

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 577**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/74** (2006.01)

**C12N 5/073** (2010.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2013 PCT/US2013/052767**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013 E 13825511 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2880054**

54 Título: **Células HLA-G modificadas y métodos**

30 Prioridad:

**31.07.2012 US 201261677739 P**

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

**13.06.2019**

73 Titular/es:

**AGEX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
1010 Atlantic Ave, Suite 102  
Alameda, CA 94501, US**

72 Inventor/es:

**HANTASH, BASIL, M.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 716 577 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

Células HLA-G modificadas y métodos

5 Antecedentes de la invención

10 La medicina regenerativa en la forma de trasplante de células es uno de los enfoques terapéuticos más prometedores para el tratamiento de afecciones médicas intratables tales como la diabetes, las enfermedades cardíacas, y las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, un obstáculo importante para implementar el trasplante de células en la clínica es el rechazo inmunitario de las células del donante, especialmente cuando estas se derivan de un huésped extraño. Si bien es posible abordar el rechazo inmunitario, en parte, mediante la administración de fármacos inmunosupresores, estos conllevan efectos secundarios adversos graves. Por lo tanto, existe una necesidad continua de desarrollar tecnologías mejoradas para las terapias de trasplante de células.

15 El documento WO 2008/121894 describe composiciones y métodos relacionados con el aislamiento, identificación y uso de células madre mesenquimatosas humanas que expresan HLA-G endógeno (HLA-G<sup>+</sup> MSC), HLA-E<sup>+</sup> (HLA-E<sup>+</sup> MSC), o HLA-G y HLA-E (HLA-GVHLA-E<sup>+</sup> MSC); en donde tal expresión puede ser intracelular, como un marcador(es) de la superficie celular, y/o como proteína soluble. Rousseau y otros (Human Immunology 64, 1005-1010 (2003)) se refieren a un polimorfismo del tipo deleción-inserción de 14pb en la región UT 3' del gen HLA-G que influye en la estabilidad del ARNm de HLA-G. Sasaki y otros (Journal of Immunology, Vol. 163, páginas 6301-6305 (1999)) describen que la expresión de HLA-E y HLA-G en células endoteliales porcinas inhibe a las células NK humanas xenoreactivas mediante las vías dependientes e independientes de CD94/NKG2. Park y otros (Immunity, vol. 15, no.2, páginas 213-224 (2001)) describen que la cola citoplasmática truncada de HLA-G sirve como una función de control de la calidad en los compartimentos post-ER. Pascale y otros (Human Immunology, vol. 161, no.11, páginas 1177-1195 (2000)) describen a las moléculas de HLA-G, -E, -F y las herramientas y los protocolos para el análisis de la transcripción y de la expresión de proteínas de los genes Clase I no clásicos. El documento WO2007/091078 describe un conjugado polipéptido en donde el conjugado comprende una porción de unión al ligando fusionada a una molécula HLA-G, o parte de esta e incluye oligómeros y dímeros de dicho conjugado y las células transgénicas que expresan HLA G. El documento US 2007/036773 describe los métodos para inducir la diferenciación de las células del estroma de la médula ósea en células neurales por medio de aumentar los niveles intracelulares de AMP cíclico y los métodos para la producción de una célula neural mediante la inducción de una célula del estroma de la médula ósea hacia la diferenciación en una célula neural mediante el aumento de los niveles de AMP cíclico.

25 Resúmen de la invención

35 En la presente descripción se describen composiciones basadas en células y los métodos para la terapia de trasplante de células basado en la expresión forzada a largo plazo de al menos una proteína HLA-G exógena en células donantes para trasplantarse a un sujeto que necesite tales células donantes. La invención proporciona los datos que muestran que las células (ya sean pluripotentes o diferenciadas) modificadas para expresar HLA-G exógena de la manera descrita en la presente descripción tienen inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión aumentada. Las capacidades de inmunogenicidad disminuida y/o de inmunosupresión aumentada proporcionadas por la modificación genética de HLA-G son estables y perduran durante largos períodos de tiempo, que incluye todo el proceso de diferenciación. La implicación es que las células HLA-G modificadas de la invención pueden servir como células o tejido donantes universales (*es decir*, que disminuyen o que eliminan la necesidad de coincidir con el tipo de moléculas de clase I y clase II del antígeno leucocitario humano clásico (HLA) entre células donantes y el receptor) para numerosas lesiones, enfermedades o trastornos.

45 En consecuencia, un aspecto descrito en la presente descripción es una célula de mamífero modificada genéticamente (una célula HLA-G modificada) que tiene una inmunogenicidad disminuida y una inmunosupresión mejorada en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, donde (i) la célula de mamífero modificada genéticamente comprende: (a) un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, un vector de expresión) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-G que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y (b) una secuencia UTR 3' (región no traducida) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:3; y (ii) la proteína HLA-G codificada se expresa por la célula de mamífero modificada genéticamente. La proteína HLA-G codificada puede expresarse por la célula de mamífero modificada genéticamente durante al menos siete semanas (por ejemplo, al menos 20 semanas o al menos 50 semanas).

50 En algunas modalidades, una célula modificada genéticamente tiene inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada si muestra: (1) una disminución de la citotoxicidad inducida por NK-92 de la célula modificada genéticamente en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética, (2) una disminución de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica in vitro de la célula modificada genéticamente en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética, y/o (3) un aumento en el tamaño y el peso del tumor formado por la célula modificada genéticamente en comparación con la célula de mamífero sin dicha modificación genética en ratones NSG humanizados.

65

- 5 En algunas modalidades, la célula de mamífero modificada genéticamente no tiene coincidencias (*es decir*, el mismo alelo(s)) en uno o más antígenos HLA en comparación con el receptor alogénico, en donde los antígenos HLA se seleccionan a partir del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR. En determinadas modalidades, la célula de mamífero modificada genéticamente solo tiene 1, 2, 3, 4, o 5 coincidencias en uno o más antígenos HLA en comparación con el receptor alogénico, en donde los antígenos HLA se seleccionan a partir del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR. En una modalidad, la célula de mamífero modificada genéticamente no tiene coincidencias con el receptor alogénico con respecto a HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR.
- 10 En algunas modalidades, el HLA-G expresado está presente en la superficie celular de la célula de mamífero modificada genéticamente.  
En algunas modalidades, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula humana, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de mono, o una célula de cerdo.
- 15 En algunas modalidades, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre, una célula progenitora o una célula que se obtiene mediante la diferenciación dirigida de la célula madre o de la célula progenitora. En algunas modalidades, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula que ya estaba diferenciada (ya sea de origen natural o *in vitro*) antes de la introducción de un transgén exógeno de HLA-G. En algunas modalidades, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre (por ejemplo, una célula madre pluripotente). En algunas modalidades, cuando la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre, la célula madre es una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida o una célula madre totipotente. En una modalidad, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre pluripotente inducida. En otra modalidad, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula madre pluripotente inducida. En una modalidad adicional, la célula de mamífero modificada genéticamente no es de un tipo de célula del sistema inmunitario. En otra modalidad, la célula de mamífero modificada genéticamente es una célula que se obtiene mediante la diferenciación *in vitro* de una célula madre o de una célula progenitora en donde la célula madre o la célula progenitora está modificada genéticamente y después se diferencian *in vitro*.
- 20 En otras modalidades, la célula modificada genéticamente es una célula totalmente diferenciada, una célula progenitora epidérmica, una célula progenitora pancreática, una célula madre hematopoyética, una célula que se obtiene por diferenciación de la célula madre pluripotente, un queratinocito, un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, un cardiomiocito, una célula madre neural, una neurona, un astrocito o un progenitor de células  $\beta$  pancreáticas.
- 25 En algunas modalidades, cuando el ácido nucleico exógeno en la célula de mamífero modificada genéticamente es un vector de expresión, el vector de expresión es un vector de transposón o un vector retroviral. En algunas modalidades, cuando el ácido nucleico exógeno es un vector de expresión, el vector de expresión es un vector de direccionamiento, y la célula de mamífero modificada genéticamente se obtuvo mediante recombinación homóloga del vector de direccionamiento. En algunas modalidades, el vector de expresión puede incluir, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera tal como una proteína fluorescente verde (GFP).
- 30 El ácido nucleico exógeno incluye, además, la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 3 que (i) es al menos 85 % idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' del gen HLA-G humano; y (ii) que comprende al menos una mutación que inhibe la unión de un microARN afín al sitio mutado dentro de un ARNm que comprende el sitio de unión mutado dentro de su región no traducida 3'.
- 35 En algunas modalidades, se proporciona un tejido artificial que contiene la célula modificada genéticamente.
- 40 En otro aspecto en la presente descripción se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2; y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y se une operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico. La secuencia de aminoácidos comprende una mutación que disminuye la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-golgi, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende al menos una mutación que inhibe la unión de un microARN afín a un ARNm que comprende el sitio de unión mutado dentro de su región no traducida 3'.
- 45 En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado de la secuencia de la región no traducida 3' no comprende la SEQ ID NO:4.
- 50 En algunas modalidades, se proporciona un vector de expresión de mamífero que incluye el ácido nucleico aislado y un promotor unido operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde el promotor no está silenciado en una célula madre. En algunas modalidades, el promotor contiene la secuencia de ácido nucleico del promotor de hámster chino EF-1 $\alpha$  (CHEF-1 $\alpha$ ) o del promotor humano EF-1 $\alpha$ . En algunas modalidades, el promotor CHEF-1 $\alpha$  comprende la SEQ ID NO:6. En otras modalidades, el promotor usado para dirigir la expresión de un transgén HLA-G es un promotor selectivo de tipo de tejido o célula. En algunas modalidades, el vector de expresión de mamífero incluye comprender una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera. En algunas modalidades, el vector de expresión
- 55
- 60
- 65

de mamífero es un vector de transposón. En algunas modalidades, se proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente que contiene el vector de expresión de mamífero.

En otra modalidad, se proporciona un vector de expresión de mamífero que comprende dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, y que comprende además, un promotor unido operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde el promotor no está silenciado en una célula madre o en una célula generada mediante la diferenciación de la célula madre. Tal promotor puede comprender la secuencia de ácido nucleico del promotor de hámster chino EF-1 $\alpha$ . En otra modalidad, el vector de expresión de mamífero comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera. En otra modalidad, el vector de expresión de mamífero es un vector de transposón. En otra modalidad, el vector de expresión de mamíferos comprende todos los elementos que se muestran en la Figura 1.

En una modalidad, se proporciona un vector de expresión de mamífero que comprende: (a) un promotor de hámster chino EF-1  $\alpha$ , (b) una secuencia de ácido nucleico que se une operativamente al promotor y que codifica HLA-G humana con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, y (c) una secuencia UTR 3' que comprende la SEQ ID NO:3. En algunas modalidades, se proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente que comprende tal vector de expresión.

En diversas modalidades, las células de mamífero HLA-G modificadas (por ejemplo, células humanas HLA-G modificadas) son para usar en la administración a un sujeto que padece de cualquiera de un número de afecciones que incluyen, pero no se limitan a enfermedad cardiovascular, enfermedad de los ojos (por ejemplo, degeneración macular), enfermedad auditiva, (por ejemplo, sordera), diabetes, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, osteoporosis, enfermedad del hígado, enfermedad del riñón, enfermedad autoinmune, artritis, enfermedad de las encías, una afección dental, o un trastorno proliferativo (por ejemplo, un cáncer). En otros casos, el sujeto padece de, o tiene un alto riesgo de padecer de, una afección de salud aguda, por ejemplo, infarto cerebral, lesión de la médula espinal, quemaduras, o una herida. En otros casos, el sujeto padece de la pérdida de tejidos tal como lipoatrofia o las pérdidas en el colágeno asociadas con el envejecimiento. En otros casos, el sujeto padece de una úlcera que no cicatriza, o necesita de un agente para ayudar en el cierre de defectos como la hipospadias y la epispadias. En otros casos, el sujeto necesita un injerto de piel temporal o permanente para la cicatrización de la herida o para sustituir la piel.

En algunas modalidades, la invención proporciona una composición celular o tisular que comprende una población de las células modificadas genéticamente de la invención para usar en un método terapéutico de tratamiento mediante reparación o regeneración celular o tisular a un sujeto que lo necesite, en donde la composición celular o tisular es adecuada para inyectar o injertar al sujeto una composición celular o tisular que comprende una población de células eHLA-G modificadas, en donde el sujeto tiene al menos una molécula de HLA clásica I o HLA de clase II no coincidente en comparación con población de células eHLA-G modificadas, y en donde la población de células eHLA-G modificadas exhibe inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con células del mismo tipo sin la modificación de eHLA-G. La inmunogenicidad disminuida y/o la inmunosupresión mejorada pueden determinarse, por ejemplo, mediante la comparación de la célula eHLA-G modificada con una célula de control del mismo tipo sin la modificación eHLA-G en un ensayo de citotoxicidad de NK-92, un ensayo de crecimiento del tumor NSG humanizado, y/o un ensayo de proliferación de PBMC. En una modalidad, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente para expresar eHLA-G. En otra modalidad, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de progenitores epidérmicos humanos modificados genéticamente para expresar eHLA-G. En otra modalidad, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de células madre mesenquimatosas humanas modificadas genéticamente para expresar eHLA-G. En otra modalidad, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de células madre embrionarias humanas modificadas genéticamente para expresar eHLA-G. En otra modalidad, la población de células modificadas genéticamente comprende una población de células diferenciadas in vitro a partir de células madre embrionarias humanas modificadas genéticamente para expresar eHLA-G. En otras modalidades, la población de células modificadas genéticamente no es rechazadas por el sistema inmunitario del sujeto durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 36, 48, o 52 semanas.

En la presente descripción se describe un método como referencia para la regeneración de la piel en un sujeto que lo necesita, el método comprende inyectar una población de fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados en un sitio de lesión de la piel en el sujeto, en donde el sujeto tiene al menos, una no coincidencia de las moléculas HLA Clase I o HLA Clase II clásicas en comparación con los fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o los progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados.

Descrito en la presente descripción como referencia, se proporciona un método de terapia celular que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una población de células de mamíferos modificadas genéticamente que comprenden una molécula de microglobulina  $\beta 2$  ( $\beta 2m$ ) humana exógena y un transgén eHLA-G de la invención.

Además, en la presente descripción se describe una célula de mamífero modificada genéticamente (una célula HLA-G modificada) que disminuyó la inmunogenicidad y/o es capaz de proporcionar un aumento en la inmunosupresión en un receptor alogénico en comparación a la célula de mamífero sin dicha modificación genética, donde (i) la célula de mamífero modificada genéticamente comprende: (a) un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, un vector de expresión) que

comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-G que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a la HLA-G humana, y que comprende una o más mutaciones de aminoácidos que disminuyen la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-golgi, y/o (b) una secuencia UTR 3' (región no traducida) que no contiene sitios de unión de microARN tal como la SEQ ID NO:3 o una secuencia que no comprende la SEQ ID NO:4; y (ii) la proteína HLA-G codificada se expresa por la célula de mamífero modificada genéticamente durante, al menos, siete semanas (por ejemplo, al menos 20 semanas o al menos 50 semanas).

En otras descripciones, en la presente descripción se describe una célula de mamífero modificada genéticamente que tiene inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con células de mamíferos sin dicha modificación genética, en donde: (i) la célula de mamífero modificada genéticamente comprende un ácido nucleico exógeno que comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico (tal como la SEQ ID NO:2) que codifica una proteína HLA-G que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la HLA-G humana de tipo silvestre consenso (tal como la SEQ ID NO:1), y que comprende una o más mutaciones de aminoácidos que disminuyen la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-golgi; y (b) una región no traducida 3' (UTR) (tal como la SEQ ID NO:3) que es al menos 85 % idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' de los genes de HLA-G humanos de tipo silvestre consenso y no comprende la SEQ ID NO:4; y (ii) la proteína HLA-G codificada se expresa por la célula de mamífero modificada genéticamente durante al menos siete semanas.

Descrito en la presente descripción como referencia se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a HLA-G humana, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una mutación que disminuye la retención de HLA-G en la vía de reciclaje del retículo endoplásmico-golgi; y (ii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de la región no traducida 3' del gen HLA-G humano y unida operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende al menos una mutación que inhibe la unión de un microARN afín a un ARNm que comprende el sitio de unión mutado dentro de su región no traducida 3'. En una modalidad, la primera secuencia de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otra modalidad, la segunda secuencia de ácido nucleico no comprende la SEQ ID NO:4. En una modalidad, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO:3.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una modalidad no limitante de un vector de expresión de transposón del transgén HLA-G (eHLA-G) mejorado que contiene un marcador de selección (neomicina fosfotransferasa) dirigido por un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK); elementos aisladores flanqueantes "INS"; un promotor de hámster chino EF-1 $\alpha$  que dirige la expresión de eHLA-G; un promotor PGK que dirige la expresión de EGFP; y elementos de transposición de repetición terminal (TR) 5'. Un transgén eHLA-G contiene una combinación de mutaciones y/o elementos no codificantes (tales como, por ejemplo, un promotor o UTR 3' modificado) que potencia la expresión, particularmente la expresión en la superficie de la célula, de la proteína HLA-G. Para los experimentos descritos en la presente descripción, el transgén eHLA-G incluye los elementos anteriores y, más específicamente, incluye una secuencia codificante de HLA-G humana como se indica en la SEQ ID NO:2 con mutaciones del motivo de recuperación del ER de HLA-G (K334A/K335A); y 2) mutación de los sitios de unión de microARN de la UTR 3' de HLA-G, en donde esta UTR 3' modificada tiene la secuencia como se indica en la SEQ ID NO:3. Ver Ejemplo 3 para una descripción adicional.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de una modalidad no limitante de un vector auxiliar de la expresión de transposasa usado para dirigir la integración genómica de un vector de expresión de transposón cotransfectado.

La Figura 3 muestra micrografías de fluorescencia de colonias de células ES humanas en diversos tiempos después de la transfección estable con un vector de expresión de transposón que dirige la expresión de eHLA-G y EGFP.

La Figura 4 (Panel Superior) muestra un gráfico de barras que representa la relación entre el número inicial de células hES transfectadas con un vector de expresión que contiene EGFP y la fracción de células EGFP<sup>+</sup> detectadas en la población celular a los 10 días posteriores a la transfección. Los números en el eje x son el número de colonias GFP<sup>+</sup> por 5x10<sup>5</sup> células. Los números en el eje y son el número de células. (Panel Inferior) muestra un gráfico de barras que muestra la relación entre diversos vectores de transposón (que usan diferentes promotores) y la fracción de células EGFP<sup>+</sup> detectadas en la población celular. Los números en el eje x son el número de colonias GFP<sup>+</sup> por 5x10<sup>5</sup> células. Para el panel inferior, de izquierda a derecha: control (con), GFP-puro (el tamaño del vector transfectado es de 7,3 kb); eHLA-G (MSCV)-GFP-puro (el tamaño del vector transfectado es de 8,6 kb); y eHLA-G (EF-1 $\alpha$ )-GFP-puro (el tamaño del vector transfectado es de 9,2 kb). Se realizaron experimentos adicionales de eficiencia de transfección de eHLA-G (EF-1 $\alpha$ )-GFP-puro (no mostrados), que indicaron que a los 10 días posteriores a la transfección, las eficiencias más altas (~500 colonias GFP<sup>+</sup> por 5x10<sup>5</sup> células) se obtuvieron en la solución V y el programa B16 después de la selección con puomicina durante 10 días.

