad de la proteína diana descrita, como se describió anteriormente. Las muestras o ensayos que comprenden la proteína diana descrita que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el alcance del efecto. Las muestras de control (no tratadas con moduladores) tienen asignado un valor de actividad relativo de 100%. La inhibición de una proteína diana descrita se logra cuando el valor de actividad relativo al control es aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25, 10%, 5% o 1%. La activación de la proteína diana descrita se logra cuando el valor de actividad relativo al control es de 110%, opcionalmente de 150%, opcionalmente de 200, 300%, 400%, 500% o 1000-3000% o más alto.

Breve descripción de los dibujos

45 **Figura 1:** Desarrollo de condiciones robustas para la reprogramación directa de fibroblastos a un destino cardíaco maduro. (A) Tinción X-gal de colonias Nebulette-LacZ⁺ que se originan siete días después de la transducción de tres factores. (B) Un esbozo de las condiciones finales de reprogramación cardíaca directa, indicando el inicio de la contracción espontánea. (C, D) Inmuntinción de marcadores de linaje cardíaco de fase media y tardía los días 11-15 y 18-21, respectivamente. Las barras de escala en (A), (C) y (D) son 100 μm.
 50

Figura 2: Evaluación de la eficacia y el éxito de la reprogramación por medio de la incidencia de los latidos y la expresión de marcadores. (A, B) Cambios en el número y el porcentaje de colonias en contracción, respectivamente, tras el tratamiento de cultivo con BMP4 solo o combinado con el inhibidor de JAK J11. (C) Imagen completa de pocillos (formato de placa de 96 pocillos) que representa la expresión relativa de cTnT y

Nanog el día 18. (D) Cuentas FACS de células positivas para los marcadores indicados en tres momentos diferentes. La barra de escala en (C) es de 900 μm .

Figura 3: Flujo de calcio y caracterización electrofisiológica de cardiomiocitos en contracción. (A) Tránsitos de calcio registrados en colonias que se contraen espontáneamente, antes y después del tratamiento con isoproterenol (Iso) y carbacol (CCh) a las concentraciones indicadas. Cuantificación del efecto del tratamiento sobre la frecuencia del tránsito (B) y la tasa de decaimiento (C). (D) Potenciales de acción espontánea registrados a partir de un cardiomiocito individual a 20-22°C. La forma de onda de un potencial de acción única se muestra en el recuadro inferior utilizando una escala de tiempo ampliada. Las líneas discontinuas indican el potencial en reposo (-62 mV) y 0mV, respectivamente. Los números de las colonias en a y b corresponden a la incidencia por 100.000 MEF cultivados en placa y se registraron el día 18; las barras de error indican e.t.m, n = 6. Las demarcaciones ** y *** indican valores de $p > 0,01$ y $p > 0,001$, respectivamente. (E) Inmunotinción de células que se contraen individualmente aisladas de una gran colonia que proviene de fibroblastos tratados con condiciones de reprogramación cardíaca.

Figura 4: El desarrollo de pluripotencia es perjudicial para la cardiogénesis. (A) Análisis de ChIP que examinan modificaciones epigenéticas en cuatro loci relevantes durante la reprogramación, como lo indican los cambios en los niveles de trimetilación de K4 y K27 de la histona H3. CorAT denota cardiomiocitos puros disponibles comercialmente. (B) Efecto de las condiciones que promueven la generación de iPSC en la reprogramación cardíaca. Representación esquemática de las modificaciones de las condiciones (izquierda) con las correspondientes eficacias relativas (derecha). (C) Prueba del protocolo de los autores de la presente invención (y partes del mismo, indicado por flechas de color gris) en mESC para determinar los efectos cardiogénicos potenciales en células pluripotentes. (D) Efectos diferenciales de la expresión transgénica prolongada sobre el latido frente al número total de colonias.

Figura 5: La reprogramación cardíaca directa representa un proceso paralelo que ocurre en ausencia de generación de iPSC. Análisis del curso temporal de la expresión del marcador del linaje cardíaco (A) y de pluripotencia (B) mediante RT-PCR cuantitativa. (C) Imágenes de contraste de fase y canal FITC que representan la formación y maduración de colonias cardíacas en los MEF informadores de Nanog-GFP. La contracción espontánea se detectó por primera vez el día 12 en la porción rodeada de la colonia. Se proporciona una activación temprana robusta del marcador Nanog-GFP utilizando métodos de reprogramación convencionales como control positivo. Las barras de error en (A) y (B) indican una desviación típica, n = 3. Las barras de escala en (C) son 100 μm .

Figura 6: Un modelo para la reprogramación directa a destinos alternativos. Un breve estallido de expresión anormalmente alta del factor de reprogramación conduce a la formación de varios intermedios altamente transitorios y epigenéticamente inestables (es decir, intermedios menos restringidos, más pluripotentes). Estas células después se "relajan" espontáneamente a estados más estables. Debido a la naturaleza muy compleja de la desdiferenciación completa, la generación de iPSC no es un resultado probable de este proceso, y requiere la expresión anormalmente alta continuada de factores de pluripotencia exógenos. Por el contrario, un cambio directo a progenitores de linaje multipotente - o incluso células diferenciadas terminalmente- representa el camino de menor resistencia, especialmente en condiciones de cultivo que (a) permiten y/o promueven su génesis y proliferación y (b) inhiben simultáneamente el establecimiento de la pluripotencia (Inhibición de JAK/STAT).

Figura 7: La transdiferenciación por expresión transitoria de los cuatro factores de reprogramación convencionales genera células madre/progenitoras neurales funcionales. (A) Esquema para la transdiferenciación de células MEF secundarias inducibles por Dox a células madre/progenitoras neurales (NPC). La duración del tratamiento con dox (4 $\mu\text{g/ml}$) se realiza durante el número indicado de días. Se añadieron diferentes medios secuencialmente como se describe en Métodos. (B) Inmunotinción de Pax6 el día 13 de colonias que surgen de las duraciones indicadas del tratamiento con dox. Se utilizaron 8 $\mu\text{g/ml}$ de dox para el tratamiento de tres días. (C) Número de colonias que expresan PLZF generadas con diferentes duraciones de tratamiento con dox, según se analizó el día 13. (D) Inmunotinción de colonias en el día 13 con diversos marcadores neurales o neuronales. (E) Inmunotinción de células diferenciadas espontáneamente de colonias aisladas el día 13 con varios marcadores neuronales o gliales maduros. Todas las barras de escala representan 100 μm .

Figura 8: La reprogramación directa es un método altamente eficaz de obtención de células madre/progenitoras neuronales puras. (A) Visión de conjunto experimental y representación de bocetos de los resultados de los paneles B, D y F. Las células después de nueve días de diferenciación de iPSC, o después de 13 días de transdiferenciación, muestran los perfiles de expresión de marcador indicados. (B) Inmunotinción el día 9 de células diferenciadas a partir de iPSC, o NPC transdiferenciadas el día 13, con anticuerpos contra los marcadores indicados. Pax6 y Sox1 demarcan el neuroectodermo temprano. Sox17 es indicativo de endodermo. La expresión de T es del mesodermo temprano. Todas las barras de escala representan 100 μm . (C-F) Análisis qRT-PCR de la expresión de los marcadores indicados en células cosechadas en múltiples puntos temporales durante el proceso de reprogramación directa (C, D) y diferenciación a partir de iPSC (E, F). Los genes de pluripotencia (C, E) y los genes específicos del linaje (D,

F) se muestran en gráficos separados. Todos los valores son relativos a la expresión en iPSC.

Figura 9: La elección del destino se dicta temprano durante el proceso de transdiferenciación por diferentes señales ambientales. (A) Esquema de experimentos que implican una exposición diferencial al medio que contiene LIF (RepM-Pluri) desde el día 4 en adelante durante el número indicado de días. El tratamiento con Dox fue durante cinco días, comenzando el día 0 (D0). (B) Número de colonias positivas para PLZF expresado como porcentaje del total de cada muestra indicada el día 9. (C, D) Análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de los genes marcadores indicados en cada muestra (cosechada el día 9). Todos los valores son relativos a la expresión en iPSC. Inmunotinción de Pax6 (E) y número total de colonias (F) de los TTF transdiferenciados en presencia o ausencia de inhibidor de JAK.

Figura 10: Un modelo para la reprogramación directa de MEF a células madre/progenitoras neurales. Al agregar medio neural a cuatro células intermedias inducidas por factores que comprenden varios estados epigenéticos, se puede lograr un cambio de destino a células madre/progenitoras neurales (NPC). Alternativamente, se pueden generar iPSC por medio de la expresión prolongada de los cuatro factores con la incubación concomitante en medio ESC. Las células que pertenecen a otros linajes también podrían aislarse, dependiendo del tipo de medio utilizado.

Figura 11: Análisis de citometría de flujo de las NSC transdiferenciadas. (A) Gráficos de FACS de dispersión directa y lateral de las muestras del día 7 y del día 12. En la muestra del día 12, las células se dividieron en dos subconjuntos basados en una distribución grosera. El subconjunto 2 no es tan prominente el día 7 como el día 12. Los subconjuntos 1 y 2 muy probablemente representan las poblaciones de fibroblastos inalterados y células transdiferenciadas formadoras de colonias, respectivamente. (B) Histogramas de células del día 12 teñidas con anticuerpos anti-SSEA1, Prominina-1 y A2B5. Se analizaron por separado las células acotadas en subpoblaciones ("gated") diferencialmente (total, subconjunto 1 o subconjunto 2). (C) Histogramas de células del día 7 y día 12 teñidas con anticuerpo PSA-NCAM.

Figura 12: Análisis citométrico de flujo de células temporalmente expuestas a LIF. (A) Esquema de experimentos con exposición diferencial al medio que contiene LIF (RepM-Pluri) desde el día 3 en adelante durante 0, 2, 4 y 8 días, respectivamente. El tratamiento con Dox fue durante cinco días, comenzando el día 0 (D0). (B) Porcentaje de células que expresan SSEA1 los días 9 y 11. (C) Histogramas de células que expresan SSEA1, según se analizaron mediante citometría de flujo.

Figura 13: Cuantificación de la expresión génica secuencial durante la transdiferenciación. La configuración experimental es la misma que en la Fig. 9A, con muestras cosechadas en los puntos temporales indicados. Los genes de pluripotencia (A) y los genes marcadores específicos de linaje (B) se muestran en gráficos separados. Todos los valores son relativos a los niveles de expresión en iPSC. El tratamiento con Dox fue durante cinco días, comenzando el día 0.

Figura 14: Reprogramación directa de fibroblastos humanos a endodermo definitivo (iDE) por medio de Oct4 y una condición inductora de endodermo única. (A) muestra iDE positivas para SOX17 y FOXA2, marcadores típicos para endodermo definitivo. (B) El análisis de secuenciación con bisulfato muestra que los promotores SOX17 y FOXA2 están ampliamente desmetilados. (C) Análisis de expresión de genes de pluripotencia y genes marcadores de endodermo definitivos en iDE.

Figura 15: Reprogramación directa de fibroblastos humanos a células de linaje pancreático, tales como células pancreáticas de tipo β . (A) Visión de conjunto experimental y representación de bocetos de los resultados. (B) Inmunotinción de iDE con anticuerpos contra los marcadores indicados. (C) Análisis de PCR en tiempo real de células β pancreáticas inducidas por iDE. Se analizó la expresión de genes marcadores islet específicos, que incluían PDX1, NKX6.1, MAFA, GLUT2, GLUCOQUINASA e INSULINA. (D) Análisis del péptido C liberado desde células pancreáticas de tipo β derivadas de iDE después de la estimulación con glucosa in vitro.

Figura 16: Transdiferenciación de fibroblastos de ratón secundarios inducibles por Dox a células pancreáticas de tipo β . (A) Visión de conjunto esquemática del protocolo de inducción. (B) Inmunotinción de las células pancreáticas de tipo β inducidas con anticuerpo específico para el péptido C.

Figura 17: Vector de Direccionamiento de GFP a Nkx2.5.

Figura 18: Los Cardiomiocitos Nkx2.5-GFP expresan bajos niveles de GFP.

Figura 19: Niveles de expresión de transcrito en cardiomiocitos.

Figura 20: Células MLC-2v-GFP expresan GFP en parches palpitantes.

Figura 21: Un porcentaje permisivo de células MLC-2v-GFP se diferencian a cardiomiocitos.

Figura 22: La tecnología Pintool suministra nanolitros de compuesto.

Figura 23: Un posible candidato del escrutinio MLC-2v muestra una fluorescencia fuerte en el canal GFP.

Figura 24: Esquema para la diferenciación por etapas de los cardiomiocitos.

Figura 25: Se requiere suficiente tamaño de colonia de ESC para la supervivencia en CDM.

Figura 26: Estructura molecular del inhibidor de GSK-3, 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO).

5 **Figura 27:** BIO induce la expresión de α MHC y GATA-4.

Figura 28: BMP-4 induce la expresión de α MHC y GATA-4.

Figura 29: Análisis RT-PCR del curso temporal de la diferenciación.

Figura 30: Las células en diferenciación expresan marcadores intermedios de diferenciación cardíaca.

Figura 31: Las células que palpitantes expresan marcadores de cardiomiocitos maduros.

10 **Figura 32:** Las células palpitantes expresan marcadores de cardiomiocitos maduros.

Figura 33: Estructura Molecular de BayK 8644.

Figura 34: Porcentaje de colonias que palpitantes.

Figura 35: Análisis FACS de marcadores mesodérmicos. Las células se trataron con la molécula pequeña BayK 8644 (A), isoprotenolol (B), dibutilil AMPc (C) o propanolol (D) y se midió la expresión de Brachyury.

15 **Figura 36:** Análisis QRT-pCR de marcadores. Se midió la multiplicidad de expresión normalizada de los marcadores para las células tratadas con BayK 8644, dibutilil AMPc, isoprotenolol o propanolol.

Figura 37: Estructura molecular del inhibidor de TGF-beta, A83-01.

Figura 38: Porcentaje de colonias palpitantes observadas después del tratamiento los días 5-7.

Figura 39: QRT-PCR después de los tratamientos los días 5-7.

20 **Descripción detallada**

I. Introducción

Se proporcionan métodos para transdiferenciar eficazmente una célula desde un primer destino celular a un segundo destino. Por ejemplo, una célula primero se diferencia a un primer destino celular. Durante la transdiferenciación, la célula cambia de un primer destino celular a un destino celular diferente. En algunas realizaciones, la célula se transdiferencia de un tipo de célula (p.ej., células de ectodermo, mesodermo o endodermo) a un tipo de célula diferente. En algunas realizaciones, una célula de ectodermo se transdiferencia a una célula de endodermo. En algunas realizaciones, una célula de ectodermo se transdiferencia a una célula de mesodermo. En algunas realizaciones, una célula de endodermo se transdiferencia a una célula de ectodermo. En algunas realizaciones, una célula de endodermo se transdiferencia a una célula de mesodermo. En algunas realizaciones, una célula mesodermo se transdiferencia a una célula endodermo. En algunas realizaciones, una célula mesodermo se transdiferencia a una célula de ectodermo. En algunas realizaciones, el método de transdiferenciación comprende al menos dos etapas:

35 (1) presentación de una célula animal que tiene un primer destino celular a condiciones para la generación de una célula (es decir, una célula menos diferenciada) que es capaz de diferenciarse a un segundo destino celular; y

(2) presentación de la célula menos diferenciada a condiciones para diferenciar la célula a una célula que tiene el segundo destino celular.

Por ejemplo, los autores de la presente invención han descubierto que es posible tratar una célula diferenciada (es decir, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) o células precursoras neurales) en cultivo para generar una célula menos diferenciada que puede diferenciarse posteriormente a cualquiera de las células cardíacas (p.ej., cardiomiocitos), células neuronales (p.ej., cuando los MEF se utilizan inicialmente) o células pancreáticas. Por lo tanto, se cree que el método es generalmente aplicable para la transdiferenciación de un tipo de célula a otro sin generar un intermedio pluripotente, o al menos sin generar una célula pluripotente inducida (iPS). Por ejemplo, los autores de la presente invención han descubierto que el método de transdiferenciación no requiere la inclusión de LIF, que típicamente se requiere para el mantenimiento de células iPS. Además, las células transitorias menos diferenciadas generadas expresan poco o nada de Nanog y por lo tanto se pueden distinguir de las células iPS por una falta sustancial de expresión de Nanog. En la medida en que se observó la expresión de Nanog u Oct4 en colonias palpitantes cuando se utilizaron condiciones para la generación de células cardiovasculares, solo las

colonias muy grandes contenían a veces tanto un parche que palpitaba como una expresión muy débil de Nanog u Oct4, pero estas áreas nunca se solapaban. Finalmente, el momento de la generación de las nuevas células (p.ej., los cardiomiocitos) medido desde el inicio de la reprogramación es considerablemente más rápido de lo que se esperaría si las células se generaran a través de células madre pluripotentes inducidas intermedias.

5 II. Generación de células indiferenciadas a partir de células que tienen un primer destino celular comprometido

Los autores de la presente invención han descubierto que la aplicación de condiciones de reprogramación de iPS parciales, pero no completas, a células diferenciadas puede dar como resultado células que son capaces de diferenciarse a un segundo destino celular, es decir, a un linaje celular diferente del primer destino celular. Como se explica a continuación, los autores de la presente invención han encontrado que la inducción de tres (Oct4, Klf4, Sox2) o cuatro (Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc) "factores Yamanaka" suministrados por retrovirus en suero pero en ausencia de LIF (es decir, un factor generalmente necesario para la producción significativa de células iPS) fue suficiente para generar células que podrían ser inducidas posteriormente y directamente a otros linajes. Aunque se pueden utilizar las condiciones específicas utilizadas por los autores de la presente invención, se cree que otras condiciones de reprogramación de iPS también se pueden modificar de manera que sustancialmente no se generen células iPS y, sin embargo, se produzcan células susceptibles de diferenciación alterada. Hasta la fecha, se ha establecido una gran cantidad de métodos y protocolos diferentes para inducir células de mamífero no pluripotentes a células iPS. Las células iPS son similares a las ESC en cuanto a morfología, proliferación y pluripotencia, a juzgar por la formación de teratomas y la contribución a las quimeras. Se cree que los protocolos de reprogramación que se pueden modificar como se describe en la presente memoria incluyen aquellos que implican la introducción de un factor de transcripción de reprogramación de polipéptidos Oct 4 y opcionalmente uno o más factores de transcripción de reprogramación seleccionados entre un polipéptido Oct (que incluye pero no se limita a Oct 3/4), un polipéptido Sox (que incluye pero no se limita a Sox2), un polipéptido Klf (que incluye pero no se limita a Klf4) y/o un polipéptido Myc (que incluye pero no se limita a c-Myc). Los factores de reprogramación se pueden introducir en las células, por ejemplo, mediante la expresión de un casete de expresión recombinante que se ha introducido en la célula diana, o mediante la incubación de las células en presencia de polipéptidos del factor de transcripción de reprogramación exógena de modo que los polipéptidos entren en la célula.

Los estudios han demostrado que la transducción retroviral de fibroblastos de ratón con cuatro factores de transcripción altamente expresados en ESC (Oct-3/4, Sox2, KLF4 y c-Myc) genera células madre pluripotentes inducidas (iPS) cuando se combinan con LIF. Véanse, Takahashi, K. y Yamanaka, S. *Cell* 126, 663-676 (2006); Okita, K., Ichisaka, T. y Yamanaka, S. *Nature* 448, 313-317 (2007); Wernig, M. et al. *Nature* 448, 318-324 (2007); Maherali, N. et al., *Cell Stem Cell* 1, 55-70 (2007); Meissner, A., Wernig, M. y Jaenisch, R. *Nature Biotechnol.* 25, 1177-1181 (2007); Takahashi, K. et al., *Cell* 131, 861-872 (2007); Yu, J. et al., *Science* 318, 1917-1920 (2007); Nakagawa, M. et al., *Nature Biotechnol.* 26, 101-106 (2007); Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. y Jaenisch, R. *Cell Stem Cell.* 2, 10-12 (2008). Tales métodos se pueden alterar para que carezcan de LIF o no generen de otro modo células iPS (que incluyen, pero no se limitan a los métodos específicos para bloquear la generación de células iPS descritos en la presente memoria) y aún puedan ser capaces de rediferenciar las células a un segundo destino celular. Como una alternativa a la omisión de LIF, o combinado con ella, para reducir la posible contaminación de células pluripotentes, se pueden incluir algunos compuestos químicos que inhiben el crecimiento de células pluripotentes en los medios de cultivo celular o se pueden poner en contacto de otro modo con las células diana. Los compuestos químicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de PI3K, inhibidores de CDK2, inhibidores de Wnt o una combinación de los mismos.

En realizaciones que implican la expresión en la célula, o el contacto con la célula, de uno o más factores de transcripción de reprogramación, los métodos pueden implicar la limitación de la expresión o exposición de las células a los factores de transcripción de reprogramación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la expresión de los factores se induce (p.ej., por medio de un promotor inducible) durante un tiempo limitado que es insuficiente para producir células iPS. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los factores de transcripción se inducen entre 1-9, 2-8, 3-6 días. La expresión se puede desactivar posteriormente al cambiar el medio o las condiciones de las células para eliminar el inductor. De forma similar, en realizaciones en las que las células están expuestas a factores de transcripción de proteínas (comentados más adelante), las células se ponen en contacto con la proteína durante un tiempo limitado, reduciendo o evitando de este modo el desarrollo de células iPS.

Esta invención emplea técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., Eds., 1994)). En algunas realizaciones, los casetes de expresión para la expresión de uno o más factores de transcripción de reprogramación se introducen en una célula.

En algunas realizaciones, la especie de célula y proteína que se va a expresar es la misma. Por ejemplo, si se utiliza una célula de ratón, se introduce en la célula un ortólogo de ratón o una variante de proteína activa de la misma. Si se utiliza una célula humana, se introduce en la célula una proteína ortóloga humana o una variante activa de la misma. Alternativamente, en algunas realizaciones, las especies de células y proteínas no se corresponden.

Se apreciará que cuando se van a expresar dos o más proteínas en una célula (p.ej., dos o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Myc), se pueden utilizar uno o múltiples casetes de expresión. Por ejemplo, cuando un casete de expresión expresa múltiples polipéptidos, se puede utilizar un casete de expresión policistrónico.

- 5 Se puede utilizar cualquier tipo de vector para introducir un casete de expresión de la invención en una célula. Los vectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y vectores virales. Los vectores virales ilustrativos incluyen, p.ej., vectores adenovirales, vectores AAV y vectores retrovirales (p.ej., lentivirales).

Se cree que los métodos adecuados para el suministro de ácido nucleico para la transformación de una célula, un tejido o un organismo para su uso con la presente invención incluyen virtualmente cualquier método mediante el cual un ácido nucleico (p.ej., ADN) se puede introducir en una célula, un tejido o un organismo, como se describe en la presente memoria o como conocerá un experto en la técnica (p.ej., Stadtfeld y Hochedlinger, *Nature Methods* 6(5):329-330 (2009); Yusa et al., *Nat. Methods* 6:363-369 (2009); Woltjen et al., *Nature* 458, 766-770 (9 de abril de 2009)). Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, suministro directo de ADN por ejemplo por medio de transfección *ex vivo* (Wilson et al., *Science*, 244: 1344 - 1346, 1989, Nabel y Baltimore, *Nature* 326:711-713, 1987), opcionalmente con Fugene6 (Roche) o Lipofectamina (Invitrogen), mediante inyección (Patentes de Estados Unidos Núm. 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859, incluyendo la microinyección (Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985; Patente de Estados Unidos Núm. 5.789.215; mediante electroporación (Patente de Estados Unidos Núm. 5.384.253; Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984); por medio de precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52: 456-467, 1973; Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990); utilizando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985); por medio de carga sónica directa (Fechheimer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987); por medio de transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987; Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980; Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989; Kato et al., *J Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987); y cualquier combinación de tales métodos.

Para abordar los problemas de seguridad que surgen de genomas de células diana que albergan secuencias exógenas integradas, se han desarrollado adicionalmente varios protocolos genéticos modificados y se pueden modificar de acuerdo con la presente invención. Estos protocolos producen células iPS con riesgos potencialmente reducidos, e incluyen adenovirus no integrantes para el suministro de genes de reprogramación (Stadtfeld, M., et al., (2008) *Science* 322, 945-949), transfección transitoria de plásmidos de reprogramación (Okita, K., et al., (2008) *Science* 322, 949-953), sistemas de transposición piggyBac (Woltjen, K., et al., (2009). *Nature* 458, 766-770, Yusa et al. (2009) *Nat. Methods* 6: 363-369, Kaji, K., et al., (2009) *Nature* 458, 771-775), Virus escindibles por Cre (Soldner, F., et al. (2009) *Cell* 136, 964-977), y el sistema de expresión episomal basado en oriP/EBNA1 (Yu, J., et al., (2009) *Science* DOI: 10.1126). Tales métodos se pueden modificar, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la reprogramación puede implicar el cultivo de células diana en presencia de una o más proteínas en condiciones que permiten la introducción de las proteínas en la célula. Véase, p. ej., Zhou H et al., *Cell Stem Cell*. 8 de mayo de 2009; 4(5):381-4; documento WO/2009/117439. Se puede introducir un polipéptido exógeno (es decir, una proteína proporcionada desde el exterior de la célula y/o que no es producida por la célula) a la célula mediante una serie de métodos diferentes que no implican la introducción de un polinucleótido que codifica el polipéptido. En algunas realizaciones, las proteínas exógenas comprenden el polipéptido del factor de transcripción de interés unido (p.ej., unido en forma de proteína de fusión o unido de forma covalente o no covalente) a un polipéptido que mejora la capacidad del factor de transcripción para entrar en la célula (y en algunas realizaciones en el núcleo celular).

Los ejemplos de secuencias polipeptídicas que mejoran el transporte a través de las membranas incluyen, pero no se limitan a, proteína de transcripción de la homeoproteína *antennapedia* de *Drosophila* (AntHD) (Joliot et al., *New Biol.* 3:1121-34, 1991; Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1864-8, 1991; Le Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9120-4, 1993), la proteína estructural VP22 del virus del herpes simple (Elliott y O'Hare, *Cell* 88:223-33, 1997); la proteína TAT del activador transcripcional del VIH-1 (Green y Loewenstein, *Cell* 55:1179-1188, 1988; Frankel y Pabo, *Cell* 55:1 289-1193, 1988); la secuencia de señal de FGF de Kaposi (kFGF); dominio de transducción de proteínas 4 (PTD4); Penetratina, M918, Transportan-10; una secuencia de localización nuclear, un péptido PEP-I; un péptido anfipático (p.ej., un péptido MPG); transportadores que mejoran el suministro tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.730.293 (que incluyen, pero no se limitan a, una secuencia peptídica que comprende al menos 5-25 o más argininas contiguas o 5-25 o más argininas en un conjunto contiguo de 30, 40 o 50 aminoácidos; que incluyen, pero no se limitan a un péptido que tiene suficientes p.ej., al menos 5, radicales guanidino o amidino); y el péptido Penetratin™ 1 comercialmente disponible, y Diatos Peptide Vectors ("DPV") de la plataforma Vectocel® disponibles de Daitos S.A. de París, Francia. Véanse también los documentos, WO/2005/084158 y WO/2007/123667 y transportadores adicionales descritos en ellos. Estas proteínas no solo pueden pasar a través de la membrana plasmática, sino que el anclaje de otras proteínas, tales como los factores de transcripción descritos en la presente memoria, es suficiente para estimular la captación celular de estos complejos. Se han descrito previamente varios polipéptidos capaces de mediar la introducción de moléculas asociadas en una

célula y se pueden adaptar a la presente invención. Véase, p.ej., Langel (2002) Cell Penetrating Peptides CRC Press, Serie de Farmacología y Toxicología.

Las secuencias polipeptídicas ilustrativas que mejoran el transporte a través de las membranas incluyen: **VP22**: G S P P T A P T R S K T P A Q G L A R K L H F S T A P P N P D A P R P R V A G F N K R V F R F S P Q T A R T A T R R I; **kFGF**: A G S A G A A V A L L A P A L A L A L A P A L L A P A L A L A P A L L A P A L L A P A G A L **PTD4**: A G S G G A A R A A R A R A A R A A R A A R A G A A G A F A A R **PENETRATINA**: R Q I K I W F Q G R R M K W K K; **TAT**: Y G R K K R R Q R R R; **M918**: M V T V L F R R L R I R R A C G P P R V R V; **TRANSPORTAN10**: A G Y L L G K I G L K A L A A L A K K I L.

En algunas realizaciones, el polipéptido que potencia el transporte a través de las membranas es una secuencia peptídica que comprende al menos 5 o más argininas contiguas o no contiguas (p.ej., un péptido con 8 argininas). En algunas realizaciones, el polipéptido que potencia el transporte a través de las membranas es una secuencia peptídica que comprende al menos 7 o más argininas contiguas o no contiguas. Por ejemplo, el polipéptido que mejora el transporte a través de las membranas es una secuencia peptídica que comprende 11 argininas contiguas, p.ej., ESGGGGSPGRRRRRRRRRRR. Como se indicó anteriormente, no es necesario que las argininas en la secuencia de potenciación del transporte sean todas contiguas. En algunas realizaciones, la poliarginina (p.ej., la región contigua o no contigua) tiene al menos 5, 8, 10, 12, 15, 20 o más aminoácidos de longitud y tiene al menos, p.ej., 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de argininas.

Se puede introducir un polipéptido exógeno en las células mediante métodos tradicionales tales como lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, bombardeo de partículas y/o microinyección, o se puede introducir en las células mediante un agente de suministro de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido exógeno se puede introducir en las células mediante lípidos anclados covalentemente o no covalentemente, p.ej., mediante un grupo miristoilo unido covalentemente. Los lípidos utilizados para la lipofección se excluyen opcionalmente de los módulos de suministro celular en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, los polipéptidos del factor de transcripción descritos en la presente memoria se introducen exógenamente como parte de un liposoma, o cóctel de lípidos (tal como Fugene®6 y Lipofectamine™ comercialmente disponibles). En otra alternativa, las proteínas del factor de transcripción se pueden microinyectar o introducir de otro modo directamente en la célula diana. En algunas realizaciones, los polipéptidos del factor de transcripción se suministran a las células utilizando reactivos de suministro de proteínas Profect, p.ej., Profect-PI y Profect-P2 (Targeting Systems, El Cajon, CA), o utilizando reactivos de transfección ProJect® (Pierce, Rockford IL, USA). En algunas realizaciones, los polipéptidos del factor de transcripción se suministran a las células utilizando un nanotubo de pared única (SWNT).

Como se comentó en los Ejemplos del documento WO/2009/117439, la incubación de células con los polipéptidos del factor de transcripción de la invención durante períodos prolongados puede ser tóxica para las células. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, las células de mamífero no pluripotentes se incuban intermitentemente con un polipéptido Oct4 y opcionalmente con uno o más de un polipéptido Oct (incluyendo, pero no limitado a Oct 3/4), un polipéptido Sox (incluyendo, pero no limitado a Sox2), un polipéptido Klf (incluyendo, pero no limitado a Klf4) y/o un polipéptido Myc (incluyendo, pero no limitado a c-Myc) con períodos intermedios de incubación de las células en ausencia de uno o más polipéptidos. En algunas realizaciones, el ciclo de incubación con y sin los polipéptidos se puede repetir durante 2, 3, 4, 5, 6 o más veces, pero no se realiza durante períodos de tiempo suficientemente prolongados (es decir, las incubaciones con y sin proteínas) para lograr el desarrollo de células pluripotentes.

Se puede poner en contacto una variedad de agentes (p.ej., inhibidor de HDAC, receptor de TGFβ/ inhibidor de ALK5, inhibidor de la vía MEK/ERK y/o inhibidor de la GTPasa Rho/ROCK, etc.) con células no pluripotentes antes, simultáneamente o después del suministro de factores de transcripción de programación (por ejemplo, suministrados a través de casete de expresión o en forma de proteínas). Las pequeñas moléculas ilustrativas que se pueden utilizar se describen, p.ej., en el documento WO/2009/117439. Por conveniencia, el día en que se suministran los factores de reprogramación se denomina "día 1". En algunas realizaciones, los inhibidores se ponen en contacto con las células en conjunto (es decir, como un "cóctel") alrededor de los días 3-7 y el contacto continúa durante 7-14 días. Alternativamente, en algunas realizaciones, el cóctel se pone en contacto con las células el día 0 (es decir, un día antes que los factores de preprogramación) y se incuban durante aproximadamente 14-30 días.

La célula en la que se introduce una proteína de interés puede ser una célula de mamífero. Las células pueden ser humanas o no humanas (p.ej., de primate, de rata, de ratón, de conejo, bovinas, de perro, de gato, de cerdo, etc.). La célula puede estar, p.ej., en cultivo o en un tejido, fluido, etc. y/o puede ser de, o estar en un organismo.

Opcionalmente, o además, las moléculas pequeñas pueden "complementar" o reemplazar lo que generalmente se entiende de otro modo como una expresión necesaria de una de estas proteínas para dar como resultado células pluripotentes. Al poner en contacto una célula con un agente que funcionalmente reemplaza uno de los factores de transcripción, es posible generar células pluripotentes con todos los factores de transcripción enumerados anteriormente, excepto el factor de transcripción reemplazado o complementado por el agente.

III. Limitación del desarrollo o crecimiento de células pluripotentes

Se proporcionan en la presente memoria métodos para transdiferenciar una célula animal de un primer destino celular no pluripotente a un segundo destino celular no pluripotente, p.ej., aumentando la cantidad de al menos un factor de transcripción de reprogramación en una célula animal que tiene el primer destino celular para generar una célula que se diferencia en respuesta a factores de diferenciación específicos del linaje. Se descubrió que los métodos proporcionados en la presente memoria no requieren la generación de una célula pluripotente intermedia. De hecho, ahora se ha descubierto que la limitación del desarrollo o crecimiento de células pluripotentes generalmente mejora la eficacia de la transdiferenciación, p.ej., desde un primer destino celular no pluripotente a un segundo destino celular no pluripotente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la presente invención comprenden la limitación del desarrollo o crecimiento de células pluripotentes.

El desarrollo o crecimiento de células pluripotentes se puede limitar de varias maneras. Por ejemplo, el protocolo de reprogramación convencional se puede modificar, p.ej., modificando los medios de reprogramación. Como se describió anteriormente, los medios de reprogramación se pueden modificar omitiendo los componentes que generalmente son necesarios para la producción significativa de células pluripotentes, p.ej., LIF. En algunas realizaciones, los medios de reprogramación se pueden modificar omitiendo los MEF alimentadores. Alternativamente, los medios de reprogramación se pueden modificar incluyendo componentes que son nocivos o perjudiciales para la producción de células pluripotentes, p.ej., FBS.

El desarrollo o crecimiento de células pluripotentes puede estar limitado por la expresión limitada de factores de transcripción. Como se detalla en los ejemplos en la presente memoria, se puede lograr una expresión limitada de los factores de transcripción colocando los factores de transcripción de reprogramación bajo el control de un promotor inducible (p.ej., un promotor inducible por doxiciclina). Por ejemplo, los factores de transcripción se pueden silenciar en ausencia de doxiciclina. La expresión limitada de los factores de transcripción se puede lograr por transfección transitoria de plásmidos de reprogramación u otros plásmidos de reprogramación no integrantes (véase, p.ej., Okita, K., et al., (2008) *Science* 322, 949-953). Del mismo modo, se puede eliminar la expresión de factores de transcripción exógenos, es decir, las células no se transfectan con ningún plásmido de reprogramación. Por ejemplo, los factores de transcripción se pueden introducir, p.ej., cultivando células diana en presencia de una o más proteínas en condiciones para permitir la introducción de las proteínas en la célula.

El desarrollo o crecimiento de células pluripotentes puede estar limitado por ciertos inhibidores que inhiben el crecimiento de células pluripotentes. Por ejemplo, se pueden utilizar ciertos inhibidores para inhibir selectivamente el crecimiento de células pluripotentes, pero no el crecimiento de células somáticas. Los inhibidores selectivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de JAK, inhibidores de PI3K, inhibidores de CDK2, inhibidores de CDK4 e inhibidores de la glucólisis. Estos inhibidores se pueden utilizar individualmente o combinados, para inhibir el crecimiento de células pluripotentes.

Inhibidores de JAK

Los inhibidores de la quinasa Janus (JAK) adecuados para su uso en la presente invención son bien conocidos en la técnica, véanse por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.452.005. Además, se han descrito compuestos de arilo bis monocíclicos, bicíclicos o heterocíclicos (Publicación PCT Núm. WO 92/20642), derivados de vinileno-azaindol (Publicación PCT Núm. WO 94/14808) y 1-ciclopropil-4-piridil-quinolonas (Patente de Estados Unidos Núm. 5.330.992) y el uso de estos agentes como inhibidores de tirosina quinasa. También se han descrito compuestos de estirilo (Patente de Estados Unidos Núm. 5.217.999), compuestos de piridilo sustituidos con estirilo (Patente de Estados Unidos Núm. 5.302.606), ciertos derivados de quinazolina (Solicitud EP publicada Núm. 0 566 266 A1), seleoindoles y seleniuros (Publicación PCT Núm. WO 94/03427), compuestos polihidroxilados tricíclicos (Publicación PCT Núm. WO 92/21660) como inhibidores de tirosina quinasa. Un ejemplo de inhibidor de JAK es 2-(1,1-dimetiletil)-9-fluoro-3,6-dihidro-7H-benz[h]-imidaz[4,5-f]isoquinolin-7-ona ("Ji1").

Inhibidores de PI3K

Las fosfoinosítido 3-quinasas (PI 3-quinasas o PI3Ks) son una familia de enzimas transductoras individuales intracelulares relacionadas capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol (PtdIns o PI). Estas enzimas también se conocen como fosfatidilinositol-3-quinasas. Basándose en la estructura primaria, la regulación y la especificidad del sustrato lipídico in vitro, la familia de la fosfoinositol-3-quinasa se puede dividir en tres clases diferentes: Clase I, Clase II y Clase III (véase Leever et al., (1999) *Current Op. Cell Biol.* 11:219).

Según se utiliza en la presente memoria, el término "inhibidor de PI3K" se refiere a un compuesto que inhibe al menos una actividad de una PI3K de Clase I, II o III en al menos uno de sus sustratos (p.ej., fosforilación de fosfatidilinositol para producir fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato (PI(3,4)P₂, sub.2) o fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PI(3,4,5) P. sub.3). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si un compuesto, tal como wortmanina o LY294002, es un inhibidor de PI3K. Un método específico para identificar tales compuestos o ligandos se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.858.753; 5.882.910; y 5.985.589, Jackson et al. (2005) *Nat. Med.* 11:507, Pomel et al. (2006) *J. Med. Chem.* 49:3857; Palanki et al. (2007)

J. Med. Chem. 50:4279).

En ciertas realizaciones, un inhibidor de PI3K inhibe la actividad de una PI3K de Clase I. Por ejemplo, un inhibidor de PI3K puede inhibir p110 α , p110 β , o p110 γ , o p110 Δ . En algunas realizaciones, un inhibidor de PI3K bloquea o reduce la actividad de p110 γ , o p110 Δ en comparación con p110 γ , o p110 Δ no tratados. En ciertas realizaciones, un inhibidor de PI3K inhibe la actividad de una PI3K de Clase II. Por ejemplo, un inhibidor de PI3K puede inhibir PI3K-C2 α , PI3K-C2 β o PI3K-C2 γ . En ciertas realizaciones, un inhibidor de PI3K inhibe la actividad de una PI3K de Clase III, Vps34.

En ciertas realizaciones, un inhibidor de PI3K es selectivo o específico para una isoforma de PI3K particular. Un inhibidor es "selectivo" o "específico" para una isoforma de PI3K particular si inhibe esa isoforma de PI3K particular más eficazmente que otras isoformas de PI3K. Por ejemplo, un inhibidor específico para una isoforma de PI3K particular puede tener un CI_{50} para la isoforma PI3K particular de a lo sumo aproximadamente 1/10 (p. ej., a lo sumo aproximadamente 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/80, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/800 o 1/1000) la CI_{50} para otras isoformas de PI3K. Por ejemplo, un inhibidor específico de p110 Δ puede tener un valor de CI_{50} para p110 Δ de a lo sumo aproximadamente 1/10 de la CI_{50} para otras isoformas de PI3K (p. ej., p110 α , p110 β o p110 γ).

En algunas realizaciones, un inhibidor de PI3K es específico para p110 α , p110 β , o p110 γ , o p110 Δ . En ciertas realizaciones, un inhibidor de PI3K inhibe dos o más clases o subclases de PI3K. En ciertas realizaciones, un inhibidor de PI3K es también un inhibidor de mTOR.

Los inhibidores de PI3K ilustrativos incluyen LY294002 (2-morfolin-4-il-8-fenilcromen-4-ona) y wortmanina. Tanto LY294002 como wortmanina son inhibidores amplios contra PI3K y también pueden inhibir mTOR. Los inhibidores de PI3K también incluyen derivados de wortmanina, tales como PX-866 (véase, Ihie et al., Mol Cancer Ther 3:763-72, 2004).

Los inhibidores específicos de p110 γ ilustrativos incluyen furan-2-ilmetilen tiazolidinodionas (AS-252424) (véase, Pomel et al., 2006, más arriba) y 3,3'-(2,4-diaminopteridina-6,7-diil)difenol (véase, Palanki et al., más arriba). Los inhibidores específicos de p110 Δ ilustrativos incluyen IC486068 e IC87114 (ICOS Corp., ahora Eli Lilly and Company) y CAL-101 y CAL-263 (Calistoga Pharmaceuticals). Otro inhibidor de PI3K con inhibición de p110 Δ y p110 β es CAL-120, un inhibidor de PI3K (Calistoga Pharmaceuticals). Otro inhibidor de PI3K ilustrativo es bismesilato de GDC-0941 (2-(1H-indazol-4-il)-6-(4-metanosulfonil-piperazin-1-ilmetil)-4-morfolin-4-il-tieno[3,2-d]-pirimidina, sal bimesilato), un inhibidor selectivo de p110 α y P110 Δ .

Los inhibidores adicionales de PI3K incluyen derivados de pirazol descritos en la Publicación PCT Núm. WO 2009/059030, derivados de amino triazol descritos en el documento WO 2009/068482, un compuesto de imidazotriazol descrito en el documento WO 2009/040552, compuestos de pirimidin-4-ona fusionados específicos para p110 Δ descritos en el documento WO 2009/064802, compuestos de morfolino-pirimidina que inhiben p110 α descritos en el documento WO 2009/066084, un derivado de 4-pirimidin-4-il-morfolina descrito en el documento WO 2009/042607, un compuesto de 4-morfolin-4-il-tienopirimidina descrito en el documento WO 2009/036082, un derivado de piridosulfonamida descrito en el documento WO 2009/055418, derivados de piridopirimidina que inhiben p110 α y/o p110 γ descritos en el documento WO 2009039140, derivados heterocíclicos que inhiben p110 α descritos en el documento WO 2009046448, furanopirimidinas y zolopirimidinas específicas para p110 Δ descritas en los documentos WO 2008/152394 y WO 2008/152390, compuestos de quinazolina específicos para p110 Δ descritos en el documento WO 2008/152387, derivados de purina sustituidos con pirimidina descritos en el documento WO 2009/045175, compuestos de tienopirimidina y pirazolopirimidina descritos en el documento WO 2009/052145, análogos de imidazolopirimidina, pirrolopirimidina y pirazolopirimidina descritos en el documento WO 2009/070524, imidazopiridazina sustituida descrita en el documento WO 2008/138834, derivados de tienopirimidino selectivos para p110 Δ descritos en el documento WO 2009/053715, derivados de purina selectivos para p110 Δ descritos en el documento WO 2009/053716, derivados de purina sustituidos con 2-(morfolin-4-ilo) descritos en el documento WO 2009/045174, inhibidores de PI3K Δ (p110 Δ) descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.518.277 y 6.800.620 y Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Núm. 2005/0261317, y documentos BGT226, XL765 y BEZ235 (Novartis).