La Figura 5 muestra una serie de micrografías de fluorescencia que muestran la expresión en células ES humanas HLA-G modificadas de la expresión de HLA-G y la tinción DAPI (imágenes superiores); Oct 3/4 y DAPI (imágenes del medio); y SSEA-4 y DAPI (imágenes inferiores).

La Figura 6 (Panel Superior) muestra un dispersograma de citometría de flujo que muestra la distribución de células doble positivas SSEA-4<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> en una población de células hES eHLA-G modificadas. (Panel Inferior) muestra la distribución de células Oct 3/4<sup>+</sup> en la población de células hES eHLA-G modificadas. SSEA-4 y Oct 3/4 son marcadores de pluripotencia. Estos datos, junto con la Figura 5, indican que las células hES eHLA-G-modificada mantuvieron sus marcadores de pluripotencia característicos de autorenovación. Adicionalmente, las hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP mantuvieron su pluripotencia y el cariotipo normal in vivo. Los ratones NSG humanizados se inyectaron por vía subcutánea con las hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP, y se observó formación de teratoma, que indica que las células inyectadas/trasplantadas no se rechazaron ya que las hESC mostraron una inmunogenicidad disminuida y/o un aumento de la inmunosupresión. El cariotipo de las células del teratoma fue normal.

La Figura 7 (Panel Superior) muestra fotomicrográficas de contraste de fase de las células de tipo silvestre (imagen de la izquierda) y de las células hESC generadas, eHLA-G modificadas (imagen de la derecha, con cuerpos embrioides (EB) en el día 15. (Panel Inferior) muestra una micrografía de fluorescencia de las EB que se muestran en el Panel Superior. No se detecta ninguna señal de GFP en los EB de hESC de tipo silvestre, mientras que se detecta la fuerte expresión de GFP en ambos EB de las hESC eHLA-G modificadas. Estos datos indican que las hESC eHLA-G<sup>+</sup> mantienen la formación de EB.

La Figura 8 muestra que las hESC eHLA-G<sup>+</sup> son resistentes al silenciamiento. (Panel Superior) muestra un histograma de distribución de citometría de flujo para la expresión de GFP en una línea hESC eHLA-G modificada, que demostró una fuerte expresión similar de GFP después de 6 y 16 pases en cultivo. (Panel Inferior) muestra un histograma de distribución de citometría de flujo para la expresión de HLA-G en la misma línea de hESC, que muestra nuevamente la expresión persistente del transgén eHLA-G en ambos pases en cultivos 6 y 16.

La Figura 9A (Panel Superior) muestra los histogramas de distribución de citometría de flujo para la expresión total (intracelular) de HLA-G en el tipo silvestre (histograma izquierdo), GFP modificada (histograma del medio) y hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP modificadas (histograma derecho). (Panel Inferior) muestra histogramas de distribución de citometría de flujo para la expresión de superficie de HLA-G en células tipo silvestre (histograma izquierdo), GFP modificadas (histograma del medio) y hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP modificada (histograma derecho). La Figura 9B (Panel Superior) muestra un histograma de distribución de citometría de flujo para la expresión total de HLA-G en las hESC eHLA-G(MSCV)-GFP modificadas. La Figura 9B (Panel Inferior) muestra la expresión de superficie de HLA-G en las hESC eHLA-G(MSCV)-GFP modificadas. Estos datos indican que HLA-G es altamente expresado cuando el transgén se une operativamente al promotor EF-1 $\alpha$ , en contraste, la expresión es mínima cuando el transgén está bajo el control del promotor MSCV. Ver además la Figura 15 para datos adicionales que muestran que la expresión del transgén HLA-G está influenciada significativamente por la actividad del promotor.

La Figura 10 muestra que la expresión de HLA clase I y clase II es similar en las células de tipo silvestre y en las hESC eHLA-G<sup>+</sup>. La tabla compara los niveles de expresión de diversas variantes de HLA y de microglobulina  $\beta$ 2 en hESC de tipo silvestre versus hESC HLA-G modificadas.

La Figura 11 muestra que el efecto de citotoxicidad inducido por NK92 se suprime en gran medida por las hESC eHLA-G<sup>+</sup>. (Ver el Ejemplo 6 para una descripción adicional). La figura muestra un gráfico de barras que ilustra los resultados de un ensayo de citotoxicidad de células NK92. Los valores de 1:10 y 1:30 indican la relación del efector (NK92) a las células diana (control de células silvestre transgénicas de GFP solo, o células modificadas con el transgén eHLA-G-GFP). Este es un ensayo *in vitro* para determinar la inmunogenicidad de hESC eHLA-G modificadas (barras negras; eHLA-G-GFP) en comparación con las hESC de tipo silvestre (barras grises; GFP). Las hESC eHLA-G modificadas exhiben una citotoxicidad sustancialmente disminuida en la presencia de las células NK92 en comparación con el caso de las hESC de tipo silvestre. Estos datos indican que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar capacidades mejoradas de donante para tales células modificadas genéticamente, ya que la citotoxicidad disminuida en la presencia de células NK92 muestra que tales células modificadas genéticamente tienen inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos. Ver Ejemplo 6 para descripción adicional.

La Figura 12 muestra una serie de gráficos de barras que representan el curso temporal de los niveles de expresión génica de diversos marcadores de pluripotencia y marcadores de progenitores epidérmicos durante la diferenciación dirigida de las hESC *in vitro* en los progenitores epidérmicos embrionarios (EEP). Los valores del eje y son niveles de expresión relativos de ARNm determinados por RT-PCR semicuantitativa. Los valores del eje x son los días en que se evaluó la expresión. Ver Ejemplo 2 para descripción adicional. Los datos de la Figura 12 indican que los marcadores de diferenciación epidérmica K14, Tap63, y  $\Delta$ Np63 se mejoraron gradualmente durante la diferenciación. En los datos que no se muestran en la presente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia de K14 y marcadores epidérmicos adicionales p63, CD29, y CD49f. Las células hEEP eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP diferenciadas fueron positivas para la expresión de las proteínas K14, p63, CD29 y CD49f, como se indica mediante la inmunofluorescencia.

La Figura 13 (Panel Superior) muestra el curso temporal de la expresión del transgén eHLA-G en una línea hESC transfectada de manera estable con el promotor EF-1 $\alpha$  que dirige la expresión de eHLA-G. (Panel Inferior) muestra una comparación del curso del tiempo (las barras negras indican el día 0; las barras horizontales a rayas a los 7 días; y las barras grises a los 14 días); de la expresión de HLA-G (ARNm) en una línea de hESC GFP modificada (control negativo),

una línea de hESC eHLA-G dirigida por el promotor MSCV, y en una línea de hESC eHLA-G dirigida por EF-1 $\alpha$ . Observe el nivel más alto y más persistente de la expresión de eHLA-G dirigida por el promotor EF-1 $\alpha$ .

Figura 14 (Efecto del polimorfismo de inserción/eliminación en K562-HLA-G1 de 14 pares de bases (pb) sobre la actividad citotóxica de las células NK). La figura muestra un gráfico de barras que compara la citotoxicidad mediada por células NK (% de lisis específica) en células de tipo silvestre K562 (barras grises), células K562 que expresan una variante de HLA-G con una inserción de 14 pb en la UTR 3' (Ins14bp) (barras negras), y células K562 que expresan una variante de HLA-G con una eliminación de 14 pb en la UTR 3' (Del14bp) (barras grises). Hay cuatro conjuntos de datos con diferentes relaciones de efectores (células NK) a las células diana (células K562).

La Figura 15 proporciona datos que indican que la expresión del transgén HLA-G es influenciada significativamente por la actividad del promotor. La RT-PCR muestra que tanto los transcritos de GFP como los de HLA-G se expresaron altamente en las líneas celulares hESC eHLA-G (EF-1 $\alpha$ )-GFP. La inmunofluorescencia muestra, además, que tanto las proteínas GFP como HLA-G se expresaron altamente en líneas celulares hESC HLA-G (EF-1 $\alpha$ )-GFP (no mostrados en la presente). Aunque, los transcritos o proteínas de HLA-G rara vez se detectaron en las líneas hESC HLA-G (pMSCV)-GFP-hESC, ya sea por RT-PCR o por inmunofluorescencia, incluso la expresión de GFP fue alta en estas células. (Datos no mostrados en la presente). Por lo tanto, los promotores de EF-1 $\alpha$  son preferidos en determinadas modalidades de la expresión del transgén HLA-G.

Figura 16. Las hEEP purificadas mostraron una morfología homóloga de queratinocitos como se muestra mediante microscopía de contraste de fase. Los clones 18 y 21 de hEEP eHLA-G-GFP se diferenciaron de las hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP modificadas como se describió en el Ejemplo 2.

Figura 17. La estabilidad del transgén HLA-G en las hEEP diferenciadas se confirmó mediante citometría de flujo. Tanto la expresión total de HLA-G (paneles superiores) como la expresión de superficie (paneles inferiores) fueron robustas para los hEEP eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP diferenciadas (más del 90 % de las células) en comparación con las células control sin HLA-G exógena (hEEP solo GFP) y hEEP de tipo silvestre.

Figura 18. Los resultados de la Figura 11 se repitieron y se confirmaron en experimentos adicionales de citotoxicidad de NK. Como se demostró, la destrucción de las hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP se redujo en más del 100 % en comparación con las hESC de control que contienen solo un transgén GFP (sin transgén HLA-G). (Nota: como se usa en la presente descripción, un transgén "mHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP" es sinónimo de "eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP".) Estos datos muestran que la expresión del transgén HLA-G imparte características inmunosupresoras y/o de inmunogenicidad disminuida en las hESC. Ver ejemplo 6 para descripción adicional.

Figura 19. Se realizaron experimentos de citotoxicidad de NK en las hEEP diferenciadas a partir de hESC. Como se demostró, la destrucción de las hEEP eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP se redujo bastante más del 100 % (aproximadamente 3 veces) en comparación con las hEEP de control. Este dato muestra que la expresión del transgén HLA-G imparte características inmunosupresoras y/o de inmunogenicidad disminuida en células diferenciadas, que muestra, además, que estas características mejoradas de evasión inmunitaria funcional de la expresión de HLA-G a través del transgén eHLA-G sobrevivieron al proceso de diferenciación dirigida. Ver Ejemplo 6 para descripción adicional.

La Figura 20 muestra los resultados de aloinjertos de hESC en ratones humanizados. Las hESC "G0" fueron las hESC control de tipo silvestre que no contienen un transgén eHLA-G, sino más bien solo GFP. "mG1(#1)" y "mG1(#2)" se refieren a dos clones diferentes de hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP nucleofectados. Los tumores G0, mG1(#1), y mG1(#2) como se muestran, se midieron y pesaron. Las hESC G0 formaron un tumor con un volumen de 126.9 milímetros cúbicos y un peso de 32 miligramos. Las hESC mG1(#1) formaron un tumor con un volumen de 748,4 milímetros cúbicos y un peso de 318 miligramos. Las hESC mG1(#2) formaron un tumor con un volumen de 1116.7 milímetros cúbicos y un peso de 675 miligramos. Ver Ejemplo 7 para descripción adicional.

La Figura 21 muestra los resultados promediados de tumores de aloinjertos de hESC en cinco ratones NSG humanizados. El panel superior muestra los resultados del peso del tumor (mg). El panel inferior muestra los resultados del volumen del tumor (milímetros cúbicos). Los datos muestran que las hESC HLA-G ("mG1") nucleofectadas formaron tumores mucho más grandes (más de 3 veces por volumen) y más pesados (más de 2 veces por peso) que las hESC de tipo silvestre ("G0") trasplantadas en ratones NSG humanizados. Esto indica que la expresión del transgén HLA-G puede proporcionar una inmunogenicidad disminuida y/o un aumento de la inmunosupresión en un ambiente de aloinjerto humano (*es decir*, los ratones humanizados con NSG). Estos datos, junto con los estudios de citotoxicidad de NK92, sustentan la aplicación general de los constructos del transgén eHLA-G descritos en la presente descripción para modificar cualquier tipo de célula conveniente en un donante alogénico superior o universal para la terapia, trasplantes, reparación de tejidos, sustitutos de células y tejidos, y similares. Ver Ejemplo 7 para descripción adicional.

Figura 22. Los fibroblastos dérmicos humanos transfectados de manera estable con el transgén eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP (células "HFD-m1-GFP") o con el constructo de control GFP-solo (células "HFD-G0-GFP") se evaluaron por su capacidad para inhibir la proliferación de PBMC. Como se demostró, el clon HFD-mG1-GFP "mG1-R1" suprimió más la proliferación de PBMC que los controles y que otros clones, lo que indica que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar inmunosupresión en células diferenciadas, tales como los fibroblastos. Ver Ejemplo 9 para descripción adicional, que

incluye un resumen de los estudios de citotoxicidad de NK-92 con HFD-m1-GFP y controles, que muestran que la modificación de eHLA-G en los fibroblastos dérmicos disminuye su inmunogenicidad. Por lo tanto, estos datos sustentan adicionalmente el uso de los constructos del transgén eHLA-G descritos en la presente descripción para modificar cualquier tipo de célula conveniente, ya sea pluripotente, multipotente, o totalmente diferenciada, en una célula donante alogénica universal o superior para la terapia, trasplantes, reparación de tejidos, sustitutos de células y tejidos, y similares.

#### Descripción detallada

La presente descripción se refiere a células de mamíferos modificadas genéticamente que expresan de manera persistente HLA-G exógena (células HLA-G modificadas), así como también a composiciones de ácido nucleico para generar tales células de mamíferos modificadas genéticamente. Las modificaciones genéticas eHLA-G descritas en la presente descripción proporcionan las células con características de inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada, de manera que esas células tienen la promesa de ser células donantes universales o mejoradas para trasplantes, regeneración o reconstrucción celular y de tejidos, y otras terapias.

#### I. Composiciones:

##### A. Células de Mamíferos Modificadas que expresan HLA-G exógena

Como se describe en la presente descripción, pueden generarse una amplia diversidad de tipos de células de mamíferos que expresan HLA-G exógena (células HLA-G modificadas). Tales tipos celulares incluyen, pero no se limitan a, células totipotentes, células madre embrionarias (por ejemplo, células madre embrionarias humanas), células madre pluripotentes inducidas (por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas humanas), células madre multipotentes, células progenitoras epidérmicas, células madre mesenquimatosas, células progenitoras pancreáticas  $\beta$ , células pancreáticas  $\beta$ , células progenitoras cardíacas, cardiomiocitos, células progenitoras hepáticas, hepatocitos, células progenitoras de músculo, células de músculo, células de riñón, osteoblastos, células progenitoras hematopoyéticas, células de folículos dentarios, células del folículo piloso, células epiteliales pigmentarias de la retina, células madre nerviosas, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células del oído interno, y fibroblastos (que incluyen fibroblastos dérmicos humanos (HFD)). En algunas modalidades, las células HLA-G modificadas no son células que tienen un tipo de célula del sistema inmunitario. Tales células de mamíferos pueden derivarse de una de numerosas especies que incluyen, por ejemplo, humana, ratón, rata, mono, o cerdo. En esencia, cualquier tipo celular puede transfectarse con los constructos descritos en la presente descripción y después evaluarse para la expresión de HLA-G y como tal expresión puede impartir inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada a la célula modificada.

En algunas modalidades, para obtener una población sustancialmente enriquecida de células HLA-G modificadas de un tipo celular conveniente, una línea de células madre pluripotente modificada genéticamente, tal como una línea de células madre embrionaria humana, o una línea de células madre pluripotente inducida humana, o cualquier línea celular que tiene características multipotentes que incluyen las células madre mesenquimatosas y las células progenitoras del sistema inmunitario que expresan HLA-G, se generan y después se someten a una diferenciación dirigida para obtener una población celular que expresa HLA-G y que es sustancialmente enriquecida para un tipo celular conveniente. En algunas modalidades, la población sustancialmente enriquecida incluye al menos aproximadamente 2 % a aproximadamente 100 % del tipo celular conveniente, por ejemplo, al menos aproximadamente 3 %, 4 %, 5 %, 7 %, 8 %, 10 %, 20 %, 22 %, 25 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, u otro porcentaje del tipo celular conveniente de al menos aproximadamente 2 % a aproximadamente 100 %. Los métodos para el enriquecimiento celular de un tipo celular conveniente son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, el documento U.S. 2010/0055785

Los métodos para obtener células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes inducidas son conocidos en la técnica, como se describe en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. núm. 7,217,569 (para la derivación de células madre embrionarias humanas) y los documentos 8,048,999, 8,058,065, y 8,048,675 (para la generación de células madre pluripotentes inducidas humanas).

Las líneas de células madre pluripotentes o multipotentes de mamíferos modificadas genéticamente, por ejemplo, células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes humanas inducidas, etcétera, y además, mamíferos modificados genéticamente completamente diferenciados, que expresan de manera estable una proteína HLA-G codificada por uno de los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción se generan por cualquiera de un número de métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la línea celular se modifica genéticamente mediante la transfección estable con uno o más vectores de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un vector plásmido o un vector de minicírculo) que incluyen un casete de expresión para la expresión de una proteína HLA-G como se describe en la presente descripción, un marcador de selección, y opcionalmente una proteína reportera. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados codificados por tales vectores incluyen proteínas que confieren resistencia a un agente de selección. Tales proteínas y sus correspondientes agentes de selección incluyen, sin limitación, puromicina N-acetiltransferasa (puromicina), higromicina fosfotransferasa (higromicina), blastidina-S-desaminasa (blastidina), y neomicina fosfotransferasa (neomicina). La selección con el agente de selección apropiado puede durar al menos aproximadamente 3 a aproximadamente 14 días, por ejemplo, aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 u otro período de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 días hasta que las colonias resistentes son visibles.



Los ejemplos de proteínas reporteras fluorescentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, EGFP y sus variantes, tales como YFP, Cian, y dEGFP; DS-Rojo, Naranja monomérico, la proteína fluorescente rojo lejano "Katushka" (Shcherbo y otros (2007), *Nat Methods*, 4:741-746), o variantes de cualquiera de las anteriores. En otras modalidades, el reportero es una enzima que convierte un sustrato que, en el proceso, produce una señal detectable, por ejemplo, una señal fluorescente o luminiscente en la presencia de un sustrato fluorogénico o luminogénico, respectivamente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la enzima marcadora de selección comprende la secuencia de aminoácidos de una luciferasa, por ejemplo, una luciferasa de luciérnaga, luciferasa de escarabajo de resorte, o luciferasa de Renilla. La actividad de la luciferasa puede detectarse proporcionando un sustrato luminogénico apropiado, por ejemplo, luciferina de luciérnaga para luciferasa de luciérnaga o celenterazina para luciferasa de Renilla. La actividad de la luciferasa en presencia de un sustrato apropiado puede cuantificarse mediante luminometría para evaluar la actividad total de la luciferasa de las poblaciones de células completas en los pocillos de la placa de cultivo, o, alternativamente, la actividad de la luciferasa de las células o colonias individuales puede detectarse mediante el uso de un microscopio en combinación con una cámara fotónica contadora. Los detalles de los ensayos de luciferasa, que incluyen los métodos de alto rendimiento, se describen en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. núms. 5,650,135, 5,744,320, and 6,982,431. En otras modalidades, la enzima reportera comprende la secuencia de aminoácidos de una beta-lactamasa modificada, cuya expresión puede detectarse y cuantificarse en células vivas mediante un ensayo de fluorescencia radiométrico para la descomposición de sustratos de  $\beta$ -lactama fluorogénicos como se describe en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 5,741,657, 6,031,094, y la publicación de la patente de los EE.UU. núm. 20070184513. Para una revisión ver, además, Qureshi (2007), *Biotechniques*, 42(1):91-96. Otras enzimas reporteras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la hidrolasa Halo-Tag® (Promega, Madison, Wis., como se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. núm. 7,238,842 y en las publicaciones de patentes núms. 20080026407 y 20080145882) y la beta galactosidasa.

En algunas modalidades, las células de mamífero modificadas genéticamente, además, se modifican genéticamente para expresar una microglobulina  $\beta$ 2 humana (número de registro de GenBank AY187687.1). Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que la expresión de la microglobulina  $\beta$ 2 humana potenciará la expresión superficial de HLA-G transgénica en las células de mamíferos modificadas genéticamente.

En algunas modalidades, el vector de expresión de ácido nucleico es un vector de transposón que incluye elementos de transposición que facilitan la integración de la transposición del vector de transposón en un genoma huésped cuando se introduce en una célula huésped en la presencia de una transposasa afín (por ejemplo, la transposasa piggyBAC), como se describe en, por ejemplo, la publicación de patente de los EE.UU. núm. 2010/0240133. Los vectores de expresión de transposón (por ejemplo, los vectores PiggyBac), así como también los vectores de expresión de transposasa, están disponibles comercialmente en, por ejemplo, System Biosciences (Mountain View, CA). En algunas modalidades, cuando se usa un vector de transposón, no es necesario un marcador de selección o casete de expresión de proteína reportera para generar una línea celular HLA-G modificada transfectada de manera estable, ya que la eficiencia de la transfección mediante tales vectores es lo suficientemente alta para obviar la necesidad para un marcador de selección. Alternativamente, el vector de expresión puede ser un vector de direccionamiento, que permite la integración sitio específica del transgén eHLA-G en el genoma de la célula huésped. El diseño y el uso de vectores de direccionamiento son rutinarios en la técnica como se ejemplifica en la patente de los EE.UU. núm. 5,464,764.

Los métodos para la preparación de vectores de expresión de ácido nucleico con calidad para transfección y los métodos de transfección están bien establecidos. Ver, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3ra Ed, (CSHL Press); and *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (2005), 9.1-9.14. Los ejemplos de métodos de transfección de alta eficiencia incluyen "nucleofección", como se describe en, por ejemplo, Trompeter (2003), *J Immunol. Methods*, 274(1-2):245-256, y en las patentes de los EE.UU. núms. 7,332,332, 8,003,389; 8,039,259, y 8,192,990 9, la transfección con reactivos de transfección basado en lípidos tales como Fugene® (Roche), DOTAP, y Lipofectamine™ (Invitrogen).

En otras modalidades, las células modificadas genéticamente, por ejemplo, líneas de células madre diferenciadas, multipotentes, pluripotentes o totipotentes, se generan mediante la transducción con un virus recombinante. Los ejemplos de virus recombinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, retrovirus (que incluyen los lentivirus); adenovirus; y virus adenoasociados. Con frecuencia, el retrovirus recombinante es el virus de la leucemia moloney murina (MMLV), pero pueden usarse, además, otros retrovirus recombinantes, por ejemplo, el Virus de la Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina (MLV), el Virus que induce focos en las células Mink, el Virus del Sarcoma Murino, virus de la Retículoendoteliosis, Virus de la Leucemia del Mono Gibbon, Virus del Mono Mason Pfizer o Virus del Sarcoma de Rous, ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Núm. 6,333,195.

En otros casos, el retrovirus recombinante es un lentivirus (por ejemplo, Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1); Virus de Inmunodeficiencia de Simio (SIV); o Virus de Inmunodeficiencia Felina (FIV), ver, por ejemplo, Johnston y otros, (1999), *Journal of Virology*, 73(6):4991-5000 (FIV); Negre y otros, (2002), *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 261:53-74 (SIV); Naldini y otros, (1996), *Science*, 272:263-267 (HIV).

El retrovirus recombinante puede comprender un polipéptido viral (por ejemplo, env retroviral) para ayudar a la entrada en la célula diana. Tales polipéptidos virales están bien establecidos en la técnica, ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Núm. 5,449,614. El polipéptido viral puede ser un polipéptido viral anfotrópico, por ejemplo, anfotrópico env, que ayuda a la entrada en células derivadas de múltiples especies, que incluyen las células diferentes de las especies

huéspedes originales. Ver, por ejemplo, id. El polipéptido viral puede ser un polipéptido viral xenotrópico que ayuda a la entrada en las células que incluyen las células diferentes de las especies huéspedes originales. Ver, por ejemplo, id. En algunas modalidades, el polipéptido viral es un polipéptido viral ecotrópico, por ejemplo, ecotrópico env, que ayuda a la entrada en las células de las especies huéspedes originales. Ver, por ejemplo, id.

5 La transducción viral de las células puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, Palsson, B., y otros, (1995), WO95/10619; Morling, F. J. y otros, (1995), Gene Therapy, 2:504-508; Gopp y otros, (2006), Methods Enzymol, 420:64-81. Por ejemplo, la infección puede lograrse mediante una infección por centrifugación o métodos de "espinoculación" que involucran someter las células a una centrifugación durante el período próximo a la adición del virus a las células. En algunos casos, el virus puede concentrarse antes de la infección, por ejemplo, mediante ultracentrifugación.

15 La multiplicidad de infección (m.o.i.) que se usa para transducir las células para ser modificadas genéticamente puede variar desde aproximadamente 1 m.o.i. a aproximadamente 50 m.o.i., por ejemplo, aproximadamente 1 m.o.i., aproximadamente 5 m.o.i., aproximadamente 7,5; m.o.i., aproximadamente 10 m.o.i., aproximadamente 15 m.o.i., aproximadamente 20 m.o.i., aproximadamente 30 m.o.i., aproximadamente 40 m.o.i., o aproximadamente 50 m.o.i.;

20 Los métodos para generar diversos tipos de células a partir de células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes humanas inducidas) mediante diferenciación dirigida son conocidos en la técnica, como se describe en, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. núms. 7,955,849, 7,763,466, 7,264,968; y las publicaciones de las solicitudes de patentes de los EE.UU. núms. 2009/0075374, y 2009/0124568.

25 En una modalidad ilustrativa, los progenitores epidérmicos embrionarios humanos (hEEP) se derivan de una línea de células madre pluripotente humana, por ejemplo, células madre embrionarias humanas o células madre pluripotentes humanas inducidas de la manera siguiente.

30 Las células madre pluripotentes se mantienen en medio de crecimiento de células madre embrionarias (ESC) que contiene DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero de reemplazo inactivado 20 %, aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM, GlutaMax 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mM. El medio de crecimiento de ESC está acondicionado para sembrar los fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente (MEF) (CF-1, ATCC) a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incuban durante 18-24 horas. Después del acondicionamiento, se adiciona bFGF 4 ng/mL y se filtra de forma estéril el medio acondicionado completo. Las hESC se subcultivan cada 5-6 días (en una proporción de 1:3 o 1:4) en placas recubiertas con Matrigel® (BD Biosciences) mediante el uso de Dispasa 1 mg/mL para eliminar las colonias celulares. La diferenciación de hEEP de células madre pluripotentes en hEEP K14<sup>+</sup>/p63<sup>+</sup>, mediante el primer cultivo de las células madre pluripotentes en placas de 6 pocillos durante 4 días en medio de crecimiento de ESC y después se cambia a medio de diferenciación 2 mL/pocillo, que comprende el medio de crecimiento no condicionado de hESC que contiene ácido retinoico todo trans 1  $\mu$ M (Sigma) y BMP4 25 ng/mL. Después del cambio de medio diariamente durante 7 días, las células se tratan con dispasa, se centrifugan y se suspenden en medio definido de queratinocitos sin suero (DSFM) y se siembran en placas recubiertas de gelatina en una proporción de 1:3. El DSFM se cambiará en días alternos durante 3-4 semanas. Después, las células se subcultivan mediante el uso de tripsina, se centrifugan, se lavan y se siembran en placas de cultivo de tejidos a 10 000 células por cm<sup>2</sup> recubiertas con gelatina en DSFM. Para verificar que las monocapas epiteliales tengan una pureza de  $\geq 90$  % y expresen K14, las células se someten a citometría de flujo de acuerdo con el método deMetallo y otros (2010), Methods Mol Biol 585:83-92. Para mejorar la pureza de las células hEEP aisladas, las células se clasificaron mediante el uso de la clasificación celular activada magnéticamente (MASC) con anticuerpos CD29. Aproximadamente el 92 por ciento de las células hEEP en cultivo de células clasificadas por CD29 MASC diferenciadas a partir de hESC eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP modificadas, fueron positivas para K14, un marcador específico de queratinocitos.

50 Las células de mamífero modificadas genéticamente que expresan eHLA-G transgénico, como se describe en la presente descripción, tienen una inmunogenicidad disminuida en relación con las células de mamífero correspondientes que no expresan HLA-G. Por ejemplo, la inmunogenicidad puede disminuirse en al menos aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 %, con relación a al tipo celular correspondiente que no expresa HLA-G exógena, por ejemplo, aproximadamente 6 %, 7 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 65 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, u otro porcentaje de inmunogenicidad con relación a células del mismo tipo celular que no expresa HLA-G exógena.

55 Los métodos para determinar la inmunogenicidad de las células son conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células de mamífero HLA-G modificadas (por ejemplo, células madre embrionarias humanas, o células diferenciadas de células madre embrionarias HLA-G modificadas, o células que ya están completamente diferenciadas antes de la modificación, etcétera) o células de mamífero sin modificar se cultivan en la presencia de una línea de células asesinas naturales alogénicas (por ejemplo, NK-92) y después se determina la citotoxicidad para las células HLA-G modificadas frente a las no modificadas inducidas por las células NK-92 mediante cualquiera de una serie de ensayos de viabilidad celular estándar.

#### Ácidos Nucleicos que Contienen el Transgén HLA-G (eHLA-G) Mejorado

65 Los ácidos nucleicos aislados (por ejemplo, los vectores de expresión de plásmidos de mamíferos) que se usan para generar células de mamíferos HLA modificadas, como se describe en la presente descripción, contienen un transgén HLA-

G "eHLA-G" mejorado que dirige una mayor expresión de superficie celular y/o secreción de HLA-G con relación a la expresión de superficie celular dirigida por un transgén HLA-G de tipo silvestre. Tal transgén incluye, típicamente, al menos tres componentes distintos: un promotor y una secuencia de la región no traducida 5' (5' UTR); una secuencia codificante; y una secuencia de la región no traducida 3' (3' UTR).

5 En algunas modalidades, el promotor para usarse para dirigir la expresión del transgén eHLA-G es uno capaz de dirigir la expresión del transgén eHLA-G en un tipo celular de interés durante un período de al menos aproximadamente siete semanas a aproximadamente 50 semanas, por ejemplo, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 15 semanas, 20 semanas, 25 semanas, 30 semanas, 35 semanas, 40 semanas, 42 semanas, 45 semanas, 47 semanas, 48 semanas, u otro período al menos aproximadamente siete semanas a aproximadamente 50 semanas. Los promotores capaces de dirigir la expresión durante períodos tan prolongados de tiempo son efectivos para evadir el silenciamiento que se produce en numerosos tipos celulares, que incluyen, por ejemplo, las células madre tales como células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas o células madre mesenquimatosas.

15 Los promotores adecuados resistentes al silenciamiento incluyen, pero no se limitan a, el promotor del factor 1 alfa de elongación de hámster chino (CHEF-1 $\alpha$ ) (ver Running Deer y otros (2004), *Biotechnol. Prog.*, 20:880-889; y Núm. de Acceso al GenBank AY188393.1), la variante del promotor M-U3/R del promotor del Virus de Células Madre Murino (MSCV) (como se describe en Swindle y otros (2004), *J Biol Chem*, 279:34-41), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor de la  $\beta$ -actina humana, y el promotor de la ubiquitina C.

20 En algunas modalidades, el promotor usado para dirigir la expresión de un transgén eHLA-G se expresa en uno o más tipos de células convenientes a un nivel que es más alto que en otros tipos celulares. Un experto en la técnica apreciará que, por ejemplo, cuando una célula madre HLA-G modificada va a diferenciarse en un tipo de célula particular, puede ser ventajoso seleccionar un promotor que sea activo dentro o incluso selectivo para ese tipo celular particular. Por ejemplo, para un promotor selectivo del tipo de tejido o célula dado, el nivel de expresión puede ser aproximadamente de dos a 100 veces más alto en el tipo celular conveniente en comparación con otro tipo celular, por ejemplo, aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, u otro nivel de expresión más alto en el tipo celular conveniente en comparación con otro tipo celular. Los ejemplos de promotores selectivos del tipo de tejido o célula incluyen, pero no se limitan a, los promotores para: Enolasa Específica de Neuronas (neuronal), Sinapsina (neuronal), CamKII (neuronas del cerebro anterior), HB9 (neuronas motoras), y Transportador de Dopamina (neuronas dopaminérgicas); Proteína Ácida Fibrilar de la Glía (astrocitos); Albúmina (hígado); Cadena Pesada de  $\alpha$ -Miosina ( $\alpha$ MHC-cardiomiocitos); Neurogenina 3 y Caja Homeótica 1 Páncreas-Duodeno (páncreas); Queratina 14 (piel); y Bestrofina 1 (epitelio pigmentario de la retina);

35 Típicamente, la secuencia del transgén eHLA-G descrita en la presente descripción codifica una proteína HLA-G que contiene al menos una a aproximadamente diez mutaciones puntuales con relación a la secuencia consenso de humano (GenBank Núm. NP\_002118.1), o de chimpancé, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mutaciones puntuales en relación con las secuencias consenso de la proteína HLA-G mencionadas anteriormente.

40 La secuencia consenso humano de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) se muestra más abajo:

**MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVD**  
**DTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTL**  
**RGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGDYALNEDLRSW**  
**TAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMQLRADPP**  
**KTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGD**  
**GTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGL**  
**VVLA AVVTGA AVAVLWRKKSSD**

55 En algunas descripciones, al menos una a aproximadamente diez mutaciones puntuales aumentan el nivel de expresión de la proteína HLA-G en la superficie celular de la célula huésped que la expresa mediante la disminución de la retención de HLA-G en el retículo endoplásmico durante el procesamiento y maduración de la proteína. Tales mutaciones incluyen, por ejemplo, una mutación en el motivo "KK" de HLA-G. Ver, por ejemplo, Park y otros (2001), *Immunity*, 15:213-224. En algunos casos, la mutación del motivo KK incluye una mutación K334A, una mutación K335A o ambas mutaciones de sustitución. En otros casos, la sustitución puede hacerse con un aminoácido alifático diferente (por ejemplo, leucina) u otro tipo del tipo de aminoácido que no sea básico.

65 La proteína HLA-G codificada de la invención tiene la secuencia de aminoácidos de la (SEQ ID NO:2), en la que se introdujeron las sustituciones K334A y K335A, con relación a la secuencia de tipo silvestre, (subrayadas):

**MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPFIAMGYVD**  
**DTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTL**  
**RGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSW**  
**TAADTAAQISKRKCEAAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPP**  
**KTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGD**  
**GTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGL**  
**VVLA AVVTGA AVAVLWRAASSD**

15 En alguna descripción como referencia de la presente descripción, un transgén eHLA-G codifica una proteína HLA-G cuya secuencia de aminoácidos es al menos 75 % a 100 % idéntica a esa de la SEQ ID NO:2, por ejemplo, 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 87 %, 88 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, u otro porcentaje idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

20 El transgén eHLA-G de la invención descrito en la presente descripción incluye, además, una región no traducida 3' (3' UTR) que contiene una serie de elementos reguladores que afectan la eficiencia de la expresión/traducción de los transcritos de HLA-G. La secuencia UTR 3' del transgén eHLA-G es una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:3:

**TGTGAAACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGTCCCTTTG**  
**TGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTGTGCAGAGACCAGCCCA**  
**CCCTGTGCCACCATGACCCTCTTCCTCATGCTGAACTGCATTCT**  
**TCCCAATCACCTTTCCTGTTCCAGAAAAGGGGCTGGGATGTCTC**  
**CGTCTCTGTCTCAAATTTGTGGTCCACTGAGCTATAACTTACTTCT**  
**GTATTAATAATTAGAATCTGAGTG**

35 Tales secuencias contienen mutaciones (subrayadas) que disminuyen la unión de dos sitios de unión de microARN que resulta en un aumento de la expresión del transgén que codifica HLA-G. Estas secuencias incluyen una delección de una secuencia de 14 pares de bases presente en el exón 8 de algunos alelos de HLA-G. Esta secuencia de 14 pares de bases se muestra más abajo como la SEQ ID NO:4:

40 SEQ ID NO:4 14-bp secuencia de inserción en UTR 3' de HLA ATTTGTTTCATGCCT

SEQ ID NO:5, más abajo, se corresponde a la SEQ ID NO:3 con la inserción de esta secuencia de 14 pares de bases (minúscula):

45 SEQ ID NO:5 (variante UTR 3'+14 BP HLA-G)

**TGTGAAACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGatttggttcatgctt**  
**TCCCTTTGTGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTGTGCAGAGACCA**  
**GCCCAACCCTGTGCCACCATGACCCTCTTCCTCATGCTGAACTGC**  
**ATTCTTCCCAATCACCTTTCCTGTTCCAGAAAAGGGGCTGGGAT**  
**GTCTCCGTCTCTGTCTCAAATTTGTGGTCCACTGAGCTATAACTTAC**  
**TTCTGTATTAATAATTAGAATCTGAGTG**

60 Se ha informado de que los alelos HLA-G que tienen una UTR 3' que incluye la inserción de 14 bases mencionada anteriormente (ver SEQ ID NO:4), producen un transcrito de ARNm de HLA-G más estable. Ver Rouseau y otros (2003), Human Immunology, 64:1005-1010. Sorprendentemente, se encontró inesperadamente que la expresión del alelo con una delección de 14 pares de bases (mostrada en la SEQ ID NO:3) parecía ser más inmunoprotectora que el alelo que incluye la inserción de 14 pares de bases. Ver la Figura 13. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que el efecto de la delección de 14 pb en los niveles de expresión de HLA-G puede ser específico del tipo de célula, por ejemplo, la delección de 14 pb aparentemente mejora la expresión de eHLA-G en células humanas, que incluyen, al menos hESC, hEEP, y células fibroblastos dérmicos humanas.