Inhibidores de CDK2

Los inhibidores de quinasa II dependientes de ciclina ilustrativos (CDK2) que se pueden emplear en la amplia práctica de la invención incluyen los compuestos inhibidores de quinasa II dependientes de ciclina descritos en las siguientes referencias: (A) derivados de oxindol sustituidos descritos en la Solicitud de Patente Internacional Núm. PCT/EP98/05559 presentada el 3 de septiembre de 1998 para "Substituted Oxindole Derivatives", (B) derivados de purina descritos en la Publicación Internacional WO97/20842; (C) derivados de piridilpirimidinamina descritos en la Publicación Internacional WO95/09852; (D) compuestos 2,6,9-trisustituidos descritos en la Publicación Internacional WO98/05335 de CV Therapeutics; (E) derivados de 4H-1-benzopiran-4-ona descritos en la Patente Alemana 3836676; (F) análogos de 2-tiol y 2-oxo-flavopiridol descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.705.350, y en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.849.733; (G) pirido[2,3-D]pirimidinas y 4-aminopirimidinas descritas en la Publicación Internacional WO98/33798 así como en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.776.942; 5.733.913; 5.223.503; 4.628.089; 4.536.575; 4.431.805; y 4.252.946; (H) compuestos inhibidores de CDK2 antivirales descritos

en la Publicación Internacional WO98/39007; (I) inhibidores quiméricos de CDK2 descritos en la Publicación Internacional WO97/27297 de Mitotix Inc.; (J) las purinas 2,6,9-trisustituidas descritas por Imbach, P., et al., 2,6,9-Trisubstituted Purines: Optimization Towards Highly Potent and Selective CDK1 Inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9 (1999), 91-96; (K) los inhibidores peptídicos descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.625.031 presentada el 29 de abril de 1997; (L) secuencias antisentido inhibidoras de CDK2 descritas en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.821.234 presentada el 13 de octubre de 1998; (M) las purinas alquiladas en C2 descritas por Legraverend, M., et al., en *Synthesis of C2 Alkynylated Purines, A New family of Potent Inhibitors of Cyclin-Dependent kinases*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (1998) 793-798; y (N) las tirfostinas descritas por Kleinberger-Doron, N., et al., en *Inhibition of Cdk2 Activation by Selected Tyrphostyins Causes Cell Cycle Arrest at Late G1 and S Phase*, *Experimental cell Research* 241, 340-351 (1998).

Inhibidores de CDK4

Los inhibidores de CDK4 (quinasa 4 dependiente de ciclina) pueden ser, en el sentido más amplio, cualquier compuesto que sea capaz de inhibir la actividad de CDK4. Como tales, se pueden utilizar inhibidores de CDK generales que pueden inhibir la actividad de dos o más CDK diferentes, p.ej., CDK1, CDK2, así como CDK4. Alternativamente, se pueden utilizar inhibidores selectivos de CDK4. Ahora se entiende que CDK4 y CDK6 son quinastas estrechamente relacionadas con propiedades bioquímicas prácticamente indistinguibles. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican CDK4 y CDK6 humanas se pueden encontrar en los números de acceso de Genbank NM_13 000075 y NM_13 001259, respectivamente. El número de acceso de Genbank U37022 también se refiere a CDK4. Según se utiliza en la presente memoria, inhibidor de CDK4 se refiere a un compuesto que se puede demostrar que inhibe la actividad de CDK4 o de CDK6. Se considera que un inhibidor dado es selectivo para CDK4 si su actividad inhibidora determinada para CDK4 es al menos 5 veces, al menos 10 veces o al menos 25 veces más potente que su actividad inhibidora determinada para una CDK que no es CDK4 ni CDK6, p.ej., CDK1, CDK2, etc.

Se conocen numerosos ensayos en la técnica para determinar la actividad inhibidora de CDK4 de un compuesto, cuyos dichos ensayos se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.040.321; 6.569.878; etc., donde los ensayos *in vitro* representativos que encuentran uso evalúan, de una manera dependiente del tiempo, la capacidad de un compuesto dado para inhibir la capacidad de CDK4 para incorporar un donante de fosfato radiomarcado a un sustrato de proteína.

Los inhibidores de CDK4 específicos representativos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

(i) indolocarbazol arciriflavina A de origen natural, así como indolocarbazoles sustituidos (véase, p.ej., Zhu et al., *J Med. Chem.* 2003, 46, 2027-2030). Otros derivados de interés incluyen aquellos descritos en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2003/0229026 y 2004/0048915 (o análogamente, los documentos WO 01/44247 y WO 02/28861, respectivamente) que describen indolo[6,7-a]-pirrolo[3,4-c]carbazol-6,8-dionas como potentes inhibidores de CDK4.

(ii) flavopiridol semisintético (también conocido como alvocidib) descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.900.727; así como análogos de flavopiridol, tales como los referidos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.733.920 y 5.849.733.

(iii) derivados de diarilurea descritos en el documento EP 1199306 A1, y derivados aromáticos o heterocíclicos fusionados con 2(1H)-pirazinona estructuralmente relacionados que tienen actividad CDK4 y CDK6 descritos en el documento US 2003/0203907 (o análogamente, documento EP 1295878 A1).

(iv) diaminotiazoles, p.ej., como los referidos en el documento US 2002/0151554 (ahora Patente de Estados Unidos Núm. 6.756.374 B2), donde un ejemplo específico de tales compuestos es el compuesto indicado por el código de investigación Ro-0506220.

(v) naftiridinonas descritas en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.150.359, las pirido[2,3-d]pirimidinas descritas en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.498.163 B1, y las 2-(piridin-2-ilamino)pirido[2,3-d]-pirimidin-7-onas descritas en la Publicación de Patente US 2003/0149001. En particular, el documento US 2003/0149001 describe 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-[5-(1-piperazinil)piridin-2-ilamino]pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (7a) indicada por el código de investigación PD-332991.

(vi) los derivados de pirimidina descritos en el documento WO 00/12485 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.593.326 B1, los derivados de imidazo[1,2-a]piridina y pirazolo[2,3-a]piridina descritos en el documento WO 01/14375, los derivados de 4-amino-5-ciano-2-anilo-pirimidina descritos en la Publicación US 2003/0087923 A1, los compuestos de aminotiazol descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.040.321, 6.262.096 B1 y 6.569.878 B1; los derivados de acridona y benzotiadiazina descritos en Patente de Estados Unidos Núm. 6.630.464 B1 (o análogamente documento WO 98/49146); y los derivados de oxindol descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.720.332 B2 (o análogamente documento WO 02/20524). Otros ejemplos de inhibidores de CDK4 son descritos por Toogood, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2002, 6, 472-478, Toogood, *Med. Res. Rev.*, 2001, 21, 487-498, y por Carini et al., *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 2209-2211.

Inhibidores de la glucólisis

Las enzimas asociadas con la ruta de la glucólisis son conocidas en la técnica e incluyen hexoquinasa, glucoquinasa (en tumores o en tejidos que proliferan rápidamente), fosfoglucoisomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfogliceromutasa, enolasa, piruvato quinasa e, indirectamente, lactato deshidrogenasa (metabolismo del lactato). Un aspecto de la invención consiste en que un inhibidor de la síntesis anaeróbica de ATP es un inhibidor de una enzima asociada con la ruta glucolítica. Los inhibidores de la ruta glucolítica son conocidos en la técnica.

Los inhibidores de la hexoquinasa pueden ser isómeros configuracionales de monosacáridos modificados en C-6 por sustitución (reemplazo) o eliminación de 6-OH (el grupo hidroxilo). Un ejemplo de un sustituyente es un radical de bloqueo, por ejemplo, un átomo de la familia de los halógenos, tal como flúor (6-fluoro-D-glucosa). Otro ejemplo de un sustituyente es un grupo tiol. Los monosacáridos modificados en C-6 mediante la eliminación de 6-OH no serán transformados por la hexoquinasa o la glucoquinasa (véase más adelante) en glucosa-6-fosfato y pueden bloquear ambas enzimas.

Los inhibidores de la hexoquinasa son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a cualquiera de los siguientes:

- (i) 6-fluoro-D-glucosa, 6-bromo-D-glucosa, 6-cloro-D-glucosa, 6-O-metil-D-glucosa, 6-Tio-D-glucosa, 6-desoxi-D-glucosa y cualquier derivado conocido en la técnica.
- (ii) derivados sustituidos en C-6 de otras piranosas con anillos de hexosas (manopiranosas, galactopiranosas). Los ejemplos incluyen 6-desoxi-6-fluoro-D-manosa, y cualquiera conocido en la técnica.
- (iii) diversos derivados de azúcares C6 halogenados (fluoro, bromo, cloro) tales como gluconolactonas, ácido glucurónico, glucopiranosido y sus derivados fosfato, y cualquiera conocido en la técnica. Los glucósidos halogenados también pueden suministrarse indirectamente a la célula, mediante compuestos tales como glucurónidos con glucósidos halogenados en la posición C-1 (una vez en la célula, las glucoronidasas lo escindirán y suministrarán hexosa activa en la célula). Preferiblemente, un inhibidor de hexoquinasa es la 6-desoxi-6-fluoro-D-glucosa y sus derivados.

Los inhibidores de glucoquinasa pueden ser cualquiera de la técnica. Éstos incluyen, pero no se limitan a, manoheptulosa, manoheptosa, glucoheptosa, N-acetilglucosamina. La glucoquinasa está predominantemente presente solo en tumores.

Inhibidores de la fosfoglucoisomerasa: la fosfoglucoisomerasa transforma la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato. Semejante transformación requiere la presencia de un grupo hidroxilo en C-2. Por lo tanto, los análogos sin hidroxilo o que tienen el hidroxilo adecuadamente bloqueado no sufrirán isomerización por la fosfoglucoisomerasa.

Otra forma de inhibir la isomerización por fosfoglucoisomerasa es mediante la modificación de la glucosa 6-fosfato en C-1 o C-5 sustituyendo el hidroxilo por un átomo halogenado (flúor, fluoruro de glucosilo) o mediante simple desoxigenación a 1-desoxi-D-glucosa.

Los inhibidores de fosfoglucoisomerasa son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a cualquiera de los siguientes:

- (i) D-hexosas sustituidas en C2, tales como 2-desoxi-2-halogeno-D-hexosas, tales como 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa (2FDG), 2-cloro-2-desoxi-D-glucosa, 2-bromo-D-glucosa, 2-yodo-D-glucosa, 2-desoxi-2,2-difluoro-D-arabino-hexosa, 2-desoxi-2-fluoro-D-manosa, 2-desoxi-D-arabino-hexosa, 2-desoxi-2-fluoro-D-galactosa, 1,6-anhidro-2-desoxi-2-fluoro-beta-D-glucopiranososa (1-6-anhidroazúcar), 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (glucosamina), 2-amino-2-desoxi-D-galactosa (galactosamina), 2-amino-2-desoxi-D-manosa (manosamina), 2-desoxi-2-fluoro-D-manosa, 2-desoxi-2-fluoro-D-galactosa, 2-desoxi-D-arabino-hexosa, 2-desoxi-2,2-difluoro-D-arabino-hexosa, 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa-1-fosfato, 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa-6-P, 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa-1,6-bifosfato, 2-desoxi-2-fluoro-D-manosa-1-P, 2-desoxi-2-fluoro-D-manosa-6-P, 2-desoxi-2-fluoro-D-manosa-1,6-bifosfato, nucleótido difosfato (por ejemplo, uridina di-P)-2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa, manosa.
- (ii) derivados sustituidos en C-2 con halógeno y NH₃ de D-glucosa-6-fosfato, 2-desoxi-2-fluoro-2-D-glucosa-6-fosfato, 2-cloro-2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato, 2-desoxi-D-arabino-hexosa-6-fosfato, D-glucosamina-6-fosfato, 2-desoxi-2-fluoro-2-D-manosa-6-P y cualquier derivado conocido.
- (iii) derivados halogenados en C-2 de piranosas con anillo de hexosa (mannopiranosas, galactopiranosas), por ejemplo C-2-desoxi-2-fluoro-D-piranosas, y cualquiera conocido en la técnica.
- (iv) derivados de azúcares halogenados en C2 (flúor, bromo, cloro, yodo) tales como gluconolactonas, ácido glucurónico, glucopiranosido y sus derivados fosfato.
- (v) modificación en C-1 o C-5: reemplazo de hidroxilo por flúor o desoxigenación o reemplazo por un grupo

azufre en C-5, tal como, pero no limitado a, fluoruro de glucosilo, 1-deoxi-D-glucosa, 5-5 tio-D-glucosa.

(vi) 6-aminonicotinamida (6AN), indirectamente por la inhibición de la PPP.

5 Los inhibidores de fosfofructoquinasa (o fructosa-6-P-quinasa) son cualquiera conocido en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes: agentes inductores de acidosis, 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa, citrato y derivados halogenados de citrato, fructosa 2,6-bisfosfato, análogos de bromoacetil-etanolamina fosfato (N-(2-metoxietil)-bromoacetamida, N-(2-etoxietil)-bromoacetamida, N-(3-metoxipropil)-bromoacetamida).

10 Inhibidores de aldolasa: los análogos que bloquean la escisión de la aldolasa, bloqueando así la formación de triosas a partir de fructosa-1,6-bisfosfato requieren la presencia de grupos hidroxilo en C-3 y C-4. Así, por ejemplo, la 3-desoxi o la 3-fluoro-D-glucosa o la 4-desoxi o la 4-fluoro-D-glucosa se pueden transformar en 4-fluoro-D-fructosa-1,6-bisfosfato, que no será escindido por la aldolasa, pero la bloqueará.

Los inhibidores de gliceraldehído 3P deshidrogenasa son cualquiera conocido en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a cualquiera de los siguientes, yodoacetato, pentalenolactona, arsénico, 1,1-difluoro-3-fosfato-glicerol.

15 Los inhibidores de la cadena de transformación del gliceraldehído (gliceraldehído 3P deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa) son cualesquiera que actúen en cualquier etapa en la que esté implicada la fosforilación. Tales inhibidores son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes: 2-fluoro (o yodo, o tio, o metoxi) o 3-fluoro (o 3,3 difluoro, 3-yodo, 3-carboxilo-, 3-tio)-gliceraldehídos o gliceratos, 3-fluoro-2-fosfoglicerato, también, fosfotioésteres u otros análogos modificados con fósforo pueden bloquear las transformaciones de gliceraldehído.

20 Los inhibidores de la piruvato quinasa son conocidos en la técnica. Alternativamente, una composición que comprende serina o fructosa 1,6-diP desplaza la ruta glucolítica hacia el ciclo de TCA; por lo tanto, una composición de la invención comprende serina y un inhibidor de TCA tal como fluoroacetato o un inhibidor de la fosforilación oxidativa tal como rodamina.

Los inhibidores de piruvato carboxilasa y PEP carboxilasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglicerato quinasa, enolasa, fosfoglicerato mutasa y triosa fosfato isomerasa son todos conocidos en la técnica.

25 Los inhibidores de la lactato deshidrogenasa son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, oxamato, ácido 2-fluoro-propiónico o sus sales; ácido 2,2-difluoro-propiónico, piruvato modificado en C-3 tal como, pero no limitado a, 3-halo-piruvato, ácido 3-halopropiónico y ácido 2-tiometilacético.

En algunas realizaciones, un inhibidor de la glucólisis es cualquiera de 2FDG, oxamato y yodoacetato.

30 La glucólisis es la vía principal para la síntesis anaeróbica de ATP. Los tumores cambian a la síntesis anaeróbica de ATP metabolizando la glucosa bien distribuida, entre otros, para proporcionar nucleótidos a través de la ruta PPP. Se sabe que las masas en proliferación que están parcialmente bajo respiración anaerobia son más resistentes a la radiación o la quimioterapia. Por lo tanto, al inhibir localmente la ruta de la glucólisis, se inhibe la respiración anaerobia que es la vía de energía principal de las células poco oxigenadas, lo que conduce a un aumento de la muerte celular de las células hipóxicas en proliferación. La proliferación de células no hipóxicas se ralentiza también
35 debido al cierre de esta vía de energía primaria.

IV. Generación de células que tienen un segundo destino celular

40 En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para diferenciar células a un destino celular deseado. Como se muestra en los Ejemplos, los autores de la presente invención pueden generar células diferenciadas, es decir, células que tienen un segundo destino celular, de cualquiera de los tres linajes principales (endodermo, mesodermo, ectodermo). Se conocen numerosos protocolos de diferenciación (es decir, protocolos que comprenden poner en contacto las células con factores de diferenciación específicos del linaje) para diferenciar células a destinos celulares y se cree que dichos protocolos se pueden aplicar generalmente a células generadas como se describió anteriormente en las secciones II y III para generar células diferenciadas. En algunas realizaciones, el protocolo de diferenciación incluye solo medios químicamente definidos.

45 En algunas realizaciones, los métodos de las secciones II y III se realizan continuamente, es decir, sin etapas intermedias significativas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la transición entre etapas simplemente implica un cambio de medios.

A. Diferenciación mesodérmica

50 En algunas realizaciones, las células se diferencian en células mesodérmicas. En algunas realizaciones, las células se diferencian en células cardíacas (p.ej., cardiomiocitos). Se cree que se puede utilizar cualquier método para inducir cardiomiocitos combinado con los métodos descritos anteriormente en las secciones II y III, según se desee. En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio químicamente definido. En algunas realizaciones, células no mesodérmicas (p.ej., células ectodérmicas, p.ej., fibroblastos) se exponen (p.ej., vía expresión o contacto con la proteína) a factores de transcripción de reprogramación durante, p.ej., 3-10, 3-6 días, etc., opcionalmente en

presencia de un inhibidor de JAK (p.ej., a una concentración suficiente para evitar el desarrollo de células iPS). Al final de este período, las células se pueden mover (p.ej., directamente) a medios de acondicionamiento para convertir las células en células mesodérmicas como se describe en la presente memoria.

5 En algunas realizaciones, los cardiomiocitos se inducen poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea, una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con una proteína BMP, un agonista del canal de calcio, un agente activador de Gas, un análogo de AMPc y/o un inhibidor de GSK-3 en condiciones para la generación de cardiomiocitos. En algunas realizaciones, los cardiomiocitos se inducen poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula como la generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea, una célula pluripotente inducida, otra célula pluripotente o progenitora) con una
10 proteína morfogenética ósea-4 (BMP4) y/o un inhibidor de GSK-3 en condiciones para la generación de cardiomiocitos. En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio químicamente definido. En algunas realizaciones, por ejemplo, un medio definido químicamente incluye RPMI-1640 con un suplemento de 0,5x N2, 1x B27 (sin vitamina A), fracción V de BSA al 0,05%, Glutamax al 0,5% y β -mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen).

15 La proteína BMP (p.ej., BMP4) aplicada a las células puede ser de cualquiera de una serie de organismos, aunque en muchas realizaciones, el origen de la especie de la proteína BMP (p.ej., BMP4) coincidirá con la especie de la célula utilizada. Así, por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula humana se pone en contacto con la proteína BMP humana (p.ej., BMP4), una célula de ratón se pone en contacto con proteína BMP de ratón (p.ej., BMP4), etc. Se apreciará que también se pueden utilizar los mutantes activos y fragmentos de proteína BMP (p.ej., BMP4).

20 En algunas realizaciones, los cardiomiocitos se pueden inducir poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula tal como la generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con proteína morfogenética ósea-4 (BMP4) sin un inhibidor de GSK-3 en condiciones para la generación de cardiomiocitos. En algunas realizaciones, los cardiomiocitos también se pueden inducir poniendo en contacto una célula con un inhibidor de GSK-3 sin BMP4.

25 En algunas realizaciones, los cardiomiocitos se inducen poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un agonista del canal de calcio de tipo L. Los agonistas del canal de calcio de tipo L ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, BayK8644 (véase, p.ej., Schramm, et al., Nature 303: 535-537 (1983)), Deshidrodidemina B (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.030.943), FPL 64176 (FPL) (véase, p.ej., Liwang, et al., Neuropharmacology 45: 281-292 (2003)), S(+)-PN 202-791 (véase, p.ej., Kennedy, et al.,
30 Neuroscience 49: 937-44 (1992)) y CGP 48506 (véase, p.ej., Chahine, et al., Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 81: 135-141 (2003)).

35 En algunas realizaciones, los cardiomiocitos se inducen poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un agente activador de Gas. Los agentes activadores de Gas ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, isoproterenol, epinefrina, cimaterol, clenbuterol, dobutamina, alprenolol, cianopindolol, propanolol, sotalol, timolol e ICI-118,551 (3-isoprofilamino)-1-[(7-metil-]4-indanil)oxi]butan-2-ol (véase, p.ej., Uğur et al., Mol Pharmacol 68: 720-28 (2005)).

40 En algunas realizaciones, los cardiomiocitos se inducen poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un análogo de AMPc. Los análogos de AMPc ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, dibutilil AMPc, 8-Bromo-AMPc y Sp-8-Br-AMPc (8-bromoadenosina-3',5'-monofosforotioato cíclico, isómero Sp) (véase, p.ej., Ferrier y Howlett, J. Pharmacol. Exp. Ther. 306:166-76 (2003)).

45 El inhibidor de GSK-3 utilizado en los métodos de diferenciación mesodérmica descritos en la presente memoria puede ser un inhibidor específico de la isoforma de GSK-3, p.ej., un inhibidor de GSK-3 β o GSK-3 α , o un inhibidor no específico de la isoforma. En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 puede estar sustituido con un inhibidor de GSK. En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 puede estar sustituido con un inhibidor de Wnt o un inhibidor de la ruta de Wnt.

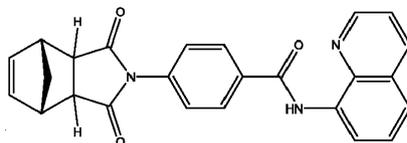
Inhibidores de Wnt

50 Se pretende que "ruta de Wnt" incluya cualquiera de las proteínas aguas abajo o aguas arriba de la actividad de la proteína Wnt. Por ejemplo, esto podría incluir LRP5, LRP6, Dkk, GSK-3, Wnt10B, Wnt6, Wnt3 (p.ej., Wnt 3A), Wnt1 o cualquiera de las otras proteínas comentadas en la presente memoria, y los genes que codifican estas proteínas. También se pretende que la discusión de la ruta Wnt incluya todas las rutas aguas abajo de Wnt, tales como las rutas de LRP5 o HBM, la ruta de Dkk, la ruta de la β -catenina, la ruta de MAPKAPK2, la ruta de OPG/RANK y similares. Por "ruta de LRP5" y "ruta de IBM" se quiere significar cualquier proteína/gen que incluya LRP5 o el
55 mutante de HBM y las proteínas aguas abajo de LRP5 o el mutante de HBM. Por "ruta de β -catenina" se quiere significar cualquier proteína/gen que incluya β -catenina y proteínas aguas abajo de β -catenina. Por "ruta de MAPKAPK2" se quiere significar cualquier proteína/gen que incluya MAPKAPK2 y proteínas aguas abajo de MAPKAPK2. Por "ruta de OPG/RANKL" se quiere significar cualquier proteína/gen que incluye OPG/RANKL y

proteínas aguas abajo de OPG y RANKL. Se pretende que "ruta de Dkk" incluya cualquier proteína/gen implicado en la interacción de Dkk-1 y LRP5 y/o LRP6 que es parte de la ruta de Wnt. Dkk-1 inhibe la actividad de LRP5.

Los inhibidores de Wnt ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, p.ej., IWP-2-(2-(3,4,6,7-tetrahidro-4-oxo-3-feniltieno[3,2-d]pirimidin-2-iltio)-N-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)acetamida), DKK1 (proteína Dickkopf 1) e IWR1 (

5



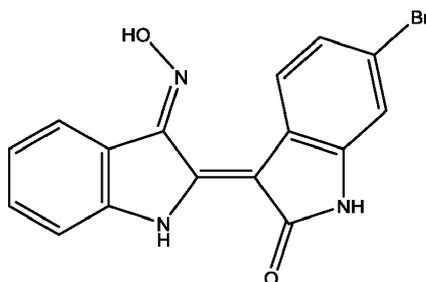
10). IWP-2 se identificó en un escrutinio de alto rendimiento para los antagonistas de la ruta de Wnt/ β -catenina (Chen, et al., Nat Chem Biol 5: 100-7, 2009). El inhibidor de Wnt IWP-2 previene la palmitoilación de las proteínas Wnt por Porcupina (Porcn), una O-aciltransferasa unida a la membrana, bloqueando de ese modo la secreción y la actividad de Wnt. Tiene una CI_{50} de 27 nM y bloquea la fosforilación del receptor de Lrp6 y la acumulación tanto de Dv12 como de β -catenina (Chen, et al., Nat Chem Biol 5: 100-7, 2009). El inhibidor de Wnt IWR1 induce un aumento en los niveles de proteína Axina2; promueve la fosforilación de la β -catenina mediante la estabilización de complejos de destrucción con un armazón de Axina (Chen, et al., Nat Chem Biol 5: 100-7, 2009; Lu et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 19: 3825, 2009). Otros inhibidores de Wnt incluyen, pero no se limitan a, compuestos IWR, compuestos IWP y otros inhibidores de Wnt descritos en el documento WO09155001 y Chen, et al., Nat Chem Biol 5: 100-7, 2009.

20 Los antagonistas de la señalización Wnt conocidos también incluyen proteínas Dickkopf, proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (sFRP), factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1) y Soggy. Los miembros de la familia de proteínas relacionadas con Dickkopf (Dkk-1 a 4) son proteínas secretadas con dos dominios ricos en cisteína, separadas por una región conectora. Dkk-3 y 4 también tienen un dominio de proquineticina. Dkk-1, 2 y 4 funcionan como antagonistas de la señalización Wnt canónica uniéndose a LRP5/6, evitando la interacción de LRP5/6 con complejos de Wnt-Frizzled. Dkk-1, 2 y 4 también se unen a Kremen-1 o 2 de la superficie celular y promueven la internalización de LRP5/6. La actividad antagónica de Dkk-3 no ha sido demostrada. Las proteínas Dkk tienen distintos patrones de expresión en tejidos adultos y embrionarios y tienen una amplia gama de efectos sobre el desarrollo y la morfogénesis de tejidos. La familia Dkk también incluye Soggy, que es homóloga a Dkk-3 pero no a los otros miembros de la familia. Los sFRP son una familia de cinco glucoproteínas de unión a Wnt que se asemejan a Frizzled unida a la membrana. La familia más grande de inhibidores de Wnt contiene dos grupos, consistiendo el primero en sFRP-1, 2 y 5, e incluyendo el segundo sFRP-3 y 4. Todas son secretadas y derivadas de genes únicos, ninguno es una forma de empalme alternativa de la familia Frizzled. Cada sFRP contiene un dominio N-terminal rico en cisteína (CRD). Otros antagonistas de la señalización Wnt incluyen WIF-1 (Factor Inhibidor de Wnt 1), una proteína secretada que se une a las proteínas Wnt e inhibe su actividad.

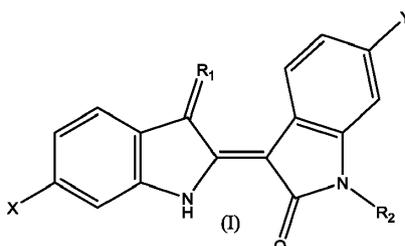
Inhibidor de GSK

35 Por "inhibidor de GSK" se quiere significar cualquier agente que inhiba la actividad de GSK. Estos pueden incluir inhibidores de GSK no selectivos, tales como LiCl u otras sales de litio, así como inhibidores de GSK selectivos. En algunas realizaciones, los inhibidores de GSK son inhibidores de GSK-3. En algunas realizaciones, los inhibidores de GSK son inhibidores específicos de la isoforma GSK-3, tales como inhibidores de GSK-3 β o GSK-3 α . Otros inhibidores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos inmunogénicamente activos de los mismos, aptámeros peptídicos, una proteína de unión a GSK, una molécula antisentido para un ácido nucleico de GSK, una molécula de interferencia de ARN, un oligonucleótido de morfolino, un ácido péptido nucleico (ANP), una ribozima y un péptido.

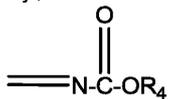
40 Como se observa en el ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 es BIO (6-bromoindirrubin-3'-oxima) de la siguiente manera:



45 En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 es un derivado de BIO que tiene la fórmula general:



En la Fórmula (I), -X e -Y son -H o un halógeno, p.ej., -Br. R₁ se selecciona del grupo que consiste en oxo, = N-OR₃,



R₂, R₃, R₄ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido (p.ej., alquilo C₁ a C₂₀ sustituido o no sustituido), heteroalquilo sustituido o no sustituido (p.ej., cicloalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o no sustituido), cicloalquilo sustituido o no sustituido (p.ej., cicloalquilo C₃ a C₁₄ que incluye estructuras de anillos fusionados), heterocicloalquilo sustituido o no sustituido (p.ej., heterocicloalquilo de 3 a 14 miembros que incluye estructuras de anillos fusionados), arilo sustituido o no sustituido (p.ej., un arilo C₆ a C₁₄ que incluye estructuras de anillos fusionados), o heteroarilo sustituido o no sustituido (p.ej., un heteroarilo de 5 a 14 miembros que incluye estructuras de anillos fusionados). Los derivados adicionales de BIO incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Publicación de Estados Unidos Núm. 2007/0276025. En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 es una molécula de indirrubina sustituida con un halógeno en la posición C6 de la molécula de indirrubina. En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 se selecciona del grupo que consiste en 6-bromoindirrubina, 6,6'-dibromoindirrubina, 6-bromoindirrubin-3'-oxima ("BIO"), 6,6'-dibromoindirrubin-3'-oxima, 6-bromoindirrubin-3'-metoxima, 6-bromo-5-metilindirrubina y 6-bromoindirrubin-3'-acetoxima, 6-bromo-5-aminoindirrubina y 6-bromo-5-amino-3'-oxima-indirrubina, 6-bromoindirrubina, 6,6'-dibromoindirrubina, 6-bromoindirrubin-3'-oxima ("BIO"), 6,6'-dibromoindirrubin-3'-oxima, 6-bromoindirrubin-3'-metoxima, 6-bromo-5-metilindirrubina, 6-bromo-5-aminoindirrubina, 6-bromo-5-amino-3'-oxima-indirrubina, 6-bromoindirrubin-3'-acetoxima, 5-amino-indirrubina, 5-amino-3'-oxima-indirrubina, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Otros posibles inhibidores de GSK-3 pueden incluir anticuerpos que se unen, variantes dominantes negativas de, y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que se dirigen a GSK-3. Los ejemplos específicos de inhibidores de GSK-3 incluyen, entre otros, Kenpaulona, 1-Azakenpaulona, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418 (véase, p.ej., Gould, et al., *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 7: 387-390 (2004)), CT 99021 (véase, p.ej., Wagman, *Current Pharmaceutical Design* 10:1105-1137 (2004)), CT 20026 (véase, Wagman, más arriba), SB216763 (véase, p.ej., Martin, et al., *Nature Immunology* 6: 777-784 (2005)), AR-A014418 (véase, p.ej., Noble, et al., *PNAS* 102: 6990-6995 (2005)), litio (véase, p.ej., Gould, et al., *Pharmacological Research* 48: 49-53 (2003)), SB 415286 (véase, p.ej., Frame, et al., *Biochemical Journal* 359: 1-16 (2001)) y TDZD-8 (véase, p.ej., Chin, et al., *Molecular Brain Research*, 137(1-2):193-201 (2005)). Otros ejemplos de inhibidores de GSK-3 disponibles de Calbiochem (véase, p.ej., Dalton, et al., documento WO2008/094597), incluyen, pero no se limitan a, BIO (2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima (inhibidor IX de GSK-3); BIO-Acetoxima (2'Z,3'E)-6-Bromoindirrubina-3'-acetoxima (inhibidor X de GSK-3); (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina (Inhibidor XIII de GSK-3); Complejo Piridocarbazol-ciclopentadienil-rutenio (Inhibidor XV de GSK-3); TDZD-8 4-Bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidino-3,5-diona (Inhibidor I de GSK-3β); 2-Tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol (inhibidor II de GSK-3β); OTDZT 2,4-Dibencil-5-oxotiadiazolidino-3-tiona (Inhibidor III de GSK-3); alfa-4-Dibromoacetofenona (inhibidor VII de GSK-3β); AR-AO 14418 N-(4-Metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea (inhibidor VIII de GSK-3β); 3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona (inhibidor XI de GSK-3β); Compuesto de pirrolopirimidina TWS119 (inhibidor XII de GSK-3β); L803 H-KEAPPAPPQSpP-NH₂ o su forma miristoilada (inhibidor XIII de GSK-3β); 2-Cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-il)-etanona (inhibidor VI de GSK-3β); AR-AO144-18; SB216763; y SB415286. Se han identificado los residuos de GSK-3β que interactúan con los inhibidores. Véase, p.ej., Bertrand et al., *J. Mol Biol.* 333 (2): 393-407 (2003).

Los expertos apreciarán que la concentración del inhibidor de GSK-3 dependerá de qué inhibidor específico se utilice. En ciertas realizaciones, se puede utilizar una combinación de dos o más inhibidores de GSK-3 diferentes.

B. Diferenciación ectodérmica

En algunas realizaciones, las células se diferencian en células ectodérmicas. En algunas realizaciones, las células se diferencian en células neurales. En algunas realizaciones, las células se diferencian en células progenitoras neurales. En algunas realizaciones, las células se diferencian en células neuronales positivas a tirosina hidroxilasa (TH). En algunas realizaciones, las células se diferencian en células del epitelio pigmentado de la retina. Se cree que se puede utilizar cualquier método para inducir la diferenciación en células ectodérmicas combinado con los métodos descritos anteriormente en las secciones II y III, según se desee. En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio químicamente definido. En algunas realizaciones, las células no ectodérmicas están expuestas (p.ej., a través de la expresión o el contacto con proteínas) a factores de transcripción de reprogramación durante, p.ej., 3-

10, 3-6 días, etc., opcionalmente en presencia de un inhibidor de JAK (p.ej., a una concentración suficiente para evitar el desarrollo de células iPS). Al final de este período, las células se pueden trasladar (p.ej., directamente) a medio de acondicionamiento para convertir las células en células ectodérmicas como se describe en la presente memoria.

5 En algunas realizaciones, la diferenciación en células neurales se induce al poner en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un inhibidor de Wnt o un inhibidor de la ruta de Wnt como los utilizados en los métodos de diferenciación mesodérmica (p.ej., IWP-2, DKK1 e IWR1) bajo condiciones para la generación de células neurales. En algunas realizaciones, células neurales (p.ej., células progenitoras neurales) se inducen poniendo en
10 contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con FGF2, FGF4 y EGF en condiciones para la generación de células neurales (p.ej., células progenitoras neurales). En algunas realizaciones, células neurales (p.ej., células neuronales positivas para TH) se inducen poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o
15 progenitora) con FGF8 y SHH en condiciones para la generación de células neurales (p.ej., células neuronales positivas para TH). En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio químicamente definido. En algunas realizaciones, un medio químicamente definido incluye una mezcla 1:1 de Advanced DMEM/F12 y Neurobasal con un suplemento de albúmina de suero bovino al 0,05%, 1x N2, 1x B27, Glutamax 2 mM y β -mercaptoetanol 0,11 mM.

20 En algunas realizaciones, la diferenciación a células del epitelio pigmentado de la retina se induce poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula tal como se generó en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con FGF2, FGF4 y EGF en condiciones para la generación de una célula progenitora neural (p.ej., como se describió anteriormente), y poniendo en contacto la célula progenitora neural con un inhibidor de TGF β y un inhibidor de GSK-3 en condiciones para la generación de la célula del epitelio pigmentado de la retina. En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio
25 químicamente definido.

En algunas realizaciones, los factores de crecimiento generalmente conocidos y utilizados en la diferenciación celular, p.ej., diferenciación de células neurales, se pueden utilizar para la diferenciación ectodérmica de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el método implica poner en contacto las células con FGF2, FGF4 y/o EGF para generar células neurales. En algunas realizaciones, el método implica poner en contacto las
30 células con FGF8 y SHH para generar células neurales.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar inhibidores de GSK-3, por ejemplo un inhibidor específico de la isoforma de GSK-3, p.ej., un inhibidor de GSK-3 β o GSK-3 α , o un inhibidor no específico de la isoforma, para la diferenciación ectodérmica (p.ej., diferenciación de células del epitelio pigmentado de la retina) de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK-3 puede ser sustituido por un inhibidor de GSK. En algunas
35 realizaciones, el inhibidor de GSK-3 puede ser sustituido por un inhibidor de Wnt o un inhibidor de la ruta de Wnt. Los inhibidores de GSK-3 y/o los inhibidores de Wnt y/o los inhibidores de la ruta de Wnt adecuados se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, se puede utilizar un inhibidor de TGF β para la diferenciación ectodérmica (p.ej., diferenciación de células del epitelio pigmentado de la retina) de acuerdo con la presente invención. Los inhibidores de TGF β adecuados se describen más abajo.

40 C. Diferenciación endodérmica

En algunas realizaciones, las células se diferencian en células endodérmicas. En algunas realizaciones, las células se diferencian en células pancreáticas (p.ej., células de linaje pancreático o células beta pancreáticas). En algunas realizaciones, las células se diferencian en células de endodermo definitivas inducidas (iDE). Se cree que se puede utilizar cualquier método para inducir la diferenciación en células endodérmicas combinado con los métodos
45 descritos anteriormente en las secciones II y III, según se desee. En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio químicamente definido. En algunas realizaciones, las células no endodérmicas (p.ej., células ectodérmicas, p.ej., fibroblastos) se exponen (p.ej., a través de la expresión o el contacto con proteínas) a factores de transcripción de reprogramación durante, p.ej., 3-10, 3-6 días, etc., opcionalmente en presencia de un inhibidor de JAK (p.ej., a una concentración suficiente para evitar el desarrollo de células iPS). Al final de este período, las células se pueden trasladar (p.ej., directamente) a medios de acondicionamiento para convertir las células en células endodérmicas como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la diferenciación en células pancreáticas se induce poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un inhibidor de la ruta de TGF β /Activina/Nodal (p.ej., A-83-01 o SB431542)
55 bajo condiciones para la generación de células pancreáticas. En algunas realizaciones, la diferenciación en células de linaje pancreático se induce poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un miembro de la familia de TGF β /Activina/Nodal opcionalmente en presencia de un inhibidor de JAK, poniendo en contacto después la célula con un inhibidor de TGF β /ALK5 (p.ej., SB431542), poniendo en contacto después la célula con nicotinamida en condiciones para la generación de la célula de linaje pancreático.
60

En algunas realizaciones, la diferenciación en una célula endodérmica definitiva inducida (iDE) se induce al poner en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un inhibidor de la ruta de TGFβ/Activina/Nodal (p.ej., A-83-01 o SB431542), un inhibidor de HDAC (p.ej., NaB) y/o un inhibidor de GSK-3 (p.ej., CHIR99021) bajo condiciones para la generación de la célula iDE. En algunas realizaciones, la diferenciación en una célula beta pancreática se induce poniendo en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida u otra célula pluripotente o progenitora) con un inhibidor de la ruta de TGFβ/Activina/Nodal (p.ej., A-83-01 o SB431542), un inhibidor de HDAC (p.ej., NaB) y/o un inhibidor de GSK-3 (p.ej., CHIR99021) en condiciones para la generación de la célula iDE, después en condiciones para la generación de células beta pancreáticas, poniendo en contacto la célula con FGF7, ácido retinoico (RA), un inhibidor de la ruta Hedgehog (p.ej., GDN-0449), un inhibidor de BMP (p.ej., LDN-193189) y/o un inhibidor de TGFβ/ALK5 (p.ej., SB431542), después poniendo en contacto la célula con EGF y/o un inhibidor de Notch (p.ej., DAPT), después poniendo en contacto la célula con bFGF, nicotinamida y/o extensina-4.

En algunas realizaciones, las condiciones incluyen un medio químicamente definido. En algunas realizaciones, por ejemplo, un medio químicamente definido incluye RPMI-1640 con un suplemento de 0,5x N2, 1x B27 (sin vitamina A), fracción V de BSA al 0,05%, Glutamax al 0,5% y β-mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen).

Los factores de crecimiento generalmente conocidos y utilizados en la diferenciación celular, p.ej., la diferenciación de células pancreáticas, se pueden utilizar para la diferenciación endodérmica de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el método implica poner en contacto células con bFGF, BMP4, EGF y/o FGF7 para generar células endodérmicas.

Se pueden utilizar pequeñas moléculas generalmente conocidas y utilizadas en la diferenciación celular, p.ej., diferenciación de células pancreáticas, para la diferenciación endodérmica de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, la diferenciación de células pancreáticas se induce incubando las células (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida, otra célula pluripotente o progenitora) con una cantidad suficiente de un inhibidor de GSK, un inhibidor de HDAC y/o un inhibidor de la ruta de TGFβ/activina (p.ej., A-83-01).

Inhibidores de la ruta TGFβ/Activina/Nodal

Los inhibidores de la ruta de TGFβ/activina ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: inhibidores del receptor de TGF beta, inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3, inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD 4, y activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7. Además, las categorizaciones que se describen a continuación son simplemente para fines de organización y un experto en la técnica sabría que los compuestos pueden afectar a uno o más puntos dentro de una ruta, y por lo tanto los compuestos pueden funcionar en más de una de las categorías definidas.

Los inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3 pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a SMAD2 o SMAD3. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen PD169316; SB203580; SB-431542; LY364947; A77-01; y 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin). (Véase, p.ej., Wrzesinski, más arriba; Kaminska, más arriba; Shimanuki, et al., *Oncogene* 26: 3311-3320 (2007)); y Kataoka, et al., documento EP1992360).

Los inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD 4 pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a SMAD2, SMAD3 y/o smad4. Los ejemplos específicos de inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD4 incluyen, pero no se limitan a, Trx-SARA, Trx-xFoxH1b y Trx-Lef1. (Véase, p.ej., Cui, et al., *Oncogene* 24: 3864-3874 (2005)) y Zhao, et al., *Molecular Biology of the Cell*, 17: 3819-3831 (2006)).

Los activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7 incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos que codifican proteínas SMAD 6 o SMAD 7 o fragmentos de las mismas y polipéptidos y fragmentos codificados por dichos ácidos nucleicos. (Véase, p.ej., Miyazono, et al., documento US 6.534.476).

En otras realizaciones, la diferenciación a células pancreáticas se induce al poner en contacto una célula (por ejemplo, una célula generada en la sección II y/o III anterior, o si se desea una célula pluripotente inducida, otra célula pluripotente o progenitora) con un receptor de TGFβ/Inhibidor de ALK5 en condiciones para la generación de células pancreáticas. Los inhibidores del receptor de TGF beta (p.ej., ALK5) pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de, y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de receptores TGF beta (p.ej., ALK5). Los inhibidores del receptor de TGFβ/ALK5 incluyen, pero no se limitan a, SB431542 (véase, p.ej., Inman, et al., *Molecular Pharmacology* 62(1):65-74 (2002)), A-83-01, también conocido como 3-(6-metil-2-piridinil) -N-fenil-4- (4-quinolinil) -1H-pirazol-1-carbotioamida (véase, p.ej., Tojo, et al., *Cancer Science* 96(11):791-800 (2005)), y disponible comercialmente, p.ej., de Toicris Bioscience); 2-(3-(6-Metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, p.ej., Dalton, et al., documento WO2008/094597), BMP4 (véase, Dalton, más arriba), GW788388 (-{4-[3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]piridin-2-il}-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)benzamida) (véase, p.ej., Gellibert, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* 49(7):2210-2221 (2006)), SM16 (véase, p.ej., Suzuki, et al., *Cancer*

Research 67(5):2351-2359 (2007)), IN-1130 (3-((5-(6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1H-imidazol-2-il)metil)benzamida) (véase, p.ej., Kim, et al., *Xenobiotica* 38(3):325-339 (2008)), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)piridina) (véase, p.ej., de Gouville, et al., *Drug News Perspective* 19(2):85-90 (2006)), SB-505124 (hidrocloruro de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina) (véase, p.ej., DaCosta, et al., *Molecular Pharmacology* 65(3):744-752 (2004)) y derivados de pirimidina (véanse, p.ej., los enumerados por Stiefl, et al., en el documento WO2008/006583). Adicionalmente, si bien no se pretende que "un inhibidor de ALK5" incluya inhibidores de quinasa no específicos, se debe entender que un "inhibidor de ALK5" incluye inhibidores que inhiben ALK4 y/o ALK7 además de ALK5, tal como, por ejemplo, SB-431542 (véase, p.ej., Inman, et al., *J. Mol. Pharmacol.* 62(1):65-74 (2002)). Sin pretender limitar el alcance de la invención, se cree que los inhibidores de ALK5 afectan al proceso de conversión/transición mesenquimal a epitelial (MET). La ruta de TGFβ/activina es un conductor para la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Por lo tanto, la inhibición de la ruta de TGFβ/activina puede facilitar el proceso de MET (es decir, la reprogramación).

Los inhibidores del receptor de TGF beta pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de y ARNip o ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a los receptores beta de TGF. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero no se limitan a, SU5416; hidrocloruro de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124); lerdelimumb (CAT-152); metelimumab (CAT-192); GC-1008; ID11; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; Gleevec; 3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona (Morina); activina-M108A; P144; TBR2-Fc soluble; y células tumorales transfectadas antisentido que se dirigen a los receptores de TGF beta. (Véanse, p.ej., Wrzesinski, et al., *Clinical Cancer Research* 13(18): 5262-5270 (2007); Kaminska, et al., *Acta Biochimica Polonica* 52(2):329-337 (2005); y Chang, et al., *Frontiers in Bioscience* 12:4393-4401 (2007)).

Inhibidores de BMP

Los inhibidores de la ruta BMP ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: Nogina, inhibidores del receptor de BMP, inhibidores de la fosforilación de SMAD 1/5/8, inhibidores de la interacción de SMAD 1/5/8 y SMAD 4, y activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7. Las categorizaciones descritas a continuación tienen meramente fines organizativos y un experto en la técnica sabría que los compuestos pueden afectar a uno o más puntos dentro de una ruta, y por lo tanto los compuestos pueden funcionar en más de una de las categorías definidas.

Los inhibidores de la fosforilación de SMAD 1/5/8 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra variantes dominantes negativas, ácidos nucleicos antisentido y moléculas pequeñas que se dirigen a SMAD 1, SMAD 5 o SMAD 8. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen LDN-193189 y Dorsomorfina (disponible comercialmente en, p.ej., Stemgent).

Los activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7 incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos que codifican proteínas SMAD 6 o SMAD 7 o fragmentos de las mismas y polipéptidos y fragmentos codificados por dichos ácidos nucleicos. (Véase, p.ej., Miyazono, et al., documento US 6.534.476.)

Los inhibidores del receptor de BMP incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos para, variantes negativas dominantes de, ARNip o ácidos nucleicos antisentido, o moléculas pequeñas que se dirigen a los receptores de BMP. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero no se limitan a, DMH-1, dihidrocloruro de Dorsomorfina y LDN-193189 (disponible comercialmente, p.ej., de Tocris Biosciences).

Inhibidores de la ruta Hedgehog

Los inhibidores de la vía Hedgehog ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de la unión de Hedgehog a su receptor e inhibidores de proteínas de señalización aguas abajo de Hedgehog (p.ej., Patched o Smoothened). Los ejemplos específicos de inhibidores de la ruta de Hedgehog incluyen ciclopamina, KAAD-ciclopamina, SANT-1, SANT-2, U18666A, JK184, GANT 58, GANT 61 y GDC-0449 (disponible comercialmente, p.ej., de Stemgent y Tocris Biosciences). Los inhibidores de la ruta Hedgehog también son descritos por Wu et al., en el documento WO 2006/050351. Los inhibidores adicionales incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos inmunogénicamente activos de los mismos, aptámeros peptídicos, una proteína de unión a Hedgehog o proteína que se une a una proteína señalizadora aguas abajo de Hedgehog, una molécula antisentido a un ácido nucleico Hedgehog o un ácido nucleico que codifica proteína de señalización aguas abajo de Hedgehog, una molécula de interferencia de ARN, un oligonucleótido de morfolino, un ácido péptidonucleico (PNA), una ribozima y un péptido.

Inhibidores de Notch

Los inhibidores de Notch ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de ligandos de Notch, inhibidores de activación de Notch e inhibidores de gamma-secretasa. Los ejemplos específicos de los inhibidores de la ruta de Notch incluyen DAPT, LY411575, L-685458, RO429097, MK-0752, MRK-003 y [11-endo]-N-(5,6,7,8,9,10-hexahidro-6,9-metanobenzo[a][8]anulen-11-il)-tiofeno-2-sulfonamida. (Véase, p.ej., Fan et al., *Cancer Res.*, 66:7445-52 (2006)). Los inhibidores adicionales incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales o policlonales (p.ej., contra Notch o contra ligandos de Notch) o fragmentos inmunogénicamente activos de los mismos, aptámeros peptídicos, una molécula antisentido para Notch, una molécula de interferencia de ARN, un oligonucleótido de morfolino, un

ácido nucleico peptídico (PNA), una ribozima y un péptido.

D. Marcadores

La diferenciación puede controlarse mediante la expresión de marcadores de diferenciación. Los marcadores de diferenciación típicos se pueden utilizar para la caracterización de las células de la invención. Por ejemplo, los marcadores de diferenciación cardíaca incluyen, p.ej., marcadores cardíacos de fase temprana Brachyury (T) y Mesp1; marcadores cardíacos de fase media Flk1, Nkx2.5, Isl1 y Gata-4; marcadores cardíacos de fase tardía Mlc2a, miosina (sarcomérica y MHCb) y cTroponina T. Los marcadores de células madre neurales incluyen Sox1 Pax6, PLZF, Sox2 y Dach1. Los marcadores para las neuronas diferenciadas incluyen Tuj1, MAP2, Dcx, Neurofilamento, NenN y Sinapsina. Los marcadores para los subtipos de neuronas diferenciadas incluyen TH, AchE, ChAT, serotonina, VGluT, Nurr1 y GABA. Los marcadores de astrocitos (células astrogiales) incluyen GFAP. Los marcadores de oligodendrocitos incluyen CNPasa, O1 y O4. Los marcadores de diferenciación pancreática incluyen, p.ej., marcadores pancreáticos de fase temprana o media: Sox17, Foxa2, HNF4a, HNF1b, HNF6, Pax6, Sox9; y marcadores pancreáticos de fase tardía: Pdx1, Nkx6.1, Nkx2.2, Isl1, MafA, péptido c e insulina.

Los métodos conocidos en la técnica se pueden utilizar para caracterizar las células de la invención. Los niveles de expresión génica pueden ser detectados mediante, p.ej., PCR en tiempo real o RT-PCR en tiempo real (p.ej., para detectar ARNm), y/o mediante transferencia Western u otras técnicas de detección de proteínas. Otras características de diferenciación celular tales como morfologías celulares asociadas con células madre diferenciadas también pueden utilizarse para la caracterización de las células de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula tiene una morfología de neurona, es decir, un cuerpo celular redondo que tiene proyecciones (axones/dendritas) mayores que 2 veces el diámetro del cuerpo celular. En algunas realizaciones, la célula tiene una morfología de cardiomiocito, es decir, células que tienen estriaciones cruzadas formadas por segmentos alternantes de actina y miosina.

E. Administración

Cualquiera de las células diferenciadas (alógenas o autólogas) como se describe en la presente memoria se puede introducir en un sujeto. Por ejemplo, las células se pueden suministrar a un tejido u órgano concretos de un sujeto que lo necesite, para mejorar o tratar una enfermedad o afección.

En algunas realizaciones, cuando se generan células cardíacas (p.ej., cardiomiocitos), las células pueden ser útiles para generar tejido cardíaco artificial, p.ej., para implantar en un sujeto mamífero. En algunas realizaciones, el método es útil para reemplazar tejido cardíaco dañado (p.ej., tejido cardíaco isquémico) y/o para estimular células madre endógenas o células somáticas no cardiomiocíticas residentes en el corazón para someterlas a cardiomiogénesis. Cuando un método implica la introducción (implantación) de un cardiomiocito en un individuo, se puede llevar a cabo un trasplante alógeno o autólogo.

Los individuos que necesitan tratamiento con células cardíacas (p.ej., cardiomiocitos) generadas como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, individuos que tienen un defecto cardíaco congénito; individuos que sufren de una afección que da como resultado tejido cardíaco isquémico, p.ej., individuos con enfermedad arterial coronaria; y similares. Un método sujeto es útil para tratar la enfermedad muscular degenerativa, p.ej., cardiomiopatía familiar, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva o enfermedad arterial coronaria con cardiomiopatía isquémica resultante.

Los individuos que necesitan tratamiento con células pancreáticas generadas como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, individuos que tienen diabetes tipo I o tipo II o que son pre-diabéticos o resistentes a la insulina.

Los individuos que necesitan tratamiento con células neuronales generadas como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, individuos que tienen daño nervioso, parálisis, etc.

Los individuos que necesitan tratamiento con células del epitelio pigmentado de la retina generadas como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, individuos que tienen degeneración macular (p.ej., degeneración macular relacionada con la edad), distrofia fotorreceptora o distrofia merTK.

Para la administración a un anfitrión mamífero, se puede formular como composición farmacéutica una población de cardiomiocitos, pancreática o neuronal (u otra célula que tenga un segundo destino celular como se describe en la presente memoria) generada utilizando un método sujeto. Una composición farmacéutica puede ser una solución, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa estéril, que comprende adicionalmente un vehículo fisiológicamente aceptable (es decir, un material no tóxico que no interfiera en la actividad del ingrediente activo). Se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica en una composición farmacéutica sujeto. La selección de un vehículo dependerá, en parte, de la naturaleza de la sustancia (es decir, células o compuestos químicos) que se esté administrando. Los vehículos representativos incluyen soluciones salinas fisiológicas, gelatina, agua, alcoholes, aceites naturales o sintéticos, soluciones de sacáridos, glicoles, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo o una combinación de tales materiales. Opcionalmente, una composición farmacéutica puede contener adicionalmente conservantes y/u otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos,

antioxidantes, agentes quelantes y/o gases inertes, y/u otros ingredientes activos.

En algunas realizaciones, una población de células que tiene el segundo destino celular, se encapsula de acuerdo con tecnologías de encapsulación conocidas, incluyendo la microencapsulación (véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350). Cuando las células se encapsulan, en algunas realizaciones, las células se encapsulan mediante macroencapsulación, como se describe, p.ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.284.761; 5.158.881; 4.976.859; 4.968.733; 5.800.828 y en la solicitud de patente PCT publicada WO 95/05452. En algunas realizaciones, una población celular que tiene un segundo destino celular está presente en una matriz.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden aplicar *in vitro* (p.ej., en cultivo) o parcial o completamente *in vivo*. En aplicaciones *in vivo*, en algunas realizaciones, se dirigen vectores, proteínas y/o moléculas pequeñas a una o más células diana en el organismo de manera que se incrementen uno o más factores de reprogramación en las células diana para generar una célula menos diferenciada. Alternativamente, tales células menos diferenciadas pueden ser generadas *in vitro* y a continuación suministradas a un tejido u órgano diana. En algunos aspectos, la célula menos diferenciada resultante está presente en un tejido u órgano y se induce su diferenciación al segundo destino celular debido, al menos en parte, a señales endógenas del propio tejido u órgano. Alternativamente, las células menos diferenciadas se pueden diferenciar a las células que tienen el segundo destino celular, por ejemplo como se describe en la presente memoria, aunque *in vivo*.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

20 Ejemplo 1: Reprogramación directa de fibroblastos a un destino cardíaco

Resumen

Los autores de la presente invención muestran aquí que la reprogramación convencional hacia la pluripotencia - que expresa de manera anormalmente alta Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc - puede representar un atajo y se puede dirigir a la cardiogénesis de una manera rápida y eficaz. Con tan solo cuatro días de expresión transgénica, los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se pueden reprogramar directamente a parches de cardiomiocitos diferenciados que se contraen espontáneamente durante un período de 11-12 días. Varias líneas de evidencia sugieren que un no está implicado un intermedio pluripotente. El método de los autores de la presente invención representa una estrategia única que permite que un estado de desarrollo transitorio y plástico establecido al principio de la reprogramación sirva eficazmente como una plataforma de transdiferenciación celular, cuya utilidad probablemente se extiende más allá de la cardiogénesis. El estudio de los autores de la presente invención tiene implicaciones potencialmente amplias para la reprogramación basada en factores iPSC y amplía el paradigma existente.

Introducción

El corazón de los mamíferos carece de una capacidad regenerativa significativa. La generación *in vitro* de células cardíacas autólogas para trasplante es un área de estudio clave para el tratamiento eficaz de la enfermedad cardíaca. Un informe reciente de la transdiferenciación satisfactoria de células somáticas a un destino cardíaco *in vitro* (Ieda, M. et al., Cell 142, 375-86 (2010)) ha planteado la posibilidad de que este proceso eventualmente pueda ser utilizado para la terapia cardíaca basada en células. Sin embargo, primero se debe mejorar la velocidad y la eficacia, especialmente si el objetivo final es proporcionar una alternativa más rápida y segura a la re-diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas autólogas (iPSC) (Schenke-Layland, K. et al., Stem Cells 26, 1537-46 (2008)).

Los autores de la presente invención y otros autores en el campo de la reprogramación a menudo han observado la aparición muy rara pero generalmente reproducible de varios tipos de células diferenciadas terminalmente, que incluyen colonias cardíacas que se contraen espontáneamente, durante las etapas posteriores de la formación de iPSC. A la luz de estas observaciones, y debido a que la pluripotencia inducida se establece de manera escalonada y estocástica (Hanna, J. et al., Nature 462, 595-601 (2009)); Stadtfeld, M. et al., Cell Stem Cell 2, 230-40 (2008)), los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que podría ser posible modificar el proceso de reprogramación para favorecer tales resultados alternativos. Los autores de la presente invención razonaron que al proporcionar las señales de desarrollo apropiadas después de una "fase de activación" epigenética inicial se podría permitir secuestrar la reprogramación convencional en esta fase temprana e inestable, y desplazar específicamente el resultado hacia la cardiogénesis.

Resultados

La reprogramación de tres factores es suficiente para activar el programa cardíaco temprano

Para probar la validez de la hipótesis de los autores de la presente invención y medir la viabilidad técnica, los autores de la presente invención transdujeron viralmente MEF que albergaban un informador Nebulette-LacZ expresado solo en el miocardio naciente (Cai, C.L. et al., Development 132, 2475-87 (2005)) con los cuatro factores

Yamanaka (Takahashi, K. y Yamanaka, S., Cell 126, 663-76 (2006)) y controlaron colorimétricamente la cardiogénesis temprana. Los autores de la presente invención modificaron el medio de reprogramación convencional eliminando el factor inhibidor de leucemia (LIF) para evitar la generación y/o mantenimiento de células pluripotentes. Los autores de la presente invención también probaron diferentes membranas basales (gelatina, fibronectina, Matrigel o Geltrex) y la adición de suero bovino fetal (FBS) a concentraciones de 1-15% para aumentar la viabilidad celular y/o las propiedades cardio-inductivas del medio. Cuando las células se cultivaron en Matrigel o Geltrex en medio sin LIF que contenía FBS al 5%, los autores de la presente invención observaron una expresión de β -galactosidasa transitoria (≤ 2 días) pero ampliamente difundida (aproximadamente 50%) en colonias nacientes después de una semana. Es importante destacar que la omisión sistemática de los factores del cóctel viral reveló que c-Myc era prescindible, es decir, la transducción de tres factores funcionó igualmente bien (Fig. 1a).

La inducción de la contracción espontánea requiere la señalización del factor de crecimiento y se potencia con una molécula pequeña

Tras iniciar con éxito el programa cardiogénico temprano en MEF, los autores de la presente invención intentaron a continuación inducir una activación robusta de la expresión génica cardíaca de fase intermedia y, en última instancia, generar parches de células cardíacas que se contraen espontáneamente, un distintivo de diferenciación terminal que se observa y cuantifica fácilmente. Para este fin, los autores de la presente invención trataron MEF transducidos de tres factores con medios químicamente definidos (CDM) así como citocinas y moléculas pequeñas que podrían potenciar la cardiogénesis regulando la actividad de la ruta de TGF β , proteína morfogenética ósea (BMP), Hedgehog, Wnt o Notch. Los tratamientos se realizaron individualmente y combinados, y en diferentes momentos durante el proceso de reprogramación. A pesar de la inadecuación general del protocolo resultante para la generación de iPSC, los autores de la presente invención también exploraron si la inhibición por molécula pequeña de JAK-STAT (transductor de señal de quinasa de Janus y activador de la transcripción), PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) o la señalización Wnt durante las fases tempranas del protocolo pueden aumentar la eficacia de la cardiomiogénesis al evitar incluso que se forme un pequeño número de iPSC intermedias. Finalmente, los autores de la presente invención experimentaron con una transición más gradual entre los diferentes medios mediante la reducción de la concentración de FBS paso a paso en incrementos de 1-4% durante 3-6 días (inmediatamente antes de cambiar a CDM). Después de varias rondas de experimentación empleando muchas combinaciones diferentes, los autores de la presente invención determinaron que las siguientes condiciones eran las más eficaces: las células se expusieron por primera vez a medios de reprogramación que contenían FBS al 15% y sustituto de suero inactivado (KSR) al 5% durante seis días, seguido de un cambio a FBS al 1% y KSR al 14% durante tres días. Durante este período inicial de nueve días, el inhibidor de JAK de molécula pequeña JI1 se mantiene continuamente en el medio a una concentración de 0,5 μ M. A partir del día nueve en adelante, las células se cultivan en CDM, con el factor de crecimiento cardioinductor BMP4 (Snyder, A. et al., J Cell Biochem 93, 224-32 (2004)) a 20 ng/ml durante los primeros cinco días (Fig. 1b).

Utilizando la transducción de tres factores con las condiciones anteriores, los autores de la presente invención observaron la expresión robusta de los marcadores cardíacos de fase media (Martin-Puig, S. et al., Cell Stem Cell 2, 320-31 (2008)) Fik1, Nkx2.5 y Gata-4 comenzando los días 9-10 (Fig. 1c). Se observaron marcadores de fase tardía que incluían troponina T cardíaca, cadena pesada de miosina sarcomérica y α -actinina desde el día 11 en adelante. Simultáneamente, la tinción de Conexina-43 se hizo evidente a lo largo de la periferia de muchas células. Curiosamente, independientemente del momento en el que se realizó ICC, solo detectamos la isoforma auricular de la cadena ligera de miosina (Mlc-2a), lo que indica que los cardiomiocitos que se estaban generando eran en su mayoría, si no exclusivamente, del subtipo auricular (Fig. 1d). Las primeras contracciones espontáneas similares a ondas también comenzaron el día 11, y muchas colonias se vieron forzadas a contraerse en su totalidad hacia el día 15. Aunque no es absolutamente necesario, BMP4 parece ser la principal fuerza impulsora detrás del desarrollo robusto del latido: de promedio, su adición aumentó la formación de parches en contracción casi 150 veces (149 ± 13 parches por 100.000 MEF cultivados en placa, $n = 6$). Sorprendentemente, la aplicación secuencial del inhibidor de JAK JI1 y BMP4 puede aumentar aún más el número de parches en contracción: Los autores de la presente invención han obtenido hasta 317 parches en contracción independiente por 100.000 MEF cultivados en placa hacia el día 21 (media = 257 ± 17 , $n = 6$; Fig. 2a). Bajo estas condiciones, la incidencia de latidos en términos del número total de colonias podría ser tan alta como 90% (media = $79 \pm 4\%$, $n = 5$; Fig. 2b). La naturaleza espectacular de este cambio y la omnipresencia del resultado cardiogénico fueron especialmente evidentes en los análisis microscópicos de todos los pocillos, en los que todas las colonias grandes de un pocillo se podían observar expresando altos niveles de cTnT y contrayéndose espontáneamente el día 18. Por el contrario, no expresaron niveles por encima del fondo de Nanog-GFP en el mismo punto temporal (Fig. 2c).

JI1 fue el más eficaz cuando se aplicó de forma continua durante los primeros nueve días, período durante el cual podría haber una remota posibilidad de generar iPSC intermedias debido al uso de factores de Yamanaka (Fig. 1b). En consecuencia, su eficacia disminuye con períodos de tratamiento más cortos; sin embargo, la extensión del tratamiento con JI1 más allá de los nueve días hasta solaparse a la aplicación de CDM y BMP4 también parece ser contraproducente (datos no mostrados). Esta última observación es respaldada por un requisito referido recientemente para la señalización de JAK-STAT en la cardiomiogénesis (Snyder, M. et al., J Biol Chem 285, 23639-46 (2010)). En el caso de BMP4, cinco días de tratamiento fueron óptimos (Fig. 1b); los períodos de tratamiento tanto más cortos como más largos resultaron ser perjudiciales para el desarrollo de colonias cardíacas palpitantes (datos no mostrados). Si bien su función precisa en la diferenciación cardíaca directa aún no se ha aclarado, es muy

probable que BMP4 impulse la inducción cardíaca a partir de precursores nacientes durante una ventana de desarrollo crítica (Cohen, E.D. et al., *Development* 135, 789-98 (2008)); Klaus, A. y Birchmeier, W., *Pediatr Cardiol* 30, 609-16 (2009)). Se podría especular adicionalmente que el efecto cardioinductor del tratamiento con JI1 podría ser el resultado de una expansión indirecta de este grupo de precursores: al evitar que las células ceben para la pluripotencia inducida, un número mayor podría estar disponible para que BMP4 actúe y se ceba para la cardiogénesis.

La transdiferenciación produce un número sustancial de cardiomiocitos altamente diferenciados y funcionalmente sensibles

Aunque el número de colonias en contracción sirve como una medida muy conveniente para las comparaciones entre muestras del éxito y la eficacia de la reprogramación, no permite una cuantificación del rendimiento de cardiomiocitos individuales. Con este fin, los autores de la presente invención utilizaron la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) los días 0, 10 y 18, examinando poblaciones cardíacas tanto precursoras (Isl1⁺, Nkx2.5⁺) como más maduras (cTnT⁺). Se observó un aumento modesto para los tres marcadores hacia el día 10, con aumentos significativos hacia el día 18. Las células Isl1⁺ y Nkx2.5⁺ no aumentaron en la misma medida que las células cTnT⁺, presumiblemente debido a que las primeras se expresan más fuertemente durante las primeras etapas del desarrollo cardíaco (Qyang, Y. et al., *Cell Stem Cell* 1, 165-79 (2007)). Sorprendentemente, casi 40% (39 ± 2%, n = 5) de las células se habían convertido en cTnT⁺ en el último punto temporal (Fig. 2d). En base a estos datos, el rendimiento final de células cTroponina T⁺ se estimó de manera conservadora en 120000 por 100.000 MEF cultivados en placa o 1,2 cardiomiocitos por fibroblasto (100.000 MEF de partida se tradujeron de manera reproducible en una cosecha a los 18 días de aproximadamente 300.000-350.000 células totales).

Para examinar más de cerca el grado de diferenciación entre la población de células en contracción, los autores de la presente invención examinaron su frecuencia de latido, los patrones de flujo de calcio y la respuesta a los agentes cronotrópicos. La frecuencia de contracción de los cardiomiocitos el día 18 varió de un mínimo de 4 latidos por minuto (BPM) (datos no mostrados) a un máximo de 130 BPM. Si bien este patrón implicaba un amplio intervalo de desarrollo/diferenciación, la última observación sugería que al menos un subconjunto de cardiomiocitos estaba adquiriendo rasgos altamente diferenciados (Kuzmenkin, A. et al., *FASEB J* 23, 4168-80 (2009)). Por consiguiente, muchos parches en contracción exhibieron tránsitos de calcio característicos (Ieda, M. et al., *Cell* 142, 375-86 (2010)); Shah, A.P. et al., *Cardiovasc Res* 87, 683-93 (2010)) (Fig. 3a) (Stieber, J. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15235-40 (2003)), cuya frecuencia podría modularse reversiblemente con isoproterenol 1 μM o carbacol 10 μM, indicando una respuesta adecuada a la señalización β-adrenérgica y muscarínica, respectivamente (Kuzmenkin, A. et al., *FASEB J* 23, 4168-80 (2009)) (Fig. 3b). La adición de isoproterenol aumentó significativamente la frecuencia de los tránsitos de calcio espontáneos y acortó el período de decaimiento (τ), mientras que el carbacol tuvo los efectos opuestos (Fig. 3c). El número total de colonias en contracción se estabilizó consistentemente más allá del día 18, pero la mayoría de las colonias continuaron contrayéndose mucho más allá del punto final de los ensayos de los autores de la presente invención (día 21), contrayéndose algunos parches todavía después de cinco semanas (datos no mostrados).

A continuación, los autores de la presente invención disociaron enzimáticamente los parches en contracción en cardiomiocitos individuales y llevaron a cabo mediciones electrofisiológicas (Fig. 3d). Los potenciales de acción espontáneos (AP) generados en estas células se asemejaban mucho a los AP "de tipo auricular" (y en menor medida a los "de tipo marcapasos") referidos en otros lugares (Stieber, J. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15235-40 (2003)), con un potencial diastólico medio (MDP) de -61,0 ± 1,2 mV y un sobreimpulso promedio de 13,9 ± 4,9 mV (n = 3). Como tales, estos datos corroboran los resultados de inmunocitoquímica que sugieren un fenotipo principalmente auricular para los cardiomiocitos que se están generando (Fig. 1d).

Cabe destacar que los autores de la presente invención han observado repetidamente un pequeño número de células individuales en contracción que muestran tinción de troponina T cardíaca característica incluso antes de la disociación enzimática, lo que indica que los cardiomiocitos nacientes pueden diferenciarse, y tal vez surgir, fuera del contexto o "nicho" de una colonia en desarrollo (Fig. 1e). Tal fenómeno sugeriría que un subconjunto de células podría estar tomando una ruta de transdiferenciación más directa (es decir, quizás no tienen que depender de señales extracelulares de células vecinas en la colonia), una hipótesis coherente con la naturaleza estocástica de la reprogramación inducida por factores de Yamanaka.

A continuación, los autores de la presente invención llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar la naturaleza y el alcance de ciertos cambios epigenéticos que tienen lugar en cuatro loci: *Oct4*, *Actn2* (que codifica α-actinina), *Ryr2* (que codifica el receptor de rianodina cardíaca), y *Tnnt2* (que codifica Troponina T cardíaca). Se examinaron los niveles relativos de trimetilación de la lisina 4 (H3K4me3) y la lisina 27 (H3K27me3) en la histona H3 en las regiones promotoras de estos genes. Como era de esperar, debido a la fuerte expresión exógena de los factores de Yamanaka durante la parte inicial del protocolo, los autores de la presente invención observaron un estallido inicial de activación de H3K4me3 (con una disminución concomitante de H3K27me3) en el promotor *Oct4* hacia el día 10, seguido de un retorno al estado reprimido dominado por H3K27me3 observado en los MEF iniciales hacia el día 19 (Fig. 4a). Los promotores de los tres genes cardíacos, todos los cuales se expresan en las fases posteriores de la cardiomiogénesis, también exhibieron enriquecimiento en H3K4me3 el día 10, pero a diferencia de *Oct4*, esta tendencia no se detuvo ni se revirtió; hacia el día 19, el

enriquecimiento en H3K4me3 era extenso en comparación con los MEF iniciales. Sorprendentemente, incluso superó los niveles encontrados en cardiomiocitos derivados de mESC (Fig. 4a). Al mismo tiempo, los niveles de H3K27me3 represiva en los loci cardíacos habían caído muy por debajo de los niveles iniciales en fibroblastos, y se acercaban a los de los cardiomiocitos de control.

5 **Los cardiomiocitos transdiferenciados muy probablemente no surgen de los precursores cardíacos contaminantes o iPSC intermedias**

Para descartar la posibilidad de que los parches palpitantes puedan estar surgiendo de células precursoras cardíacas multipotentes raras en los cultivos de MEF de los autores de la presente invención, los autores de la presente invención sometieron a ensayo su método en fibroblastos de punta de cola (TTF), una fuente mucho más homogénea de fibroblastos que no contiene ninguna célula cardíaca. Puesto que las células postnatales y adultas son más refractarias a la reprogramación (Markoulaki, S. et al., Nat Biotechnol 27, 169-71 (2009)), fue necesario utilizar los cuatro factores de reprogramación, incluyendo c-Myc, para inducir la formación de colonias cardíacas. Sorprendentemente, el día 12 - sólo un día más tarde que cuando se utilizaron los MEF - los autores de la presente invención observaron un pequeño número de colonias que comenzaba a contraerse. A pesar de esta sorprendente similitud en el tiempo, el número de parches palpitantes generado por 100.000 células cultivadas en placa (115 ± 7 , $n = 6$) fue menor que el rendimiento de los MEF reprogramados en las mismas condiciones (145 ± 6 , $n = 6$; $p < 0,01$).

Las condiciones utilizadas en el protocolo de los autores de la presente invención no son conducentes al establecimiento o mantenimiento de iPSC (Blelloch, R. et al., M., Cell Stem Cell 1, 245-7 (2007)). Los autores de la presente invención no utilizan células alimentadoras o LIF, y cambian a medios químicamente definidos que contienen moléculas cardiogénicas al inicio del protocolo. Lo más importante, incluso con la transducción de tres factores, los primeros parches en contracción aparecen en el plazo de 12 días, un período mucho más corto que el mínimo requerido de aproximadamente tres semanas para generar iPSC con los tres factores (Nakagawa, M. et al., Nat Biotechnol 26, 101-6 (2008)); Wernig, M. et al., Cell Stem Cell 2, 10-2 (2008)). Sorprendentemente, la reprogramación cardíaca de los TTF también avanza al mismo ritmo, aunque normalmente se esperaría que esas células obtenidas posnatalmente se reprogramaran más lentamente (Okada, M. et al., Biochim Biophys Acta 1800, 956-63 (2010)). A pesar de estas consideraciones, los autores de la presente invención intentaron descartar de forma más rigurosa la posibilidad de que su método pudiera depender de la generación de un intermedio pluripotente transitorio, cuya rediferenciación podría dar lugar a cardiomiocitos.

En primer lugar, los autores de la presente invención razonaron que si la generación de iPSC antes del cambio a CDM era crítica, el uso de medios de reprogramación convencionales con LIF durante los primeros nueve días debería producir un mayor número de colonias en contracción. Sin embargo, esta sustitución en realidad dio como resultado un retraso de cuatro días en el inicio del latido y un descenso de ~25 veces en el número de colonias palpitantes (Fig. 4b). Una consecuencia crítica de este resultado es que los primeros eventos de reprogramación, provocados principalmente por la expresión anormalmente alta de los factores de Yamanaka, parecen estar generando una población heterogénea de células con un potencial de desarrollo diverso, ya que incluso los medios de reprogramación convencionales permiten la generación de un muy pequeño número de progenitores cardíacos. Adicionalmente, las condiciones que favorecen el desarrollo de iPSC deben hacerlo a expensas de otros resultados potenciales del proceso de reprogramación: aunque marginalmente permisivos, los medios de reprogramación convencionales son una opción muy pobre para el inicio de la reprogramación cardíaca directa.

40 **La inducción prolongada del programa de pluripotencia inhibe la transdiferenciación**

En segundo lugar, la rápida inducción de latidos sugiere que las decisiones de compromiso de linaje se toman bastante temprano. Los autores de la presente invención especularon que los factores de reprogramación (especialmente Oct4) funcionan principalmente para "borrar" la identidad celular por mecanismos epigenéticos, y no activan directamente genes específicos del linaje. Por el contrario, la exposición a señales externas específicas del corazón (en este caso, el tratamiento con BMP4) probablemente tenga uno o varios papeles en la especificación temprana del linaje y/o la inducción de la diferenciación terminal. En cualquier caso, la expresión anormalmente alta de los factores de reprogramación solo debe requerirse transitoriamente para permitir la activación de las redes de genes específicas del linaje, con una expresión prolongada que es probable que sea perjudicial. Para probar esta hipótesis, los autores de la presente invención generaron MEF secundarios que albergaban transgenes inducibles por doxiciclina (Wernig, M. et al., Nat Biotechnol 26, 916-24 (2008)) e informador Nanog-GFP (Hanna, J. et al., Cell 133, 250-64 (2008)) para controlar el establecimiento de la pluripotencia (Silva, J. et al., Cell 138, 722-37 (2009)). Sorprendentemente, solo cuatro días de tratamiento con doxiciclina fueron suficientes para inducir el latido el día 11. La duración óptima del tratamiento farmacológico fue de cinco a seis días, no produciendo un tratamiento de más de nueve días ninguna célula cardíaca (Fig. 4d). Por el contrario, la generación de colonias de iPSC que utilizan este sistema particular requiere un mínimo de 12 días de inducción transgénica (Wernig, M. et al., Nat Biotechnol 26, 916-24 (2008)); Brambrink, T. et al., Cell Stem Cell 2, 151-9 (2008)). Incluso el requisito más corto de expresión de transgenes notificado hasta la fecha es de siete a ocho días (Stadtfeld, M. et al., Nat Methods 7, 53-5 (2010)). En resumen, la reprogramación cardíaca óptima requiere que los transgenes se inactiven mucho antes de que la pluripotencia se pueda establecer endógenamente.

60 Los autores de la presente invención también sometieron a ensayo su protocolo sobre mESC para establecer si

tenía un efecto cardiogénico sobre las células pluripotentes. La sustitución de mESC en cultivos de 0, 3, 6 o 9 días en el protocolo de los autores de la presente invención no produjo ningún parche en contracción hacia el día 21 o más allá, lo que indica que su protocolo no pudo provocar el desarrollo de colonias cardíacas de iPSC, incluso si surgieron durante el proceso de reprogramación directa (Fig. 4c). En resumen, estos resultados demuestran que el establecimiento de la pluripotencia genuino durante el protocolo de los autores de la presente invención constituiría de hecho una fuerte barrera para la reprogramación cardíaca satisfactoria.

La transdiferenciación cardíaca y la generación de iPSC representan procesos paralelos que no se solapan

En tercer lugar, los resultados de RT-PCR cuantitativa muestran que el programa cardiogénico ya está en marcha los días 4-6, como lo indica la expresión robusta de los transcritos de *Mesp1* y *GATA4* (Fig. 5a). Los autores de la presente invención observaron que la aleatoriedad y la asincronía inherentes a la reprogramación tal vez daban como resultado una población heterogénea de células del mesodermo cardíaco y, a su vez, una mayor variación entre muestras. Por el contrario, los niveles de transcritos del factor de reprogramación disminuyen precipitadamente después de la extracción de doxiciclina y, en general, permanecen muy bajos. Los transcritos de *Nanog* endógenos no son detectables hasta los días 8-9, y a niveles muy bajos (Fig. 5b). En consecuencia, la mayoría de las colonias no expresan ningún *Nanog*-GFP en absoluto; solo un pequeño subconjunto muestra niveles de fluorescencia escasamente por encima del fondo, comenzando los días 9-12 (datos no mostrados). Por lo tanto, cualquier activación de bajo nivel de *Nanog* coincide con la expresión temprana de marcadores cardíacos maduros tales como la isoforma β de la cadena pesada de miosina (*MHC β*) y el inicio de la contracción espontánea el día 11 (Fig. 5a). Aunque esta activación simultánea de los marcadores de iPSC y cardiomiocitos de fase tardía descarta de manera eficaz la posibilidad de que el primero pueda de alguna manera dar lugar a este último, los autores de la presente invención intentaron demostrar definitivamente que el desarrollo de la contracción espontánea no requiere la activación de la red de pluripotencia endógena. Para lograr esto, los autores de la presente invención tomaron fotografías diarias de un gran número de células sometidas a reprogramación directa y evaluaron retrospectivamente la expresión de *Nanog*-GFP en colonias que finalmente comenzaron a contraerse. No es de extrañar que descubrieran que estas colonias no habían expresado ni siquiera cantidades diminutas de *Nanog*-GFP en ningún momento durante su formación o diferenciación (Fig. 5c).

Los análisis FACS de células *SSEA-1*⁺ y *Nanog*⁺ los días 0, 10 y 18 corroboraron los resultados anteriores: incluso el día 18, las células *Nanog*⁺ solo comprendían 1% de la población. Las células *SSEA-1*⁺ formaron una fracción similarmente pequeña de las células el día 18. El día 10, estas últimas células representaron cerca de 10% de la población (Fig. 2d). Sin embargo, dado que *SSEA-1* es uno de los primeros marcadores inducidos sobre la expresión anormalmente alta de factores de Yamanaka (Stadtfeld, M. et al., *Cell Stem Cell* 2, 230-40 (2008)) - y de hecho se expresa en un intervalo de células precursoras diferenciadas (Anjos-Afonso, F. y Bonnet, D., *Blood* 109, 1298-306 (2007); Koso, H. et al., *Dev Biol* 292, 265-76 (2006)) - no es un marcador de pluripotencia genuino. Esta noción es especialmente válida dada la falta de expresión de *Nanog* concomitante (Silva, J. et al., *Cell* 138, 722-37 (2009)) y el precipitado declive de la población *SSEA-1*⁺ hacia el día 18. Los autores de la presente invención suponen que los niveles más altos hacia el día 10 pueden ser el resultado de una regulación a la baja demorada de *SSEA-1* inducida exógenamente después de la retirada de dox.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que cualquier célula similar a iPSC generada en el protocolo de los autores de la presente invención es un subproducto menor y muy probablemente no contribuya a la formación de cardiomiocitos. La observación de que la inhibición de la ruta JAK-STAT por *Ji1* puede desplazar el equilibrio considerablemente a favor de la cardiomiogénesis constituye una fuerte evidencia de que la relación entre iPSC y la formación de cardiomiocitos es de suma cero, es decir, que representan resultados mutuamente excluyentes.

Discusión

Los autores de la presente invención han demostrado que la reactivación breve de factores de reprogramación en fibroblastos embrionarios y adultos se puede utilizar para generar rápidamente cardiomiocitos en contracción - casi con seguridad sin pasar por un intermedio pluripotente. En comparación con la transdiferenciación por expresión anormalmente alta del factor específico del linaje, el protocolo de los autores de la presente invención es casi tres veces más rápido: las primeras contracciones espontáneas comienzan después de 11 días frente a 4-5 semanas (Ieda, M. et al., *Cell* 142, 375-86 (2010)). Por otra parte, la eficacia en términos de rendimiento de los cardiomiocitos *cTnT*⁺ es varias veces mayor: los autores de la presente invención han obtenido aproximadamente 1,2 células *cTnT*⁺ para cada fibroblasto cultivado en placa (contra un máximo estimado de 0,2) (Ieda, M. et al., *Cell* 142, 375-86 (2010)). Esta última hazaña es muy posible gracias a la generación de células precursoras mitóticamente activas similares a las progenitores cardiovasculares multipotentes *Isl1*⁺ (MICP) (Qyang, Y. et al., *Cell Stem Cell* 1, 165-79 (2007)), como sugieren los datos de expresión génica. Es tentador especular que estas células intermedias, si se aíslan y estabilizan con éxito en cultivo, con el tiempo podrían convertirse en una fuente ampliable y renovable no solo para los cardiomiocitos, sino también para muchas otras células cardiovasculares terminalmente diferenciadas.

El procedimiento que han descubierto los autores de la presente invención tiene un gran parecido con la formación de regeneración de blastema en el pez cebra y las ranas, durante el cual se establece la etapa de transdiferenciación mediante la expresión transitoria de bajo nivel de los factores de pluripotencia (especialmente *Oct4* y *Sox2*) en lugar de un restablecimiento de la pluripotencia (Christen, B. et al., *BMC Biol* 8, 5 (2010)). Si bien

esto sugiere que los dos procesos podrían compartir un mecanismo común, la confirmación de esta hipótesis requerirá una comprensión más detallada de los fundamentos moleculares de la reprogramación y sus diversas fases intermedias (Stadtfeld, M. et al., *Cell Stem Cell* 2, 230-40 (2008)). El papel clave aquí para los factores de reprogramación es probablemente la inducción de un estado de cromatina abierto, evolutivamente más pluripotente, marcado por una alta inestabilidad epigenética (Meshorer, E. et al., *Dev Cell* 10, 105 - 16 (2006).); Hochedlinger, K. y Plath, K., *Development* 136, 509-23 (2009)); Artyomov, M.N. et al., *PLoS Comput Biol* 6, e1000785). Las poblaciones intermedias altamente inestables pueden dar lugar a una multitud de tipos celulares a medida que se "relajan" rápidamente a estados epigenéticamente más estables, entre los cuales la pluripotencia es uno de los muchos resultados posibles (Fig. 6). Este modelo subraya la versatilidad y el potencial únicos del esquema de transdiferenciación de los autores de la presente invención en comparación con la expresión anormalmente alta del factor de transcripción específico del linaje, es decir, la probabilidad de que los precursores y/o tipos de células totalmente diferenciados de muchos linajes diferentes puedan obtenerse simplemente mediante el uso de diferentes señales inductivas. Por lo tanto, para la generación de tejido autólogo, la transdiferenciación ofrece una alternativa potencialmente muy atractiva a la metodología iPSC más bien tortuosa.

15 **Material y métodos**

Cultivo celular y medios: Todos los MEF (129S2/SvPasCrif) se obtuvieron de acuerdo con los protocolos de WiCell (https://www.wicell.org/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=687). Los TTF fueron una amable donación del Dr. Hans Schöler. Los MEF secundarios se obtuvieron como se describió previamente (Wernig, M. et al., *Nat Biotechnol* 26, 916-24 (2008)). Todos los resultados se obtuvieron inicialmente y se confirmaron con los MEF Nebulette-LacZ; para asegurar la reproducibilidad y minimizar la variación inter-experimental, los resultados referidos provienen casi exclusivamente de experimentos que utilizan MEF secundarios inducibles por dox utilizando el período de inducción óptimo. Los MEF inicialmente se pasaron en placas de cultivo tisular recubiertas con gelatina (0,1% durante 2 horas a 37°C) en DMEM con un suplemento de SFB al 10%, Glutamax 2 mM y NEAA 0,1 mM (todos los componentes de Invitrogen, Carlsbad, CA). Antes de la transducción viral, las células se sembraron en placas recubiertas con Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) o Geltrex (Invitrogen) (1:40, durante la noche a 4°C) a $3,5 \times 10^4$ células por pocillo de una placa de seis pocillos (7×10^4 células para TTF) en el mismo medio. De 12 a 24 horas después de la adición del virus, las células se lavaron con PBS y se cambiaron a medios de reprogramación: DMEM inactivado con sustituto de suero inactivado al 1-15%, FBS calificado con ES al 1-15%, Glutamax al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, B-mercaptoetanol 0,1 mM y nucleósidos calificados con ESC al 1% (todos los componentes de Invitrogen excepto los nucleósidos, Millipore, Billerica, MA). Cuando se requirió para un experimento de control, también se agregó LIF (Millipore) a 10^3 unidades ml^{-1} . A los tiempos indicados, las células se lavaron de nuevo con PBS y se cambiaron a CDM: RPMI-1640 con un suplemento de 0,5xN2, 1x B27 (sin vitamina A), fracción V de BSA al 0,05%, Glutamax al 0,5% y β -mercaptoetanol 0,1 mM (todos los componentes de Invitrogen). Se añadieron BMP4 (Stemgent, San Diego, CA) y/o JI1 (EMD, San Diego, CA) en múltiples puntos temporales para diferentes duraciones. Se añadieron medios de nueva aportación al menos una vez cada 48 horas a lo largo de todos los experimentos. Para la reprogramación inducible de los MEF secundarios, se utilizaron 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dox, con la excepción de los experimentos de inducción de cuatro días, en los que los primeros dos días de tratamiento se realizaron a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Empaquetamiento retroviral y transducción: Los retrovirus que codificaban *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, y *c-Myc* se envasaron individualmente en células PLAT-E utilizando vectores basados en pMX (Addgene, Cambridge, MA) y se llevaron a cabo infecciones tal como se describió previamente (Takahashi, K. et al., *Nat Protoc* 2, 3081-9 (2007)).