5 En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que contiene el transgén eHLA-G incluye, además, secuencias aisladoras que flanquean el casete de expresión eHLA-G. Las secuencias aisladoras mitigan los efectos de posición genómica que podrían afectar falsamente la expresión de un casete de expresión exógeno integrado. En algunas modalidades, las secuencias aisladoras a usar contienen la secuencia aisladora del núcleo de  $\beta$ -globina HS4 de pollo.

10 En algunas modalidades, el ácido nucleico que contiene el transgén eHLA-G incluirá, además, un marcador de selección como se describe en la presente descripción. Opcionalmente, el ácido nucleico aislado que contiene el transgén eHLA-G puede contener, además, una proteína reportera como se describe en la presente descripción.

15 En algunas modalidades, la generación de una línea celular eHLA-G modificada se genera mediante el uso de un vector de transposón que comprende un casete de expresión eHLA-G, pero no contiene casetes de expresión para un marcador de selección o una proteína reportera. El vector se introduce en las células que se modificarán junto con un vector de expresión de transposasa, seguido de una clonación por dilución limitante. Como la población de células transfectadas se modifica de manera muy eficiente, puede evitarse la necesidad de usar marcadores de selección o proteínas reporteras. Esta es una consideración importante, especialmente para las células que se usarán en el contexto de la terapia celular en pacientes humanos. El porcentaje de células que se modifica con éxito mediante los métodos de transfección estables basados en transposones puede variar entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 50 %, por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 7 %, 8 %, 15 %, 20 %, 22 %, 30 %, 40 %, u otro porcentaje de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 % de las células transfectadas.

25 En algunas modalidades, la expresión de proteínas codificadas por un ácido nucleico que codifica dos o más proteínas es dirigida por promotores separados. En otras modalidades, un casete de expresión policistrónico puede incorporar una o más secuencias del sitio de entrada ribosomal interno (IRES) entre los marcos abiertos de lectura incorporados en el casete de expresión policistrónica. Las secuencias IRES y su uso son conocidos en la técnica como se ejemplifica en, por ejemplo, Martínez-Salas (1999), Curr Opin Biotechnol, 10(5):458-464. Alternativamente, múltiples marcos abiertos de lectura pueden vincularse entre sí mediante una secuencia intermedia del péptido 2A del virus de la enfermedad fiebre aftosa (F2A) o secuencias similar a 2A de otros virus. Ver, por ejemplo, Hasegawa y otros (2007), Stem Cells, 25:1707-1712y Symczak y otros (2004), Nat Biotechnol, 589-594. La inclusión de la secuencia del péptido 2A permite la escisión postraduccional de un polipéptido contiguo que contiene eHLA-G y otras secuencias (por ejemplo, una secuencia de la proteína reportera o una secuencia de proteína marcador de selección) en proteínas separadas.

35 Si bien la identidad entre secuencias de aminoácidos relativamente cortas o secuencias de ácido nucleico puede determinarse fácilmente mediante inspección visual, el análisis con un algoritmo apropiado, que típicamente se facilita mediante un programa informático, se usa comúnmente para determinar la identidad entre secuencias más largas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia, típicamente, se introducen en una computadora, si es necesario posteriormente se designan coordenadas, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba(s) con relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros de programa designados. Una serie de algoritmos matemáticos para obtener rápidamente la alineación óptima y calcular la identidad entre dos o más secuencias son conocidos e incorporados en numerosos programas informáticos disponibles. Los ejemplos de tales programas incluyen los programas para el análisis de secuencia de aminoácidos MATCH-BOX, MULTAIN, GCG, FASTA, y ROBUST, y los programas para las secuencias de nucleótidos SIM, GAP, NAP, LAP2, GAP2, y PIPMAKER. Los programas informáticos de análisis preferidos para el análisis de las secuencias de aminoácidos y polinucleótidos incluyen los programas ALIGN, CLUSTALW (por ejemplo, versión 1.6 y versiones posteriores de estos), y los programas BLAST (por ejemplo, BLAST 2.1, BL2SEQ, y versiones posteriores de estos).

50 "Identidad" (en ocasiones denominada "identidad general", en contraste con la "identidad local", que se describe más adelante en la presente descripción) con respecto a las secuencias de aminoácidos o nucleótidos se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o bases de nucleótidos, respectivamente, que son idénticas en las dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos cuando dos de tales secuencias de aminoácidos o dos de tales secuencias de nucleótidos están alineadas óptimamente entre sí. Si, en el alineamiento óptimo, una posición en una primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o residuo de nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos correspondiente, las secuencias exhiben identidad con respecto a esa posición del residuo. El nivel de identidad entre dos secuencias (o "porcentaje de identidad de secuencia") se mide como una relación del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias con respecto al tamaño de las secuencias analizadas (es decir, porcentaje de identidad de secuencia=(número de posiciones idénticas/número total de posiciones).veces.100).

60 Además, se incluyen en la presente descripción los ácidos nucleicos que se hibridan específicamente en condiciones de rigurosidad baja, media o alta a una sonda de al menos 100 nucleótidos de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o a la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOS:3 o 5.

65 Las condiciones de hibridación de baja rigurosidad, como se usan en la presente descripción, incluyen, por ejemplo, la hibridación con una sonda de 100 nucleótidos de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 % de contenido de GC; a 42 °C en 2X SSC y SDS al 0,1 %. Las condiciones de hibridación de rigurosidad media incluyen, por ejemplo, a 50° C en 0,5X SSC y 0,1% SDS. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad incluyen, por ejemplo, la hibridación con la

sonda mencionada anteriormente a 65 °C en 0,2X SSC y 0,1% SDS. En estas condiciones, a medida que se eleva la temperatura de hibridación, se obtiene un ácido nucleico con una homología de secuencia superior.

5 Un transgén eHLA-G descrito en la presente descripción incluye, además, una región no traducida 3' (3' UTR) que contiene numerosos elementos reguladores que afectan la eficiencia de la expresión/traducción de los transcritos de HLA-G. La secuencia del transgén eHLA-G 3' UTR es una secuencia de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75 % idéntica a la secuencia de la (SEQ ID NO:3), por ejemplo, al menos 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 87 %, 88 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, u otro porcentaje idéntico a la secuencia de HLA-G 3' UTR (SEQ ID NO:3).

10 Composiciones que Comprenden Células eHLA-G Modificadas Genéticamente

En la presente descripción se incluyen, además, composiciones farmacéuticas, composiciones tóxicas, injertos celulares y tejidos artificiales que comprenden o que se generan mediante el uso de uno o más tipos de células de mamífero HLA-G modificadas. Como se muestra en la presente descripción, las hESC eHLA-G modificadas mostraron una expresión de HLA-G estable y persistente, incluso a través de la diferenciación dirigida en hEEP. Además, la expresión estable y persistente de HLA-G proporcionó a las células modificadas genéticamente una inmunogenicidad disminuida y o una inmunosupresión mejorada. Además, en la presente descripción se demuestra que los fibroblastos dérmicos humanos eHLA-G modificados, que son células totalmente diferenciadas, tienen además una expresión estable y persistente de HLA-G que proporciona inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada. Por lo tanto, los constructos de eHLA-G descritos en la presente descripción pueden usarse para generar células donantes universales de cualquier tipo, ya sea a partir de la diferenciación dirigida de una célula pluripotente o multipotente modificada genéticamente, o a partir de la modificación genética de una célula totalmente diferenciada.

25 En un aspecto, se proporciona una composición tóxica para la regeneración o reparación de la piel que comprende una célula de fibroblasto dérmico modificado genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para inyección que comprende una célula de fibroblasto dérmico modificado genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona una composición para injerto de piel que comprende una célula de fibroblasto dérmico modificado genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, se proporciona una composición para injerto de piel permanente que comprende una célula progenitora epidérmica embrionaria modificada genéticamente que comprende un transgén eHLA-G como se describe en la presente descripción.

35 En otro aspecto, los supercántigos sintéticos biocompatibles para tejidos artificiales y los métodos para su generación se describen en la técnica y pueden usarse con las células HLA-G modificadas descritas en la presente descripción para producir un tejido artificial que tiene inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con los tejidos que contienen células que no expresan HLA-G exógeno. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 7,960,166 titulada "Composiciones y procesos microfabricados para ingeniería de tejidos que contienen múltiples tipos de células".

40 II. Métodos

Tratamiento mediante Terapia Celular

45 Debido a que las células modificadas para expresar de manera estable HLA-G exógena de la manera descrita en la presente descripción tienen inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión aumentada, estas características permiten que la célula modificada sirva como una célula o tejido donante universal o mejorado. Esto se debe a que la disminución de la inmunogenicidad y/o la mejora en la inmunosupresión, mediada por HLA-G, proporcionada a la célula pueden disminuir o eliminar el requisito de la coincidencia de las moléculas de clase I y clase II del antígeno leucocitario humano clásico (HLA) entre las células del donante y el receptor) para numerosas lesiones, enfermedades, o trastornos.

50 Por lo tanto, las células HLA-G modificadas que expresan de manera estable eHLA-G (y opcionalmente, además, la microglobulina  $\beta 2$  humana exógena), como se describe en la presente descripción, pueden usarse como terapia. La terapia puede dirigirse al tratamiento de la causa de la enfermedad; o alternativamente, la terapia puede ser para tratar los efectos de la enfermedad o afección. Las células modificadas genéticamente pueden transferirse a, o aproximarse a, un sitio lesionado en un sujeto; o las células pueden introducirse al sujeto de una manera que permita que las células migren, o se dirijan, al sitio lesionado. Las células transferidas pueden reemplazar ventajosamente las células dañadas o lesionadas y permitir una mejora en la condición general del sujeto. En algunos casos, las células transferidas pueden estimular la regeneración o reparación de tejidos, que incluye la regeneración de la piel o la reparación de la piel.

60 En diversas modalidades, las células de mamífero HLA-G modificadas (por ejemplo, células humanas HLA-G modificadas) son para usar en la administración a un sujeto que padece de cualquiera de un número de afecciones que incluyen, pero que no se limitan enfermedad cardiovascular, enfermedad de los ojos (por ejemplo, degeneración macular), enfermedad auditiva, (por ejemplo, sordera), diabetes, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, osteoporosis, enfermedad del hígado, enfermedad del riñón, enfermedad autoinmune, artritis, enfermedad de las encías, una afección dental, o un trastorno proliferativo (por ejemplo, un cáncer). En otros casos, el sujeto padece de, o tiene un alto riesgo de padecer de, una afección de salud aguda, por ejemplo, infarto

5 cerebral, lesión de la médula espinal, quemaduras, o una herida. En otros casos, el sujeto padece de la pérdida de tejidos tal como lipoatrofia o las pérdidas en el colágeno asociadas con el envejecimiento. En otros casos, el sujeto padece de una úlcera que no cicatriza, o necesita de un agente para ayudar en el cierre de defectos como la hipospadias y la epispadias. En otros casos, el sujeto necesita un injerto de piel temporal o permanente para la cicatrización de la herida o para sustituir la piel.

10 En un aspecto, la invención proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente de la invención para usar en un método universal de injerto celular o de tejido a u sujeto que lo necesite, el método comprende inyectar o injertar al sujeto una composición celular o tisular que comprende una población de células eHLA-G modificadas de la invención, en donde el sujeto tiene al menos una molécula de HLA clásica I o HLA de clase II no coincidente en comparación con la población de células eHLA-G modificadas, y en donde la población de células eHLA-G modificadas exhibe inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con células del mismo tipo sin la modificación de eHLA-G. La inmunogenicidad disminuida y/o la inmunosupresión mejorada pueden determinarse, por ejemplo, mediante la comparación de la célula eHLA-G modificada con una célula de control del mismo tipo sin la modificación eHLA-G en un ensayo de citotoxicidad de NK-92, un ensayo de crecimiento del tumor NSG humanizado, y/o un ensayo de proliferación de PBMC.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una célula de mamífero modificada genéticamente de la invención para usar en un método para regenerar la piel a un sujeto que lo necesite, el método comprende inyectar una población de fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados de la invención y/o los progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados de la invención a un sitio de lesión de la piel en el sujeto, en donde el sujeto tiene al menos una molécula clásica de HLA clase I o HLA clase II no coincidente en comparación con la población de fibroblastos dérmicos eHLA-G modificados y/o progenitores epidérmicos embrionarios eHLA-G modificados.

25 Los tipos de células HLA-G modificadas para administrarse a un sujeto que las necesite incluyen, pero no se limitan a, células progenitoras epidérmicas, células madre mesenquimatosas, células progenitoras pancreáticas  $\beta$ , células pancreáticas  $\beta$ , células progenitoras cardíacas, cardiomiocitos, células progenitoras hepáticas, hepatocitos, células progenitoras de músculo, células de músculo, células de riñón, osteoblastos, células progenitoras hematopoyéticas, células de folículos dentarios, células del folículo piloso, células epiteliales pigmentarias de la retina, células madre neural, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, o cualquier combinación de estas. Tales células de mamíferos pueden derivarse de una de numerosas especies que incluyen, por ejemplo, humana, ratón, rata, mono, o cerdo.

35 La terapia puede dirigirse al tratamiento de la causa de la enfermedad; o alternativamente, la terapia puede ser para tratar los efectos de la enfermedad o afección. Las células HLA-G modificadas pueden transferirse a, o aproximarse a, un sitio lesionado en un sujeto; o las células pueden introducirse al sujeto de una manera que permita que las células migren, o se dirijan, al sitio lesionado. Las células transferidas pueden reemplazar ventajosamente las células dañadas o lesionadas y permitir una mejora en la afección general del sujeto. En algunos casos, las células transferidas pueden estimular la regeneración o reparación de tejidos.

40 Las células transferidas pueden ser células diferenciadas a partir de células madre pluripotentes (o totipotentes) HLA-G modificadas. Las células transferidas pueden ser células madre multipotentes diferenciadas a partir de células HLA-G modificadas, pluripotentes.

45 El número de administraciones de tratamiento a un sujeto puede variar. La introducción de células HLA-G modificadas y/o diferenciadas en el sujeto puede ser un evento único; pero en determinadas situaciones, tal tratamiento puede provocar una mejoría durante un período de tiempo limitado y requerir una serie continua de tratamientos repetidos. En otras situaciones, pueden requerirse múltiples administraciones de las células antes de que se observe un efecto. Como se apreciará por los expertos en la técnica, los protocolos de tratamiento exactos dependerán de la enfermedad o afección, y de la etapa de la enfermedad y de los parámetros del sujeto individual que se está tratando.

50 Las células HLA-G modificadas pueden introducirse en el sujeto a través de cualquiera de las siguientes vías: parenteral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratraqueal, intraperitoneal, o en el fluido espinal. Las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en células y después transferirse a los sujetos que padecen de una amplia gama de enfermedades o trastornos.

55 Las células de los islotes pancreáticos (o las células primarias de los islotes de Langerhans) pueden trasplantarse a un sujeto que padece diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus, tipo 1), ver por ejemplo, Burns y otros, (2006) Curr. Stem Cell Res. Ther., 2:255-266. Por lo tanto, en algunas modalidades, las células beta pancreáticas derivadas de células HLA-G modificadas se trasplantan en un sujeto que padece diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus, tipo 1).

60 En otros ejemplos, las células hepáticas o las células madre hepáticas derivadas a partir de células HLA-G modificadas se trasplantan a un sujeto que padece de una enfermedad hepática, por ejemplo, hepatitis, cirrosis, o insuficiencia hepática.

Las enfermedades cardíacas degenerativas, tales como la miocardiopatía isquémica, la enfermedad de conducción, y los defectos congénitos, podrían beneficiarse de las terapias con células madre. Ver, por ejemplo, Janssens y otros, (2006), *Lancet*, 367:113-121.

5 Las células hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas (HSC) derivadas de células HLA-G modificadas pueden trasplantarse en un sujeto que padece de cáncer de la sangre, u otro trastorno sanguíneo o inmunológico. Los ejemplos de cánceres de la sangre que son potencialmente tratados con células hematopoyéticas o HSC incluyen: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica (CML), enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin. Con frecuencia, un sujeto que padece de tal enfermedad debe someterse a radiación y/o  
10 tratamiento quimioterapéutico para destruir las células sanguíneas que se dividen rápidamente. La introducción en estos sujetos de las HSC derivadas de células HLA-G modificadas puede ayudar a repoblar los reservorios de células depletados.

15 Los sujetos que padecen de enfermedades o trastornos neurológicos podrían beneficiarse especialmente de la terapia de células HLA-G modificada, especialmente cuando la barrera hematoencefálica puede haberse comprometido. En algunos enfoques, las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en células madre neurales o neuronas y después trasplantarse a un sitio lesionado para tratar una afección neurológica, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, infarto cerebral, lesión de la médula espinal, u otro trastorno del sistema nervioso central, ver, por ejemplo, Morizane y otros, (2008), *Cell Tissue Res.*, 331(1):323-326; Coutts and Keirstead (2008), *Exp. Neurol.*, 209(2):368-377; Goswami and Rao (2007), *Drugs*, 10(10):713-719.

20 Para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en neuronas que actúan mediante dopamina y después trasplantarse al cuerpo estriado de un sujeto con enfermedad de Parkinson. Para el tratamiento de la esclerosis múltiple, las células madre neurales pueden diferenciarse en oligodendrocitos o progenitores de oligodendrocitos, que después se transfieren a un sujeto que padece EM.

30 Para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno neurológico, un enfoque exitoso puede ser introducir células madre neurales al sujeto. Por ejemplo, para tratar la enfermedad de Alzheimer, el infarto cerebral o una lesión de la columna vertebral, las células HLA-G modificadas pueden diferenciarse en células madre neurales seguido por el trasplante en el sitio lesionado. Las células HLA-G modificadas pueden diseñarse, además, para responder a señales que pueden dirigir su migración hacia lesiones para la reparación del cerebro y la médula espinal, por ejemplo, Chen y otros, (2007), *Stem Cell Rev.*, 3(4):280-288.

35 Opcionalmente, las células HLA-G modificadas para incluirse en los métodos de terapia celular, además, expresan una proteína reportera como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la proteína reportera a usarse es una que facilita la detección *in vivo* (por ejemplo, la formación de imágenes) de las células introducidas. Por ejemplo, las células pueden expresar una proteína fluorescente emisora de rojo lejano, tal como Katushka, cuyas largas longitudes de onda de excitación y emisión son muy adecuadas para la obtención de imágenes en tejidos. Katushka está disponible comercialmente bajo la marca "TurboFP635" (Evrogen, Moscú, Rusia).