Ensayos LacZ: se detectó la expresión de Nebulette-LacZ *in situ* utilizando un kit de tinción de beta-galactosidasa (Stratagene, San Diego, CA).

Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia: Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 15 minutos, se lavaron tres veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubaron en PBS que contenía Triton X-100 al 0,3% (Sigma-Aldrich) y suero de burro al 5% (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las incubaciones de anticuerpos primarios se realizaron durante la noche a 4°C: troponina T cardíaca (CT3, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; 1:1.000); Fik1 (AF-644, R&D Systems, Minneapolis, MN; 1:100); Gata4 (sc-25310, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:200); Cadena pesada de miosina (MF20, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:200); Nkx2.5 (sc-8697, Santa Cruz, 1:200); Mlc2v (también conocida como Myl7; sc-34488, Santa Cruz, 1:50); Conexina-43 (610061, BD Biosciences, 1:100) y α -actinina (NBP1-40428, Novus, Littleton, CO; 1:100). Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados con Alexa Fluor (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente y los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich). Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio Zeiss AX10 equipado con una cámara AxioCam HRm y se procesaron utilizando el soporte lógico Axiovision 4.7.1. Los experimentos de rastreo de colonias y las imágenes microscópicas de todos los pocillos se realizaron en un sistema Pathway 435 (BD Biosciences).

PCR cuantitativa: Para cada muestra/punto temporal, se extrajo el ARN total de dos pocillos de una placa de seis pocillos utilizando el RNeasy Plus Mini Kit con columnas Qiashredder (Qiagen, Alemania), después de lo cual se sometió a transcripción inversa 1 μg de ARN con el iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Todas las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron por duplicado en un sistema CFX96 con iQ SYBR Green Supermix

(Bio-Rad), utilizando una vigésima parte de una reacción de ADNc por réplica. Los datos de expresión se normalizaron con respecto a los niveles de transcrito de proteína L7 ribosómica. Cada conjunto de reacciones se repitió utilizando ADNc de al menos tres experimentos independientes. Las secuencias de cebadores y los detalles de las condiciones de amplificación están disponibles a demanda.

5 **PCR cuantitativa de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-qPCR):** Se realizó la ChIP utilizando un kit Magna ChIP G disponible comercialmente (Millipore). Brevemente, las histonas y el ADN se entrecruzaron mediante incubación en formaldehído al 1%. La cromatina se sometió a sonicación a continuación a una longitud de fragmento de ADN promedio de 200 a 500 pb. Se incubaron cantidades iguales de cromatina soluble con y sin anti-IgG de conejo normal, anti-histona H3 lisina 4 trimetilada (Núm. 17-614, Millipore; 3 µl/reacción) o anti-histona H3 lisina 27 trimetilada (Núm. 17-622, Millipore, 4 µg/reacción) que se habían preincubado con anticuerpos secundarios conjugados con esferas magnéticas. Después de incubaciones de los anticuerpos durante la noche, se revirtió el entrecruzamiento de ADN-histona y los fragmentos de ADN se purificaron. Los fragmentos de ADN obtenidos sin anticuerpo se utilizaron como controles de entrada, mientras que los fragmentos de ADN obtenidos con IgG de conejo normal se aplicaron como controles negativos. Un microlitro de la solución de ADN resultante de cada condición se sometió a reacción de PCR en tiempo real. Las barras de error representan la desviación típica. Las secuencias de cebadores utilizadas están disponibles a demanda.

20 **Citometría de flujo:** Las células adherentes en las placas se lavaron con PBS y se disociaron con tripsina (Invitrogen), Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) o colagenasa II (Invitrogen) durante 10-45 minutos a 37°C. Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción helado (HBSS [Invitrogen] con HEPES 10 mM [Sigma], FBS al 2% [Invitrogen] y azida al 0,1% [Sigma]) y se aplicaron a través de coladores de una sola célula (BD Biosciences). La incubación con anticuerpos se realizó a 4°C durante 30 minutos en el volumen y las concentraciones sugeridas por el fabricante. Las células se lavaron tres veces con tampón de tinción y se fijaron en paraformaldehído al 4% de alta calidad (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron nuevamente con tampón de tinción y se contaron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el soporte lógico CellQuest (BD Biosciences). El análisis final se realizó más tarde con el soporte lógico FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-Fikl conjugado con APC (560070, BD Biosciences), anti-SSEA1 conjugado con PE (560142, BD Biosciences), anti-Nanog conjugado con Alexa647 (560279, BD Biosciences), anti-cTnT (ab10214, Abcam, Cambridge, MA) y anti-Nkx2.5 (sc-8697X, Santa Cruz). Los anticuerpos no marcados se conjugaron con PE o APC utilizando el kit de conjugación rápida LYNX apropiado (AbD Serotec, Alemania). Todos los experimentos incluyeron los controles de isotipo apropiados, conjugados utilizando los mismos kits que antes cuando fue necesario.

35 **Obtención de imágenes de calcio y pruebas de agentes cronotrópicos:** Las células se cargaron con Fluo-4-AM (5 µM, 30 min, 37°C) (F14201, Invitrogen), y se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview 1000 con una lente de inmersión en aceite 40X (apertura numérica 1.3). Se utilizó el modo de barrido de línea para medir los tránsitos de Ca²⁺ espontáneos a 37°C. El procesamiento de imágenes y el análisis de datos se realizaron como se describió previamente (Ouyang, K. et al., J Biol Chem 280, 15898-902 (2005)). Para la prueba del fármaco, todas las mediciones se repitieron 10 minutos después de la adición de isoproterenol (1 µM; Sigma) o Carbacol (10 µM; Sigma-Aldrich).

40 **Electrofisiología:** Los cúmulos de células en contracción se disociaron a 37°C durante 30-45 minutos utilizando 1 mg/ml de Colagenasa tipo II en medio RPMI-1640 con un suplemento de HEPES 10 mM y piruvato de sodio 5 mM (todos los reactivos de Invitrogen). Después de pipetear repetidamente para asegurar la disociación completa, se dejó que las células se adhirieran a cubreobjetos Biocoat recubiertos con fibronectina (BD Biosciences) durante la noche en medio Cor.At (Lonza, Alemania). Se realizaron registros de fijación de membrana "patch clamp", de una sola célula utilizando un amplificador Axopatch 200B y el soporte lógico pClamp 10.0 (HEKA Elektronik, Alemania), como se describió previamente (Ouyang, K. et al., J Biol Chem 280, 15898-902 (2005)). Los potenciales de acción espontáneos se registraron bajo condiciones de fijación de corriente "current clamp" de células completas con una resistencia de pipeta de fijación de membrana de 4-6 MΩ. La solución externa convencional contenía (en mM): NaCl 150, KCl 5,0, CaCl₂ 2,0, MgCl₂ 1,0, HEPES 10 y glucosa 10 (pH 7,4 ajustado con NaOH). La solución de pipeta intracelular contenía (en mM): KCl 150, NaCl 5,0, MgCl₂ 1,0, EGTA 2,0, MgATP 1,0, HEPES 10 (pH 7,2 ajustado con KOH). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-22°C).

Videos: Todos los videos fueron grabados utilizando una cámara digital Canon A650IS montada a medida en un microscopio Zeiss Axiovert 40C.

Estadística: Los valores de P para el propósito de las comparaciones de grupo se calcularon utilizando la prueba t de Student. La diferencias donde p <0,05 se consideraron significativas.

55 **Ejemplo 2: Reprogramación directa de células precursoras neurales a un destino cardíaco**

Las células precursoras neurales (NPC) transducidas con cuatro factores (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) pueden dar lugar a un pequeño número de colonias palpitantes en el plazo de 18 días. De promedio, se obtuvieron seis colonias palpitantes/50k células cultivadas en placa cuando se cambiaron directamente a medios de reprogramación después de la transducción viral (es decir, sin incubación durante la noche en medios NPC). El mantenimiento de las células

en medio NPC durante las primeras 24 horas después de la transducción solo dio como resultado la mitad del número de colonias, y éstas latieron más lentamente. Curiosamente, las NPC transducidas solo con tres factores (Oct4, Sox2 y Klf4) dieron lugar a muchas colonias de color rosad, presumiblemente islas de sangre hematopoyética.

Ejemplo 3: Reprogramación directa de fibroblastos a un destino neural

5 La técnica simple pero poderosa de pluripotencia inducida eventualmente puede suministrar una amplia gama de células diferenciadas para la terapia celular y el desarrollo de fármacos. Sin embargo, la preparación de células apropiadas a través de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) requiere la reprogramación de las células somáticas y la re-diferenciación posterior. Dado lo arduo y prolongado que puede ser este proceso, los autores de la presente invención intentaron determinar si sería posible convertir las células somáticas en células madre/progenitoras de linaje específico de otra capa germinal en una etapa, pasando por alto la fase pluripotente intermedia. Los autores de la presente invención muestran aquí que la inducción transitoria de los cuatro factores de reprogramación (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) puede transdiferenciar eficazmente fibroblastos a células madre/progenitoras neurales funcionales (NPC) con entradas de señalización apropiadas. En comparación con las "células iN" (células neuronales inducidas), las NPC transdiferenciadas tienen la clara ventaja de ser expandibles *in vitro* y de conservar la capacidad de generar múltiples subtipos neuronales y células gliales. Los resultados de los autores de la presente invención proporcionan un nuevo paradigma para la reprogramación basada en factores de iPSC demostrando que puede modificarse fácilmente para servir como una plataforma para la transdiferenciación.

Introducción

20 A pesar de que se ha informado sobre la transdiferenciación satisfactoria de un tipo de célula a otro mediante la expresión anormalmente alta de genes específicos del linaje *in vivo* (Takeuchi, J. K. et al., Nature 459 (7247): 708-711 (2009)), Zhou, Q. et al., Nature 455 (7213): 627-632 (2008)) e *in vitro* (Graf, T. et al., Nature 462 (7273): 587-594 (2009)); Ieda M. et al., Cell 142 (3): 375-386 (2010)), estos métodos generalmente solo son eficaces cuando se utilizan tipos de células relacionadas estrechamente con el desarrollo. Mientras que la generación de células iN (Vierbuchen, T. et al., Nature 463 (7284): 1035-1041 (2010)) utilizando factores de transcripción neurales específicos ha establecido que la transdiferenciación entre linajes también es posible *in vitro*, todos los esquemas de transdiferenciación hasta la fecha implican la expresión anormalmente alta de diferentes conjuntos de factores de transcripción específicos del linaje. Curiosamente, un estudio reciente que informa sobre la transdiferenciación de factor único de fibroblastos a precursores de sangre utilizando OCT4 (Szabo, E. et al., Nature 468 (7323): 521-526 (2010)) no es una excepción: en virtud de su expresión ectópica a largo plazo y su extensa unión a las regiones reguladoras de los genes hematopoyéticos clave, OCT4 también parece estar participando en la regulación de los programas hematopoyéticos que actúan como un factor de transcripción específico del linaje en este contexto. El aspecto excepcional de este estudio es más bien la capacidad de generar una población de progenitores mitóticamente activa que se puede diferenciar adicionalmente a una variedad de células sanguíneas, una hazaña crítica que aún no se ha logrado en la transdiferenciación a linajes cardíacos y neurales.

35 En un esfuerzo por diseñar una estrategia de transdiferenciación más general que podría dar lugar a una amplia gama de tipos de células no relacionados, incluyendo los precursores específicos del linaje, los autores de la presente invención han intentado dirigir la reprogramación convencional basada en cuatro factores de iPSC (Takahashi, K., et al., Cell 126 (4): 663-676 (2006)); Takahashi K. et al., Cell 131 (5): 861-872 (2007)) hacia resultados alternativos. Específicamente, estudios que indican que las iPSC se generan de manera secuencial y estocástica (Stadtfeld, M. et al., Cell Stem Cell 2 (3): 230-240 (2008)); Brambrink, T. et al., Cell Stem Cell 2 (2): 151-159 (2008); Hanna J. et al., Nature (2009)) han conducido a los autores de la presente invención a la hipótesis de que podrían ser capaces de manipular las células en un estado temprano y epigenéticamente altamente inestable inducido por los factores de reprogramación. Diferentes condiciones podrían dar lugar a una multitud de tipos de células (Artyomov, M. N. et al., PLoS Comput Biol 6 (5): e1000785 (2010)) con perfiles epigenéticos más estables. 45 En este contexto, la pluripotencia inducida es solo uno - y quizás entre los menos probables - de muchos resultados posibles. De hecho, los estudios han encontrado células reprogramadas parcial o incompletamente que expresan marcadores múltiples de linaje específico (Takahashi, K., et al., Cell 126 (4): 663-676 (2006)); Mikkelsen, T. S. et al., Nature 454 (7200): 49-55 (2008); Meissner, A. et al., Nat Biotechnol 25 (10): 1177-1181 (2007)); Silva, J. et al., PLoS Biol 6 (10): e253 (2008)); Maherali, N. et al., Cell Stem Cell 1 (1): 55-70 (2007)); Sridharan, R. et al., Cell 136 (2): 364-377 (2009)), aunque estas células no parecían representar tipos de células fisiológicamente relevantes. En consecuencia, los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que podría ser posible sesgar deliberadamente el proceso de reprogramación temprano hacia un tipo de célula precursora definida empleando condiciones de señalización inductivas y/o permisivas, después de lo cual las células deseadas podrían seleccionarse y expandirse.

55 En el presente estudio, los autores de la presente invención han reprogramado directamente fibroblastos a células madre/progenitoras neurales funcionales (NPC) durante un período abreviado de inducción de cuatro factores. Este proceso de reprogramación directa es claramente distinto de la reprogramación convencional a iPSC o la diferenciación directa de células pluripotentes. Los hallazgos de los autores de la presente invención no solo representan la primera transdiferenciación satisfactoria de células somáticas a NPC en proliferación, sino que también forman la base de una nueva metodología para la transdiferenciación entre linajes a células multi- u oligo- 60 potentes.

Resultados

Para probar rigurosamente la hipótesis de los autores de la presente invención, estos intentaron una transdiferenciación entre linajes de fibroblastos a NPC utilizando el sistema de MEF secundarios inducibles con doxiciclina (dox) (Hanna J. et al., *Nature* (2009)); Wernig, M. et al., *Nat Biotechnol* 26 (8): 916 - 924 (2008)); Hanna, J. et al., *Cell* 133 (2): 250-264 (2008)). La expresión anormalmente alta inducible permite un control temporal preciso sobre la expresión de los factores de reprogramación de iPSC convencionales, evitando los efectos potencialmente perjudiciales que surgen de su expresión anormalmente alta constitutiva. Para garantizar la supervivencia de los MEF durante el inicio del procedimiento de reprogramación, estos se mantuvieron en medio de MEF y de inicio de reprogramación (RepM-Ini; sin LIF) durante los primeros 3-6 días de tratamiento con dox. Posteriormente, se aplicó un medio de reprogramación neural (RepM-Neural) para inducir la generación y/o proliferación de NPC nacientes. RepM-Neural contiene FGF2, EGF y FGF4 para soportar NPC (Ying, Q. L. et al., *Nat Biotechnol* 21 (2): 183-186 (2003)); Hitoshi, S. et al., *Genes Dev* 18 (15): 1806-1811 (2004)). Los autores de la presente invención probaron los tratamientos con dox entre tres y seis días para determinar la duración óptima de la expresión de los factores de reprogramación (Fig. 7A). Inicialmente los autores de la presente invención encontraron que un mínimo de tres días de tratamiento con dox era suficiente para obtener colonias positivas para Pax6 después de 8-9 días adicionales en cultivo en RepM-Neural (Fig. 7B). Estas colonias típicamente contenían varios cientos de células que expresaban PLZF de forma casi homogénea, un marcador de NSC en roseta (Elkabetz et al., *Genes Dev.*, 22 (2): 152-165 (2008)), y Pax6, un factor de transcripción neural temprano (Walther, C y Gruss, P, *Development*, 113 (4), 1435-1449 (1991)) (Fig. 7B, C, D). La extensión del tratamiento con dox a seis días aumentó el número de colonias ($0,59\% \pm 0,01$, $n = 2$, eficacia de generación de colonias). Sorprendentemente, los autores de la presente invención encontraron que casi 100% de las colonias mostraron transdiferenciación neural independientemente de la duración probada del tratamiento con dox ($95,9\% \pm 4,6$, $n = 3$, Fig. 7C).

Los autores de la presente invención encontraron estructuras típicas de rosetas neurales, expresión de PLZF y expresión luminal de ZO-1 (Elkabetz, Y. et al., *Genes Dev* 22 (2): 152-165 (2008)) en las colonias transdiferenciadas (Fig. 7D). En muchas colonias, también encontraron neuronas positivas para Tuj1, algunas de las cuales coexpresan el marcador neuronal cortical temprano Dcx, e incluso el marcador neuronal dopaminérgico tirosina-hidroxilasa (Fig. 7D). Es importante destacar que estos perfiles de expresión no se observan en las células iN (Vierbuchen, T. et al., *Nature* 463 (7284): 1035-1041 (2010)). El análisis de citometría de flujo de las células transdiferenciadas reveló que una población de células que expresaban Prominina-1, PSA-NCAM y A2B5 comenzaba a emerger después del día siete (Fig. 11B, C). Esta población, en la que varios progenitores neurales (Alcock, J. et al., *Cell Res* 19 (12): 1324-1333 (2009)) parecen coexistir, probablemente representa las células formadoras de colonias (subconjunto 2 en la Fig. 11A). Notablemente, esta población no contenía un número significativo de células que expresaban SSEA-1, un marcador de células madre pluripotentes (Fig. 11B). La heterogeneidad de las células reprogramadas (Fig. 7D) probablemente refleje caminos paralelos de reprogramación, algunos de los cuales dan lugar a una transdiferenciación más directa hacia destinos neuronales maduros - p.ej. debido a que las células neuronales maduras coexisten con NPC transdiferenciadas (Fig. 7D) y las células que expresan PSA-NCAM se generaron tan pronto como el día siete en la población que acababa de emerger (Fig. 11C).

Después de la transdiferenciación, las colonias neuronales mitóticamente activas, que típicamente se ha encontrado que expresan Pax6 (Walther, C. et al., *Development* 113 (4): 1435-1449 (1991)) - se aislaron mediante selección manual y se subcultivaron en bloque en medio NPC convencional que contenía FGF2 y EGF para la expansión de NPC (Fig. 7B). Cada pequeño cúmulo podría formar una colonia en el plazo de varios días después del aislamiento; sin embargo, a pesar de los pases enzimáticos leves y la evitación de la disociación de una sola célula, las NPC parecían perder su capacidad de formar colonias en 3-5 pases. En este punto, las NPC se disociaron en células individuales y a continuación se cultivaron en medio N2 sin citocinas para una diferenciación adicional. Después de 1-2 semanas de diferenciación espontánea, los autores de la presente invención observaron neuronas maduras que expresaban NeuN y Map2, neuronas GABAérgicas y astrocitos que expresan GFAP (Fig. 7E). Estos resultados sugirieron colectivamente que las NPC que expresan Pax6 y PLZF son NPC funcionales que se pueden diferenciar a neuronas maduras y células gliales. En comparación con el tortuoso proceso de reprogramación a iPSC y subsecuente re-diferenciación a NPC, el método de transdiferenciación inducida de los autores de la presente invención - que requiere solo una única etapa que se completa en 13 días y muestra casi 100% de colonias recientemente generadas que están compuestas principalmente por NPC - es un proceso altamente eficaz, directo y rápido para generar NPC.

Es importante destacar que el marcador Nanog-GFP albergado por las células MEF secundarias nunca se expresó durante la transdiferenciación. De hecho, se descubrió que su activación requería al menos nueve días de tratamiento con dox seguido de una semana de cultivo posterior (Wernig, M. et al. *Nat Biotechnol* 26 (8): 916-924 (2008)). Por lo tanto, los autores de la presente invención llegaron a la conclusión de que no se generaron iPSC totalmente reprogramadas en el lapso de tiempo de su experimento, y que las células que expresaban Pax6 y PLZF se reprogramaron directamente a partir de fibroblastos en lugar de volver a diferenciarlas desde células pluripotentes intermedias. Para comprender y caracterizar mejor este proceso de transdiferenciación, los autores de la presente invención realizaron análisis adicionales.

En primer lugar, los autores de la presente invención intentaron descartar de manera más definitiva la posibilidad de que la generación de NPC pudiera requerir primero la formación de intermedios pluripotentes transitorios. Con este

fin, probaron el tratamiento RepM-Neural directamente en las iPSC (NGFP1) que se utilizaron en inyecciones de blastocisto para producir las células MEF secundarias, con la hipótesis de que se obtendrían resultados similares a los de MEF si la generación de NPC dependiera de la generación de un pequeño número de células pluripotentes al principio del proceso de transdiferenciación. Sin embargo, encontraron que el uso de iPSC como población de partida dio como resultado una mezcla altamente compleja de células neuroectodérmicas (positivas para Sox1 y Pax6), endodérmicas (positivas para Sox17) y mesodérmicas (positivas para T) (Fig. 8A, B). Por el contrario, la mayoría de las colonias transdiferenciadas de los MEF estaban casi en su totalidad compuestas por células que expresaban Sox1, el marcador neuroectodérmico más temprano (Ying, Q. L. et al., Nat Biotechnol 21 (2): 183-186 (2003)), y Pax6 (Fig. 8A, B). El análisis de RT-PCR corroboró estos resultados, ya que la expresión de Sox1 y Pax6 era exclusiva en la transdiferenciación (Fig. 8D). Como se indicó anteriormente, las células generadas a partir de las iPSC mostraron un perfil mucho más arbitrario de expresión del gen marcador específico de linaje (Fig. 8E, F). Aunque la diferenciación neural convencional no se basa en las citocinas que apoyan NPC, los autores de la presente invención no pudieron hacer una comparación en su ausencia porque nunca se observó crecimiento celular de células transdiferenciadas sin estas citocinas. Estos resultados muestran que las NPC transdiferenciadas surgen directamente de los fibroblastos sin ninguna dependencia de la generación de intermedios pluripotentes.

En segundo lugar, los autores de la presente invención analizaron la expresión de marcadores neurales a lo largo del tiempo para identificar el inicio de la especificación neuronal durante la transdiferenciación. Ya en el día tres, la expresión de Pax6 se incrementó en 5,6 veces en comparación con MEF en D0. La expresión Sox1 comenzó el día cinco y se incrementó espectacularmente a partir de entonces (Fig. 8D). Críticamente, durante la diferenciación de iPSC, la expresión de Sox1 también comienza el día cinco (Fig. 8F). Este último hallazgo implica que si la transdiferenciación dependiera de la generación de un intermedio pluripotente, este intermedio tendría que surgir al menos cinco días antes de la expresión inicial de Sox1. Puesto que la expresión de Sox1 comienza el día cinco durante la transdiferenciación, esto no deja tiempo para la reprogramación de los MEF a la pluripotencia. Adicionalmente, ni siquiera se detectan cantidades mínimas de expresión del gen Nanog hasta mucho más tarde en el proceso de transdiferenciación (Fig. 8C). En resumen, las NPC Sox1⁺ no pueden estar surgiendo de supuestos intermedios pluripotentes generados durante la transdiferenciación.

Los autores de la presente invención también investigaron la posible generación de células madre de epiblasto (EpiSC) durante la transdiferenciación puesto que FGF2 apoya la autorrenovación de EpiSC, pero no pudieron detectar ninguna expresión de FGF5 (Greber, B. et al., Cell Stem Cell 6 (3): 215-226 (2010)) en cualquier punto del proceso (Fig. 8D). Además, Sox17 y Brachyury (T), que no son solo marcadores de linaje, sino que también están altamente expresados en EpiSC (Tesar, P.J. et al., Nature 448 (7150): 196-199 (2007)), tampoco se detectaron (Fig. 8D). Colectivamente, sus resultados apoyan firmemente la noción de que las NPC transdiferenciadas se obtienen de células intermedias no pluripotentes que surgen durante la fase temprana del proceso.

En tercer lugar, los autores de la presente invención supusieron que la elección del destino entre las NPC y las iPSC está determinada por la exposición a la señalización específica de cada tipo de célula. Para probar esta hipótesis, examinaron los efectos del uso de medio que contiene LIF (Fig. 9A). Sorprendentemente, incluso una breve exposición (tan poco como un día) a LIF disminuyó claramente el número de colonias que expresan PLZF el día nueve (Fig. 9B). Por el contrario, el análisis de citometría de flujo mostró que la exposición a LIF aumenta el número de células que expresan SSEA1 (Fig. 12B, C). El análisis de expresión génica también mostró una regulación negativa de Sox1 y Pax6 con la regulación ascendente concomitante de Nanog y Rex1 bajo las mismas condiciones (Fig. 9C, D). La expresión correlacionada entre SSEA1 y Nanog tanto como Rex1 implica un aumento general en el carácter pluripotente por tratamiento LIF extendido. En consecuencia, observaron que se generaban pequeños cúmulos de células que expresaban Nanog-GFP cuando utilizaron RepM-Pluri en todo el proceso (esencialmente medio de mantenimiento ESC) en lugar de RepM-Neural. Interesantemente, la expresión de Sox17, T, y FGF5 los días 9, 11 y 13 también se incrementó por exposición a LIF (Fig. 13B). Este aumento de la expresión de genes específicos de otros linajes podría ser el resultado de la re-diferenciación espontánea de las células que expresan Nanog-GFP generadas por la exposición a LIF o quizás de una inducción de células de tipo EpiSC. Estos resultados implican que las células intermedias pueden entrar en la trayectoria para convertirse en iPSC o NPC en respuesta a LIF o al medio de soporte de NPC, respectivamente. Esta especificación del tipo de célula dependiente de citocinas durante la reprogramación directa también se ha demostrado en otros estudios recientes (Szabo, E. et al., Nature 468 (7323): 521-526 (2010)); Han, D. W. et al., Nat Cell Biol (2010)). Por lo tanto, está claro que la elección entre la conversión a NPC y la reprogramación completa a iPSC podría verse influida en un punto muy temprano durante el proceso de transdiferenciación.

Finalmente, los autores de la presente invención no observaron ninguna expresión de marcadores de pluripotencia (Oct4), neurales (Sox1, Pax6) o neuronales (Tuj1) en las células de partida o en las células cultivadas en medios RepM-Neural sin inducción de dox, lo que sugiere fuertemente una ausencia de células neurales contaminantes en la población inicial de MEF. No obstante, para descartar rigurosamente cualquier contribución de las células de la cresta neural y las células madre mesenquimatosas contaminantes que puedan existir en poblaciones de MEF bastante heterogéneas (Weston, J. A. et al., Dev Dyn 229 (1): 118-130 (2004)), los autores de la presente invención reprogramaron los fibroblastos adultos de punta cola (TTF) utilizando el sistema STEMCCA inducible por Dox (Sommer, C. A. et al., Stem Cells 27 (3): 543-549 (2009)) siguiendo el mismo método descrito anteriormente. Los autores de la presente invención transdiferenciaron satisfactoriamente los TTF a NPC que expresaban Pax6 en 13 días (Fig. 9E) con una eficacia de 0,07% (\pm 0,006% etm) utilizando solo seis días de inducción - más corto que los

ocho días requeridos para la generación de células pluripotentes a partir de TTF con este sistema (Sommer, C. A. et al., *Stem Cells* 27 (3): 543-549 (2009)).

Debido a que el tratamiento con LIF a corto plazo parece aumentar el carácter pluripotente de las células reprogramadas, aunque los niveles de expresión de *Nanog* y *Rex1* todavía son bastante bajos en comparación con las iPSC (Fig. 9D) - podría existir un pequeño número de células sensibles a LIF en los cultivos de los autores de la presente invención. Para eliminar estrictamente la posibilidad de estas células, los autores de la presente invención inhibieron la señalización de JAK/Stat3 que está directamente implicada en la reprogramación pluripotente (Yang, J. et al., *Cell Stem Cell* 7 (3): 319-328 (2010)) mediante el tratamiento con el inhibidor de molécula pequeña de JAK. Aunque esta inhibición disminuyó el número de colonias en aproximadamente 30% (Fig. 9F), todas las colonias restantes expresaron homogéneamente Pax6 (Fig. 9E). Estos resultados implican que la transdiferenciación de los autores de la presente invención toma estrictamente un camino independiente de la reprogramación pluripotente que puede bloquearse mediante el tratamiento con inhibidor de JAK1.

En resumen, los autores de la presente invención han transdiferenciado con éxito los fibroblastos a NPC funcionales y proliferantes. Tal transdiferenciación basada en cuatro factores iPSC puede guiarse modulando el tiempo de expresión del transgén y el entorno de cultivo (tales como citocinas específicas) y también será útil para la transdiferenciación a otros linajes.

Discusión

Los autores de la presente invención han demostrado un cambio directo del tipo de célula de fibroblastos a NPC funcionales mediante la expresión transitoria de los cuatro factores de reprogramación, por lo que el proceso es claramente distinto y no depende de la generación de las iPSC. Este proceso de transdiferenciación es altamente específico y eficaz, y se completa en el plazo de 9 a 13 días. El método de los autores de la presente invención logra un cambio de tipo de célula entre linajes muy similar al de las células iN (Vierbuchen, T. et al., *Nature* 463 (7284): 1035-1041 (2010)), con una ventaja fundamental: las células resultantes son células progenitoras expandibles. Otra ventaja del método de los autores de la presente invención es el uso de factores generales de reprogramación en lugar de factores de transcripción específicos del linaje. Debido a que los cuatro factores de Yamanaka fueron elegidos para la generación de células pluripotentes (Takahashi, K., et al., *Cell* 126 (4): 663-676 (2006)), generalmente solo se consideran útiles para la obtención de iPSC. Sin embargo, los resultados de los autores de la presente invención sugieren un paradigma diferente en el que se pueden generar varias células intermedias evolutivamente plásticas en el proceso, y que las iPSC son quizás solo uno de los muchos resultados posibles de la reprogramación de cuatro factores. El resultado final puede depender en gran medida de las entradas de señalización extrínsecas (Fig. 10). Curiosamente, en el tritón, *Sox2*, *Klf4*, y *c-Myc* se regulan temporalmente al alza después de la eliminación del cristalino o la amputación de un miembro para iniciar el proceso de regeneración (Maki, N. et al., *Dev Dyn* 238 (6): 1613-1616 (2009)). Esta observación respalda la hipótesis de los autores de la presente invención de que los cuatro factores convencionales de iPSC no solo inducen la reprogramación a iPSC, sino que también pueden ser capaces de mediar la conmutación directa de destino entre células diferenciadas. De hecho, los autores de la presente invención también han encontrado que los fibroblastos se pueden transdiferenciar a células cardíacas que se contraen espontáneamente mediante la expresión temporal de los mismos cuatro factores de reprogramación en diferentes condiciones de cultivo en el plazo de 11 días (Efe *et al.*, en imprenta). Estos resultados implican colectivamente un proceso de reprogramación generalmente no específico/no dirigido inducido por los cuatro factores de iPSC (es decir, no específicamente dirigido hacia el estado pluripotente como se ha considerado), y sugieren una nueva estrategia/paradigma para expandir y explotar significativamente la reprogramación basada en factores iPSC. Los diferentes tiempos de expresión del transgén y las condiciones de cultivo pueden permitir que se establezca temprano un estado de desarrollo transitorio y plástico para servir eficazmente como una plataforma celular para la transdiferenciación hacia diversos linajes.

Aunque las células iN son neuronas funcionales (Vierbuchen, T. et al., *Nature* 463 (7284): 1035-1041 (2010)), carecen del potencial de generar los diversos subtipos neuronales que se pueden obtener a partir de las iPSC. Además, estas neuronas post-mitóticas pueden no ser muy adecuadas para el estudio de ciertas enfermedades neurológicas, debido no solo a su estado no proliferativo (que limita severamente su número), sino también a su incapacidad para recapitular los fenotipos de la enfermedad que aparecen en la fase del progenitor neural (Marchetto, M. C. et al., *Hum Mol Genet* (2010)). Actualmente, las iPSC derivadas de pacientes con enfermedades neurológicas de inicio tardío (p.ej., aquellos con Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica) no recapitulan fácilmente los fenotipos de la enfermedad cuando se vuelven a diferenciar (Soldner, F. et al., *Cell* 136 (5): 964-977 (2009)) Dimos, J. T. et al., *Science* 321 (5893): 1218-1221 (2008)), aunque algunas iPSC de pacientes con defectos genéticos muestran sus síntomas (Lee, G. et al., *Nature* (2009)); Ebert, A. D. et al., *Nature* 457 (7227): 277-280 (2009)). Estos hallazgos implican que la reprogramación completa a un estado pluripotente puede restablecer ciertas características epigenéticas del estado de enfermedad, lo que requiere un envejecimiento a largo plazo en condiciones de estrés para su manifestación repetida. Teniendo en cuenta esta correlación negativa entre el grado de reprogramación y la manifestación de un fenotipo de enfermedad concreto, los autores de la presente invención creen que se puede demostrar que las NPC transdiferenciadas, - que se obtienen con una reprogramación limitada - son un sistema modelo de enfermedad superior para las iPSC cuando se estudian tales enfermedades de aparición tardía.

Aunque los autores de la presente invención utilizaron células MEF secundarias, el proceso de transdiferenciación puede parecer a primera vista ineficaz en comparación con la reprogramación de iPSC con las mismas células (Wernig, M. et al., *Nat Biotechnol* 26 (8): 916 - 924 (2008)). Sin embargo, teniendo en cuenta el período de inducción abreviado, la eficacia es razonable, es decir, comparable a la reprogramación inicial confirmada por análisis retrospectivos (Smith, Z. D. et al., *Nat Biotechnol* 28 (5): 521-526 (2010)).

Los autores de la presente invención no observaron una regulación al alza significativa de los marcadores de EpiSC tales como *Sox17*, *Brachyury* (Tesar, P.J. et al., *Nature* 448 (7150): 196-199 (2007)) y *FGF5* (Greber, B. et al., *Cell Stem Cell* 6 (3): 215-226 (2010)) durante reprogramación directa llevada a cabo por los mismos. No obstante, un estudio reciente del grupo de Schöler demostró que la reprogramación directa a EpiSC se puede lograr en 3-5 semanas (Han et al., *Nat Cell Biol*, 13 (1): 66-71 (2011)) que es sustancialmente más lenta que el método de los autores de la presente invención. Por lo tanto, una emergencia temporal de EpiSC durante reprogramación directa de los autores de la presente invención, que se puede lograr en 12 días, es muy poco probable. Curiosamente, cinco días de inducción seguidos de tratamiento con LIF a largo plazo causaron una mayor expresión de *Sox17* y *FGF5* con niveles extremadamente bajos de *Brachyury* y *Nanog* (Fig. 13). Estas células pueden parecerse parcialmente a EpiSC; sin embargo, la ausencia de LIF en medios de transdiferenciación de los autores de la presente invención hace que la generación de tales células sea casi imposible. Para lograr un estado de EpiSC iPSC completamente reprogramado, puede ser necesaria una inducción mucho más prolongada de los factores de reprogramación.

En un reciente y emocionante desarrollo, se mostró que la expresión lentiviral de OCT4 solo mediaba la reprogramación directa de células humanas a progenitores sanguíneos (Szabo, E. et al., *Nature* 468 (7323): 521-526 (2010)). Aunque la expresión de OCT4 está regulada a la baja después de la diferenciación a largo plazo, se requiere inducción a largo plazo y siempre hay un riesgo de reactivación lentiviral de la expresión de OCT4, que puede inducir lesiones displásicas (Hochedlinger, K. et al., *Cell* 121 (3): 465-477 (2005)). El estudio de los autores de la presente invención muestra que la expresión temporal de cuatro factores de reprogramación es suficiente para inducir la transdiferenciación específica del linaje. Cuando proceso de transdiferenciación de los autores de la presente invención se puede replicar utilizando métodos de expresión temporales y no virales, tales como la transfección transitoria (Okita, K. et al., *Science* 322 (5903): 949-953 (2008)); Jia, F. et al., *Nat Methods* 7 (3): 197-199 (2010)), la transducción de proteínas (Zhou, H. et al., *Cell Stem Cell* 4 (5): 381-384 (2009)); Kim, D. et al., *Cell Stem Cell* 4 (6): 472-476 (2009)), la transfección de ARNm (Warren, L. et al., *Cell Stem Cell* 7 (5): 618-630 (2010)) o moléculas pequeñas (Zhu, S. et al., *Cell Stem Cell* 7 (6): 651-655 (2010)), constituirá la base de una transdiferenciación segura y conveniente en un amplio espectro de linajes.

Materiales y métodos

Reprogramación y diferenciación directa: Se inyectaron células iPS inducibles con Dox NGFP1 (Hanna J. et al., *Nature* (2009)); Hanna, J. et al., *Cell* 133 (2): 250-264 (2008)) (Stemgent) en blastocistos C57BL/6 y se implantaron en ratones portadores (CD1, Harlan). Los embriones quiméricos se aislaron en E12.5-13.5. Las cabezas, los órganos en desarrollo y las médulas espinales se retiraron cuidadosamente de los embriones y los MEF se prepararon y seleccionaron como se describió previamente (Hanna J. et al., *Nature* (2009)); Wernig, M. et al., *Nat Biotechnol* 26 (8): 916 - 924 (2008)); Hanna, J. et al., *Cell* 133 (2): 250-264 (2008)). Para la reprogramación, los MEF secundarios (p3-4) se cultivaron en placa en placas de cultivo recubiertas con Geltrex a $1,5-2 \times 10^4$ células/cm² en medio MEF (medio de Eagle modificado de Dulbecco con un suplemento de suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y Glutamax 2 mM). El tratamiento con doxiciclina (Sigma-Aldrich, 2-8 µg/ml) se inició a la mañana siguiente (Día 0) y continuó hasta el día o los días designados. Las células se cultivaron en medio MEF durante un día adicional y se cambiaron a medio de iniciación de reprogramación (RepM-Ini; DMEM inactivado con un suplemento de sustituto de suero inactivado al 10%, FBS al 5%, NEAA 0,1 mM, Glutamax 2 mM y β-mercaptoetanol 0,055 mM) durante tres días. Para la reprogramación de células madre/progenitoras neurales, el medio se cambió a medio de reprogramación neural (RepM-Neural; los medios DMEM/F12 Advanced y Neurobasal se mezclaron 1:1 y se complementaron con albúmina de suero bovino al 0,05%, 1xN2, 1xB27, Glutamax 2 mM, β-mercaptoetanol 0,11 mM, 20 ng/ml de FGF2, 2 ng/ml de FGF4 y 20 ng/ml EGF). RepM-Pluri es lo mismo que RepM-Ini, con la adición de 1000 unidades/ml de LIF (Millipore).

Para la reprogramación de TTF, los sobrenadantes de Lentivirus se produjeron y cosecharon como se describió previamente (Takahashi K. et al., *Cell* 131 (5): 861-872 (2007)). Brevemente, las células 293T (Invitrogen) se cultivaron en placa a 5×10^6 células por placa de 100 mm y se incubaron durante la noche en una incubadora a 37°C. Las células se transfectaron con 4 µg de pHAGE2-TetOminiCMV-STEMCCA (29) o FUW-M2rtTA (Addgene) junto con la mezcla de empaquetamiento (1 µg de psPAX2 y 3 µg de pMD2.G) (Addgene) y FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron a continuación en una incubadora a 32°C, después de lo cual los sobrenadantes se recogieron a las 48 y 72 horas (post-transfección) y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore) antes de su uso. Los TTF se prepararon como se describió previamente (Takahashi, K., et al., *Cell* 126 (4): 663-676 (2006)). Brevemente, las colas (solo el tercio final) se cortaron en trozos pequeños (menos de 0,5 cm) y se cultivaron en placas recubiertas de gelatina en medio MEF. Las células que migraron del tejido se transfirieron a una nueva placa y se utilizaron después de un pase más (p3). Después de dos rondas de transducción con STEMCCA y el virus que expresaba rtTA, las células se sembraron en placas recubiertas con Geltrex a 2×10^4 células/cm² y se reprogramaron como se ha descrito anteriormente. Se añadió el inhibidor 1 de JAK (Calbiochem) desde el día 4 en adelante a 0,5µM durante la transdiferenciación de

TTF.

Para la diferenciación neuronal, las células completamente disociadas se colocaron en placas recubiertas con Geltrex en medio N2 (Elkabetz, Y. et al., Genes Dev 22 (2): 152-165 (2008)). Para la diferenciación, las iPSC cultivadas en RepM-Pluri se disociaron en células individuales y se colocaron en placas recubiertas de Geltrex. Después de un cultivo durante la noche, el medio se reemplazó por RepM-Neural. Todos los medios se repusieron al menos una vez cada dos días. Todos los reactivos se adquirieron de Invitrogen si no se especificaba, y todas las citocinas son de R&D Systems.

RT-PCR cuantitativa: El ARN total se extrajo de las muestras en los puntos temporales designados utilizando el RNeasy Plus Mini Kit con QiaShredder (Qiagen). Se transcribió de forma inversa un microgramo de ARN total por muestra utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad) y el ADNc se diluyó con 130 μ l de agua. Se utilizó 1/50 del ADNc diluido para la PCR cuantitativa con iQ SYBR Green Supermix en el sistema CFX96 (Bio-Rad). Todas las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado o triplicado, y los datos de expresión se normalizaron para expresión tanto de *Gapdh* como de β -actina utilizando el soporte lógico gestión CFX (Bio-Rad). Todas las secuencias de cebadores se enumeran en publicaciones anteriores (Hanna J. et al., Nature (2009)); Wernig, M. et al., Nat Biotechnol 26 (8): 916 - 924 (2008)); Greber, B. et al., Cell Stem Cell 6 (3): 215-226 (2010)).

Análisis inmunocitoquímico: Las muestras se lavaron una vez con D-PBS (Invitrogen, sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) y se fijaron con una solución de formaldehído puro al 4% (Electron Microscopy Sciences) con ácido pícrico al 0,15% (Sigma-Aldrich) en D-PBS durante 20 min, seguido de tres lavados con D-PBS. El bloqueo y la permeabilización se realizaron con una solución de BSA al 3% (Jackson ImmunoResearch) y Triton X-100 al 0,3% (Sigma-Aldrich) en D-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA al 1% y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de 1 hora de lavado (incluidos varios cambios en el tampón) con BSA al 0,1% en D-PBS, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios Alexa-555 o Alexa-488 conjugados (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio Zeiss AX10 equipado con una cámara AxioCam HRm, y procesadas con el soporte lógico Axiovision (Zeiss). Los anticuerpos primarios utilizados son Pax6 (Covance, 1:500, rb), Tuj1 (Covance, 1:5000, m o rb), Dcx (SantaCruz, 1:200, gt), TH (Sigma, 1:500, m), ZO-1 (Invitrogen, 1:500, rb), PLZF (EMD Chemical, 1:100, m), GFAP (Dako, 1:1000, rb), GABA (Sigma, 1:3000, rb), NeuN (Millipore), 1:50, m), Map2 (Abcam, 1:5000, chk), Sox1 (SantaCruz, 1:300, gt), Sox17 (R & D, 1:1000, gt) y T (SantaCruz, 1:300, gt).

Análisis citométrico de flujo: Las células cultivadas hasta que los puntos temporales designados se lavaron con D-PBS y se disociaron con Accutase (Innovative Cell Tech). Después de la cosecha, las células se lavaron dos veces con tampón FACS enfriado con hielo (HBSS con un suplemento de HEPES 10 mM, FBS al 2% y azida sódica al 0,1% [Sigma-Aldrich]). Las células no disociadas se eliminaron haciendo pasar suspensiones dos veces a través de un filtro (BD). Las células se incubaron individualmente con anticuerpos SSEA1 conjugado con PE (BD) y PSA-NCAM conjugado con APC, Prominina-1 y A2B5 (Miltenyi Biotec) durante 30 min a 4°C (todas las concentraciones de acuerdo con lo sugerido por el fabricante). Los anticuerpos de control de isotipo apropiados también se utilizaron por separado. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con cinco volúmenes de tampón FACS, se fijaron y se resuspendieron en solución de formaldehído puro al 4% (Electron Microscopy Sciences) en PBS. Se analizaron más de 20.000 células utilizando el soporte lógico FACSCalibur y CellQuest (BD). Para un análisis posterior, se utilizó el soporte lógico FlowJo (Tree Star).

40 Ejemplo 4: Reprogramación directa de fibroblastos humanos a células endodérmicas

Procedimientos experimentales

Reprogramación directa de fibroblastos humanos: Se cultivaron fibroblastos humanos (CRL-2097) en una placa de cultivo de tejidos de 100 mm y se transdujeron con sobrenadantes de virus recién producidos, tal como se describió previamente. A continuación se sembraron 10.000 células transducidas OCT4 en la placa recubierta con Matrigel y se cultivaron en medio de reprogramación y se trataron con CHIR99021 3 μ M (Stemgent) durante 1 semana, seguido de tratamiento con CHIR99021 3 μ M, NaB 0,1 mM y 100 ng/ml de Activina A durante otras 3-4 semanas. Las colonias positivas para CXCR4 se recogieron para su expansión en medio de expansión y se pasaron a la proporción de 1:3 cada vez por Accutase. Medio de reprogramación: DMEM/F12 Advanced, Sustituto de suero inactivado al 10%, Glutamax al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%, β -mercaptoetanol 0,1 mM. Medio de expansión: RPMI Advanced, Glutamax al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, 0,5 \times N2, 0,5 \times B27, de penicilina/estreptomicina al 1%, β -mercaptoetanol 0,1 mM, 25 ng/ml de Wnt3a, 50 ng/ml de EGF y 100 ng/ml Activina A (Stemgent). Todos los productos de cultivo celular fueron de Invitrogen/Gibco BRL excepto en los casos mencionados.

Producción de células de tipo β pancreáticas: El protocolo para la inducción adicional de las células de tipo β pancreáticas se modificó a partir de la bibliografía publicada previamente. Brevemente, las iDE se cultivaron en medio I y se trataron con 50 ng/ml de FGF7, ácido retinoico 2 μ M (RA), GDC-0449 0,1 mM (un inhibidor de la ruta Hedgehog), LDN-193189 0,1 mM (un inhibidor de BMP) y A83-01 0,5 M (un inhibidor del receptor de TGF β /ALK5) durante 5d; a continuación se cambiaron a medio II añadiendo 50 ng/ml de EGF y DAPT 1 μ M durante 3d; finalmente, estas células se cultivaron en medio III con 10 ng/ml de bFGF, 50 ng/ml de Extendina-4 y nicotinamida

10 mM durante otros 5-7 días. Medio I: IMDM/F12, glutamax al 1%, BSA al 0,5%, 0,5 x ITS, 0,5 x B27, penicilina/estreptomicina al 1%; Medio II: DMEM, glutamax al 1%, 1xB27, penicilina/estreptomicina al 1%; Medio III: DMEM/F12, Glutamax al 1%, 1xB27, penicilina/estreptomicina al 1%.

Resultados

5 **Reprogramación directa de fibroblastos humanos a endodermo definitivo (iDE):** El endodermo definitivo inducido (iDE) podría generarse a partir de fibroblastos primarios humanos mediante OCT4 y condiciones inductoras endodérmicas únicas (CHIR99021 3 μ M (un inhibidor de GSK-3), NaB 0,1 mM (un inhibidor de HDAC) y 100 ng/ml de Activina A (un miembro de la familia TGF β /Activina/Nodal)). Estos iDE fueron positivos para SOX17 y FOXA2, una caracterización típica para el endodermo definitivo (Fig. 14A). El análisis de secuenciación de bisulfato reveló que los promotores SOX17 y FOXA2 de los iDE se desmetilaron en gran medida, proporcionando evidencia adicional para la reactivación del programa de transcripción endodérmica en iDE (Fig. 14B). Además, estos iDE expresaron genes específicos de endodermo definitivo, incluyendo SOX17, FOXA2 y CER, pero no expresaron genes pluripotentes, tales como OCT4 y NANOG (Fig. 14C). En conclusión, estos iDE representan células endodérmicas definitivas típicas.

15 **Nueva generación de células de tipo β pancreáticas:** Para investigar más a fondo el potencial de desarrollo de estos iDE, los autores de la presente invención aplicaron un protocolo modificado para inducir estos iDE a células de linaje pancreático (Fig. 15A). Después de aproximadamente 2 semanas de inducción por etapas y maduración, finalmente se generaron células de tipo β pancreáticas a partir de estos iDE (Fig. 15B). Estas células de tipo β pancreáticas expresaron marcadores típicos específicos del linaje, tales como PDX1, NKX6.1, PEPTIDO C e INSULINA. Estas células positivas para INSULINA también fueron positivas para PÉPTIDO C, excluyendo la captación de insulina de los medios de cultivo. El análisis de PCR en tiempo real mostró que estas células de tipo β pancreáticas también expresaban genes islet específicos, incluyendo PDX1, NKX6.1, MAFA, GLUT2, GLUCOQUINASA e INSULINA (Fig. 15C). Además, el péptido C humano se liberó de estas células de tipo pancreáticas durante la estimulación con glucosa in vitro, lo que indica que estas células de tipo β pancreáticas son funcionales (Fig. 15D). En conclusión, estos iDE podrían inducirse nuevamente a células productoras de insulina y de tipo β pancreáticas sensibles a glucosa.

Ejemplo 5: Reprogramación directa de fibroblastos de ratón a células endodérmicas

Métodos de diferenciación

30 Para la preparación de fibroblastos embrionarios de ratón secundarios, se inyectaron células iPS inducibles por Dox NGFP1 (Hanna et al., Nature, 26 (8): 916-924 (2009)); Hanna et al., Cell, 133 (2): 250-264 (2008)) en blastocistos C57BL/6 y se implantaron en ratones portadores (CD1, Harlan). Los embriones quiméricos se aislaron en E12.5-13.5. Las cabezas y los órganos en desarrollo se retiraron cuidadosamente de los embriones y los fibroblastos embrionarios de ratón se prepararon y seleccionaron como se describió previamente (Hanna et al., Nature, 26 (8): 916-924 (2009)); Hanna et al., Cell, 133 (2): 250-264 (2008)); Wernig et al., Nat. Biotechnol., 26: 916-924 (2008)).

35 Los MEF secundarios (p2-3) se sembraron en placa sobre placas de cultivo recubiertas con Matrigel a 1×10^4 células/cm² en medio MEF. El medio se cambió a Medio I con Doxyciclina (4 μ g/ml) al día siguiente (Día 0). El día 5, el medio se cambió a Medio I con Activina A (10 ng/ml) y el inhibidor de JAK (0,5 μ M). El día 9, el medio se cambió a Medio II con RA (2 μ M), A83-01 (0,5 μ M), BMP4 (10 ng/ml) y bFGF (10 ng/ml). El día 12, el medio se cambió a Medio III (véase la Fig. 16). Las células se alimentaron cada 2 días durante todo el procedimiento. Medio MEF: DMEM, Glutamax 2 mM, FBS al 10%, penicilina/estreptomicina 1x. Medio I: DMEM inactivado, Glutamax 2 mM, KSR al 10%, FBS al 5%, NEAA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 0,11 mM, 1xpenicilina/estreptomicina. Medio II: DMEM, Glutamax 2 mM, suplemento de medio 1 x B27 y 1x penicilina/estreptomicina. Medio III: DMEM/F12, FBS al 10%, progesterona 20 nM, putrescina 100 μ M, 1 mg/ml laminina, nicotinamida 10 mM, 1 x premezcla de ITS que contiene insulina, transferrina y ácido selenico, suplemento de medio 1 x B27 y 1 x penicilina/estreptomicina.

Resultados

45 El día 25, las células se fijaron para inmunotinción de péptido C (Fig. 16). Aproximadamente 50% de las células eran positivas para péptido C.

Ejemplo 6: Cardiomiogénesis en células madre pluripotentes

Métodos de diferenciación

50 Las ESC pluripotentes representan una fuente potencialmente ilimitada de cardiomiocitos funcionales, ya que pueden proliferar en el estado pluripotente indefinidamente y diferenciarse a cardiomiocitos palpitantes. La realización de este potencial depende del desarrollo de métodos de diferenciación consistentes y eficientes. El método más común para inducir cardiomiogénesis de células ES murinas implica cultivo en suspensión (en presencia de suero y ausencia de factor inhibidor de leucemia complementado/LIF) para formar agregados (EB), que se diferencian a diversos tipos de células, incluyendo células hematopoyéticas, endoteliales, neuronales y de músculo cardíaco [3]. El aislamiento del tipo de célula deseado se puede lograr a través de la disociación de EB y

FACS, seguido de nuevo cultivo en placa. Cuando se utiliza combinado con tratamientos específicos de factores de crecimiento, este ha sido un método eficaz, aunque engorroso, para generar tipos de células cardíacas y ha sido particularmente útil en la identificación de células precursoras cardíacas. Si bien los protocolos de diferenciación descritos anteriormente tienen una gran utilidad, todavía no son óptimos para el estudio de los factores que influyen en la especificación cardíaca. En particular, los componentes de los medios tales como el suero bovino fetal (FBS) y el Sustituto de Suero Inactivado (KO-SR) contienen composiciones indefinidas que incluyen factores de crecimiento; por ejemplo, se ha demostrado que KO-SR tiene actividad de proteína morfogenética ósea (BMP). El uso de medios indefinidos puede oscurecer y complicar el análisis de los factores que afectan a la diferenciación de los cardiomiocitos. Adicionalmente, la naturaleza tridimensional del modelo EB de diferenciación de cardiomiocitos hace que sea difícil obtener poblaciones homogéneas de células debido a la presencia de gradientes de difusión dentro de los cuerpos embrioides y las interacciones tridimensionales célula-célula. Puesto que la diferenciación de EB es similar a la del embrión en desarrollo, implica inherentemente la generación de poblaciones heterogéneas de células. Por el contrario, la diferenciación monocapa proporciona una mayor capacidad para proporcionar una concentración local específica y uniforme de factores de crecimiento.

Una estrategia alternativa para la diferenciación EB que ha demostrado ser satisfactoria en el sistema humano es el co-cultivo de ESC con una línea celular que puede dirigir el destino celular. En particular, cultivando las líneas de hESC hES2 y hES3 con una línea celular endodérmica de ratón (END2), se puede obtener un promedio de 25% de cardiomiocitos. [9] Los autores especulan que factores desconocidos secretados por las células endodérmicas pueden estar estimulando directamente la diferenciación de los cardiomiocitos. Desafortunadamente, el método de cocultivo no es un sistema definido, y como tal, es difícil identificar los mecanismos subyacentes de su éxito.

Un método de diferenciación que ha demostrado ser satisfactorio en la diferenciación de los derivados neurales y de endodermo ha sido la diferenciación monocapa en medios sin suero. Como se discutió, los medios sin suero permiten determinaciones precisas y repetibles de la efectividad de los mecanismos de señalización dados en la especificación del destino celular. Como tal, se ha logrado un progreso considerable utilizando estos sistemas de diferenciación para comprender los mecanismos que rigen la especificación de derivados de ectodermo y endodermo. Hasta la fecha, el éxito similar aún no se ha logrado con la diferenciación de los cardiomiocitos, y como tal, hay varias preguntas pendientes sobre la especificación del destino cardíaco.

Mecanismos de señalización implicados en la cardiomiogénesis

Señalización Wnt

Si bien la importancia de la ruta canónica de Wnt en cardiomiogénesis se ha apreciado durante mucho tiempo, la modalidad en la que promueve el desarrollo cardiovascular no está clara ya que se ha informado que tanto los activadores como los inhibidores de la señalización Wnt tienen efectos positivos. Los experimentos con embriones de pollo demostraron que los antagonistas de Wnt Dickkopf-1 y Crescent, liberados por el endodermo anterior adyacente, estimulan la diferenciación del mesodermo cardíaco. Del mismo modo, en los embriones de rana, Dickkopf-1 y Crescent se difunden desde el organizador de Spemann y estimulan la diferenciación cardíaca en el mesodermo adyacente. También en embriones de ratón, la inactivación condicional de β -catenina en el endodermo definitivo dio como resultado la formación de un corazón ectópico [10]. Por otro lado, se sabe que la señalización Wnt es esencial para todos los aspectos de la cardiomiogénesis en drosophila. Los estudios concurrentes con los de los autores de la presente invención, han sugerido un papel bifásico de la señalización Wnt en el desarrollo cardíaco en el ratón.

Señalización de BMP

Al igual que la señalización Wnt, se aprecia la importancia de la señalización de BMP en el desarrollo cardíaco, aunque los mecanismos específicos no están claros. Los estudios iniciales en embriones de anfibio y pollo demostraron que la señalización de BMP media la especificación cardíaca por el endodermo adyacente [15]. La señalización de BMP se mostró posteriormente como esencial en la formación de corazón de vertebrados, también [16]. Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de BMP Nogina dio como resultado un aumento marcado de la cardiomiogénesis en un modelo EB de diferenciación de células ES de ratón [17]. Este estudio tiene como objetivo identificar una condición monocapa sin suero para la diferenciación de los cardiomiocitos que se puede utilizar para aclarar los factores específicos y la señalización requerida para la estimulación de esta transición.

TGF-Betal/Activina/Nodal

En una serie de estudios, Keller usó una línea celular ES marcada con GFP dirigida al gen específico mesendodérmico *Brachyury* para cuantificar la inducción de mesodermo y endodermo y para aislar y caracterizar estas poblaciones. En resumen, se descubrió que, junto con el tratamiento con Wnt, la Activina podría inducir la formación de células de línea primitiva (Bry+). Además, utilizando una línea celular ES marcada doblemente GFP-Bry CD4-Foxa2, pudieron evaluar si las células de línea primitiva formadas eran anteriores (alta Foxa2) o posteriores (baja Foxa2). Se determinó que concentraciones más altas de Activina A estimulaban la formación de células de la línea primitiva anterior; el destino cardíaco se aisló para las células en esta fracción.

Moléculas pequeñas que afectan a la diferenciación cardíaca

Utilizando las mESC transfectadas de forma estable con la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) activada por el promotor de la cadena pesada de α -miosina (α MHC) específica de músculo cardíaco como informador, Takahashi *et al.* escrutaron 880 fármacos conocidos en cultivos monocapa y descubrieron que el ácido ascórbico (vitamina C) puede mejorar significativamente la diferenciación cardíaca espontánea de las mESC. Curiosamente, otros antioxidantes tales como la N-acetilcisteína o la vitamina E no tienen un efecto similar, lo que sugiere que la actividad inductora de cardiomiogénesis del ácido ascórbico puede ser independiente de su propiedad antioxidante.

Simultáneamente a este trabajo, el laboratorio Schultz escrutó grandes bibliotecas químicas combinatorias utilizando células P19 que se transfectaron de forma estable con el informador de luciferasa impulsado por el promotor del factor natriurético atrial específico del músculo cardíaco (ANF) y encontró una serie de compuestos de diaminopirimidina, llamada cardiogenol AD, que puede inducir eficaz y selectivamente P19 y mESC para diferenciarse a cardiomiocitos. Las células diferenciadas expresaron múltiples marcadores de músculo cardíaco, incluyendo GATA-4, Nkx2.5, MEF2 y la cadena pesada de miosina (MHC), y formaron grandes áreas de parches que latían espontáneamente.

Utilizando células de carcinoma embrionario P19 con un BAC con *Nkx2.5-Luciferasa de luciérnaga* integrado establemente, Olson *et al.* escrutaron la biblioteca química de la Universidad de Texas Southwestern de 147.000 compuestos para encontrar activadores del destino cardíaco. Inicialmente, los investigadores encontraron que NaB era un activador de la expresión Nkx2.5-luc y, por lo tanto, lo utilizaron como un control positivo en su escrutinio. Utilizando un enfoque de quimioinformática, los investigadores identificaron una familia concreta de moléculas pequeñas de sulfonil-hidrazona (Shz) como la más prometedora. Se demostró que las moléculas no eran inhibidores de HDAC, no activaban el promotor de CMV en células P19CL6 y no podían dirigir la diferenciación neuronal en células madre.

En un escrutinio de moléculas pequeñas *in vivo* destinado a identificar sustancias químicas que pueden modular el patrón dorsoventral, el grupo identificó recientemente dorsomorfina (6-[4-(2-Piperidin-1-il-etoxi)fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]pirimidina), una molécula que puede inhibir selectivamente el receptor BMP tipo I. Dado que se había demostrado previamente que el factor de crecimiento Nogina, un inhibidor de la señalización de BMP, promovía la diferenciación cardíaca en un modelo de EB de desarrollo de ratón, los autores sometieron a ensayo la dorsomorfina para determinar los efectos inductores cardíacos. Los autores informan de que el tratamiento de las células ES con dorsomorfina solo durante las primeras 24 horas de diferenciación indujo una diferenciación cardíaca robusta, aunque se había informado de que el tratamiento con Nogina era eficaz cuando se trataban durante 5 días, incluyendo 3 días antes de la diferenciación. Los autores postulan que la dorsomorfina induce la diferenciación cardíaca al restringir la diferenciación de otros tipos de células, incluyendo los linajes endotelial, de músculo liso y hematopoyético.

Escrutinio de moléculas pequeñas para determinar reguladores de cardiomiogénesis

Generación y caracterización de una línea ESC Nkx2.5-GFP: Uno de los desafíos de evaluar la eficacia y la eficiencia de la diferenciación es el método para determinar qué tipos de células se generan. Los análisis comunes que identifican el tipo celular incluyen RT-PCR, transferencia Western, inmunotinción y caracterización funcional (p.ej., células palpitantes). Con la excepción de algunas caracterizaciones funcionales, todos estos métodos implican la finalización del experimento ya que las células deben ser cosechadas o fijadas. Una estrategia alternativa es marcar las células con una proteína fluorescente (GFP) bajo el control de un promotor específico para el tipo de célula de interés. Al elegir un marcador para un tipo de célula, generalmente es mejor elegir el gen expresado más temprano que también sea específico para el tipo de célula, a menudo un gen del factor de transcripción ya que estos generalmente preceden a la expresión de genes estructurales. Además de ser específico, el marcador también debe expresarse de manera ubicua en el linaje específico de interés. Numerosos factores de transcripción se expresan en el corazón en desarrollo donde dirigen y controlan la expresión génica específica del corazón y regulan el destino celular. Quizás el factor de transcripción específico cardíaco más esencial es Nkx2.5. Nkx2.5 se expresa a lo largo de todo el desarrollo del corazón y también en cardiomiocitos. Además, el gen *Nkx2.5* tiene expresión ubicua en el tubo cardíaco, a diferencia de otros factores de transcripción ligados al corazón (*Tbx5*) que pueden expresarse esporádicamente en el eje anteroposterior del tubo cardíaco.

Construcción de la célula ES Nkx2.5-GFP: Se obtuvo un plásmido dirigido a pCSX-EGFP-PP-DT que contenía un vector Nkx2.5 EGFP del grupo Morisaki en Osaka, Japón, como se observa en la Figura 17.

De todos los clones seleccionados que tenían insertado el vector activado, se ampliaron 10 líneas celulares con la inserción correcta de GFP en el locus Nkx2.5 para su ensayo. Se generaron cuerpos embrioides en gota colgantes para cada línea celular y se controló diariamente la expresión de GFP. Desafortunadamente, la expresión de GFP no era claramente visible en ninguno de los clones, como se muestra en la Fig. 18 (núcleos teñidos de color azul con DAPI en una región de contracción que es negativa para la expresión de Nkx2.5-GFP).

Las células se diferenciaron adicionalmente a colonias palpitantes que también mostraron niveles de expresión de GFP que eran marginalmente visibles bajo el microscopio de fluorescencia. Como tal, los autores de la presente

invención determinaron que estas células serían inadecuadas para el control de la diferenciación cardíaca en entornos de escrutinio de alto rendimiento. Investigaciones adicionales con un colaborador (Burcin, Novartis) indicaron que a pesar de su papel crucial en el desarrollo cardíaco, los niveles de transcrito de Nkx2.5 solo aumentan 10 veces los niveles basales (Fig. 19) mientras se diferenciaban mientras que el gen estructural MLC-2v está regulado al alza más de 1000 veces en los cardiomiocitos.

Habiendo determinado que Nkx2.5 no sería un marcador apropiado para la diferenciación cardíaca, los autores de la presente invención buscaron identificar otros marcadores que pudieran ser más adecuados. Su colaborador en Novartis, Mark Burcin, había desarrollado recientemente una línea celular ES MLC-2v-GFP, que su laboratorio aún tenía que caracterizar. De forma similar a la validación de las líneas Nkx2.5, los autores de la presente invención generaron EB en gota colgante con las células MLC-2v-GFP para diferenciar espontáneamente los cardiomiocitos. A diferencia de los factores de transcripción, un gen estructural tal como la miosina debe estar muy regulado al alza por encima de los niveles basales. Además, como MLC-2v tiende a marcar las células ventriculares (las más afectadas en un corazón con infarto miocárdio), los autores de la presente invención razonaron que este sería un marcador excelente para la diferenciación. Tras el examen de las regiones de latido de las células bajo el microscopio de fluorescencia, se observó la expresión de GFP en las células que se contraen, así como en algunas células que rodean las células que se contraen. En la Figura 20 se muestra una imagen representativa de la expresión de MLC-2v-GFP de los cardiomiocitos diferenciados de EB con núcleos azules teñidos con DAPI). Si bien los autores de la presente invención esperaban un patrón de expresión más específico, sintieron que estas células serían suficientes para proceder con un escrutinio de alto rendimiento de moléculas pequeñas.

Para configurar un escrutinio para moléculas capaces de inducir cardiomiogénesis en células ES, los autores de la presente invención buscaron en primer lugar identificar una condición permisiva. Idealmente, una condición permisiva es aquella en la que un bajo porcentaje de células se diferencian a cardiomiocitos en ausencia de un control positivo. Un porcentaje demasiado alto significaría que la señal de una molécula "candidata" no sería significativamente más alta que la señal de fondo, y un porcentaje demasiado bajo podría significar que la condición no permitiría la diferenciación cardíaca y, por lo tanto, se perderían los candidatos potenciales. Los autores de la presente invención decidieron utilizar placas de 384 pocillos, ya que estas tenían suficiente área para la supervivencia celular y la homogeneidad celular. Puesto que el suero es capaz de inducir la diferenciación mesodérmica, optaron por utilizar un medio similar al medio de células ES sin el factor de autorrenovación LIF. Se sometieron a ensayo diversas densidades de cultivo en placa y se determinó que 5.000 células por pocillo eran lo suficientemente densas, sin ser demasiado densas, lo que hacía que las células crecieran demasiado y murieran. Los medios se reemplazaron cada 3 días, y las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia para identificar el momento ideal para la observación de GFP. Hacia el día 15, los autores de la presente invención observaron aproximadamente 1% de células expresadas en GFP, aunque no se observaron regiones de latido. En la Figura 21 se muestra un pequeño parche de células positivas para GFP diferenciadas en medio químicamente definido sobre Matrigel en un medio definido sin suero.

Para el escrutinio, se cultivaron en placa 5.000 células por pocillo de una placa negra de 384 pocillos recubiertos con gelatina, en 80 µl de medio ES. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se añadió el medio de diferenciación. Los autores de la presente invención eligieron utilizar una biblioteca de 50.000 compuestos dirigidos a quinasas que habían demostrado ser fructíferos en estudios similares previos. Utilizando una máquina Pintool (Figura 22), se añadieron 500 nl de compuesto a cada pocillo, y los medios se renovaron cada 3 días a partir de entonces.

Aproximadamente 280 compuestos mostraron una cantidad de señal significativamente mayor en el canal de GFP del microscopio a los 15 días. En la Figura 23 se muestra un compuesto candidato representativo que muestra una señal extensa en el canal de GFP del microscopio fluorescente.

Los falsos positivos y los falsos negativos pueden ser un problema importante en los escrutinios de moléculas pequeñas. Los falsos positivos pueden incluir moléculas fluorescentes que imitan la señal de GFP, diferenciación aleatoria en un pocillo dado o interacción de una molécula pequeña con un componente aleatorio del medio. Los falsos negativos pueden incluir compuestos cuyo efecto esté enmascarado por un componente del medio. Para escrutar falsos positivos, los 280 compuestos iniciales se dispusieron en una nueva placa de 384 pocillos, y el escrutinio se repitió utilizando estos. Minutos después de agregar los compuestos, las células se observaron bajo el microscopio de fluorescencia para evaluar la posible fluorescencia de los compuestos. Los 15 compuestos fluorescentes más fuertes de los 280 originales inducían fluorescencia en las células solo 5 minutos después de la adición, lo que indica un falso positivo debido a la fluorescencia del compuesto. Del resto, solo 10 de estos compuestos iniciales se repitieron en el primer seguimiento, y desafortunadamente ninguno de los 10 se repitió en un segundo seguimiento. Los autores de la presente invención suponen que la falta de éxitos repetibles en este escrutinio se debía a una combinación de falsos positivos y falsos negativos, con el problema subyacente indefinido y componentes de medios aleatorios (suero) que enmascaran candidatos reales y estimulan candidatos falsos.

Una condición monocapa sin suero para cardiomiocitos: El método más común para inducir cardiomiogénesis de células ME murinas implica cultivo en suspensión (en presencia de suero y ausencia de factor inhibidor de leucemia complementado/LIF) para formar agregados (EB), que se diferencian a diversos tipos de células, incluyendo células hematopoyéticas, endoteliales, neuronales y del músculo cardíaco. El aislamiento del tipo de

célula deseado se puede lograr a través de la disociación de EB y FACS, seguido de recultivo en placa. Cuando se utiliza combinado con tratamientos específicos de factores de crecimiento, se ha demostrado que este es un método eficaz, aunque engorroso, para generar tipos de células cardíacas y ha sido particularmente útil en la identificación de células precursoras cardíacas. Si bien los protocolos de diferenciación descritos anteriormente tienen una gran utilidad, todavía no son óptimos para el estudio de los factores que influyen en la especificación cardíaca. En particular, los componentes de medios tales como el suero bovino fetal (FBS) y el Sustituto de Suero Inactivado (KO-SR) contienen composiciones indefinidas que incluyen factores de crecimiento. Por ejemplo, se ha demostrado que KO-SR tiene actividad de proteína morfogenética ósea (BMP). El uso de medios indefinidos puede oscurecer y complicar el análisis de los factores que afectan a la diferenciación de los cardiomiocitos. Además, la naturaleza tridimensional del modelo EB de diferenciación de cardiomiocitos hace que sea difícil obtener poblaciones homogéneas de células debido a la presencia de gradientes de difusión dentro de los cuerpos embrioides y las interacciones tridimensionales célula-célula. Puesto que la diferenciación de EB es similar a la del embrión en desarrollo, esto implica necesariamente la generación de poblaciones heterogéneas de células. Por el contrario, la diferenciación monocapa proporciona una mayor capacidad para proporcionar una concentración local específica y uniforme de factores de crecimiento.

Desarrollo del ensayo: Si bien la diferenciación celular es un proceso fluido, su estudio se puede simplificar definiendo fases de diferenciación. Con el fin de identificar las condiciones que conducen a la diferenciación de cardiomiocitos, los autores de la presente invención emplearon una estrategia de matriz en la que las células se diferenciaron durante 10 días que abarcaban 4 ventanas de tratamiento (seguido de un período de maduración en el procedimiento final). Las fases identificadas para el presente estudio fueron mesoendodermo, mesodermo, precursor cardíaco, cardiomiocito temprano y cardiomiocito maduro. En la Figura 24 se muestra un esquema que representa la transición de las células ES a cardiomiocitos, incluyendo los marcadores para cada tipo de célula definido y los tratamientos utilizados para estimular cada transición.

Los autores de la presente invención comenzaron por identificar una condición mínima libre de suero en la que aproximadamente 1% de las células expresarían α MHC (cadena pesada de alfa-miosina) después de 10 días de cultivo. Las combinaciones de los componentes del medio y los recubrimientos de las placas se analizaron en paralelo, siendo la condición más permisiva y consistente un medio modificado N2/B27 químicamente definido en placas recubiertas con Matrigel (véase Métodos). Antes de la diferenciación, las células ES se mantuvieron en un estado pluripotente en MEF y con LIF. En el día -1, las células se tripsinizaron y se volvieron a cultivar en placas recubiertas con Matrigel en medio con un suplemento de LIF, permitiendo una mejor supervivencia celular y una formación de colonias inicial más robusta. En un día, se alcanza un tamaño de colonia suficiente que permite la supervivencia en un medio libre de suero (Figura 25).

A partir de una búsqueda bibliográfica, los autores de la presente invención identificaron factores de crecimiento, citocinas y moléculas pequeñas que se había informado que influyen en la diferenciación cardíaca, tales como activadores e inhibidores de las rutas BMP, TGF- β /Nodal, Hedgehog, Wnt y Notch, y probaron la capacidad de cada una para inducir cardiomiogénesis en cada ventana temporal. Por ejemplo, para someter a ensayo Dkk-1 en la segunda ventana, las células estuvieron en medio basal durante los días 0-2, se trataron con Dkk-1 durante los días 2-5, a continuación se cultivaron en medio basal hasta el día 10 antes de la puntuación de inmunofluorescencia. Por lo tanto, los reguladores positivos de la especificación cardíaca en cada fase se identificaron por su capacidad para inducir la expresión de la cadena pesada de alfa-miosina (α MHC) el día 10, según se evaluó mediante inmunotinción.

Resultados

BMP y Wnt estimulan la diferenciación cardíaca temprana

Algunos factores no tuvieron un efecto significativo (p.ej., hedgehog), pocos tuvieron efectos negativos (p. ej., Activina A), mientras que dos factores tuvieron efectos sorprendentemente positivos al dirigir la especificación cardíaca. Se encontró que el potente inhibidor de GSK-3, 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO) (Figura 26), aumenta el porcentaje de tinción de α MHC cuando se administra en la primera ventana (día 0-2) y, en menor medida, durante la segunda ventana (día 2-5), con una dosis óptima de 4 μ M. En la Figura 26 se muestra una imagen representativa de células cardíacas inducidas por BIO teñidas para alfa-MHC y GATA-4.

BMP-4, un miembro de la superfamilia de TGF- β , tuvo efectos similares en el porcentaje de células positivas a α MHC cuando se administró durante la primera y/o segunda ventanas de tratamiento con una concentración óptima de 20 ng/ml. En la figura 28 se muestra una imagen representativa de las células cardíacas inducidas por BMP-4 teñidas para alfa-MHC y GATA-4.

El tratamiento con BMP-4 o BIO en la primera ventana dio como resultado aproximadamente 20% de células teñidas para α MHC. Cuando los tratamientos óptimos de estas dos primeras ventanas se combinan en un único esquema de diferenciación, las células se desarrollan y se diferencian en colonias donde aproximadamente 35% de las células se tiñen positivamente para MHC el día 10.

La inhibición de Wnt por Dkk-1 estimula la diferenciación cardíaca tardía

Después de identificar los efectores positivos de la cardiomiogénesis en las dos primeras ventanas de diferenciación, los autores de la presente invención intentaron reexaminar su grupo de factores en las últimas fases de diferenciación. En esta iteración, las células se trataron con una combinación de BMP-4 y BIO durante 5 días antes de ser tratadas en la tercera ventana (día 5-7) o cuarta ventana (día 7-10). En este caso, los autores de la presente invención encontraron que el tratamiento con el inhibidor de Wnt Dkk-1 aumentó adicionalmente la eficiencia de la diferenciación cardíaca en 20%. Además, cuando estas colonias de células se volvieron a cultivar en placa sobre placas recubiertas de gelatina y se mantuvieron en un medio basal, casi 50% desarrolló un fenotipo palpitante después de 6 días de cultivo.

10 Análisis de la diferenciación en el curso del tiempo

Con el fin de llegar a una comprensión más clara de este proceso, los autores de la presente invención llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia y RT-PCR de las células en diferenciación. El día -1, las células se volvieron a cultivar en placa sobre Matrigel en medio que contenía LIF, y el día 0 las células continuaron expresando el marcador de pluripotencia Oct-4 (Fig. 29). En este punto, las claves de autorrenovación se eliminaron y la especificación de mesodermo comenzó a través de la señalización BMP y Wnt simultánea. En esta fase, las células comenzaron a parecerse a la línea primitiva del embrión en desarrollo, expresando marcadores tales como Brachyury T y Gata-4, siendo expresado Gata-4 tan temprano como el día 2 (Fig. 29) y siendo expresado Brachyury T tan temprano como el día 3 (Fig. 18).

En la Tabla 1 se enumeran los cebadores y las condiciones específicos utilizados para los estudios de RT-PCR.

20

Tabla 1 - Cebadores y condiciones de RT-PCR

Gen	Efector	Antisentido	Ciclos	T Fusión (°C)
Oct3/4	GGCGTTCTCTTTGGAAAG GTGTC	CTCGAACCACATCCTTCT CT	25	58
BryT	CAT GTA CTC TTT CTT GCT GG	GGT CTC GGG AAA GCA GTG GC	33	58
GATA4	TTC CTT GTC CTC ATC ACC CAC AGA	GAC AA TGT TAA CGG GTT GTG GAG G	32	58
Flk1	GGTTCTCTGTCAAGTGGC GGTAAA	AGCACACAGGCAGAAAC CAGTAGA	32	58
Isl-1	TGT CAG GAG ACT TGC CAC TTT	GCC AAA CGT TTA TTA GTG AAA TAG TCC TG	32	58
Nkx2.5	ACC TTT CTC CGA TCC ATC CCA CTT	GCG TTA GCG CAC TCA CTT TAA TGG	28	58
Mlc2a	AAG GGA AGG GTC CCA TCA ACT TCA	AAC AGT TGC TCT ACC TCA GCA GGA	30	58
Mlc2v	ACT TCA CCG TGT TCC TCA CGA TGT	TCC GTG GGT AAT GAT GTG GAC CAA	32	58
ANF	TTCTCGTCTTGGCCTTTT G	CCTCATCTTCTACCGGCA TCTTC	32	58
Nrg1	CCA ATG GCC ACA TTG CCA ATA GGT	AGC CTG GCC TGT AAT TCT TCC TGT	32	58
β -Actina	GAA GGT GAC AGC ATT GCT TCT GTG	TTG GTC TCA AGT CAG TGT AGA GGC	27	58

La estimulación continuada con BMP-4 y BIO durante los días 2-5 especificó las células primero como mesodérmicas y más tarde más específicamente como mesodermo de formación cardíaca, como se observó por expresión de Isl-1 y Flk-1 (Figura 29). En la tercera ventana de tratamiento, BMP-4 y BIO fueron reemplazados por Dkk-1, y la expresión de Isl-1 aumentó (Figuras 29, 30C) y se expresaron Nkx2.5 (Figs., 29, 30D) y MEF-2c (Figs. 29, 30E). Después de un total de 5 días de tratamiento con Dkk-1, comenzaron a expresarse los primeros marcadores de cardiomiocitos maduros (Fig. 29).

En este punto, los autores de la presente invención encontraron que se facilitó la maduración adicional al volver a cultivar las células en placas recubiertas de gelatina en medio basal, sin utilizar factores de crecimiento adicionales. Las colonias de células comenzaron a contraerse espontáneamente después de aproximadamente 6 días y expresaron genes cardíacos específicos tales como Troponina T, α MHC y MLC-2v (Figuras 29, 31 y 32).

Los autores de la presente invención determinaron que los cardiomiocitos en contracción podrían mantenerse posteriormente en medio sin suero durante más de un mes.

Un escrutinio a pequeña escala en una condición monocapa libre de suero

Habiendo identificado la primera condición monocapa libre de suero para la diferenciación cardíaca de células ES, los autores de la presente invención trataron de probar su eficacia como una plataforma para descubrir reguladores de la cardiomiogénesis. Se reunieron una colección de aproximadamente 200 moléculas pequeñas y factores de crecimiento que se informó que eran influyentes en los procesos de desarrollo. Las células ES R1 se desarrollaron y cultivaron en placa para la diferenciación en Matrigel en placas de 24 pocillos utilizando los medios y los factores de crecimiento descritos anteriormente. A continuación, se agregó la colección de escrutinio y se eliminó de cada pocillo en puntos temporales específicos con el fin de tener en cuenta las diferentes ventanas temporales de desarrollo. La colección se escrutó los días 0-2, 2-5 y 5-7.

La señalización de calcio estimula la diferenciación mesodérmica

Se encontró que un fuerte estimulante positivo de la diferenciación cardíaca era el agonista del canal de calcio de tipo L (LTCC) BayK 8644 (Figura 33). La señalización de calcio está involucrada en varias rutas de señalización importantes para el desarrollo. Con respecto a la formación de mesodermo y al establecimiento de patrones, se ha sugerido que gradientes intracelulares de Ca^{2+} e inositol-1,4,5-trisfosfato ($Ins(1,4,5)P_3$) juegan un papel en la formación del eje dorsal-ventral (D-V) del embrión.

Los miembros de la clase Wnt-1 señalizan a través de la vía de señalización canónica Wnt/beta-catenina, en la que una estabilización de la beta-catenina citoplásmica permite que la beta-catenina regule la expresión génica en el núcleo. Por el contrario, los miembros de la clase Wnt-5A estimulan la liberación de Ca^{2+} intracelular y activan dos enzimas sensibles a Ca^{2+} - proteína quinasa II (CamKII) y la proteína quinasa C (PKC) dependientes de Ca^{2+} /calmodulina - de una manera dependiente de proteína G, pero independiente de β -catenina. Esta ruta se conoce comúnmente como ruta Wnt/ Ca^{2+} , o señalización Wnt no canónica, ya que se cree que el calcio estimula CamKII y PKC.

Para determinar con mayor detalle los mecanismos por los cuales el calcio podría estar estimulando la diferenciación cardíaca, se analizaron los factores de crecimiento y las moléculas pequeñas en las rutas relacionadas. Como se indicó, la señalización Wnt no canónica depende del calcio. El modelo de diferenciación propuesto, sin embargo, establece que se requiere la señalización Wnt canónica en la diferenciación de las primeras fases. Puesto que la señalización Wnt canónica y no canónica generalmente son señales opuestas, es poco probable que el calcio estuviera operando en la vía no canónica aquí. Sin embargo, Wnt5a se sometió a ensayo para determinar su capacidad para estimular la diferenciación cardíaca en la misma fase que BayK 8644, tanto junto con Bmp-4 como junto con BIO y solo. El tratamiento con Wnt5a dio como resultado una disminución de 20% en la eficacia global de latido en la diferenciación, posiblemente al interferir con la señalización Wnt canónica.

Para aclarar que el efecto observado con BayK 8644 fue de hecho mediado por calcio, se sometieron a ensayo varios compuestos reguladores beta-adrenérgicos. Los receptores beta adrenérgicos interactúan con las proteínas G que contienen las subunidades G α s (Gs) y G α i (Gi). Las subunidades G α s y Gbetagamma regulan positivamente los canales de Ca^{2+} de tipo L. Además, varias isoformas de las adenilato (adenilil) ciclasas son activadas por las subunidades G α s y, por definición, la activación de los receptores b-adrenérgicos puede elevar los niveles de AMP cíclico ((AMPc)). Curiosamente, el activador de Gs isoproterenol mostró un efecto inductor cardíaco aún más potente que BayK 8644, mientras que el betabloqueante propranolol disminuyó enormemente el potencial cardíaco. Para evaluar si el efecto del calcio podría explicarse por los niveles de AMPc, los autores de la presente invención sometieron a ensayo un inhibidor de la adenilil ciclasa 2',5'-dd-3'-AMP-bis (t-Bu-SATE) y observaron una disminución en el porcentaje de cúmulos palpitanes. Además, el análogo AMPc estable dibutilil AMPc, a menudo utilizado para estimular la señalización PKA/PKC, aumentó el porcentaje de colonias palpitanes (Figura 34).

Para determinar qué papel podrían jugar el calcio y el AMPc en esta fase temprana de diferenciación cardíaca, se

llevó a cabo FACS utilizando dos marcadores implicados en los destinos mesodérmicos. Específicamente, se utilizó una célula ES Brachyury-EGFP (una donación del laboratorio Keller) para identificar células que progresan a una población de tipo línea primitiva. Adicionalmente, las células se tiñeron utilizando un anticuerpo Flk-1 para delinear nuevamente la ubicación axial de las células de tipo línea primitiva. Brevemente, las células se trataron con moléculas pequeñas el día 0-2, y se recogieron el día 4,5 para su análisis. Como se observa en los gráficos de FACS (Figura 35), los compuestos sometidos a ensayo tuvieron un efecto menor sobre la expresión de Brachyury-GFP, y un efecto mayor sobre la expresión de Flk-1. BayK8644, isoproterenol y dibutilil AMPc mostraron todos un aumento similar en la porción de células GFP+ que también fueron positivas para Flk-1, mientras que el propranolol disminuyó el porcentaje de células positivas para Flk-1. Estos resultados indican que la señalización de calcio y AMPc ayuda a especificar adicionalmente la diferenciación a un subconjunto de la línea primitiva que es cardiogénico (Flk-1+).

Para analizar más a fondo el mecanismo de acción del efecto cardiogénico observado con estas moléculas, se llevó a cabo QRT-PCR en células tratadas desde el día 0-2 y se recogieron el día 4,5.

Como se observa en el análisis de expresión (Figura 36), BayK8644, dibutilil AMPc e isoproterenol aumentaron la expresión de Brachyury T, Flk-1, GATA-4 y MESP1.

GATA-4 es un factor de transcripción de dedo de zinc de la familia GATA que interactúa con los factores de transcripción cardíaca Nkx2.5, Tbx5 y HAND2 y su expresión es ligeramente anterior a la de Nkx2.5, aunque no es completamente específica para destinos cardíacos. El gen Mesp1 codifica la proteína básica HLH MesP1 que se expresa en el linaje celular mesodérmico durante la gastrulación temprana. La alteración del gen Mesp1 conduce a una morfogénesis aberrante del corazón, lo que produce cardía bífida. MesP1 se expresa en las células precursoras del tubo cardíaco y se requiere que las células mesodérmicas se desvíen de la línea primitiva y generen un solo tubo cardíaco. Flk-1 es un receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y marca los precursores cardíacos y hematopoyéticos que surgen de la línea primitiva.

Un inhibidor de TGF-beta estimula la diferenciación cardíaca en fases posteriores del desarrollo

La superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF)-beta es un grupo diverso de citocinas que tienen efectos pleiotrópicos en numerosos procesos biológicos. La señalización de TGF-beta se logra mediante complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina quinasa de tipo I y tipo II. Tras la unión del ligando de TGF-beta y la heterodimerización, el receptor de tipo I es fosforilado por el receptor de tipo II que activa una cascada de transducción de señales que implica las rutas de Smad. Los miembros de la superfamilia se clasifican en 2 categorías: TGF-beta/Activina/Nodal y BMP/GDF. El grupo TGF-beta/Activina/Nodal activa la quinasa tipo receptor de Activina (ALK) 4, 5 y 7, que fosforilan Smad2 y 3, mientras que el grupo BMP/GDF activa ALK 1, 2, 3 y 6, que a su vez fosforilan Smad1, 5 y 8.