40 **EJEMPLOS**

45 Los siguientes ejemplos específicos son para interpretarse justo como ilustrativos, y no limitantes del resto de la descripción de modo alguno. Sin entrar en otros detalles innecesarios, se considera que, basándose en la presente descripción, una persona con experiencia en la técnica podrá usar al máximo la presente invención. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y que la información particular en Internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente mediante la búsqueda en Internet. La referencia a esto evidencia la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

50 **Ejemplo 1 Identificación de Patrones de Expresión Génica Asociados con la Tolerancia Inmunitaria de las Células Cancerosas**

55 Los arreglos de tejidos blandos de cáncer humanos se examinaron inicialmente en busca de un gen de tolerancia inmunitaria candidato que mostrara una mayor expresión con la progresión del cáncer a estados metastásicos, presumiblemente debido a la evasión de los mecanismos de vigilancia inmunitaria. Los datos revelaron una fuerte correlación positiva entre la metástasis exitosa y los niveles de expresión de diversos genes previamente implicados en la tolerancia inmunitaria. Para evaluar si las MSC podrían inducir tolerancia inmunitaria y aceptación de aloinjerto, las MSC se sometieron a una prueba cruzada mediante RT-PCR para examinar los niveles de expresión de estos genes candidatos y diversos HLA antigénicos. La Tabla 1 ilustra que en el pase de cultivo 1 las MSC expresaban el HLA clase I, HLA-G y II marcadores adicionales a CD200, CD47, e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Se encontró que una población de MSC expresaba HLA-G en niveles moderados, aunque menos que el que se encontró para Jeg-3, una línea de cáncer con potencial metastásico agresivo.

65



Tabla 1

Tipo celular	Pase en cultivo #	HLA clase Ia	HLA-G	HLA clase II	IDO	CD200	CD47
MSC G	1	++++	-	-/+	+	++	+
	3	++++	-	++	+	++	+
MSC G <sup>+</sup>	1	++++	++	-/+	+	++	+
	3	++++	-	++	+	++	+
Jeg3	1	++	+++	-/+	-	-	+
	3	++	+++	-/+	-	-	+

15 Dado que el efecto inmunosupresor de las MSC *in vivo* parece ser transitorio, las MSC se pasaron sucesivamente y se controlaron para detectar cambios en los niveles de expresión de los genes seleccionados. En el pase en cultivo 3, la expresión de HLA-G natural fue ausente en las MSC, aunque otros marcadores candidatos permanecieron sin cambios. La expresión de HLA-G no se alteró en las células Jeg-3. Después las MSC se aislaron en base a la expresión de HLA-G en la superficie celular mediante el uso de FACS, y se encontró que entre 0,5-3 % de las MSC expresaban HLA-G en la superficie celular. Para evaluar la capacidad de las MSC HLA-G<sup>+</sup> para evadir el rechazo del donante *in vivo*, 1-3 x10<sup>5</sup> células se inyectaron en las venas de la cola de ratones inmunocompetentes. Se recolectaron muestras de sangre (200 µl) del plexo retroorbital y se clasificaron por FACS mediante el uso de un AcM antihumano específico para HLA de clase I. La Tabla 2 muestra 1 semana después del trasplante, las MSC HLA-G<sup>+</sup> (y las células Jeg-3) demostraron una ventaja de supervivencia 24 y 270 veces sobre las células HSC y Jurkat (ambas HLA-G<sup>-</sup>), respectivamente. Alrededor de las dos semanas, la ventaja de las MSC HLA-G<sup>+</sup> aumentó a 27 y 311 veces. Las MSC HLA-G<sup>-</sup> sobrevivieron a la misma tasa que las HSC, lo que sugiere que una subpoblación HLA-G<sup>+</sup> de MSC pueden exhibir efectos tolerogénicos mejorados con relación a las MSC no clasificadas en un contexto *in vivo*. De hecho, el análisis post mortem reveló tumores evidentes en los pulmones de los ratones inmunocompetentes 12 semanas después del trasplante con células Jeg-3, pero no con las MSC G<sup>+</sup> (datos no mostrados).

Tabla 2

Tipo celular	HLA-G	Tiempo de Extracción de la Muestra	% de Supervivencia
100k MSC	-	2 semanas	0,51 %
100k MSC	+	1 semana	10,82 %
		2 semanas	12,47 %
150k Jeg-3	+	1 semana	13,5 %
300k HSC	-	1 semana	0,46 %
300k Jurkat	-	1 semana	0,04 %

45 A continuación, un constructo HLA-G modificado se sobreexpresó en células HF (fibroblastos humanos) y K562, y se evaluó la protección contra la lisis inducida por células NK humanas (Tabla 3). La citotoxicidad mediada por NK disminuyó en un 75 % en los HF HLA-G<sup>+</sup> HF y se eliminó virtualmente en las células K562 HLA-G<sup>+</sup>. Esto es consistente con la protección observada en las Jeg-3 HLA-G<sup>+</sup> que se revirtió mediante la incubación con el anticuerpo neutralizante anti-HLA-G (87G) pero no con un control de isotipo. Estos datos sugieren que la protección contra la muerte inducida por NK fue dependiente de HLA-G.

Tabla 3

Promotor	Recuperación del ER	UTR 3'	Expresión de superficie de HLA-G	Lisis citotóxica (3:1)	Silenciamiento
pMSCV	tipo silvestre	ausente	bajo-medio	32-41 %	4-6 semanas
pMSCV	tipo silvestre	tipo silvestre	bajo	40-60 %	4-6 semanas
pMSCV	mutado	tipo silvestre	medio	25-33 %	4-6 semanas
pMSC <sup>mut</sup>	tipo silvestre	ausente	bajo-medio	35-42 %	Ninguno @ 12 mo
pMSC <sup>mut</sup>	mutado	mutado	alto	0-8 %	Ninguno @ 5 mo

Estudios anteriores demostraron que el promotor de MSCV mutado, M-U3/R, evitó la presión del silenciamiento durante 10 semanas de cultivo. Nuestros estudios demostraron que M-U3/R resistió el silenciamiento después de 1 año de cultivo continuo, superior al promotor de tipo silvestre que fue silenciado durante 4-6 semanas de cultivo. Además, la mutación o delección de la UTR 3' mejoró la expresión de superficie de HLA-G, como lo hizo la mutación del motivo de recuperación del ER. La mayor expresión en la superficie de HLA-G se correlacionó negativamente con la lisis citotóxica, lo que refuerza la importancia de emplear un constructo óptimo de suministro de genes.

#### Ejemplo 2 Cultivo y Diferenciación de Células Madre Embrionarias Humanas en Progenitores Epidérmicos Humanos (hEEP)

Todos los reactivos de cultivo de tejidos fueron de Life Technologies a menos que se especifique de cualquier otra manera. El medio de crecimiento de ESC contiene DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero de reemplazo 20 %, aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM, GlutaMax 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma). El medio de crecimiento de ESC se acondicionó para sembrar fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente (MEF) (CF-1, ATCC) a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron durante 18-24 horas. Después del acondicionamiento, se adicionó bEGF 4 ng/mL y se filtró de forma estéril el medio acondicionado completo. Las hESC se subcultivaron cada 5-6 días (fracción 1:3 o 1:4) en placas recubiertas con Matrigel mediante el uso de Dispasa 1 mg/mL, para eliminar las colonias celulares. Se generaron las hEEP K14<sup>+</sup>/p63<sup>+</sup> de acuerdo con el método de Metallo y otros *más arriba*. En resumen, las hESC se cultivaron en placas de 6 pocillos durante 4 días y después se trataron con medio de diferenciación 2 mL/pocillo, compuesto por medio de crecimiento de hESC no condicionado que contiene ácido retinoico todo trans 1  $\mu$ M (Sigma) y 25 ng/mL de BMP4. Después de los cambios diarios del medio durante 7 días, las células se trataron con dispasa, se centrifugaron y se suspendieron en medio definido de queratinocitos (DSFM) sin suero y se sembraron en placas recubiertas de gelatina en una relación de fracciones de 1:3. El DSFM se cambió en días alternos durante 3-4 semanas. Después, las células se subcultivaron mediante tripsinización, se centrifugaron, se lavaron y se sembraron en placas a 10 000 células por cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de tejidos recubiertas con gelatina en DSFM. Después de 14 días en un medio definido de queratinocitos sin suero, se observaron los primeros signos de diferenciación epidérmica mediante microscopía, caracterizada por la formación de una estructura de lámina epidérmica. Después de cuatro semanas de cultivo, las células en láminas epidérmicas mostraron un fenotipo de diferenciación epidérmica típico con morfología cúbica.

El aislamiento del ARN total de las células y las reacciones de transcriptasa inversa se describieron anteriormente en Zhao y otros (2010), Tissue Eng Part A, 16(2):725-733. La amplificación por PCR específica se realizó en el termociclador Hybaid Omnigene (Bio-rad, Hercules, CA) mediante el uso de cebadores específicos de los genes de interés como se muestra en la Figura 12. Las condiciones de la PCR consistieron en 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 1 minutos y 72 °C durante 1 minuto con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Se detectaron diez  $\mu$ l de cada producto de PCR mediante electroforesis en gel de bromuro de etidio. Los datos de la Figura 12 indican que los marcadores de diferenciación epidérmica K14, Tap63, y  $\Delta$ Np63 se mejoraron gradualmente durante la diferenciación. En datos que no se muestran en la presente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia de K14 y marcadores epidérmicos adicionales p63, CD29 y CD49f. Las hEEP eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP diferenciadas fueron positivas para la expresión de las proteínas K14, p63, CD29 y CD49f, como se indica mediante la inmunofluorescencia.

Para verificar que las monocapas epiteliales tenían una pureza de  $\geq 90$  % y que expresaban K14, las células se sometieron a citometría de flujo de acuerdo con el método de Metallo y otros *más arriba*, y se analizaron en un BD FACS Canto II. El impacto de la expresión del transgén eHLA-G (hESC eHLA-G(EF1- $\alpha$ )-GFP) en la diferenciación de hESC en EP (progenitores epidérmicos) se evaluó mediante la comparación del grado de positividad de K14 para el tipo silvestre en las hEEP G<sup>-</sup> y G<sup>+</sup>. Para mejorar la pureza de las células hEEP aisladas, las células se clasificaron mediante el uso de la clasificación celular activada magnéticamente (MASC) con anticuerpos CD29. Aproximadamente el 92 por ciento de las células hEEP en cultivo de células clasificadas por CD29 MASC diferenciadas a partir de hESC eHLA-G(EF1 $\alpha$ )-GFP modificadas, fueron positivas para K14, un marcador específico de queratinocitos. Las hEEP purificadas mostraron una morfología homóloga de queratinocitos como se muestra mediante microscopía de contraste de fase (ver Figura 16).

La estabilidad del transgén HLA-G en las hEEP diferenciadas se confirmó mediante citometría de flujo. Tanto la expresión total de HLA-G como la expresión de superficie fueron robustas para eHLA-G las hEEP diferenciadas (EF-1 $\alpha$ )-GFP (más del 90 % de las células) en comparación con las células de control sin HLA-G exógena (hEEP solo GFP) y las hEEP de tipo silvestre (ver Figura 17). Solo los clones que produjeron una diferenciación similar al de las células de tipo silvestre se seleccionaron para estudios posteriores.

#### Ejemplo 3 Diseño del Constructo eHLA-G y Expresión Estable en las hESC

Se diseñó un constructo novedoso de HLA-G mediante la combinación de múltiples modificaciones: 1) mutación del motivo de recuperación del ER de HLA-G (K334A/K335A); y 2) mutación de los sitios de unión de microARN a la UTR 3' de HLA-G. Dado que los sistemas de suministro de genes virales continúan como un serio desafío para la regulación, se utilizó el sistema PiggyBac, un enfoque no viral basado en transposones que recientemente demostró alcanzar una eficiencia de transfección del 90 % en HI hESC (Lacoste y otros (2009), Cell Stem Cell, 5:332-342.). Este sistema requiere un plásmido donante que contenga el transposón (Figura 1A) y un plásmido auxiliar que exprese la transposasa (Figura 2). Para generar plásmidos auxiliares, el cDNA de transposasa humanizado con codón ePiggyBac se sintetizó según el diseño

(GeneArt) y después se clonó en pBluescript (Stratagene) en dirección 3' de un promotor PGK y en dirección 5' de una secuencia de señal de poliadenilación de SV40 (pA). Para el casete de expresión de eHLA-G, se compararon múltiples promotores, que incluyen el promotor M-U3/R, el promotor MSCV y el promotor EF1 $\alpha$  (CHEF-1 $\alpha$ ) de hámster chino, cuya secuencia se proporciona más abajo como la SEC ID NO: 6.

5 (SEQ ID NO:6)-una modalidad del promotor CHEF-1 $\alpha$

GGATGGCGGGGCTGACGTCGGGAGGTGGCCTCCACGGGAAGGGACACCCGGATC  
 TCGACACAGCCTTGGCAGTGGAGTCAGGAAGGGTAGGACAGATTCTGGACGCC  
 10 TCTTGGCCAGTCCTCACCGCCCCACCCCGATGGAGCCGAGAGTAATTCATACAA  
 AAGGAGGGATCGCCTTCGCCCTGGGAATCCCAGGGACCGTCGCTAAATTCTGG  
 15 CCGCCTCCCAGCCCGGAACCGCTGTGCCCGCCAGCGCGGGCGGGAGGAGCCTG  
 CGCCTAGGGCGGATCGCGGGTCGGCGGGAGAGCACAAGCCCACAGTCCCCGGCG  
 GTGGGGGAGGGGCGCGCTGAGCGGGGGCCCGGGAGCCAGCGCGGGGCAAACCTG  
 20 GGAAAGTGGTGTCTGTGTGCTGGCTCCGCCCTCTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACG  
 GTATAAAAGTGCGGTAGTCGCGTTGGACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGTC  
 25 AGAACGCAGGTGAGTGGCGGGTGTGGCCTCCGCGGGCCCGGGCTCCCTCCTTTG  
 AGCGGGGTCGGACCGCCGTGCGGGTGTCTGTCGGCCGGGCTTCTCTGCGAGCGTTC  
 CCGCCTGGATGGCGGGCTGTGCGGGAGGGCGAGGGGGGGAGGCCTGGCGGCG  
 30 GCCCGGAGCCTCGCCTCGTGTGCGGGCGTGAGGCCTAGCGTGGCTTCCGCCCCGC  
 CGCGTGCCACCGCGGCCGCGCTTTGCTGTCTGCCC GGCTGCCCTCGATTGCCTGC  
 CCGCGGCCCGGGCCAACAAAGGGAGGGCGTGGAGCTGGCTGGTAGGGAGCCCC  
 35 GTAGTCCGCATGTCGGGCAGGGAGAGCGGCAGCAGTCGGGGGGGGGACCGGGC  
 CCGCCCGTCCCGCAGCACATGTCCGACGCCGCTGGACGGGTAGCGGCCTGTGTC  
 40 CTGATAAGGCGGCCGGGCGGTGGGTTTTAGATGCCGGGTTTCAGGTGGCCCCGGG  
 TCCCGGCCCGGTCTGGCCAGTACCCCGTAGTGGCTTAGCTCCGAGGAGGGCGAG  
 CCCGCCCGCCGGCACCAGTTGCGTGC GCGGAAAGATGGCCGCTCCCGGGCCCT  
 45 GTAGCAAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCAGCCCGGCGGAGCGGGGCGGGT  
 GAGTCACCCACACAAAGGAAGAGGGCCTTGCCCTCGCCGGCCGCTGCTTCCTGT  
 50 GACCCCGTGGTGTACCGGCCCACTTCAGTCACCCCGGGCGCTCTTTCGGAGCAC  
 CGCTGGCCTCCGCTGGGGGAGGGGATCTGTCTAATGGCGTTGGAGTTTGCTCACA  
 TTTGGTGGGTGGAGACTGTAGCCAGGCCAGCCTGGCCATGGAAGTAATTCTTGGA  
 55 ATTTGCCATTTTGAGTTTGGAGCGAAGCTGATTGACAAAGCTGCTTAGCCGTTC  
 AAAGGTATTCCTCGAACTTTTTTTTTTAAGGTGTTGTGAAAACCACCG

60 Para generar el plásmido donante, la repetición terminal (TR) 5' del mutante T53C/C136T de 313 pb y la TR 3' de 235 pb (como se describe en Lacoste *más arriba*) se sintetizó según diseño y se clonó hacia los extremos 5' y 3', respectivamente, del siguiente casete de expresión: eHLA-G, un aislador de núcleo de  $\beta$ -globina HS4 de pollo de 250 pb (Recillas-Targa y otros (2002), PNAS USA, 99:6883-6888), EGFP, y pA. HS4 se usó para prevenir la propagación de la cromatina represiva en el constructo integrado. La expresión de EGFP fue dirigida por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) (ver Figura 1A). La secuencia del elemento HS4 se muestra más abajo como la SEC ID NO:7.

(SEQ ID NO:7) una modalidad del elemento HSF

5 GAGCTCACGGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCT  
 CCCCCGCTAGGGGGCAGCAGCGAGCCGCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCT  
 CCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGG  
 10 TGGCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGAC  
 ACCTGGGGGATACGGGGAAAAAGCTT

15 El vector vacío del plásmido donante (HLA-G<sup>-</sup>) fue idéntico al plásmido donante de eHLA-G, excepto que se excluye el constructo eHLA-G (Figura 1B). Antes de la transferencia de genes, las hESC se trataron durante 1 hora con Y-27632 10 μM, un inhibidor de ROCK que ha demostrado disminuir sustancialmente la apoptosis inducida por disociación y aumenta la eficiencia de clonación (Watanabe y otros (2007), Nat Biotechnol, 25:681-686. Las hESC se disociaron en tripsina-EDTA 0,25 % a 37 °C durante cinco minutos, se lavaron en medio mTeSR acondicionado más Y-27632 y se suspendieron en la solución de nucleofección L (Amaya). Se añadieron 3 μg de plásmidos auxiliares y 6 μg del donante de transposón por 1,5 x 10<sup>5</sup> células, y se realizó la nucleofección con los parámetros del programa B-016. Después las hESC se sembraron en CM más Y-27632 a 2 x 10<sup>5</sup> células por placa de 6 cm, para la selección clonal. Después de 24 horas, el medio de cultivo se cambió a CM solo, después y en lo adelante se cambió diariamente. Los clones con la expresión dual más alta de tdT/eHLA-G se seleccionaron mediante el uso de la microscopía de fluorescencia en vez de seleccionar mediante resistencia a antibióticos o citometría de flujo, ya que el silenciamiento de transgenes es frecuente en las hESC y solo una fracción de células transgénicas únicas da lugar a una línea celular marcada (Braam y otros (2008), Nat Methods, 5:389-392).