Se cree que la señalización de TGF-beta es esencial para el desarrollo del mesodermo, en particular para la inducción de la línea primitiva. En estudios *in vitro*, el grupo de Keller demostró una reducción drástica de la diferenciación cardíaca cuando los EB se trataron con el inhibidor de TGF-beta SB431542. Además, puesto que la línea primitiva migra hacia adentro en el embrión en desarrollo, las células se someten a EMT, lo que permite su movilidad; La EMT es estimulada por la señalización de TGF-beta. Curiosamente, los autores de la presente invención encontraron que el tratamiento con el inhibidor de TGF-beta A83-01 (Figura 37) en realidad indujo un mayor número de colonias palpitantes cuando se utilizó los días 5 a 7 del programa de diferenciación. A83-01 es selectivo para los receptores ALK4, 5 y 7, y es más específico que SB431542.

Para demostrar adicionalmente que la inhibición de la señalización de Activina/Nodal/TGF-beta está desempeñando un papel en la determinación cardíaca, se analizaron los factores de crecimiento Activina y TGF-beta. Como se esperaba, el tratamiento con estos factores de crecimiento dio como resultado un número menor de colonias palpitantes, como se muestra en la Figura 38.

Se llevó a cabo QRT-PCR para observar la inducción de cardiomiogénesis a nivel de transcrito. El día 5, cuando comienza el tratamiento con A83-01, el estado predominante es el de una población de tipo línea primitiva desarrollada que aún no ha mostrado una expresión sólida de marcadores de precursores cardíacos tales como Nkx2.5, Isl-1 y c-kit. Como se puede observar en la Figura 39, el tratamiento con A83-01 desde los días 5-7 indujo niveles más altos de expresión de marcadores cardíacos específicos cuando se evaluó el día 8, mientras que el tratamiento con Activina A tuvo el efecto opuesto.

Discusión

Por lo tanto, el modelo de diferenciación de cardiomiocitos que proponen los autores de la presente invención se modela de forma más sencilla puesto que implica 4 fases de diferenciación, seguidas por un periodo de maduración. En las fases más tempranas, tanto BMP-4 como Wnt solos pueden especificar células ES hacia linajes mesoendodérmicos y mesodérmicos. Cuando ambas rutas se activan concomitantemente, la diferenciación se vuelve más específica para un subconjunto de mesodermo que forma corazón. La β -catenina induce la formación de mesodermo a través de la expresión de Brachyury T, y también se cree que BMP-4/Smad1 induce mesodermo, aunque su mecanismo no está claro.

La señalización continuada de BMP y Wnt en la segunda fase de diferenciación ayuda en la especificación del destino cardíaco a través de la promoción directa de genes precursores cardíacos. Los componentes de la ruta aguas abajo de BMP-4, Smad1/4 activan la expresión de Nkx2.5 a través de la unión directa de su promotor. De manera similar, se ha demostrado que la señalización Wnt canónica induce la formación del mesodermo dorsal y promueve la formación de precursores cardíacos regulando directamente la expresión del gen precursor cardíaco, islet-1. En el inicio de la tercera fase de diferenciación, los primeros marcadores de precursores cardíacos apenas comienzan a expresarse. La especificación de los precursores cardíacos de esta mezcla de células mesodérmicas se logró cuando se usó el inhibidor de Wnt Dkk-1.

Después de la estimulación continua con Dkk-1 en la cuarta fase de diferenciación, las células comienzan a expresar marcadores maduros de cardiomiocitos y forman colonias densas que son resistentes a la disociación mediada por tripsina. Los autores de la presente invención observaron un aumento de la eficacia en la maduración cardíaca cuando estas colonias se separaron y se volvieron a sembrar a menor densidad en placas recubiertas de gelatina, mientras se mantenían en medio basal.

Aunque numerosos factores de crecimiento han sido implicados en la cardiomiogénesis, los autores de la presente invención han encontrado un requisito mínimo de señalización para la especificación cardíaca que es notablemente simple. Sus resultados indican que la señalización BMP y Wnt ocupa un lugar elevado en el orden de especificación cardíaca mesodérmica y posterior y que la inhibición de la señalización Wnt es importante en fases posteriores de diferenciación. Es inevitable que la regulación de más rutas esté implicada en la especificación de los linajes cardíacos; la condición de monocapa definida químicamente descrita en la presente memoria debería ser una herramienta excelente para la consecución de estos factores.

Si bien la señalización de calcio/AMPC es importante en varios programas de diferenciación, su importancia concreta en la especificación del mesodermo cardiogénico era desconocida previamente. Esta fase de diferenciación coincide con el movimiento hacia adentro de la gastrulación que naturalmente implica un aumento en las concentraciones de calcio. Sin embargo, el único papel que se pensaba que desempeñaba el calcio era la motilidad y los cambios morfogénicos que ocurren durante la gastrulación. En estudios de los autores de la presente invención, se demostró que el calcio también desempeña un papel de señalización en una ruta de AMPC para dirigir las células hacia un destino mesodérmico cardiogénico.

Si bien se han descrito las condiciones de la monocapa para la diferenciación de los derivados neurales y del endodermo, hasta donde saben los autores de la presente invención, aún se tiene que lograr un éxito similar en la diferenciación cardíaca. El uso de una condición de diferenciación basal similar debería facilitar las comparaciones de diferentes poblaciones derivadas de ESC. Anteriormente, se informó de que BIO y BMP-4 estimulaban la autorrenovación de las mESC. En este estudio, se identificó un nuevo efecto de inducción de mesodermo cardíaco de BIO sobre ESC, y se observó un papel positivo fuerte para BMP-4 en la formación de mesodermo cardíaco. Claramente, el efecto de estas moléculas depende contextualmente de factores tales como la composición de las moléculas de señalización en el medio y la matriz extracelular. Como tal, el presente estudio destaca el valor del enfoque libre de suero y monocapa para el estudio de la diferenciación de ESC. Se deben facilitar análisis adicionales de la regulación de la cardiomiogénesis mediante el uso del sistema descrito, ya que la falta de componentes del medio indefinidos debería proporcionar resultados más confiables y consistentes. Del mismo modo, el uso de un procedimiento de diferenciación de monocapas permite imitaciones con un ajuste más fino del proceso de desarrollo *in vivo*.

Métodos

Generación de ESC activadas: Las células ES R1 se cultivaron en la capa de alimentación hasta cerca de la confluencia, se tripsinizaron, se resuspendieron en 0,2-0,5 ml de PBS y se transfirieron a una cubeta de electroporación con un espacio de 0,4 cm. La construcción dirigida linealizada (25-60 µg) se añadió a la cubeta y se mezcló brevemente con una pipeta y se colocó en hielo durante unos minutos antes de la electroporación. Se usó un BioRad Gene Pulser II a una capacitancia máxima y 500V. La cubeta se enfrió inmediatamente durante 10 minutos. La mezcla se resuspendió en medio de ES caliente y se sembró en la capa de alimentación (placa de 16 pocillos). Al día siguiente, los medios se cambiaron y la selección comenzó con 0,1 µg/ml de puomicina. Cuando las colonias se volvieron claramente visibles a simple vista, aproximadamente una semana más tarde, se seleccionaron las colonias. Las colonias que exhibían forma de colonia redonda y bordes definidos se recogieron utilizando una pipeta de 200 µl, que contenía 30 µl de tripsina, y se transfirieron a placas de 96 pocillos. Las células se dividieron a continuación en placas de 96 pocillos para la congelación y placas de 24 pocillos para la recolección del ADN. El ADN se recogió añadiendo tampón de lisis de sarcosilo e incubando durante la noche. La lisis se transfirió a tubos que contenían 5 ul de proteinasa K y se mezclaron. Los tubos se rellenaron a continuación con EtOH y se mezclaron hasta que se formó el precipitado y se centrifugaron durante 2 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se retiró y se añadieron otros 500 uL de EtOH del 70% y se sometió a agitación vorticial. Después de otra centrifugación de 5 minutos a rpm máximas, se separó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar al aire, antes de resuspender el sedimento en 125 ul de agua.

Se diseñaron un conjunto de cebadores específico para el promotor Nkx2.5 y el inserto GFP para utilizarse para someter a ensayo la integración correcta del vector. Se realizaron reacciones de PCR para los 500 clones

generados, mostrando 10 de los clones el tamaño correcto del producto de PCR en un gel de electroforesis. Las 10 líneas celulares con la inserción correcta de GFP en el locus Nkx2.5 se ampliaron para el ensayo. Se generaron cuerpos embrioides en gota colgante para cada línea celular y se controlaron diariamente para determinar la expresión de GFP.

- 5 **Mantenimiento de células madre embrionarias:** Todos los reactivos son de Invitrogen a menos que se indique lo contrario. Las mESC R1 se cultivan en placas recubiertas con gelatina al 0,1% con células MEF (CF-1) irradiadas en medio de crecimiento (ESGM). ESGM contiene DMEM Inactivado, Sustituto de Suero Inactivado al 15%, 1x L-Glutamax, beta-mercaptoetanol 1 mM, 1x aminoácidos no esenciales, 1x nucleósidos, y 1000 U/ml de LIF (Millipore).
10 Todos los reactivos son de Invitrogen a menos que se indique lo contrario. Antes de la diferenciación, las células se pasaron una vez por MEF de baja densidad.

- Diferenciación cardíaca:** Las células se colocan en placas a una densidad de 200.000 células/pocillo de una placa de 6 pocillos en 2,5 ml de ESGM. Las placas de 6 pocillos se recubren durante la noche a 4°C con 1 ml de Matrigel (BD Bioscience) diluido 50 veces a partir de la concentración de partida. Veinticuatro horas después del cultivo en placa, o después de alcanzar un tamaño de colonia suficiente, las células se cambian a medio químicamente
15 definido (CDM) y se tratan con BIO 4 μ M (Calbiochem) y 20 ng/ml de BMP-4 (R&D). CDM contiene RPMI 1640, 0,5x N2, 1x B27 (sin vitamina A), 0,5x Glutamax, beta-mercaptoetanol 0,55 mM, 1x aminoácidos no esenciales, 1x nucleósidos. El día 2, se cambia el medio y nuevamente se añade a las células CDM que contiene BIO 4 μ M con 20 ng/ml de BMP-4. El día 5, las células se lavan una vez con PBS y el medio se cambia a CDM que contiene 100 ng/ml de Dkk-1 (R&D). El día 7, se cambia el medio y nuevamente se agrega MDL que contiene 100 ng/ml de Dkk-1
20 a las células. El día 10, las células se tripsinizan (0,05% de tripsina) (aproximadamente 5 minutos a 37°C o hasta que las células comienzan a desprenderse) y se vuelven a colocar sobre placas de 6 pocillos recubiertas de gelatina en CDM sin factores de crecimiento adicionales. En este momento, las células habrán formado colonias densas que serán difíciles de alterar (Fig. 2b complementaria). Si las células no se desprenden solo con tripsina, se puede utilizar un raspador de células. La tripsina se utiliza principalmente para separar las células en lugar de disociarlas a una suspensión de una sola célula. Es preferible que las colonias permanezcan intactas. La tripsina se inactiva brevemente con medio MEF, las células se centrifugan y se resuspenden en CDM para el cultivo en placa. El medio se actualiza según sea necesario para eliminar las células muertas y los desechos (cada 1 a 2 días).

- Inmunofluorescencia:** Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (Sigma) durante 15 minutos y se tiñeron en Triton al 0,3% (Sigma) que contenía suero de burro al 5% (Jackson ImmunoResearch). Los anticuerpos se utilizaron en diluciones de MF20 [*Developmental Studies Hybridoma Bank* (DSHB)] 1:100, CT3 (DSHB) 1:100, Nkx2.5 (Santa Cruz) 1:200, MEF-2c (Santa Cruz), Islet-1 (DSHB) 1:100 y Brachyury T (Santa Cruz) 1:200. Se utilizaron anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch) a 1:200 para Cy2 y 1:500 para Cy3. Los núcleos se tiñen con DAPI (Sigma).
30

- Análisis FACS:** Las células se recogieron en una suspensión de células individuales mediante tratamiento con tripsina al 0,05%, se inactivaron con medio que contenía suero y se resuspendieron en tampón FACS: 1x PBS (libre de Ca/Mg^{2+}), EDTA 1 mM, HEPES 25 mM pH 7,0, suero fetal bovino al 1%. Las células se filtraron a continuación con un filtro de 0,2 μ m y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.
35

- qRT-PCR:** El ARN total de cada muestra se preparó a partir de 5×10^4 células que utilizan el mini kit RNeasy (Qiagen). La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando Reverse Transcription System (Promega) y la PCR se realizó utilizando PCR Super Mix (Invitrogen).
40

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para convertir una célula animal de un primer destino celular no pluripotente a un segundo destino celular no pluripotente, comprendiendo el método:

5 aumentar la cantidad de al menos un factor de transcripción de reprogramación en una primera célula no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente para generar una célula intermedia no pluripotente introduciendo en la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 o un polipéptido c-Myc, o

10 poner en contacto la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más de un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; y

15 someter la célula intermedia no pluripotente a factores diferenciadores específicos del linaje para inducir la diferenciación de la célula intermedia no pluripotente para generar una célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente, en donde (i) la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog, y (ii) la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente es una célula de linaje mesodérmico, una célula de linaje ectodérmico o una célula de linaje endodérmico.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de JAK.

20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente es un fibroblasto o una célula precursora neural.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente es un cardiomiocito, una célula que tiene un destino celular neuronal o una célula que tiene un destino celular pancreático.

25 5. El método de la reivindicación 4, en donde la etapa de presentación comprende poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con BMP4, un agonista de los canales de calcio, un agente activador de Gas, un análogo de AMPc y/o un inhibidor de GSK-3.

6. Un método *in vitro* de transdiferenciación de una célula animal a un cardiomiocito, que comprende:

30 introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2, para generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog; y

35 poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de GSK-3, un agonista de los canales de calcio, un agente activador de Gas, un análogo de AMPc, y/o una proteína BMP en condiciones para la generación del cardiomiocito;

diferenciando así la célula intermedia no pluripotente al cardiomiocito.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la célula animal no pluripotente es una célula humana.

8. El método de la reivindicación 6, en donde el método comprende adicionalmente poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de JAK.

40 9. El método de la reivindicación 8, en donde la célula intermedia no pluripotente se pone en contacto con el inhibidor de JAK antes de poner en contacto la célula con el inhibidor de GSK-3, el agonista del canal de calcio, el agente activador de Gas, el análogo de AMPc y/o la proteína BMP.

10. Un método *in vitro* para la transdiferenciación de una célula animal a una célula progenitora neural, comprendiendo el método:

45 introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2, para generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog; y

50 poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con FGF2, FGF4 y EGF en condiciones para la generación de la célula progenitora neural;

diferenciando así la célula intermedia no pluripotente a la célula progenitora neural.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el método comprende adicionalmente poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de Wnt, un inhibidor de JAK, o tanto un inhibidor de Wnt como un inhibidor de JAK.

5 12. El método de la reivindicación 11, en donde la célula intermedia no pluripotente se pone en contacto con el inhibidor de Wnt, el inhibidor de JAK o tanto el inhibidor de Wnt como el inhibidor de JAK antes de poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con FGF1, FGF4 y EGF.

13. Un método in vitro para la transdiferenciación de una célula animal a una célula de endodermo definitiva inducida (iDE), comprendiendo el método:

10 introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc, para
15 generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog; y

poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de HDAC y un miembro de la familia de TGFβ/Activina/Nodal en condiciones para la generación de la célula iDE;

20 diferenciando así la célula intermedia no pluripotente a la célula iDE.

14. Un método in vitro para la transdiferenciación de una célula animal a una célula beta pancreática, comprendiendo el método:

(1) introducir en una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; o poner en contacto una primera célula animal no pluripotente que tiene un primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, y opcionalmente uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido Klf4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido c-Myc; para
25 generar una célula intermedia no pluripotente, en donde la célula intermedia no pluripotente no expresa significativamente Nanog;

(2) poner en contacto la célula intermedia no pluripotente con un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de HDAC y un miembro de la familia de TGFβ/Activina/Nodal en condiciones para la generación de una célula de iDE; y

(3) bajo condiciones para la generación de la célula beta pancreática,

35 (a) poner en contacto la célula iDE con FGF7, RA, un inhibidor de la ruta Hedgehog, un inhibidor de BMP y un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5;

(b) poner en contacto la célula de la etapa (3) (a) con EGF y un inhibidor de Notch; y

(c) poner en contacto la célula de la etapa (3) (b) con bFGF y nicotinamida;

diferenciando así la célula intermedia no pluripotente a la célula beta pancreática.

40 15. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente es una célula mesodérmica, ectodérmica o endodérmica, y en donde la célula que tiene el segundo destino celular no pluripotente está en el mismo o diferente linaje celular que la primera célula no pluripotente.

16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene lugar sin requerir LIF exógeno.

45 17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 15 o 16 que comprende introducir en la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente, uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2, o poner en contacto la primera célula no pluripotente que tiene el primer destino celular no pluripotente con un polipéptido Oct4, un polipéptido Klf4 y un polipéptido Sox2.
50

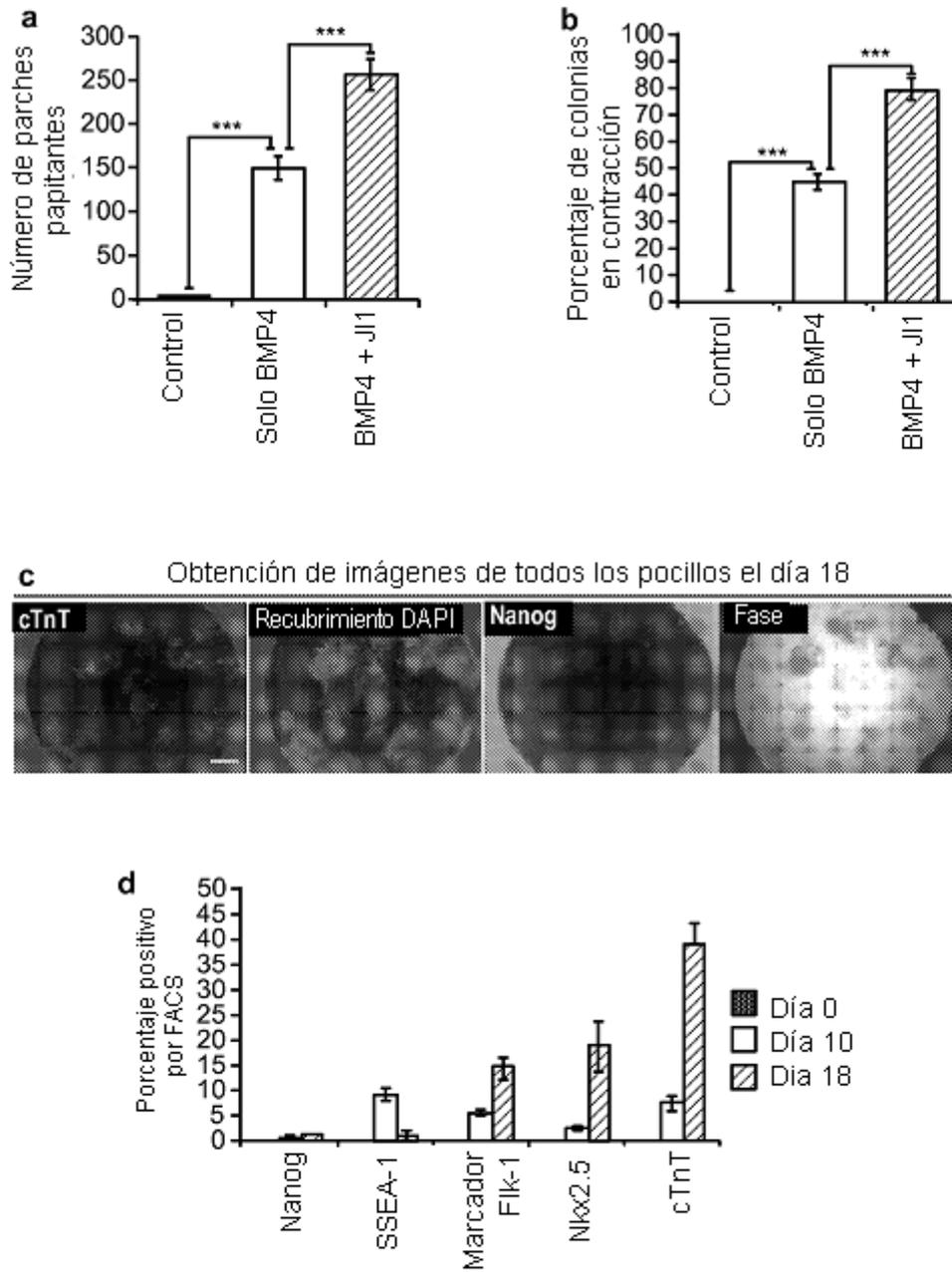


FIG. 2

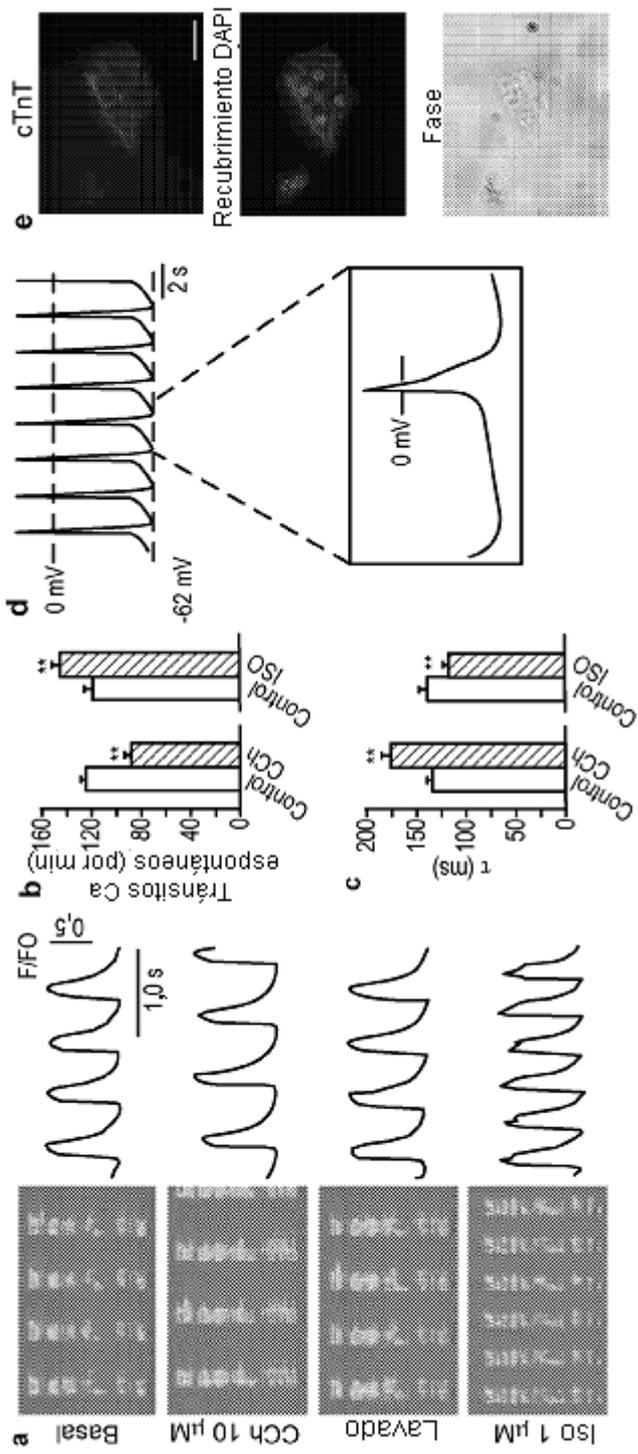


FIG. 3

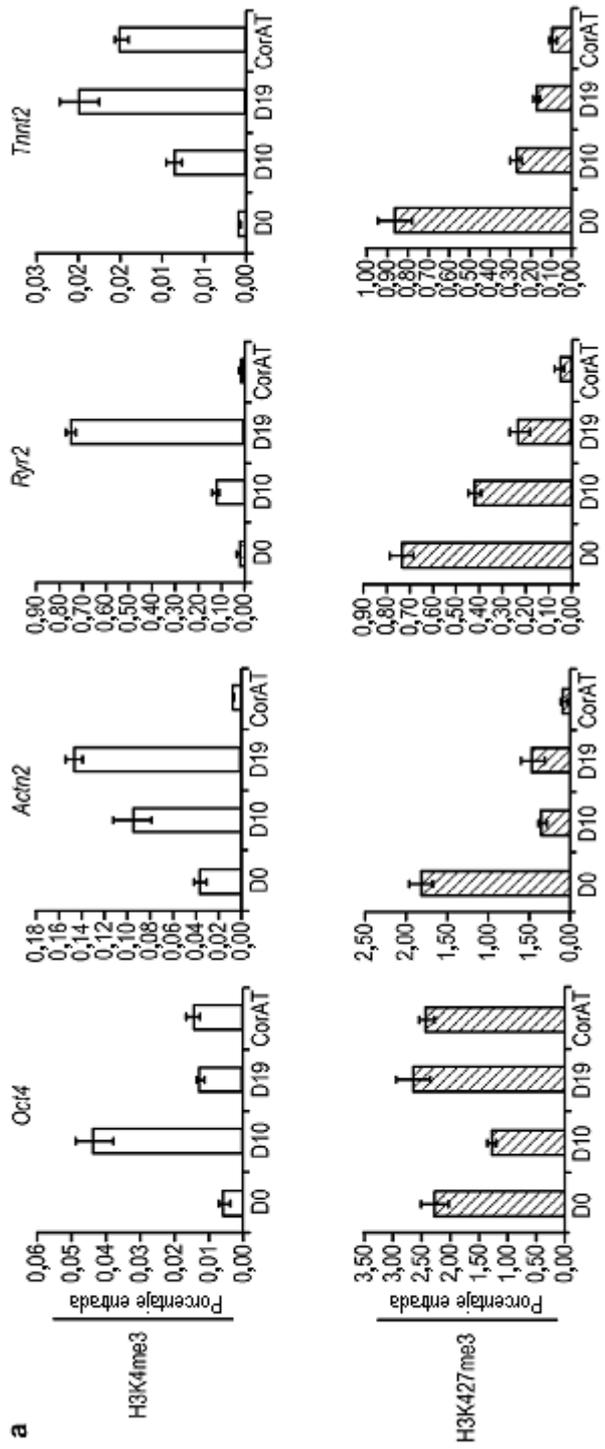


FIG. 4

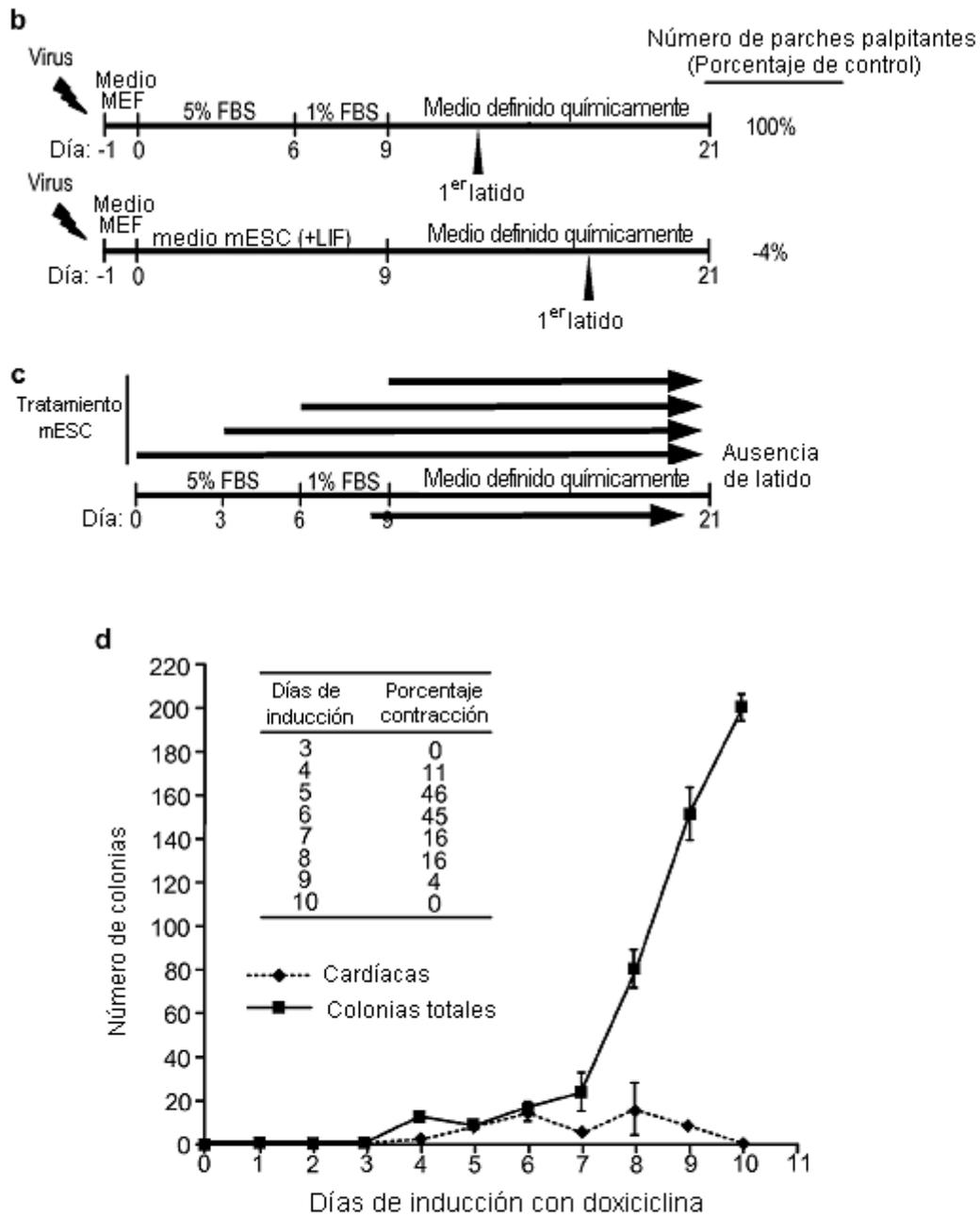


FIG. 4

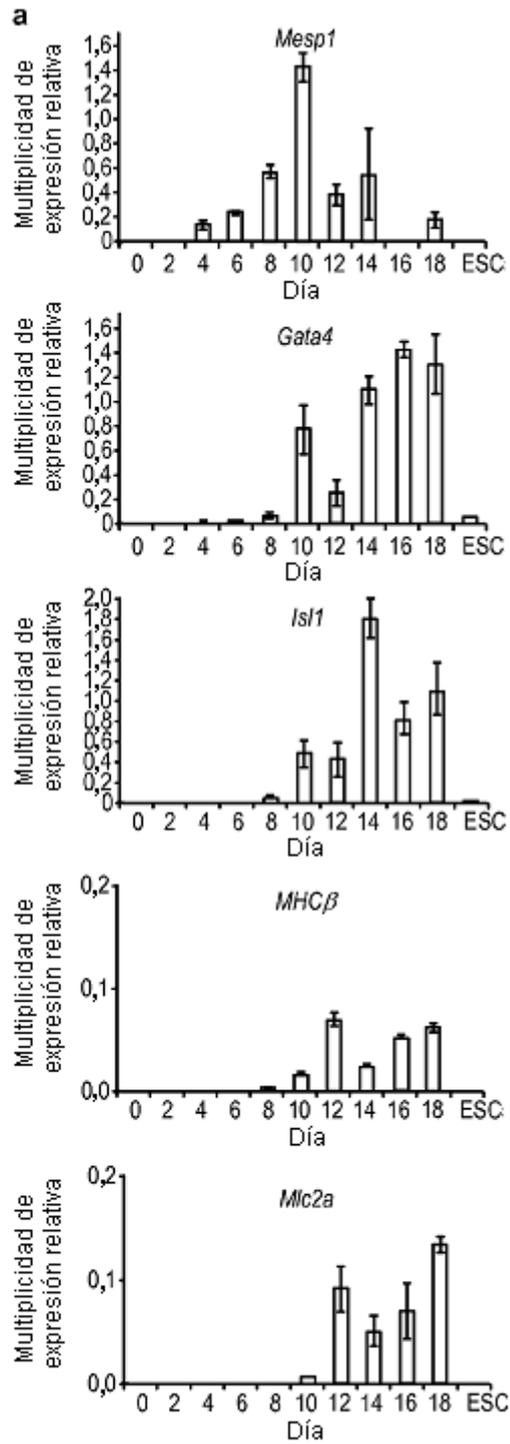


FIG. 5

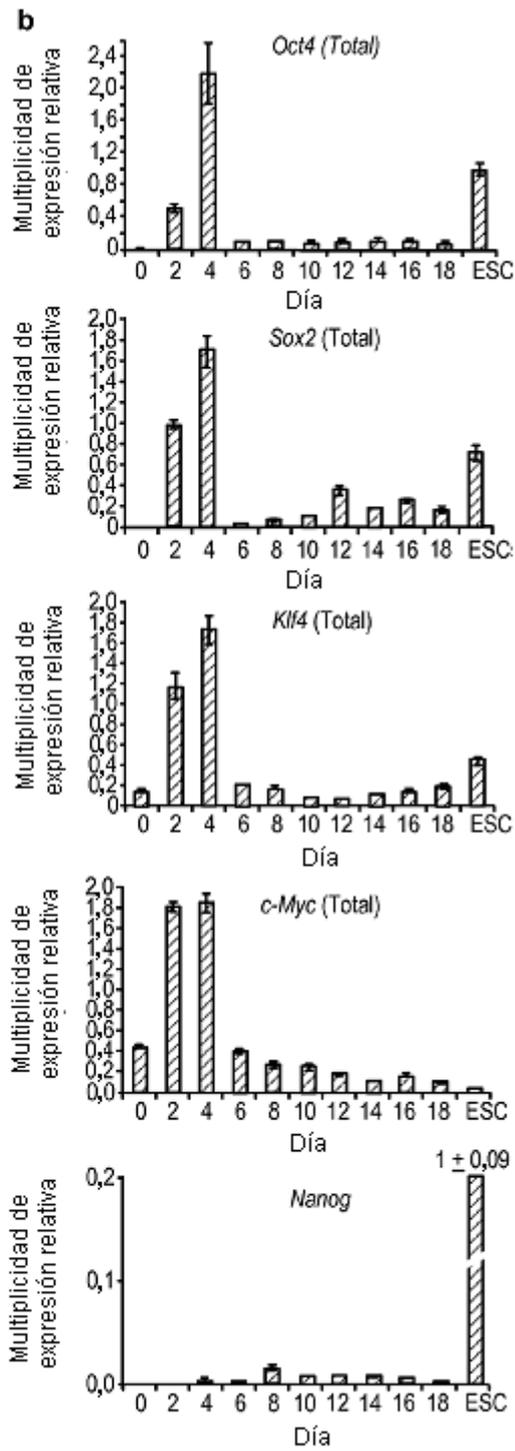


FIG. 5

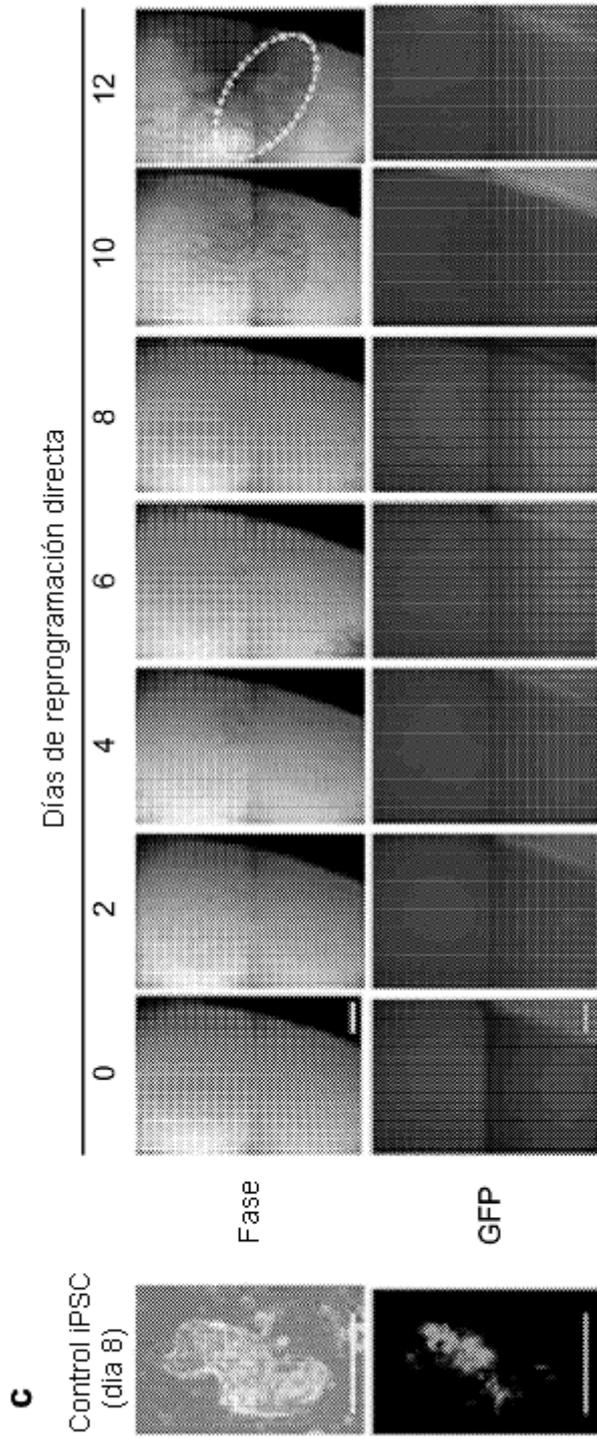


FIG. 5

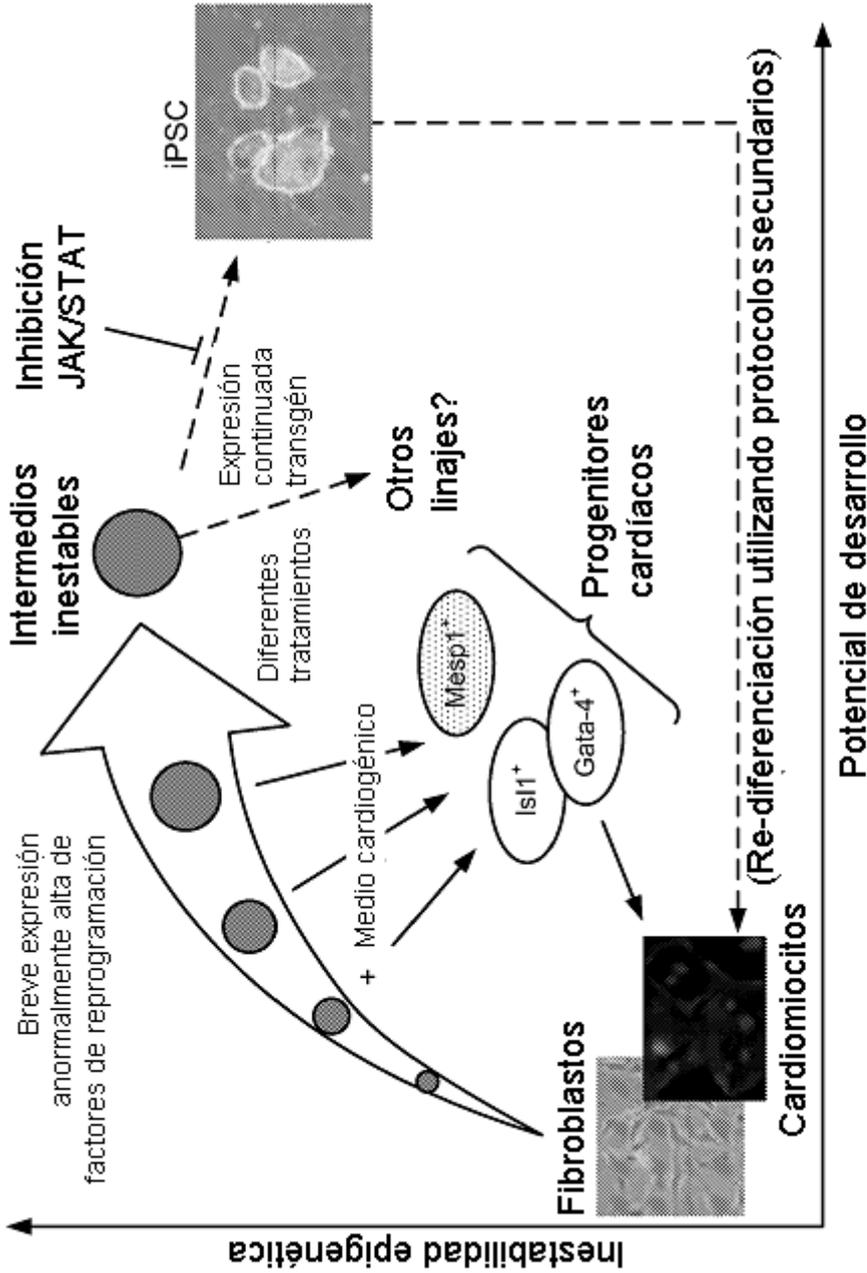


FIG. 6

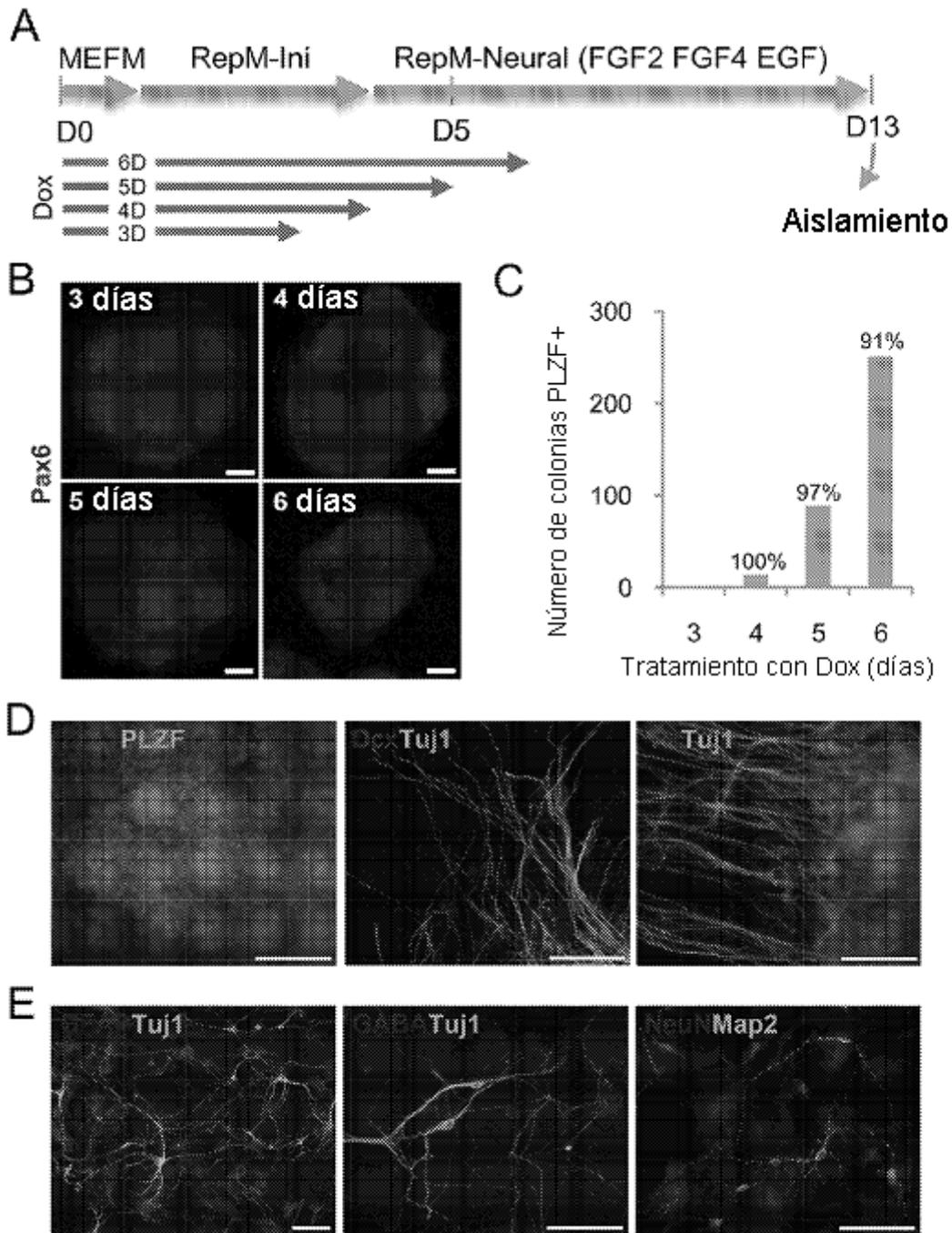


FIG. 7

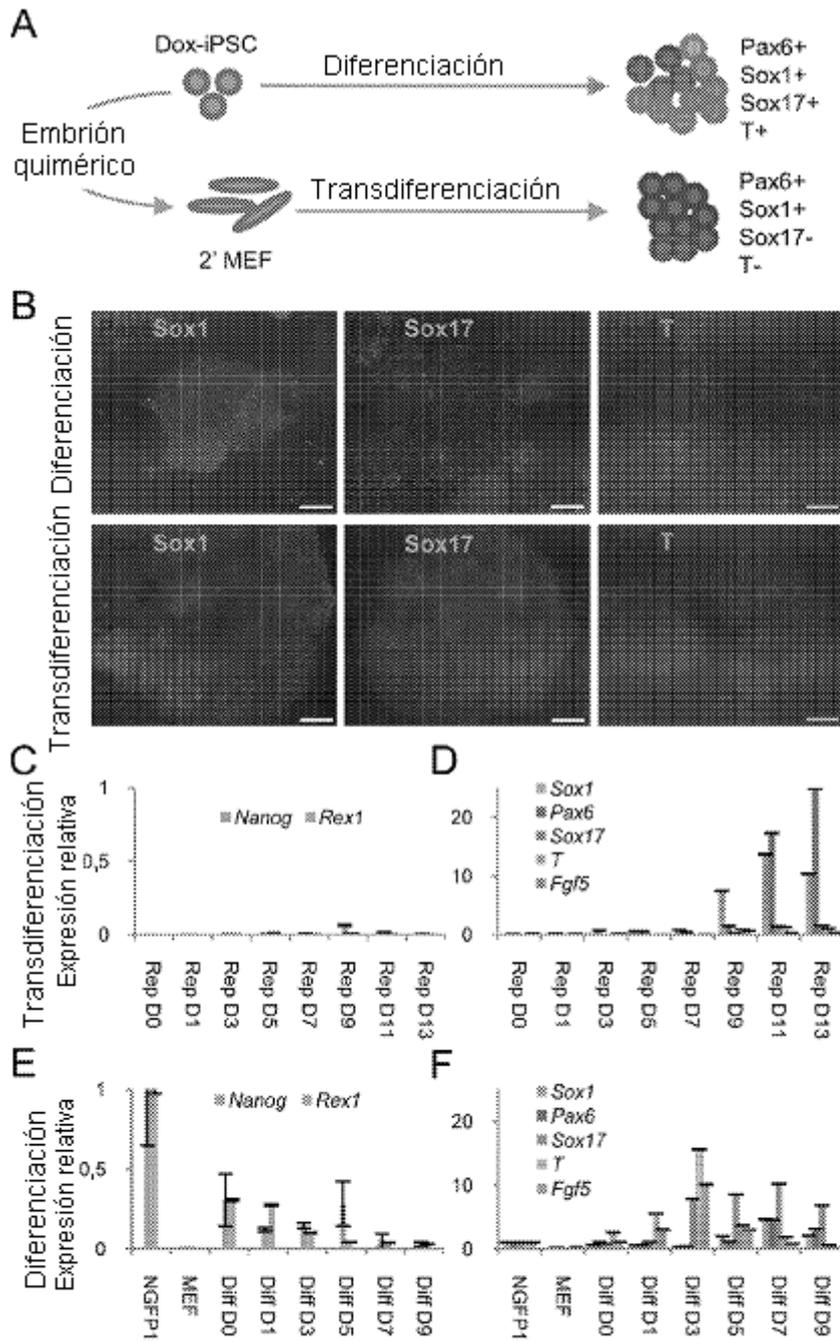


FIG. 8

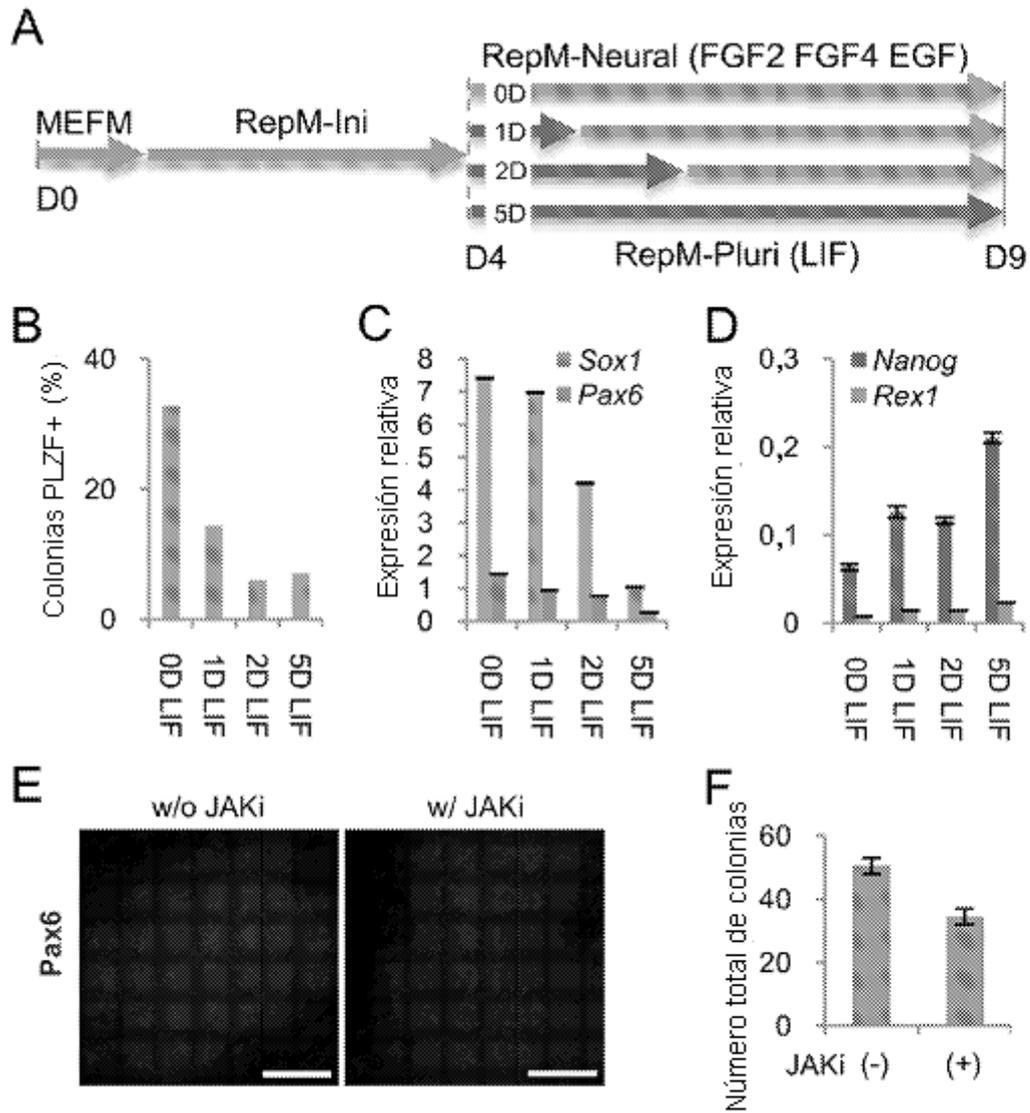


FIG. 9

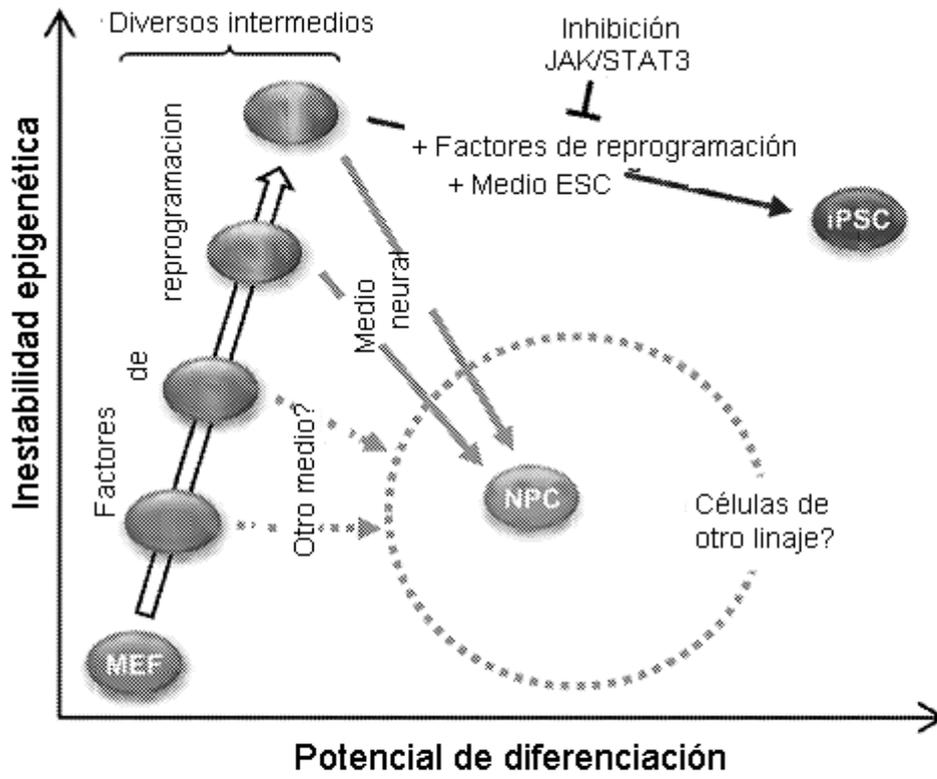


FIG. 10

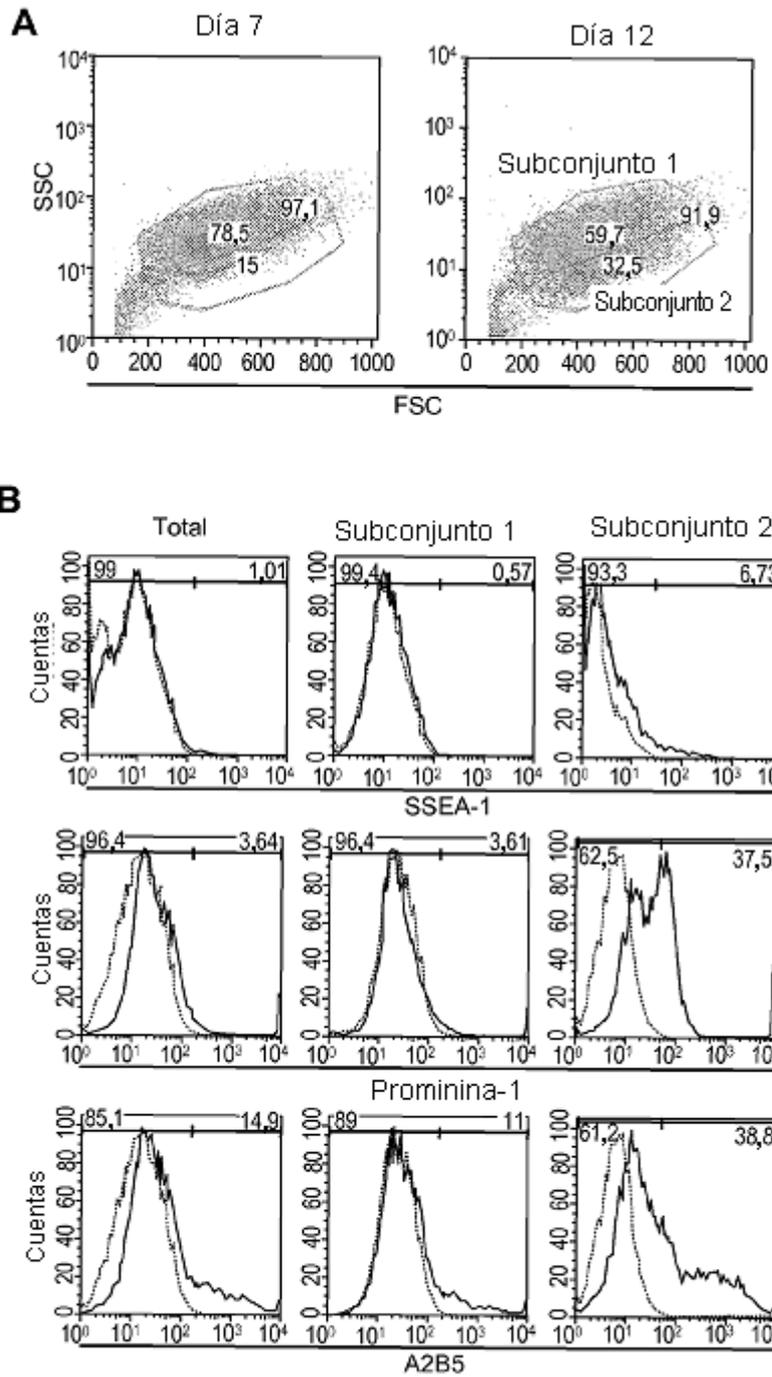
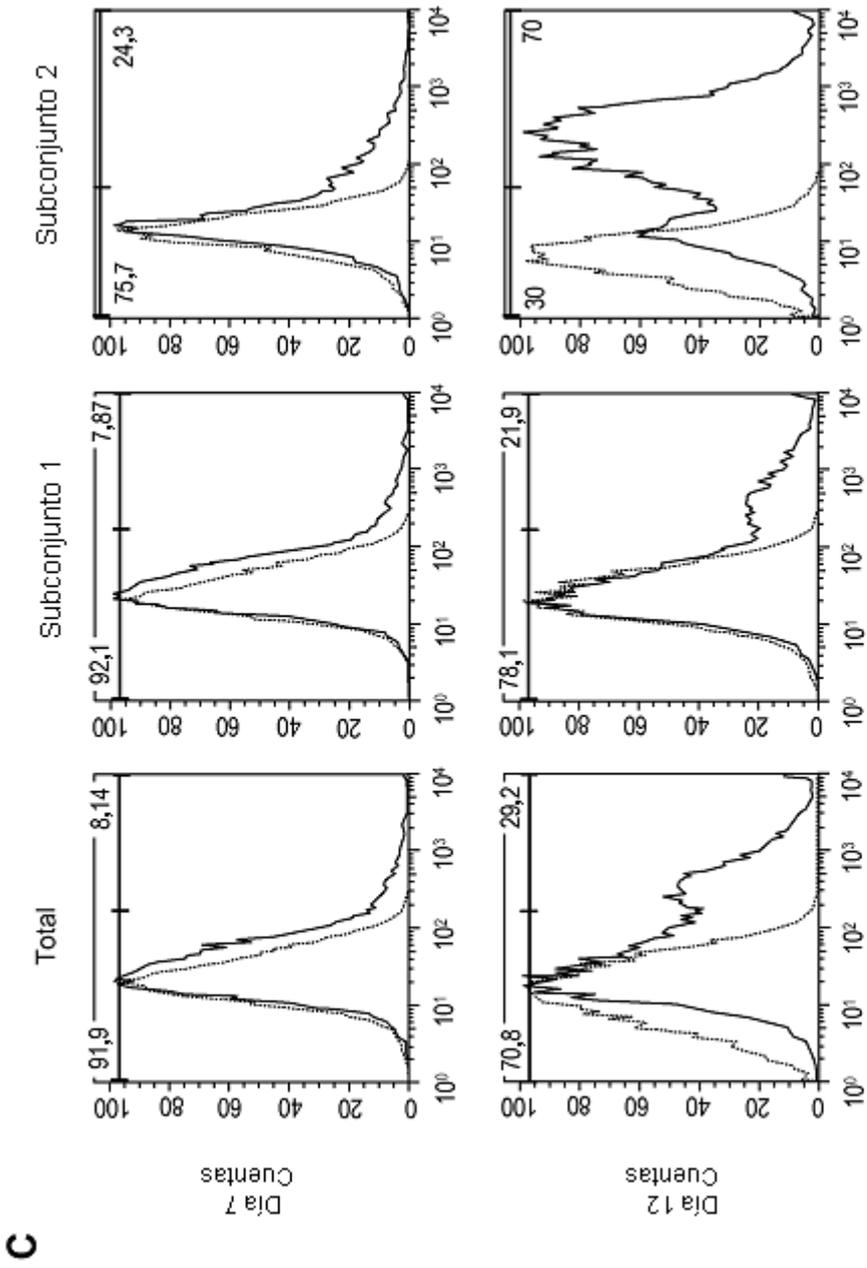


FIG. 11



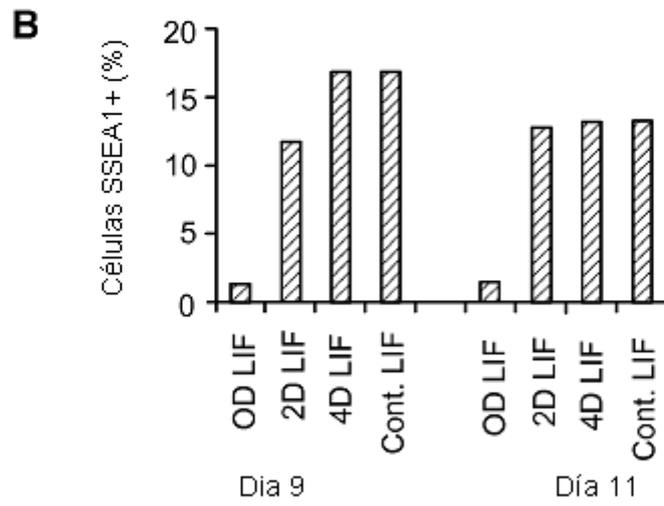
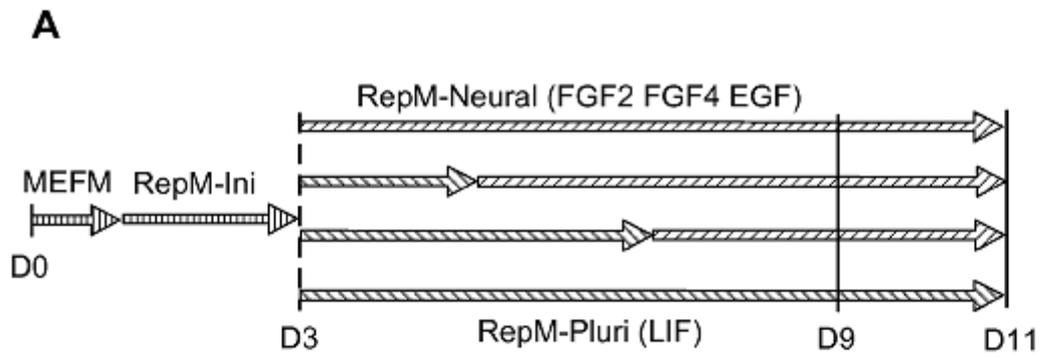