Ejemplo 4 Evaluación del Sistema de Suministro Génico ePiggyBac

30 La eficiencia de transfección de eHLA-G se determinó mediante la siembra de las células transfectadas en CM más Y-27632 a 2 x 10<sup>3</sup> células por placa de 6 cm durante 24 horas, después se hizo cambio de medio a CM solo. Después, el medio se cambió diariamente durante siete días, y las colonias se evaluaron mediante tinción de células vivas y microscopía de inmunofluorescencia, como se discute en el Ejemplo 5. Para cada clon, se contaron tres campos de alta potencia y se calculó el porcentaje de proteína reportera en las hESC <sup>+</sup>/eHLA-G<sup>+</sup>. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 3-4. El sitio de inserción de eHLA-G se determinó mediante el uso de una estrategia de rescate de plásmidos como se describe en Lacoste y otros *más arriba*. En resumen, se aisló ADN genómico de los clones de hESC transgénicos y se digirió con BamHI/BglII/NotI, se autoligó a baja concentración con ADN ligasa T4 durante toda la noche a 16 °C, se precipitó con isopropanol 100 % y se lavó con etanol 70 % antes de la transformación en DH10B *E. coli* y se seleccionó en ampicilina. El número de copias de eHLA-G se determinó mediante el uso de PCR SplinkTA. Se realizó el bandedo G estándar cada 20 pases en cultivo para evaluar la estabilidad del cariotipo. El eHLA-G y el gen silenciador de la proteína reportera se evaluaron cada 10 pases en cultivo mediante el uso de la citometría de flujo. Antes de la disociación y el análisis, las hESC se trataron durante una hora con Y-27632 10 μM. Después, las células se disociaron con tripsina-EDTA 0,25 % a 37 °C durante cinco minutos, se lavaron en CM más Y-27632, se suspendieron en PBS enfriado con hielo que contiene BSA al 0,1 % y EDTA 0,5 mM, y después se analizaron mediante el uso de un Citómetro de flujo II canto BD FACS (Becton Dickinson). Como se muestra en las Figuras 8 y 9, en el pase en cultivo 16, esencialmente no se observó silenciamiento de la expresión de EGFP o eHLA-G. Se evaluó la pluripotencia cada 20 pases en cultivo mediante la detección inmunocitoquímica de lo siguiente: 1) marcadores de pluripotencia Oct3/4, SSEA-4, Sox2 y Nanog (Figuras 5 y 6), 2) proteína reportera <sup>+</sup>/eHLA-G<sup>+</sup> formación de cuerpos embrioides (Figura 7), y 3) el marcador endodérmico Gata 6, el marcador mesodérmico actina de músculo, y el marcador ectodérmico de la cadena pesada de neurofilamento en células hESC transgénicas diferenciadas (datos no mostrados), todos mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Leica CTR6500. Todos los anticuerpos fueron de Abcam a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Ejemplo 5 Localización en la superficie celular de eHLA-G y otras proteínas HLA

55 La tinción de células vivas se usó para detectar la expresión de las moléculas de superficie HLA clase Ia, HLA-E, eHLA-G, y HLA clase II en células hESC y hEPP transgénicas versus de tipo silvestre. En resumen, las células se recolectaron y se lavaron en PBS frío, se tiñeron con el correspondiente 1° AcM en PBS que contiene suero de cabra 10 % y BSA 3 % durante 60 minutos a 4 °C, se lavaron, se fijaron con paraformaldehído 1 % durante 10 minutos, y posteriormente se tiñeron con una IgG anti-ratón inducida en cabra conjugada con FITC durante 30 minutos a 4 °C. Las alícuotas de control se tiñeron con una IgG de isotipo afin para evaluar la unión no específica a las células diana. Cada anticuerpo (MEMG/9 para HLA-G, MEM-E/08 para HLA-E, Bu8 para HLA clase Ia, y HKB1 (Abbiotec, San Diego, CA) para HLA clase II) se evaluó por primera vez a varias diluciones con el propósito de determinar las condiciones óptimas para lograr solamente la unión específica. Después de la tinción, las células se expandieron en un portaobjetos de vidrio, se dejaron secar al aire y después se montaron con medio anti-desvanecimiento que contiene DAPI (Vector Laboratories). Los portaobjetos se observaron inmediatamente bajo un microscopio de fluorescencia Leica CTR6500. Como se muestra en las Figuras 5 y 10, la expresión de HLA-A,B,C; HLA-E, HLA-DP, DQ, DR, y β-microglobulina fueron similares en células de tipo silvestre

y en las células ES humanas eHLA-G modificadas, mientras que se observó un nivel aproximadamente siete veces mayor de expresión de HLA-G en las células ES humanas eHLA-G modificadas.

#### Ejemplo 6 Evaluación de la Expresión de eHLA-G en la Citotoxicidad Inducida por Células NK-92

Las células hESC que expresan eHLA-G se cultivaron y se diferenciaron en hEEP como se describió en el Ejemplo 2. Las células NK-92 (CRL-2407, Colección Americana de Tipos de Cultivos, Manassas, VA) se cultivaron en el Medio Alfa del Medio Esencial Mínimo (a-MEM, Invitrogen) suplementado con FBS 12,5 %, suero de caballo 12,5 %, inositol 0,2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, ácido fólico 0,02 mM e IL-2 recombinante 100 IU/mL (Sigma) a 37 °C en una incubadora humidificada al 5 % de CO<sub>2</sub>.

La citotoxicidad se realizó mediante el uso de un kit de Ensayo de Citotoxicidad No Radiactiva CytoTox96 (Promega, Madison, WI) como se indica en el protocolo. En resumen, las células efectoras se mezclaron con  $5 \times 10^3$  células diana a diversas relaciones de células E:T, NK-92 (Efector o "E") con respecto a hESC o hEEP (diana o "T") en placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, MA). Después de 4 horas a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> 5 %, se recolectaron 50  $\mu$ l del sobrenadante para determinar la liberación de LDH. La liberación espontánea y la liberación máxima de LDH de la células diana y la liberación espontánea de LDH de la células efectoras se determinaron mediante la incubación de estas células en medio solo. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como porcentajes del % de lisis. El porcentaje de lisis específica se determinó de la siguiente manera: (liberación experimental - liberación espontánea del efector - liberación espontánea de la diana / liberación máxima de la diana - liberación espontánea de la diana)  $\times$  100. En todos los experimentos, la liberación espontánea fue <10 % de la liberación máxima.

Como se muestra en la Figura 11, en una relación E:T de 1:10, la destrucción de las hESC que expresan eHLA-G disminuyó en más del 50 % en relación con las células de tipo silvestre que expresan GFP solo. A una E:T de 1:30, la destrucción de las hESC que expresan eHLA-G disminuyó en aproximadamente un 75 %. Las hESC de tipo silvestre se destruyen a una tasa razonable como se muestra para ambas relaciones E:T (GFP solo). Además, se demostró que la expresión del alelo HLA-G UTR 3' (Del 14 pb) en células K562 resulta en la disminución de la citotoxicidad inducida por células NK en relación con la observada en células K562 que expresan el alelo HLA-G (Ins 14bp), así como también en células K562 no modificadas. Ver la Figura 13.

Los resultados de la Figura 11 se repitieron y se confirmaron en experimentos adicionales de citotoxicidad de NK. Como se muestra en la Figura 18, la destrucción de las hESC eHLA-G (EF-1 $\alpha$ )-GFP disminuyó en más del 100 % en comparación con las hESC de control que contienen solo un transgén GFP (sin transgén HLA-G). Estos datos muestran que la expresión del transgén HLA-G imparte características inmunosupresoras y/o inmunogenicidad disminuida en las hESC.

Además, se realizaron experimentos de citotoxicidad de NK en las hEEP diferenciadas a partir de las hESC. Como se muestra en la Figura 19, la destrucción de las hEEP eHLA(EF-1 $\alpha$ )-GFP diferenciadas a partir de las hESC eHLA(EF-1 $\alpha$ )-GFP disminuyó bastante más del 100 % (aproximadamente 3 veces) en comparación con las hEEP de control. Estos datos muestran que el transgén eHLA(EF-1 $\alpha$ )-GFP es estable y persistente durante todo el proceso de diferenciación, y que la expresión de HLA-G es capaz de impartir características inmunosupresoras y/o inmunogenicidad disminuida en células diferenciadas.

#### Ejemplo 7 Determinación de la Inmunogenicidad de las Células e-HLA-G<sup>+</sup> *In Vivo* mediante Aloinjertos en Ratones Humanizados

Recientemente se demostró que un modelo de ratón humanizado con linfocitos de sangre periférica humana (Hu-PBL-NSG), pero no ratones NSG inmunodeficientes de tipo silvestre, rechazó islotes no coincidentes dentro de 1-2 semanas después del trasplante (King y otros (2008), Clin Immunol, 126:303-314). Aunque la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) se establece en 4-5 semanas, la supervivencia del injerto se controla hasta que se cumplen los criterios de eutanasia. La presencia de solo niveles más bajos de GVHD nos permite ampliar nuestra ventana de observación. Se adquirieron los ratones NSG (hembras a las seis semanas de edad) de Jackson Laboratory y se manipularon de acuerdo con las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales y las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Instituto de Animales de Laboratorio Recursos, Consejo Nacional de Investigación, Academia Nacional de Ciencias). Se generaron ratones NSG humanizados funcionales mediante la inyección intravenosa de aproximadamente  $20 \times 10^6$  PBMC humanos en los ratones NSG de acuerdo con (Pearson y (2008), Curr Protoc Immunol, Ch. 15 :Unit15.21; y King y otros más arriba). El injerto se verificó a las cuatro semanas aproximadamente mediante la recolección de la sangre del plexo venoso retroorbital de ratones anestesiados mediante el uso de tubos capilares recubiertos con EDTA (Drummond Scientific) y tubos de 1,5 mL tratados con EDTA (Eppendorf). Después se procesaron células para determinar la positividad de CD45 humana mediante análisis por FACS de acuerdo con King y otros más arriba. Los niveles de células CD45<sup>+</sup> que alcanzan un 0,1 % en la sangre a las cuatro semanas se consideran un injerto exitoso y permiten estudios de rechazo al trasplante alogénico.

Los sistemas de cultivo hESC y hEEP que se usan típicamente exponen las células a derivados animales inmunogénicos tales como el ácido siálico Neu5Gc (Martin y otros (2005), Nat Med, 11:228-232). Por lo tanto, puede agregarse un paso de descontaminación que recientemente se demostró que disminuye significativamente los niveles de Neu5Gc (Heiskanen y otros (2007), Stem Cells, 25:197-202). Las hESC pueden descontaminarse de Neu5Gc mediante el uso de dos enfoques:

1) cultivar en medio TeSR1 suplementado con bFGF, LiCl, GABA y ácido piperídico en placas recubiertas con matriz humana de acuerdo con el método de Ludwig y otros (2006), *Nat Biotechnol*, 24:185-187, y 2) reemplazo de KSR mediante un suero humano inactivado por calor del grupo sanguíneo AB Rh<sup>-</sup> (Heiskanen y otros (2007), *Stem Cells*, 25:197-202. Las hESC cultivadas bajo ambos métodos pueden evaluarse mediante incubación con AcM anti-Neu5Gc y analizarse mediante citometría de flujo. El segundo enfoque puede adoptarse, ya que el método de Ludwig y otros puede requerir la adaptación de las hESC. Las hEEP se cultivan en DFSM que carece de derivados animales por su fabricante.

El objetivo de realizar aloinjertos con células HLA-G modificadas es evaluar si la expresión de HLA-G disminuye la inmunogenicidad según lo indicado por un aumento en el tamaño del tumor. Antes del trasplante, se afeitó el sitio de inyección para facilitar la observación clínica. Se siguieron en todo momento las pautas para el manejo y cuidado de los animales, que incluyen el uso apropiado de anestesia. Se suspendieron 5 x 10<sup>6</sup> hESC transgénicas eHLA-G<sup>+</sup> y HLA-G<sup>-</sup> en 100 µl de los medios apropiados que contienen tinta india para marcar el sitio de inyección. Esto facilita la evaluación histológica si se observa una fluorescencia insuficiente. Se inyectaron células por vía subcutánea en la almohadilla de grasa mamaria torácica de cinco ratones Hu-PBL-NSG de 3 meses de edad. Los resultados esos aloinjertos se muestran en las Figuras 20 y 21. Las hESC "G0" son las hESC control que no contienen un transgén eHLA-G, sino solo el GFP. "mG1(#1)" y "mG1(#2)" se refieren a dos clones diferentes de hESC eHLA-G(EF-1α)-GFP nucleofectados. Los tumores G0, mG1(#1), y mG1(#2), como se muestran en la Figura 20, se midieron y pesaron. Las hESC G0 formaron un tumor con un volumen de 126,9 milímetros cúbicos y un peso de 32 miligramos. Las hESC mG1(#1) formaron un tumor con un volumen de 748,4 milímetros cúbicos y un peso de 318 miligramos. Las hESC mG1(#2) formaron un tumor con un volumen de 1116,7 milímetros cúbicos y un peso de 675 miligramos.

La Figura 21 muestra los resultados promediados de tumores de aloinjertos de hESC en cinco ratones NSG humanizados. Los datos muestran que las hESC HLA-G ("mG1") nucleofectadas formaron tumores mucho más grandes (más de 3 veces por volumen) y más pesados (más de 2 veces por peso) que las hESC de tipo silvestre ("G0") trasplantadas en ratones NSG humanizados. Por lo tanto, los datos indican que la expresión del transgén eHLA-G puede proporcionar inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión aumentada. Esto sustenta la aplicación general de los constructos del transgén eHLA-G descritas en la presente descripción para modificar cualquier tipo de célula conveniente en un donante alogénico superior o universal para terapia, trasplantes, reparación de tejidos, sustitutos de células y tejidos, y similares.

Los experimentos de aloinjerto descritos anteriormente con ratones NSG humanizados pueden realizarse con cualquier tipo de célula eHLA-G modificada que prolifera activamente o puede inducirse a proliferar.

Además, los aloinjertos en ratones humanizados pueden monitorearse mediante el uso de un Sistema de Imágenes In Vivo Spectrum (Caliper, Mountain View, CA) con un filtro de emisión de 620 nm y un tiempo de exposición de 2,5 segundos. A una longitud de onda de 620 nm o más, la autofluorescencia experimentada con GFP se elimina y la señal puede detectarse a una profundidad de 2,5 cm debajo de la superficie de la piel (Shaner y otros (2004), *Nat Biotechnol*, 22:1567-1572). A los ratones se les toman imágenes longitudinalmente y se pesan semanalmente. Si no se observa ninguna señal durante el período de cuatro semanas, los ratones se sacrifican y la almohadilla de grasa mamaria torácica inyectada se evalúa histológicamente mediante el uso de la microscopía de fluorescencia para detectar la proteína reportera fluorescente utilizada. En todos los casos, después de sacrificar los ratones, el tejido se tiñe con hematoxilina y eosina para evaluar la formación de teratoma y el rechazo inmunitario. La inmunohistoquímica se realiza, además, para detectar la microglobulina β2 humana (PBMC, hESC, hEEP) y CD45 (PBMC), y esta última sirve como medida complementaria de la infiltración de células inmunitarias del aloinjerto. Los portaobjetos se leen por un patólogo experto cegado con respecto a las condiciones experimentales.

#### Ejemplo 8 Evaluación de la tumorigenicidad de las hEEP eHLA-G<sup>+</sup>- y HLA-G<sup>-</sup>

El impacto de la influencia de eHLA-G en la tumorigenicidad de hEEP se evaluó mediante la inyección de hEEP transgénica G<sup>+</sup> y hEEP no transgénica G<sup>-</sup> mediante el uso de un protocolo similar al descrito en el Ejemplo 8, excepto que las células se trasplantan a ratones NSG no humanizados. Un total de 14 ratones se monitorizan mediante el uso de imágenes longitudinales fluorescentes de animales vivos y la evaluación del peso mensualmente durante los primeros nueve meses o hasta que cumplan con los criterios de eutanasia. Después, los ratones se sacrifican y se colecta la glándula mamaria torácica inyectada en paraformaldehído tamponado neutro al 4 %. El tejido fijado se transfiere a etanol al 70 % y se embebe en parafina. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina y se procesan para la microscopía de proteína reportera fluorescente. Si se encuentra que las secciones de tejido son negativas para la proteína reportera, se teñirán mediante el uso de AcM específicos para la microglobulina β2 humana y CD45, y esta última servirá para garantizar la presencia de células distintas de las PBMC en el lugar de la inyección.

Se asume la significación estadística de las medias independientes para valores de p <0,05. Las comparaciones de las medias de dos muestras se determinan mediante el uso de una prueba t de Student. Las comparaciones de tres o más medias se realizan mediante el uso de un análisis de varianza de una o dos vías, y la prueba post-hoc de Bonferroni. Todas las medidas de varianza se presentan como error estándar de la media. Se realiza una regresión lineal para comparar la relación entre los datos in vitro e in vivo para determinar si el primero tiene un valor predictivo hacia el rechazo del aloinjerto humano en el modelo de ratón Hu-PBL-NSG que se utiliza en este estudio. Por ejemplo, el aumento del porcentaje en la aloproliferación in vitro disminuirá contra el par coincidente de PBMC usado en la fase in vivo (el resultado es el nivel de fluorescencia de la proteína reportera a las cuatro semanas posteriores al trasplante). Un resultado exitoso

en la presente es un alto valor  $R^2$  y un coeficiente de pendiente negativo, lo que sugiere que la expresión de eHLA-G conduce a un aumento del injerto. Tal interpretación está supeditada a una alta correlación entre la expresión de eHLA-G y la positividad de la proteína reportera en los clones seleccionados para usar en los estudios in vitro e in vivo.

5 Ejemplo 9 Evaluación de la inmunosupresión e inmunogenicidad de eHLA-G transfectada establemente en fibroblastos completamente diferenciados

10 Los constructos del transgén eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP y control se transfectaron en fibroblastos dérmicos humanos recién nacidos (un tipo de célula que ya está completamente diferenciado) mediante el uso de la nucleofección. Las células fibroblastos dérmicos humanos recién nacidos (HFD) se adquirieron de la ATCC y se cultivaron en Medio Dulbecco Iscove Modificado (IMDM) (ATCC) suplementado con FBS 10 % y PS 1 % PS (Invitrogen). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 %, las células se cosecharon mediante la incubación con tripsina-EDTA 0,25 % (Invitrogen) durante 3 minutos a 37 °C. Se contaron 0,5x10<sup>6</sup> células, se centrifugaron y se suspendieron en solución de nucleofección de fibroblastos dérmicos humanos (Cat. Núm. VPD-1001, Lonza, Walkersville, MD). Los plásmidos auxiliares y de transposón se adicionaron a la suspensión celular, y la nucleofección se realizó con los parámetros del programa U-020 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Lonza). Después, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en humidificado a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después de 24 horas, las células transfectadas estables se seleccionaron con puromicina 1  $\mu$ g/mL (Sigma) 7 días. Las células estables positivas para GFP se mantuvieron en puromicina 500 ng/mL y la expresión de HLA-G y GFP se detectó mediante citometría de flujo. Los transfectantes estables se mantuvieron en cultivo para usar en ensayos de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en ensayos de citotoxicidad de NK-92 como se describió más abajo.