FIG. 12

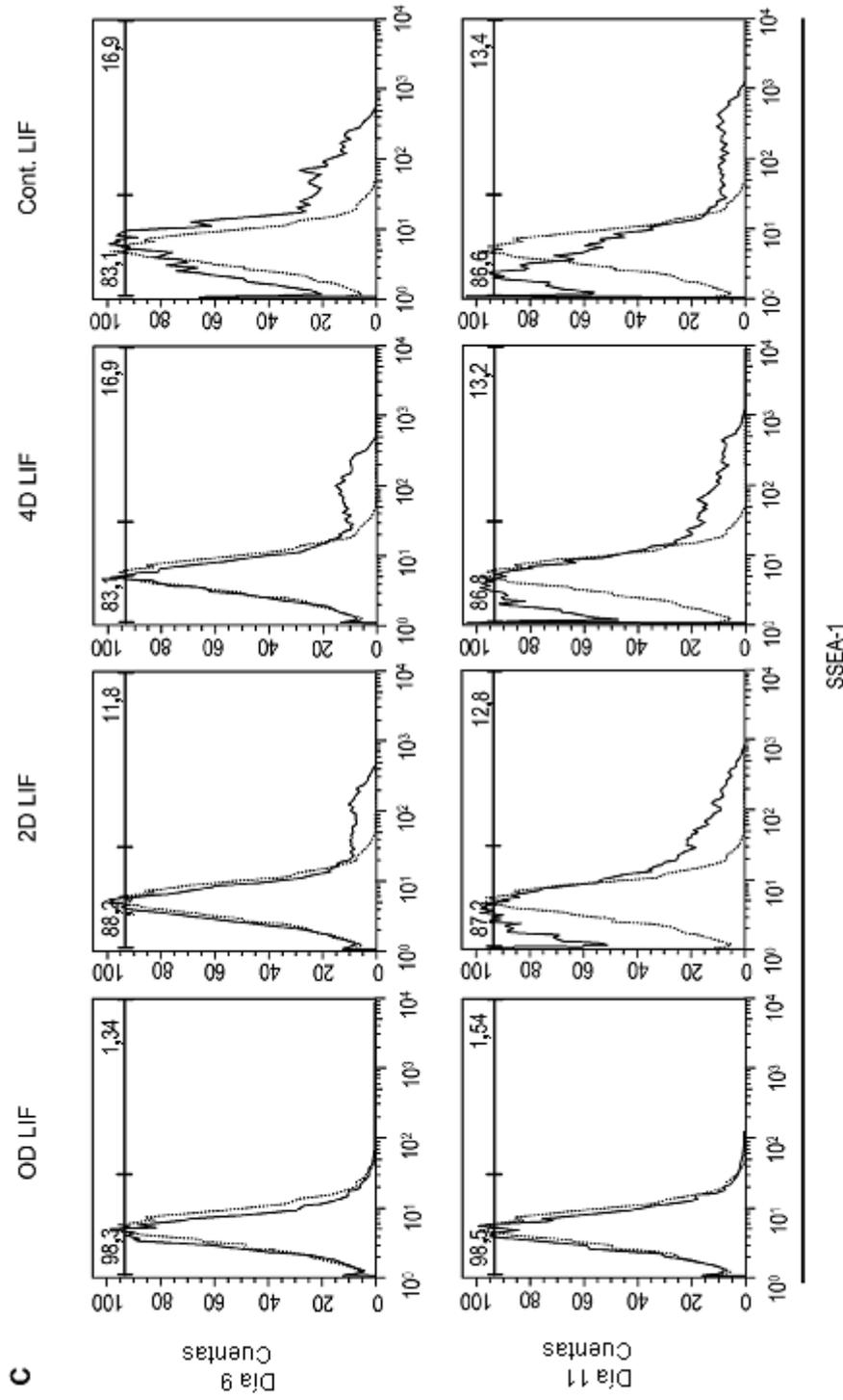


FIG. 12

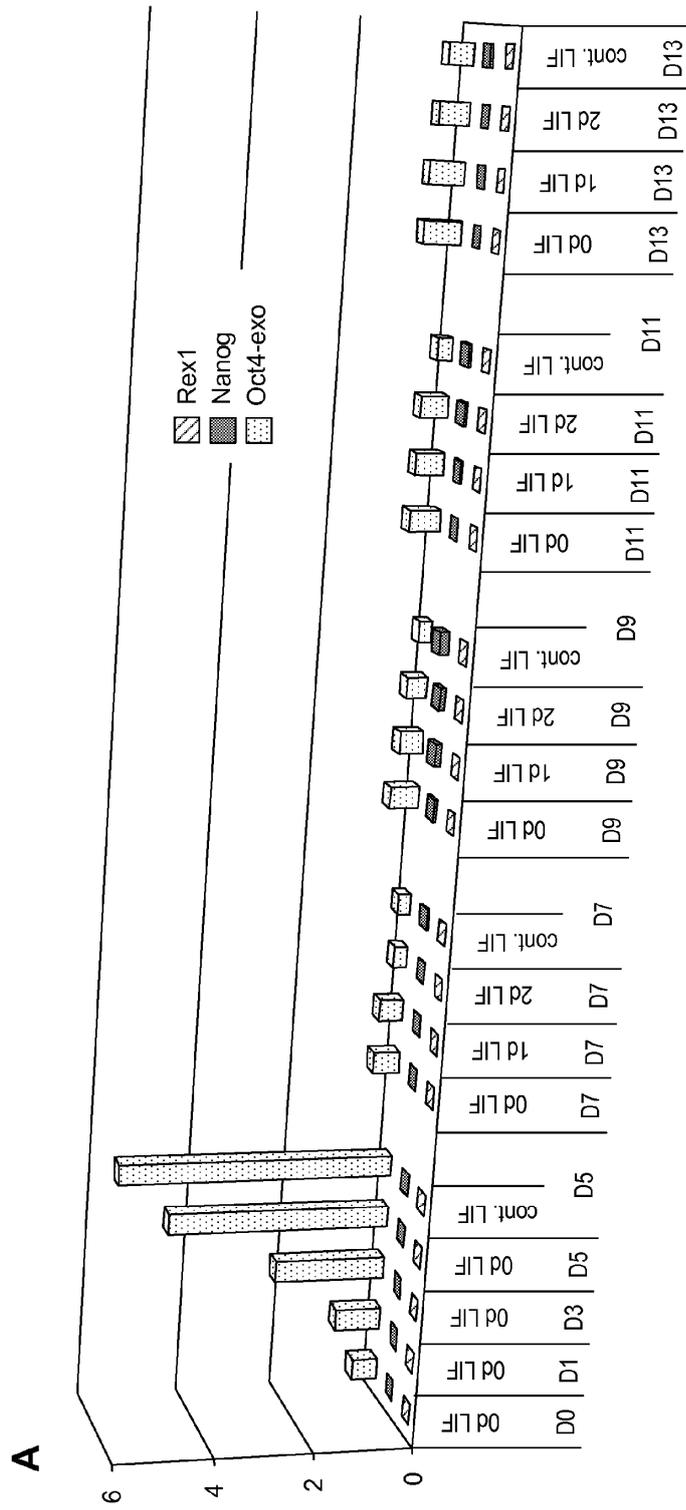


FIG. 13

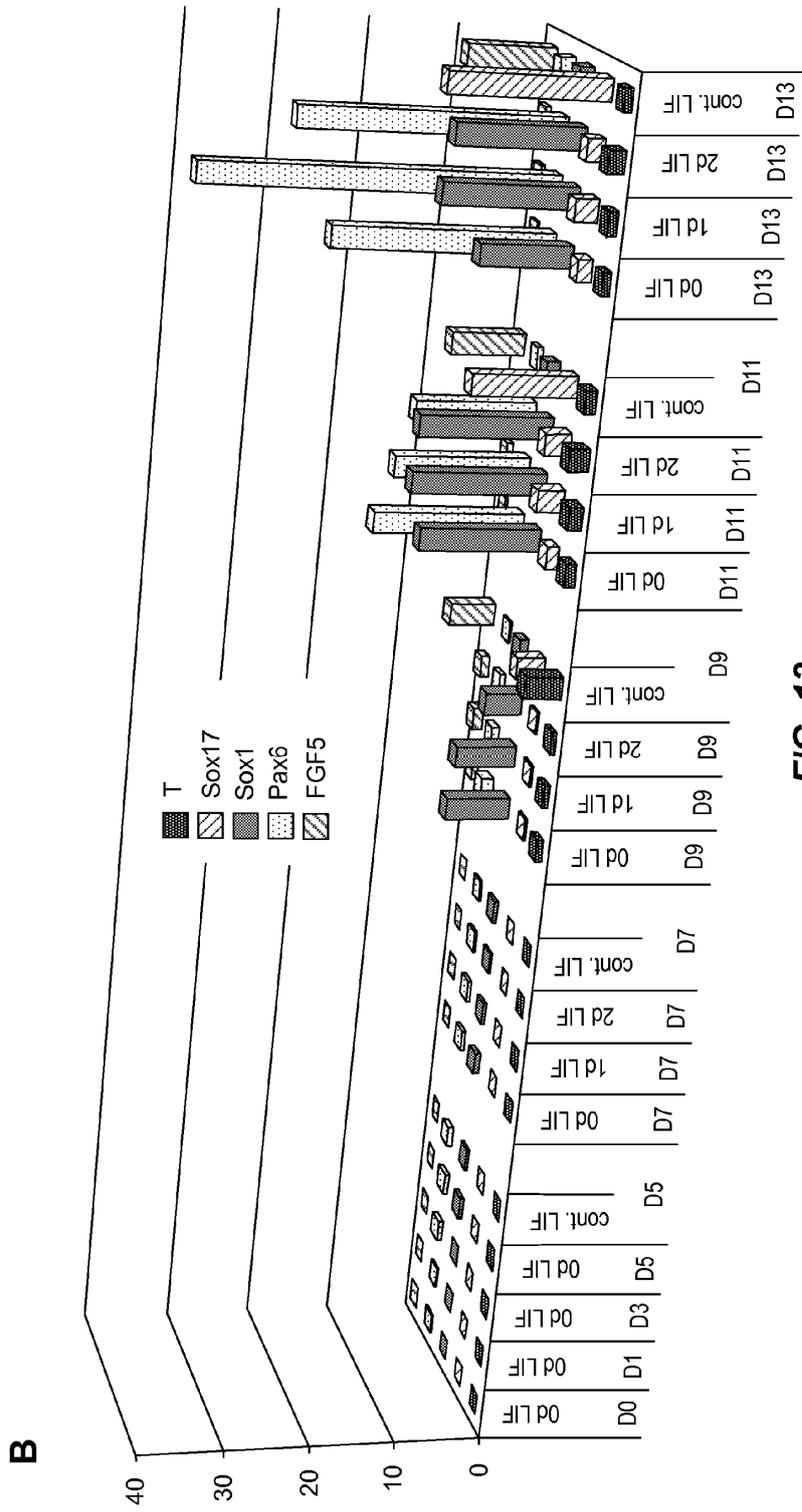


FIG. 13

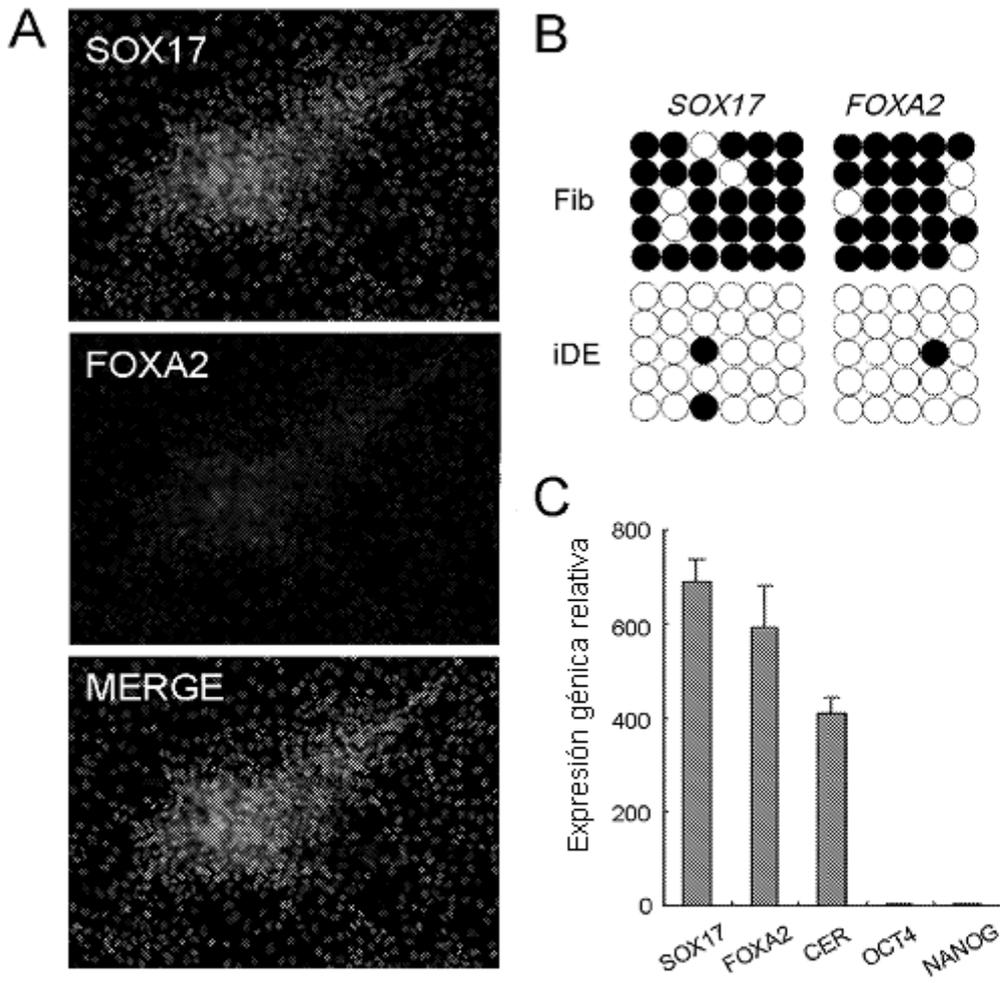


FIG. 14

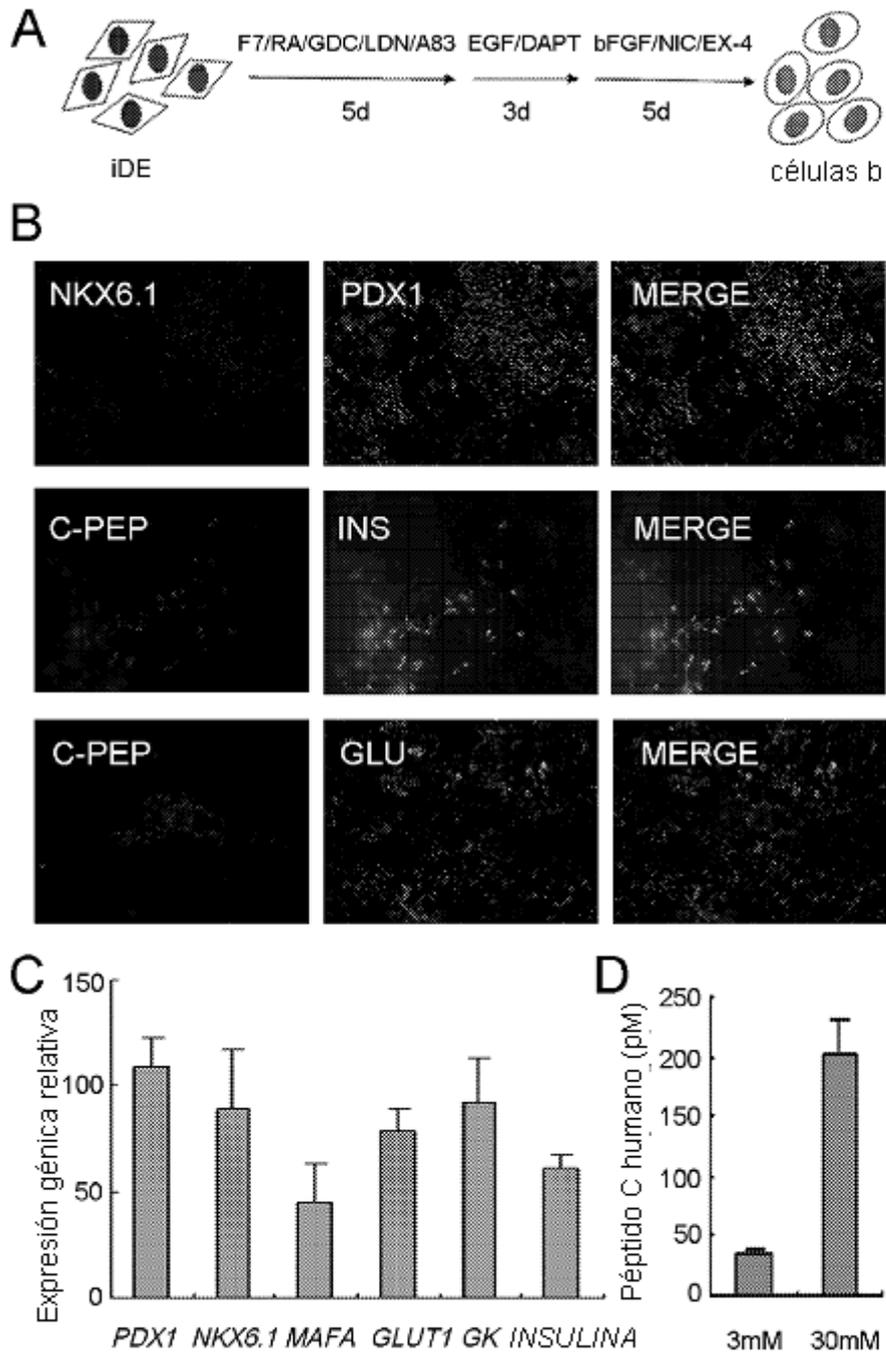


FIG. 15

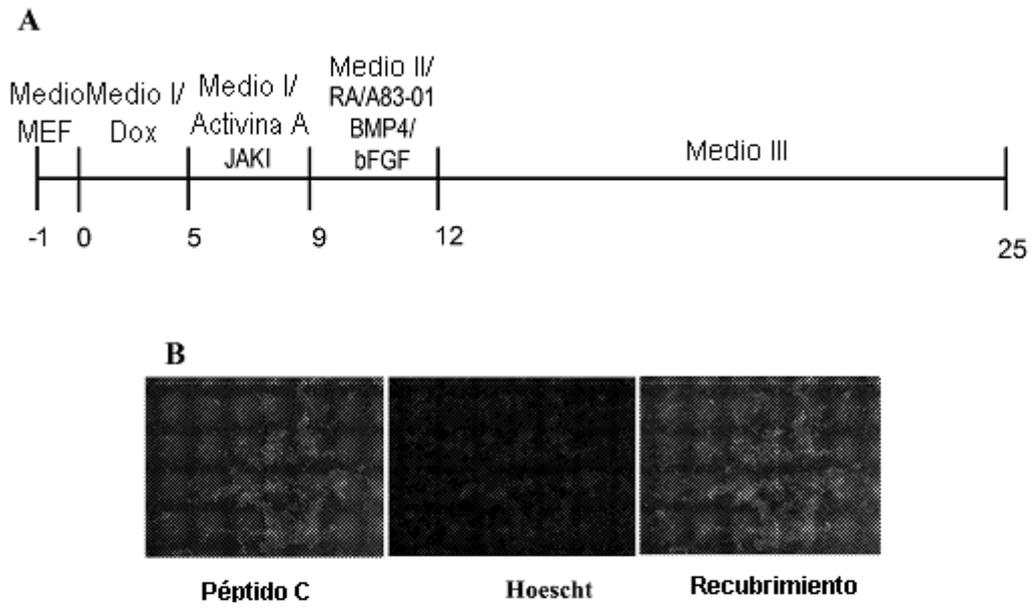


FIG. 16

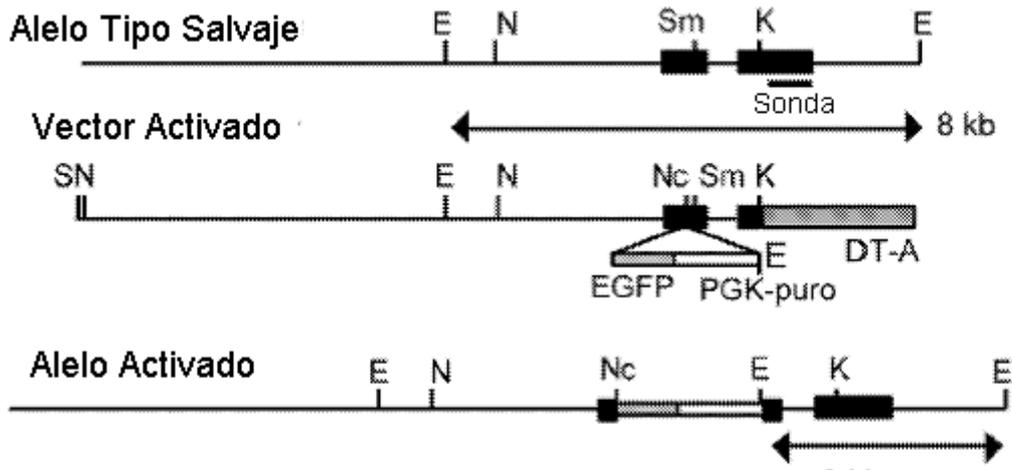


FIG. 17

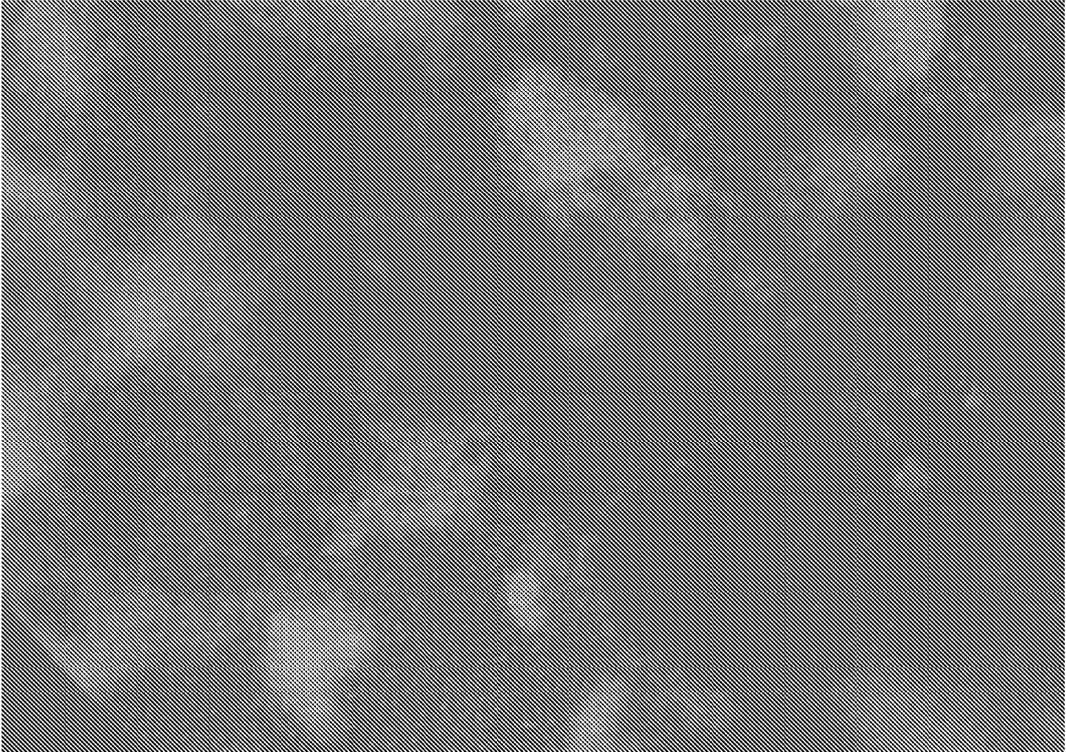


FIG. 18

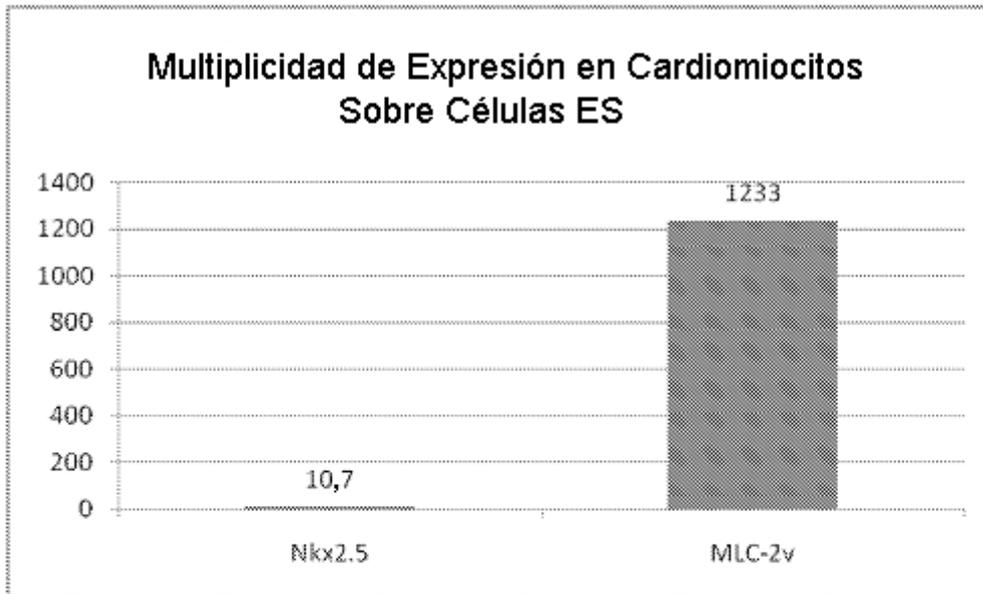


FIG. 19

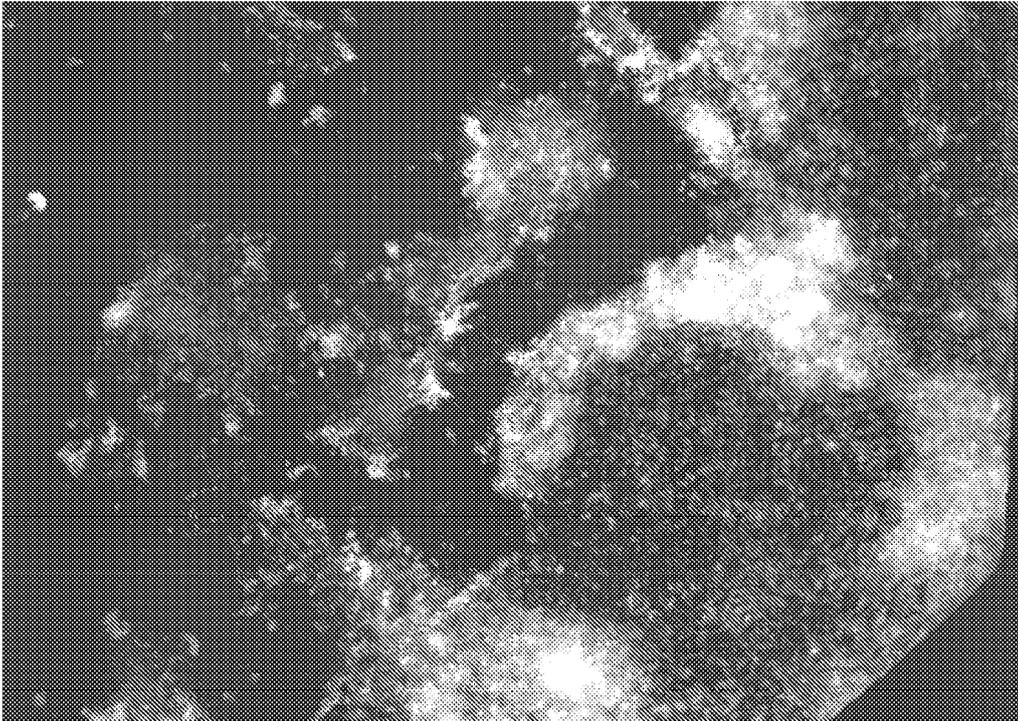


FIG. 20

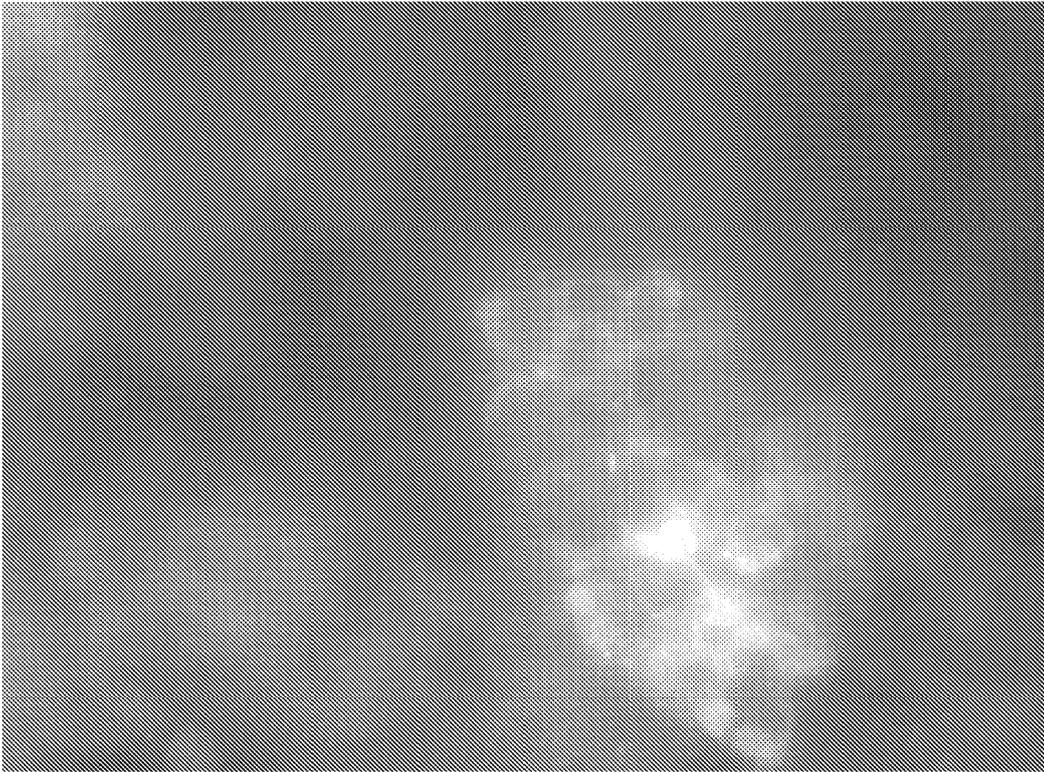


FIG. 21

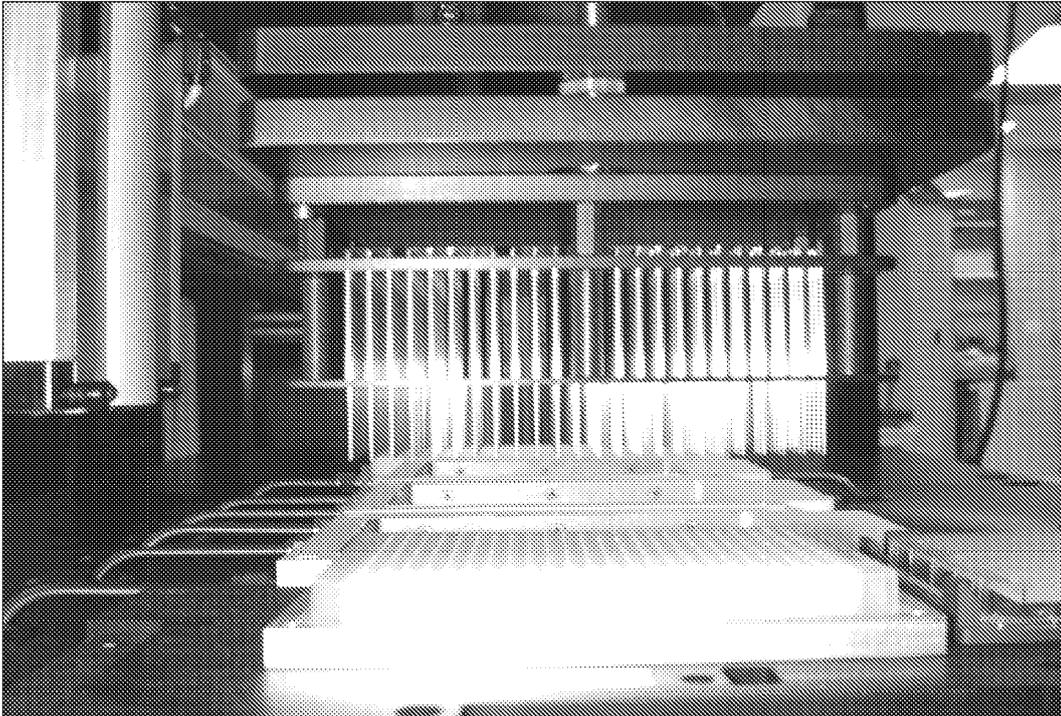


FIG. 22

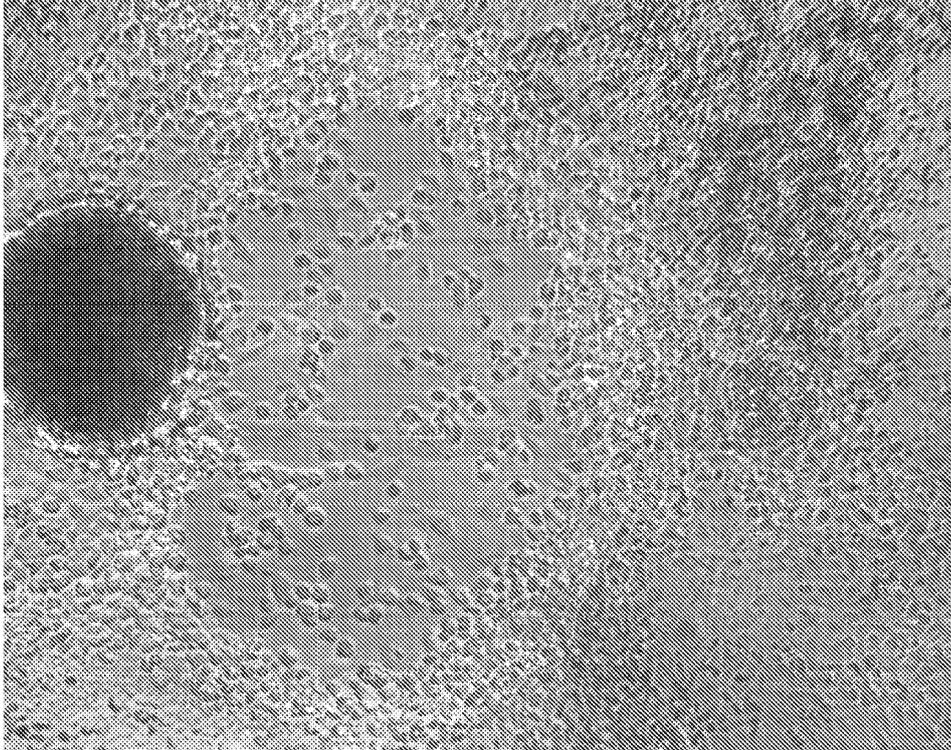


FIG. 23

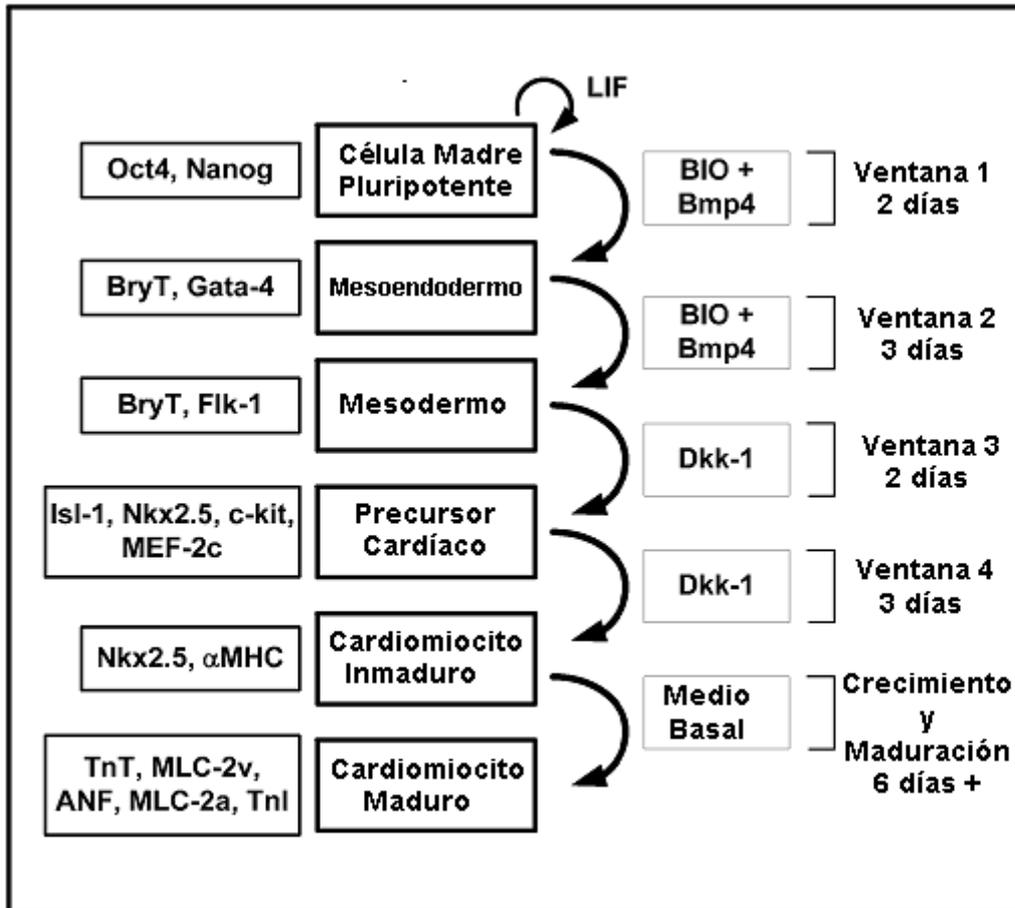


FIG. 24

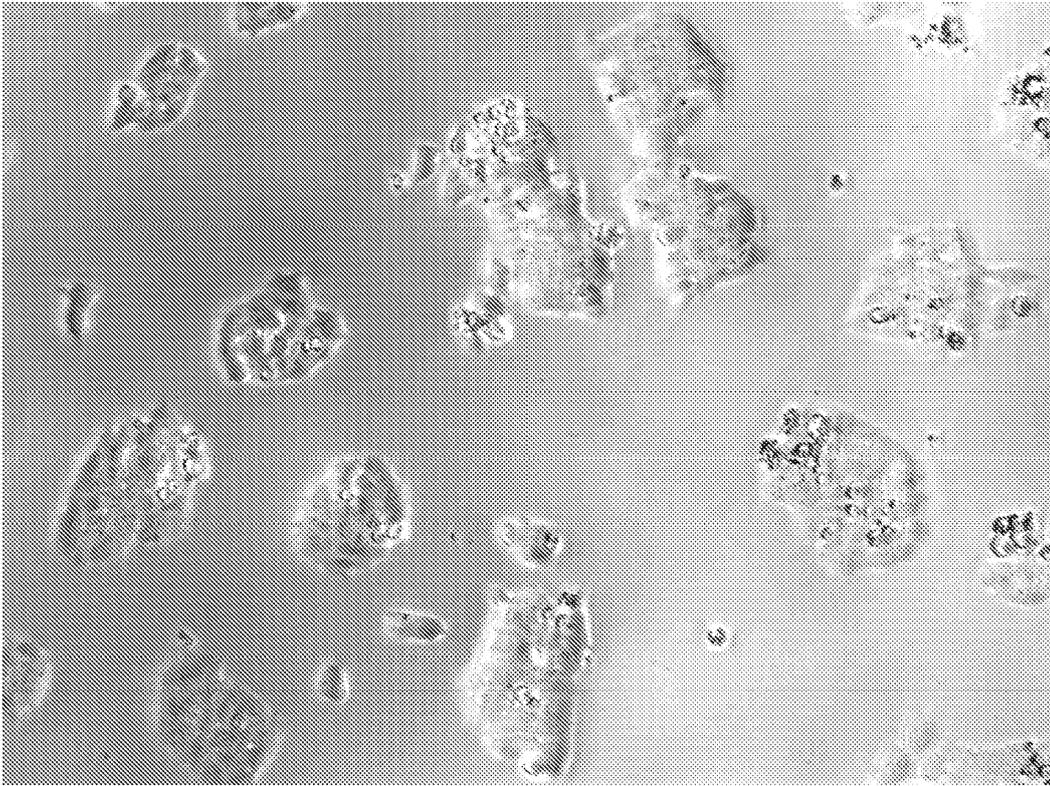


FIG. 25

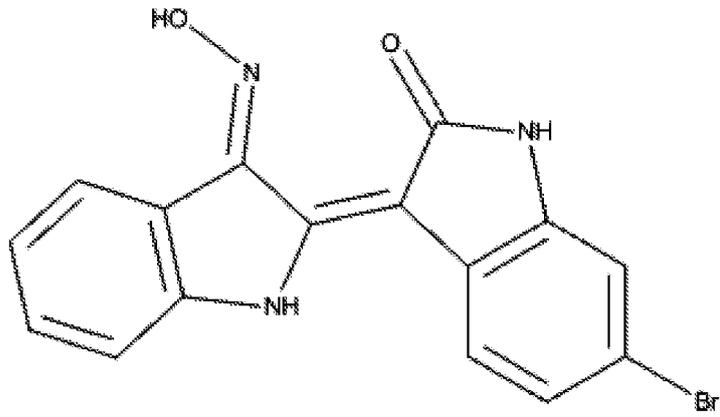


FIG. 26

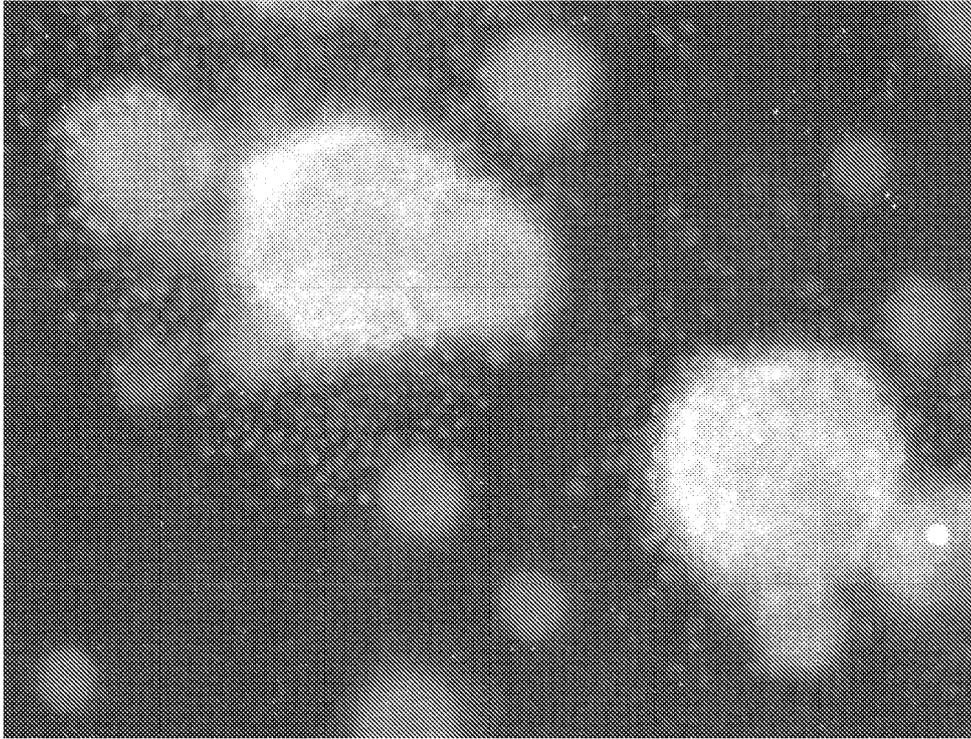


FIG. 27

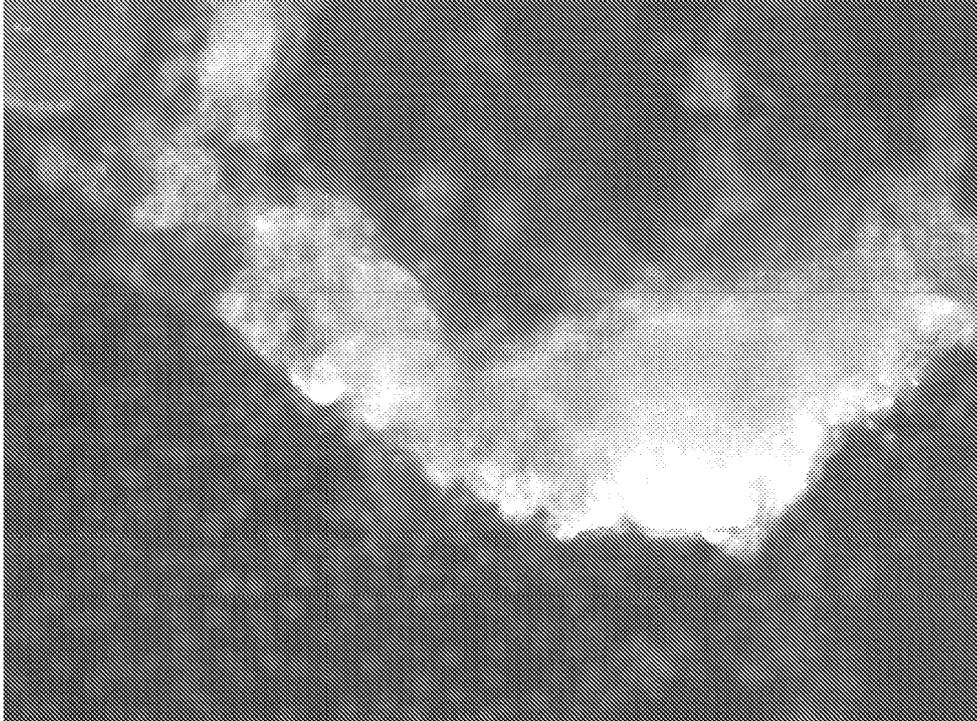


FIG. 28

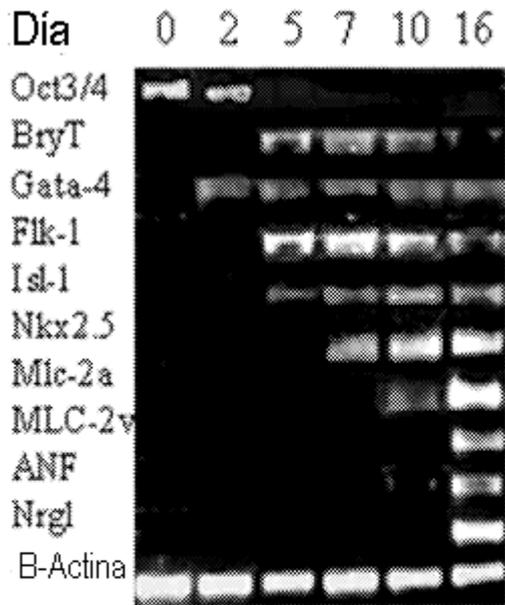


FIG. 29

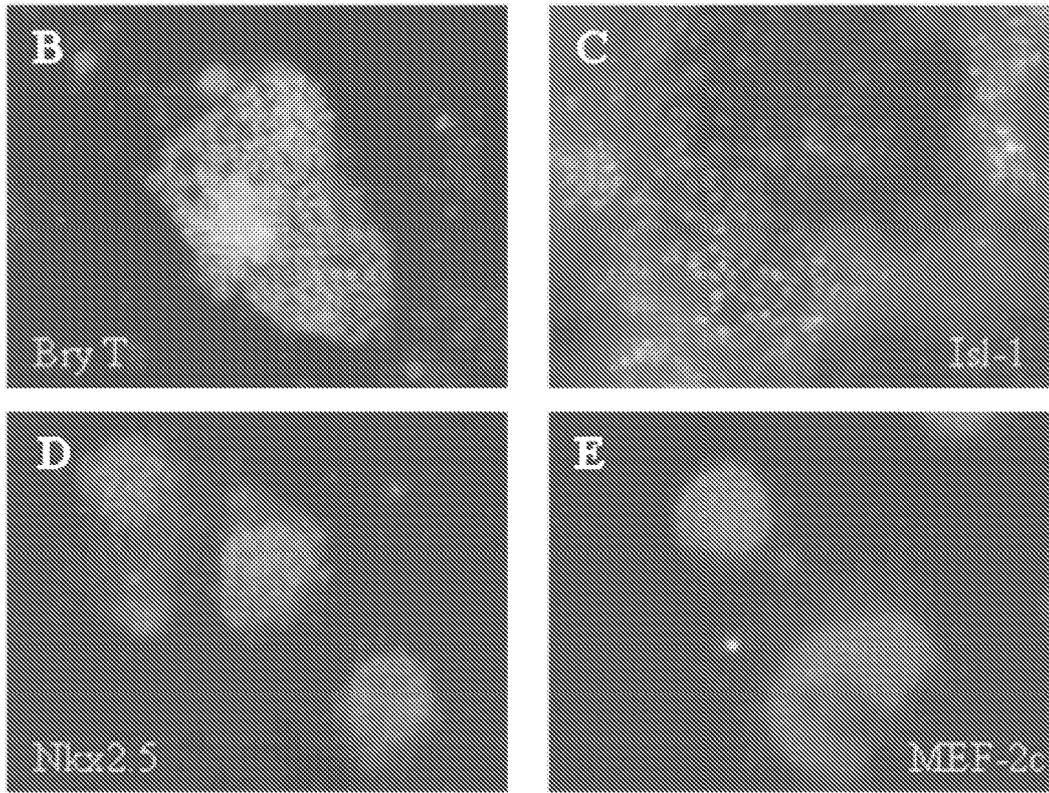


FIG. 30

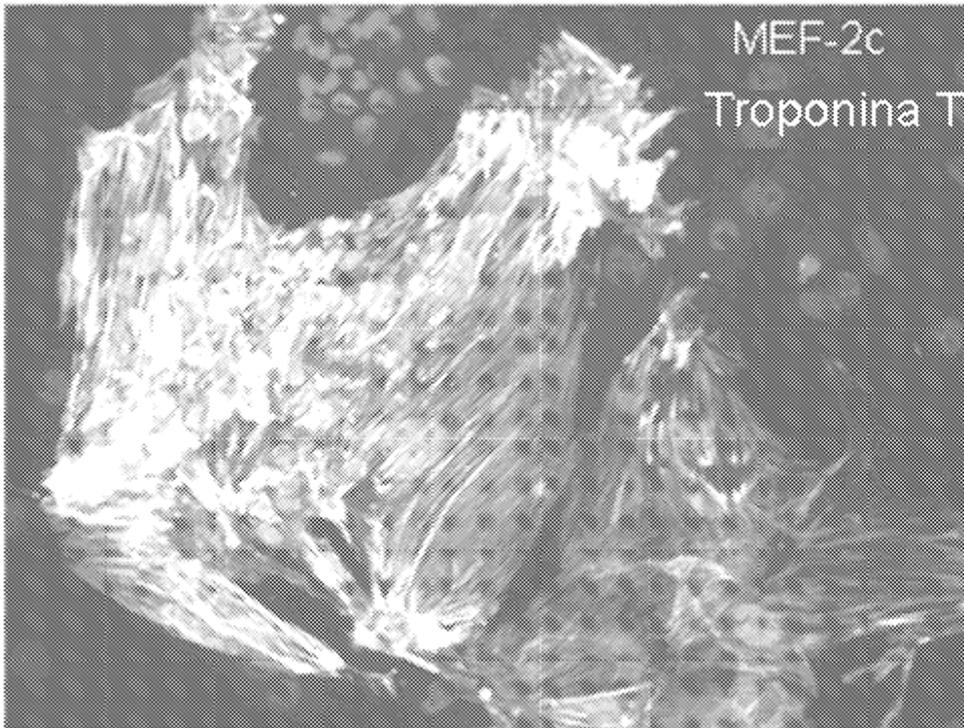


FIG. 31

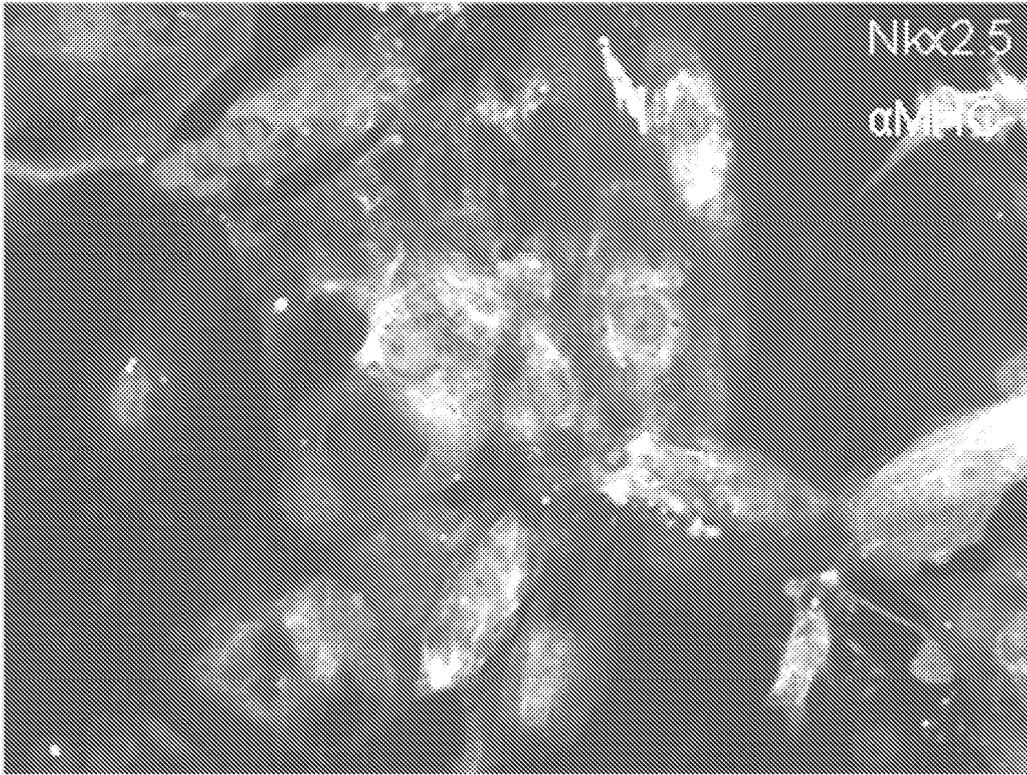


FIG. 32

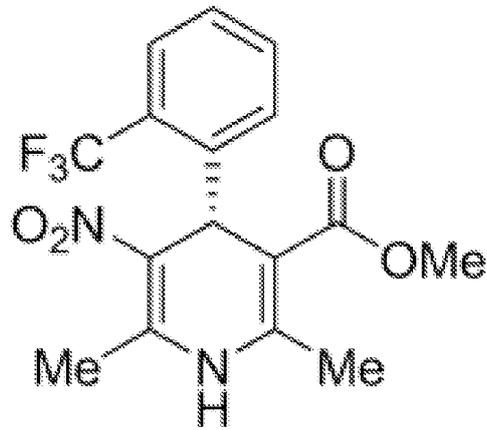


FIG. 33

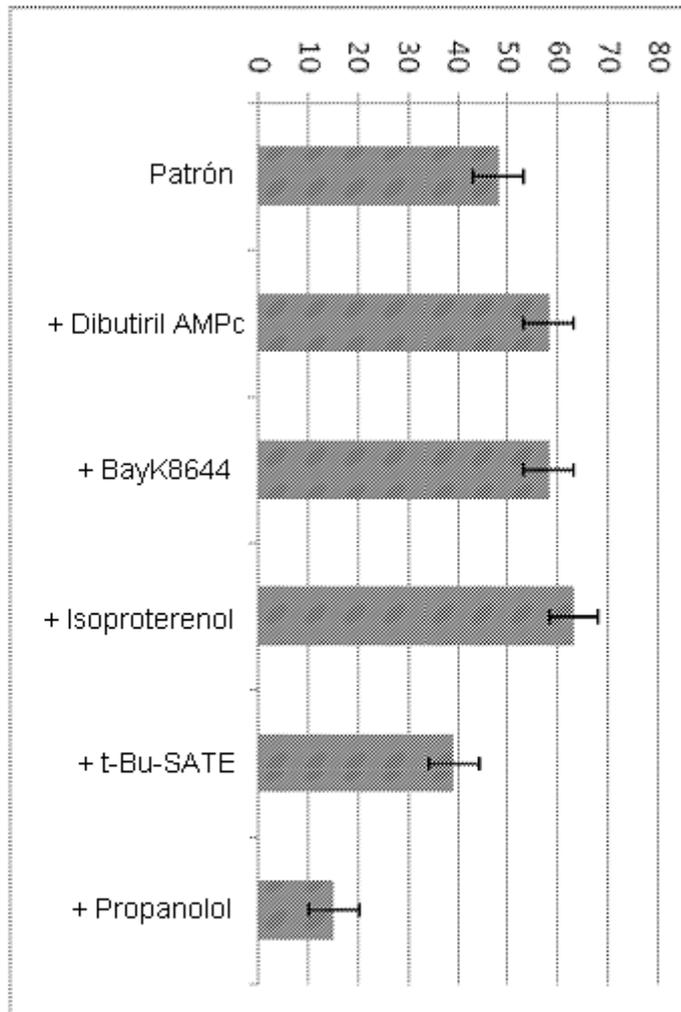


FIG. 34

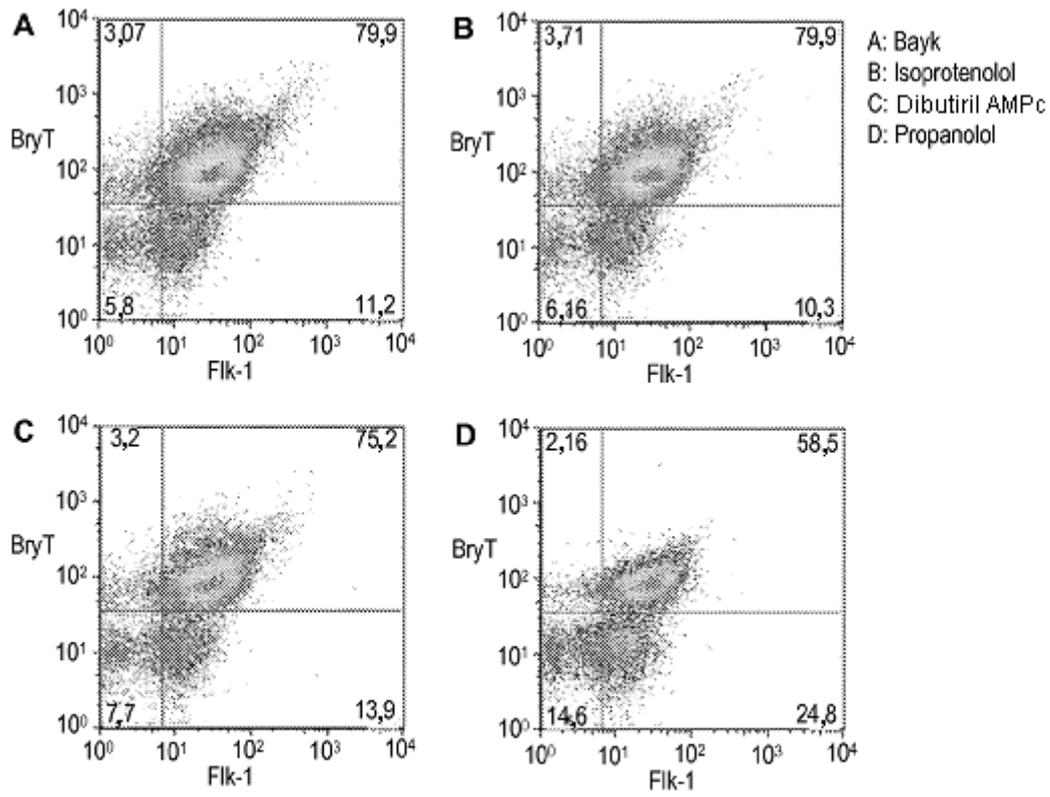


FIG. 35

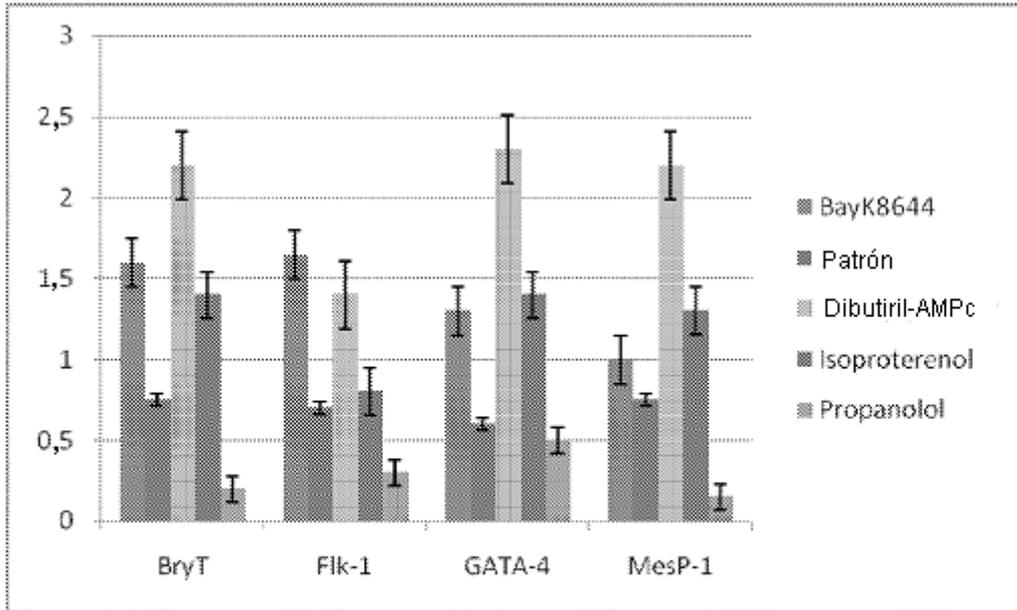


FIG. 36

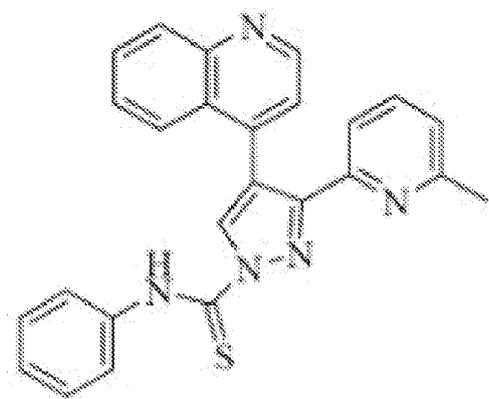


FIG. 37

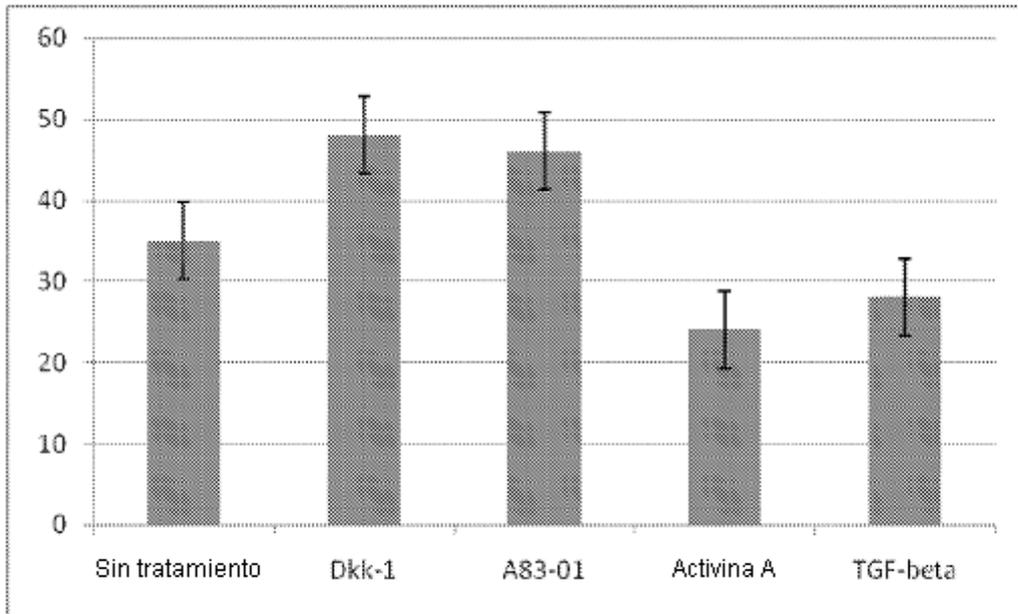


FIG. 38

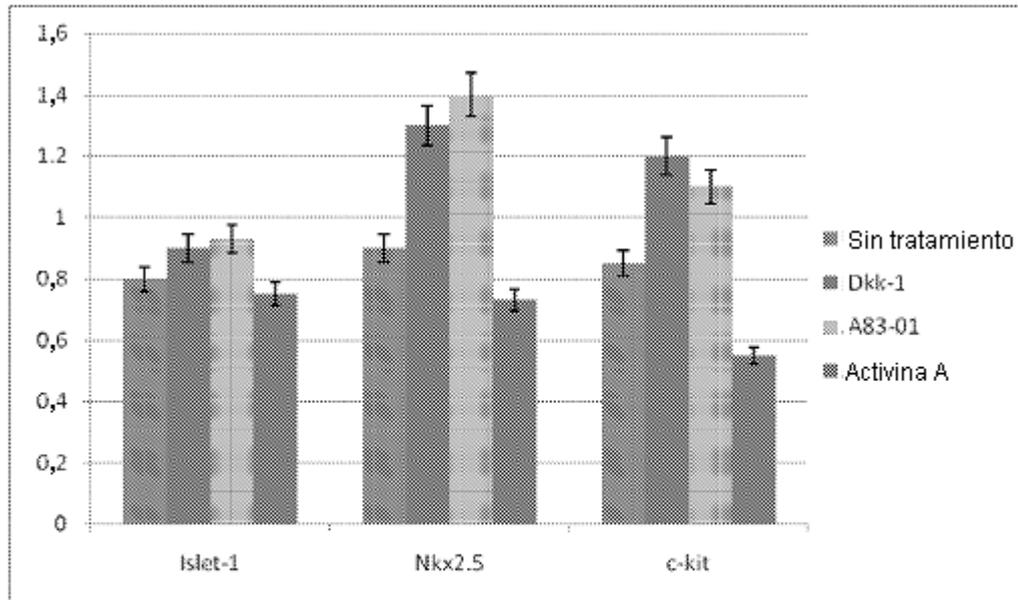


FIG. 39