25 *Ensayos de proliferación de PBMC.* Los fibroblastos dérmicos humanos transfectados de manera estable con el transgén eHLA-G(EF-1 $\alpha$ )-GFP (células "HFD-m1-GFP") o con el constructo de control GFP-solo (células "HFD-G0-GFP") se evaluaron por su capacidad para inhibir la proliferación de PBMC. Las células HFD-G0-GFP y -mG1-GFP se inactivaron con Mitomicina C (10  $\mu$ g/mL durante 2,5 horas), se sembraron a 3,0x10<sup>3</sup> células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se les permitieron adherirse durante 24 horas. 1x10<sup>5</sup> PBMC en la presencia de PHA 6  $\mu$ g/mL se adicionaron en triplicado en las células HFD correspondientes. Se incluyeron células HFD-G0-GFP y -mG1-GFP solas para la corrección MTT-OD. (El "MTT" es un reactivo de sustrato de color amarillo pálido que es escindido por células vivas para producir un producto de formazán azul oscuro. Este proceso requiere mitocondrias activas, e incluso las células recién muertas no escinden cantidades significativas de MTT. Por lo tanto, el MTT proporciona un ensayo colorimétrico que puede usarse para ensayos de proliferación o citotoxicidad). Se incluyeron como control PBMC sin PHA y PBMC con PHA 6  $\mu$ g/mL. Los cocultivos se incubaron durante 3 días y se estimó la proliferación de PBMC con el uso del reactivo MTT mediante el uso de la siguiente fórmula: % de proliferación de PBMC = [(OD570 de HFD/PBMC/PHA - OD570 de HFD)/ (OD570 de PBMC/PHA)] x 10. Como se muestra en la Figura 22, el clon HFD-mG1-GFP "mG1-R1" suprimió la proliferación de PBMC en mayor proporción que los controles y que otros clones, lo que indica que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar inmunosupresión y/o inmunogenicidad disminuida para células diferenciadas, tales como los fibroblastos.

40 *Ensayos de citotoxicidad de NK-92.* Los ensayos se realizaron sustancialmente como se describió anteriormente. En resumen, 2,5x10<sup>3</sup> células diana (*es decir*, células HFD-m1-GFP o células HFD-G0-GFP) se incubaron con células NK-92 a una relación E:T 3:1, 10:1, 30:1 en medio CTL durante 7 horas. Se incluyeron células K562-WT como control positivo para la citotoxicidad de NK-92. La citotoxicidad se determinó con un kit de ensayo de citotoxicidad CytoTox96. El porcentaje de lisis específica se determinó de la siguiente manera: % de lisis específica = [(liberación de LDH experimental - liberación espontánea del efector - liberación espontánea de la diana)/ (liberación máxima de la diana - liberación espontánea de la diana)] x 100. Como se muestra en la Tabla 4 más abajo, los clones HFD-mG1-GFP "mG1-R1" y "mG1-#1" suprimieron la citotoxicidad de NK-92 en mayor proporción que los controles y que los otros clones, lo que indica que la expresión de HLA-G exógena puede proporcionar inmunosupresión y/o inmunogenicidad disminuida para células diferenciadas, tales como los fibroblastos.

50 Tabla 4: Citotoxicidad de NK-92 Contra las Células Diana HFD-G0 y HFD-G1

Células diana (2,5x10 <sup>3</sup> )	% de citotoxicidad		
	10.1	30.1	60,1 (E.T)
HFD-GO-2	0	0	15
HFD-mG1-#1	0	1	4
HFD-mG1#3	0	0	0
HFD-mG1-R1	0	1	4
HFD-mG1-R2	2	1	9
K562-WT	X	36	44

65

Reivindicaciones

1. Una célula de mamífero genéticamente modificada que tiene inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, en donde:
  - (i) la célula de mamífero modificada genéticamente comprende un ácido nucleico exógeno que comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-G que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y (b) una región no traducida (UTR) 3' que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3; y
  - (ii) la proteína HLA-G codificada se expresa por la célula de mamífero modificada genéticamente.
2. La célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde la proteína HLA-G se expresa durante al menos 7 semanas, al menos 20 semanas o durante al menos 50 semanas.
3. La célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además un promotor del Factor-1 alfa de Elongación (EF-1 $\alpha$ ), en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína HLA-G se une operativamente al promotor EF-1 $\alpha$ , opcionalmente en donde el promotor EF-1 $\alpha$  comprende la secuencia de la SEQ ID NO:6.
4. La célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde el HLA-G expresado está presente en la superficie celular de la célula de mamífero modificada genéticamente.
5. La célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde la célula de mamífero modificada es una célula humana, o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre, una célula progenitora, una célula que se obtiene por diferenciación in vitro de la célula madre o de la célula progenitora, una célula totalmente diferenciada, una célula progenitora epidérmica, una célula progenitora pancreática, una célula madre hematopoyética, un queratinocito, un fibroblasto, un hepatocito, una célula madre mesenquimatosa, un cardiomiocito, una célula madre neural, una neurona, o un astrocito, o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre humana embrionaria, una célula madre humana mesenquimatosa, o una célula progenitora epidérmica embrionaria humana, o en donde la célula modificada genéticamente es un fibroblasto dérmico humano.
6. La célula modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde la inmunogenicidad disminuida y/o la inmunosupresión mejorada de la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética se determina mediante, ya sea: (1) una disminución de la citotoxicidad inducida por NK-92 de la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, (2) una disminución de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica in vitro por la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética, y (3) un aumento en el tamaño y el peso del tumor formado por la célula modificada genéticamente en comparación con el mismo tipo de célula de mamífero sin dicha modificación genética en ratones NSG humanizados.
7. La célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico exógeno es un vector de expresión, opcionalmente en donde el vector de expresión de mamífero es un vector de transposón, u opcionalmente en donde el vector comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera.
8. Un tejido artificial que comprende la célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1.
9. Una composición de injerto de piel, reparación de la piel, o regeneración de la piel que comprende la célula de mamífero modificada genéticamente de conformidad con la reivindicación 1, en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre, una célula progenitora, una célula que se obtiene por diferenciación in vitro de la célula madre o de la célula progenitora, una célula totalmente diferenciada, una célula progenitora epidérmica, una célula progenitora pancreática, una célula madre hematopoyética, un queratinocito, un fibroblasto, un hepatocito, una célula madre mesenquimatosa, un cardiomiocito, una célula madre neural, una neurona, o un astrocito, o en donde la célula modificada genéticamente es una célula madre embrionaria humana, una célula madre mesenquimatosa humana, o una célula progenitora epidérmica embrionaria humana.
10. Un ácido nucleico aislado que comprende:
  - (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y
  - (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3 y que se une operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico.
11. Un vector de expresión de mamífero que comprende el ácido nucleico aislado de conformidad con la reivindicación 10 y un promotor unido operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico, en donde el promotor no está



silenciado en una célula madre o en una célula generada por diferenciación de la célula madre, opcionalmente en donde el promotor comprende la secuencia de ácido nucleico del promotor EF-1 $\alpha$  de hámster chino, u opcionalmente que comprende además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína reportera, u

5 opcionalmente en donde el vector de expresión de mamíferos es un vector de transposón.

12. El vector de expresión de mamíferos de conformidad con la reivindicación 11 en donde el promotor comprende la secuencia de ácido nucleico de un promotor elegido a partir de un grupo que incluye el promotor EF-1 $\alpha$  de hámster chino, el promotor EF-1 $\alpha$  humano, el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), la variante del promotor M-U3/R del virus de células madre murino (MSCV), el promotor de la  $\beta$ -actina humana, el promotor de la ubiquitina C, el promotor de la enolasa específica de neurona, el promotor de sinapsina, el promotor CamKII, el promotor HB9, el promotor del transportador de dopamina, el promotor de la proteína ácida fibrilar de la glía, el promotor de albúmina, el promotor de la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina, el promotor de neurogenina 3, el promotor de caja homeótica 1 páncreas-duodeno, el promotor de queratina 14, y el promotor de bestrofin 1.

13. El vector de expresión de mamíferos de conformidad con la reivindicación 12 en donde el promotor comprende la secuencia de ácido nucleico de un promotor elegido a partir de un grupo que incluye el promotor EF-1 $\alpha$  de hámster chino, el promotor EF-1 $\alpha$  humano, el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), la variante del promotor M-U3/R del virus de células madre murino (MSCV), el promotor de la  $\beta$ -actina humana, y el promotor de la ubiquitina C.

14. Una célula de mamífero modificada genéticamente que comprende el vector de expresión de mamíferos de conformidad con la reivindicación 11.

15. Una composición celular o tisular que comprende una población de células de mamíferos modificadas genéticamente de conformidad con la reivindicación 1 para usar en un método terapéutico de tratamiento mediante reparación o regeneración celular o tisular, en donde la composición celular o tisular es adecuada para inyectar, implantar, o injertar a un sujeto que lo necesite, en donde el sujeto tiene al menos una molécula clásica de HLA clase I o HLA clase II no coincidentes en comparación a la población de células de mamíferos modificadas genéticamente, y en donde la población de células de mamíferos modificadas genéticamente exhibe inmunogenicidad disminuida y/o inmunosupresión mejorada en comparación con las células del mismo tipo sin la modificación genética,

opcionalmente en donde la al menos una molécula clásica de HLA clase I o HLA clase II no coincidentes se selecciona a partir del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR, u

opcionalmente en donde el sujeto no tiene coincidencias con las células modificadas genéticamente con respecto a HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR, u

opcionalmente en donde la inmunogenicidad disminuida y/o la inmunosupresión mejorada se determinan mediante un ensayo de citotoxicidad de NK-92, un ensayo de crecimiento tumoral NSG humanizado y/o un ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica, u

opcionalmente en donde la población de células de mamíferos modificadas genéticamente comprende una población de fibroblastos dérmicos humanos, una población de progenitores epidérmicos humanos, una población de células madre embrionarias humanas, una población de células madre mesenquimatosas humanas o células madre humanas embrionarias modificadas genéticamente que se diferenciaron in vitro.



Figura 1

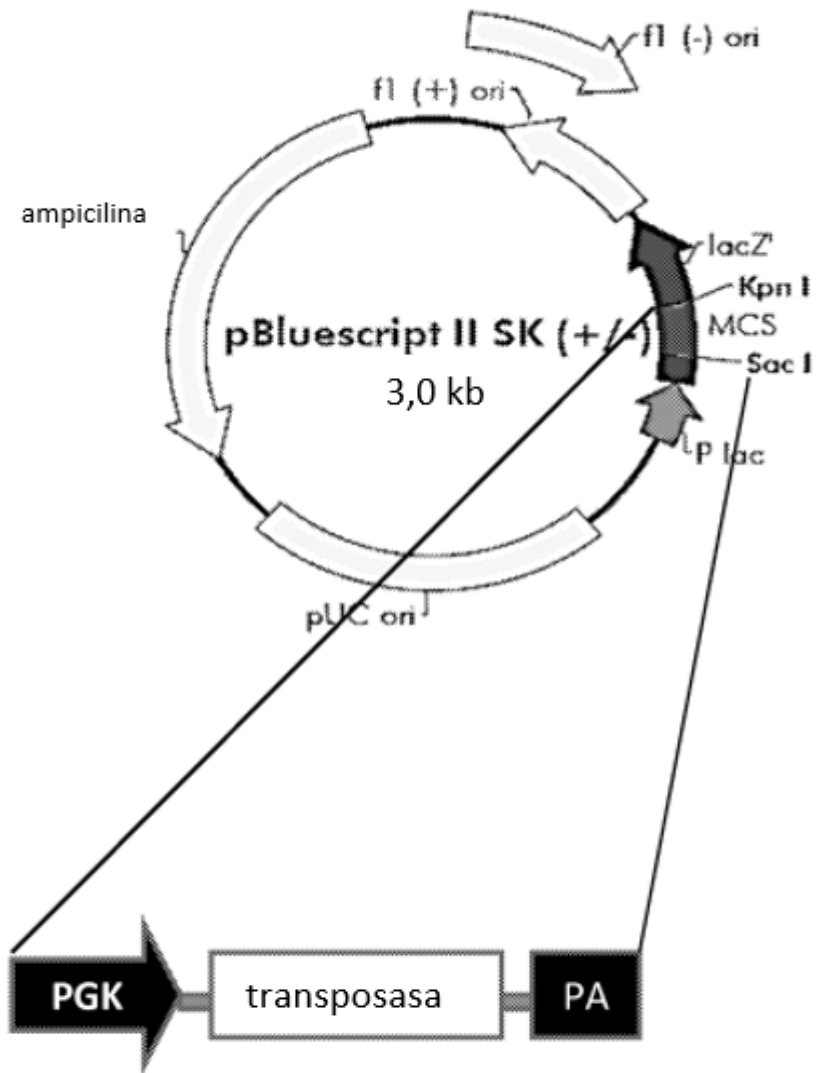


Figura 2

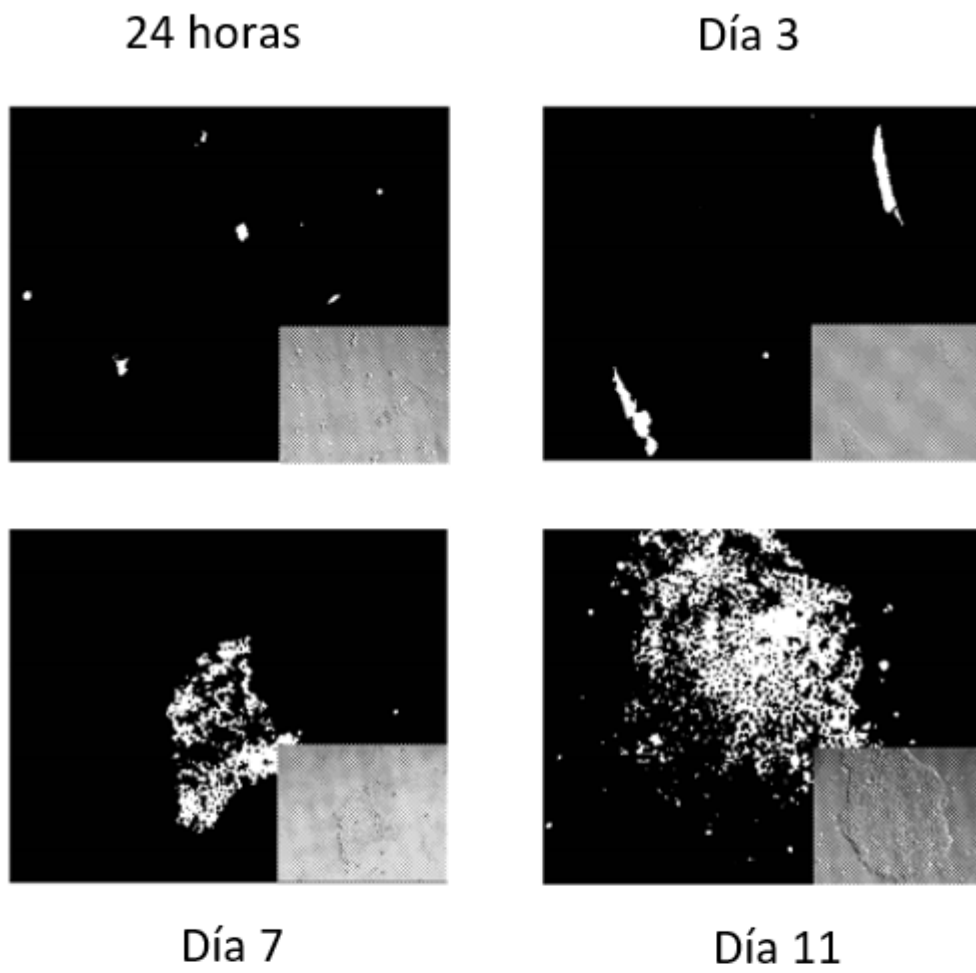


Figura 3

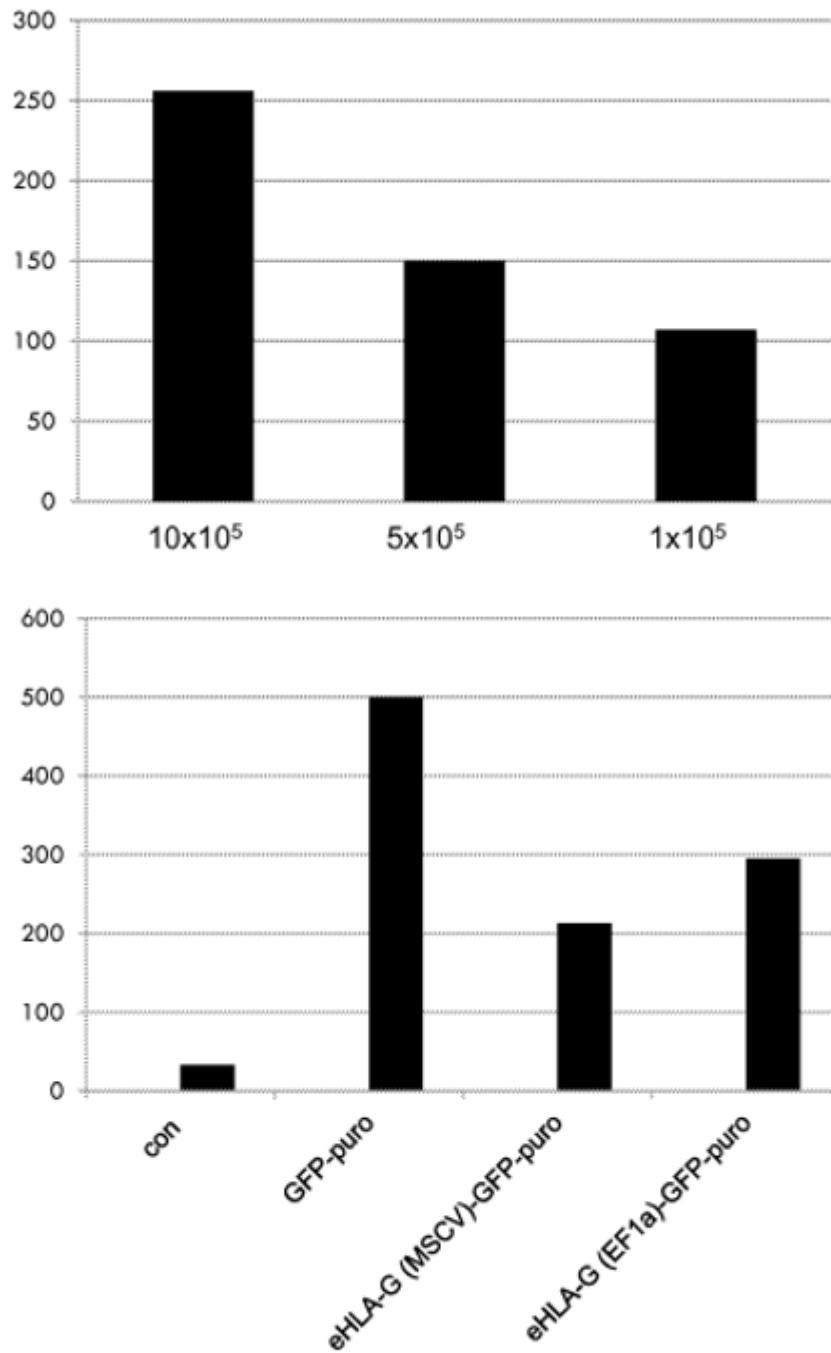
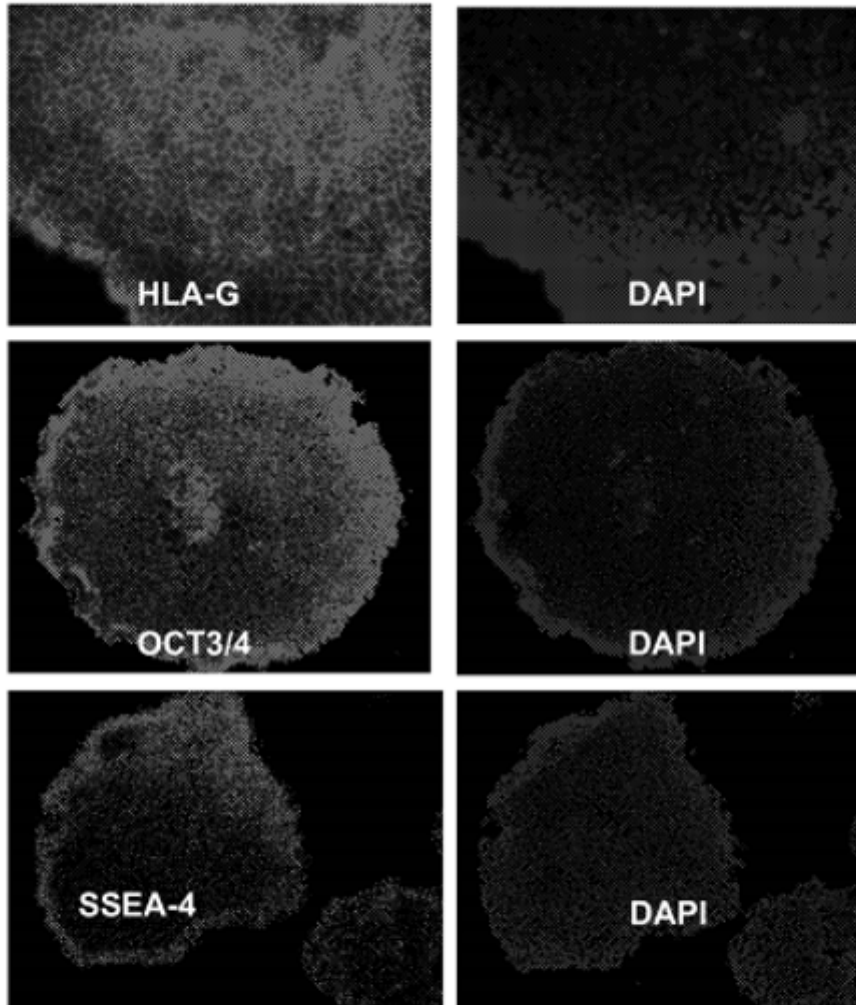


Figura 4



**hESC eHLA-G<sup>+</sup>**

Figura 5

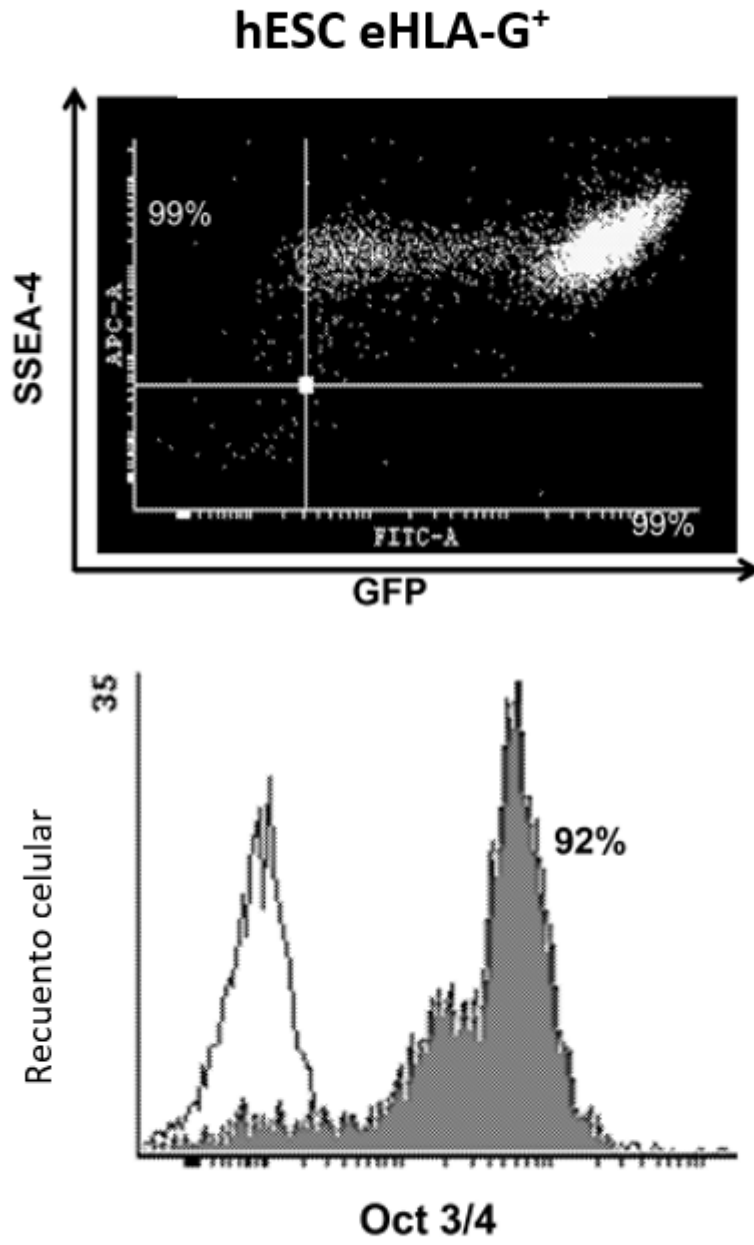


Figura 6

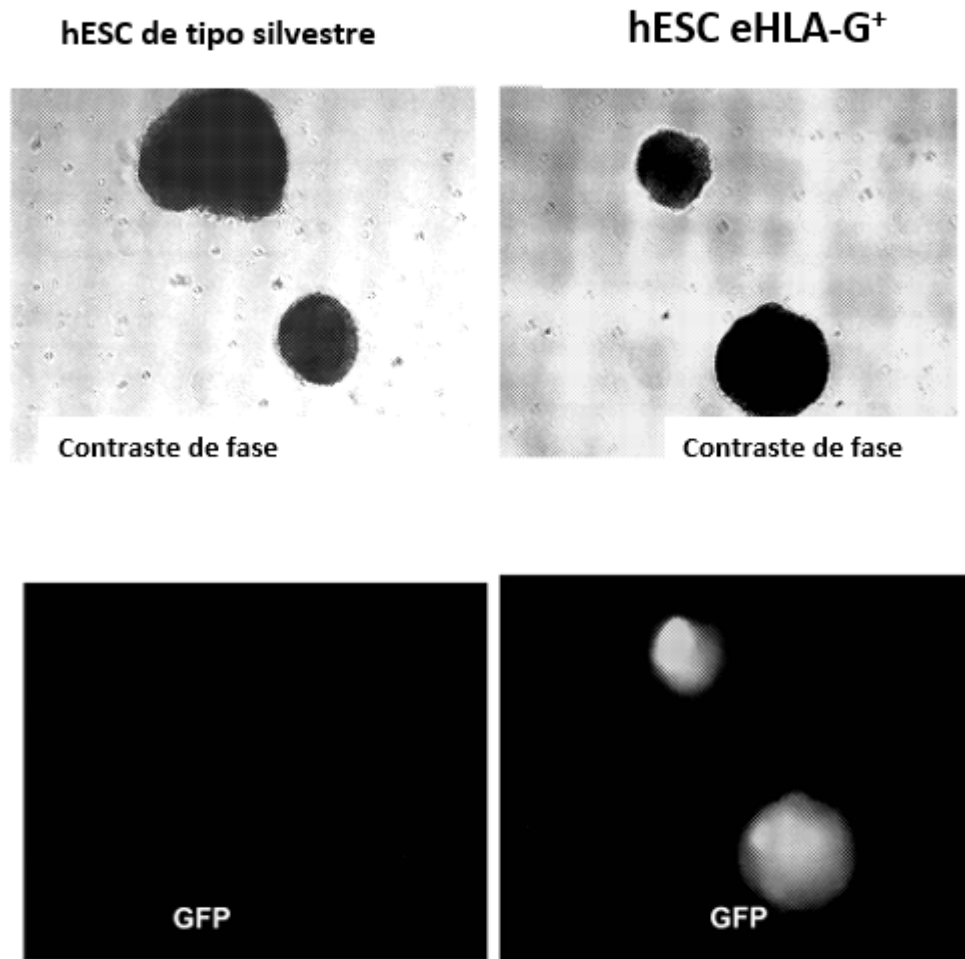


Figura 7



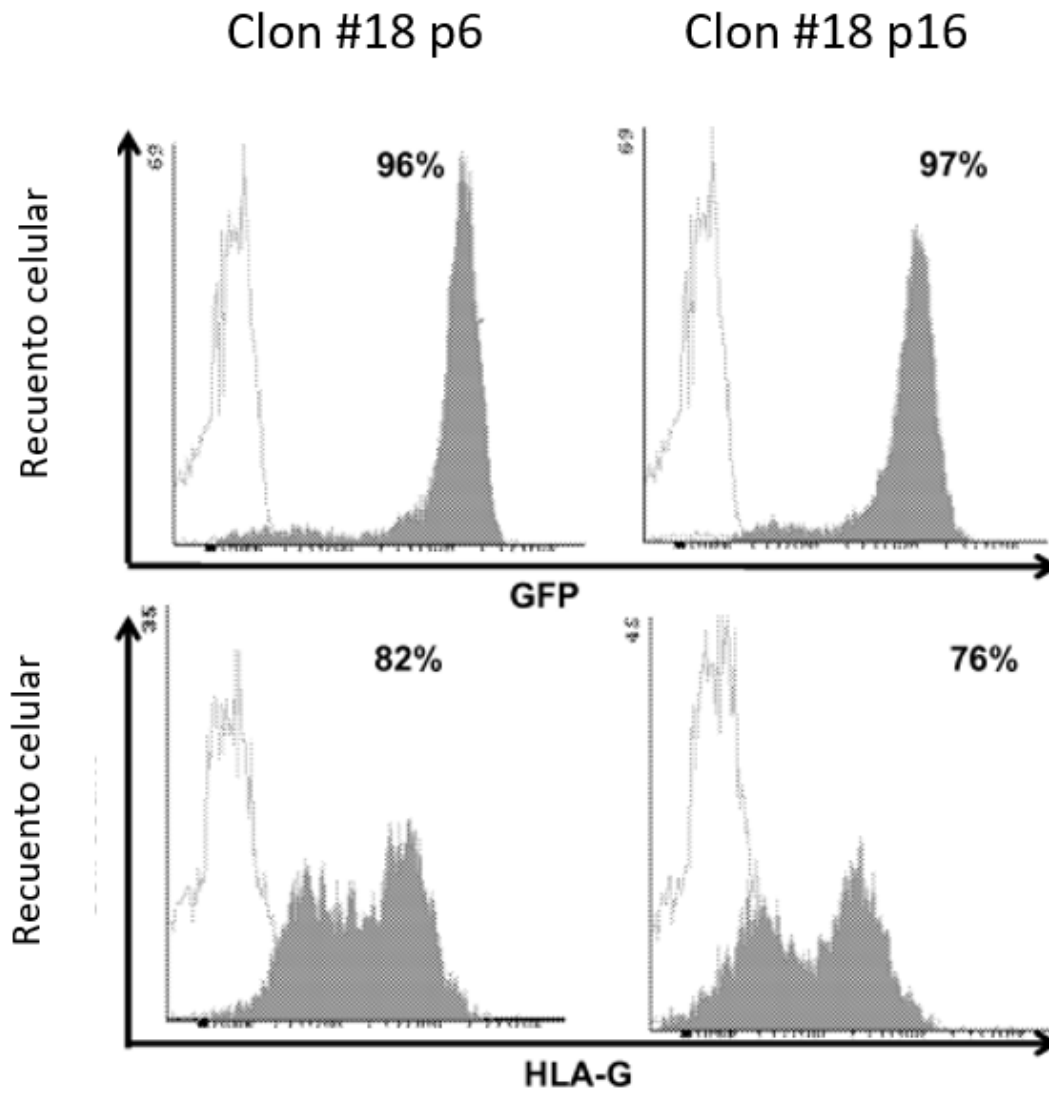


Figura 8

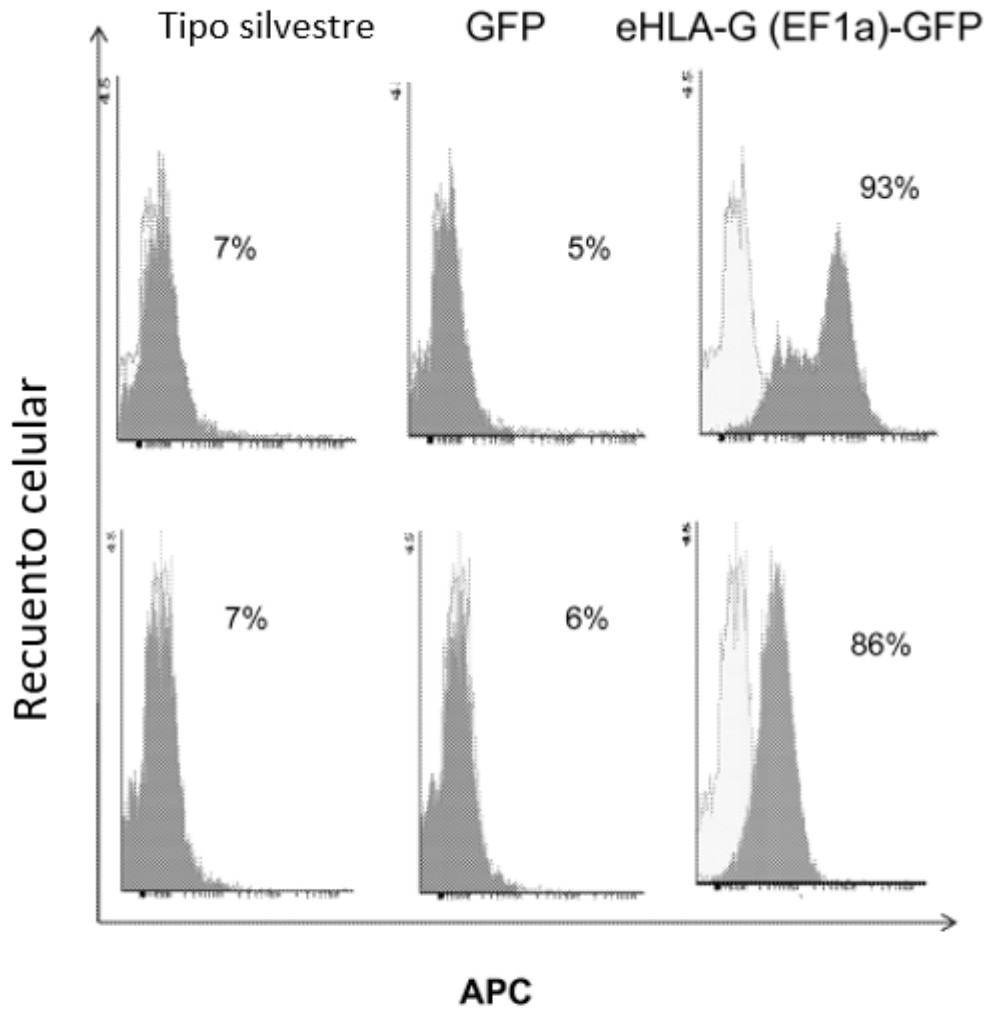


Figura 9A

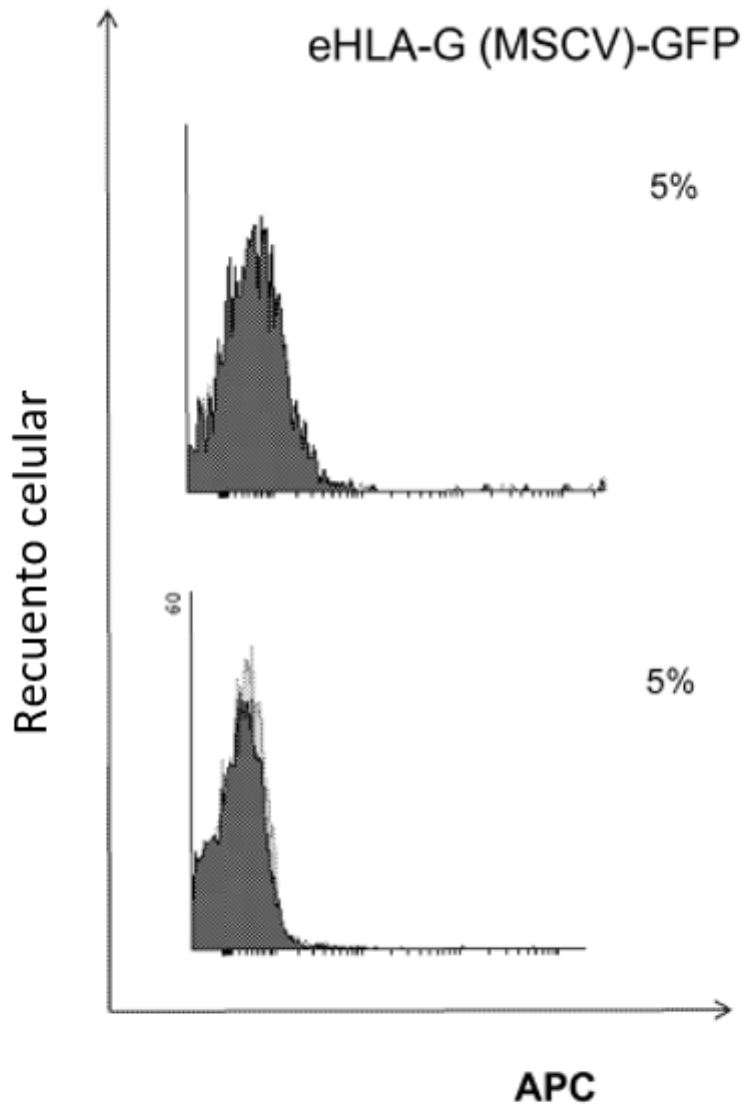


Figura 9B

Anticuerpo	Tipo silvestre		<b>eHLA-G-GFP</b>	
	% reactividad (media $\pm$ EEM)	Relación MFI (media $\pm$ EEM)	% reactividad (media $\pm$ EEM)	Relación MFI (media $\pm$ EEM)
<b>HLA-A,B,C</b>	98.3 $\pm$ 0.5	123.5 $\pm$ 9.1	98.3 $\pm$ 0.4	132.1 $\pm$ 9.2
<b>HLA-E</b>	2.4 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.1
<b>HLA-G</b>	8.0 $\pm$ 1.0	1.0 $\pm$ 0	<b>58.6<math>\pm</math>6.2</b>	<b>7.1<math>\pm</math>1.4</b>
<b>HLA-DP,DQ,DR</b>	29.7 $\pm$ 3.2	3.7 $\pm$ 0.9	29.3 $\pm$ 1.9	3.6 $\pm$ 0.2
<b><math>\beta</math>2M</b>	99	364	99.0 $\pm$ 0	357 $\pm$ 51

Figura 10

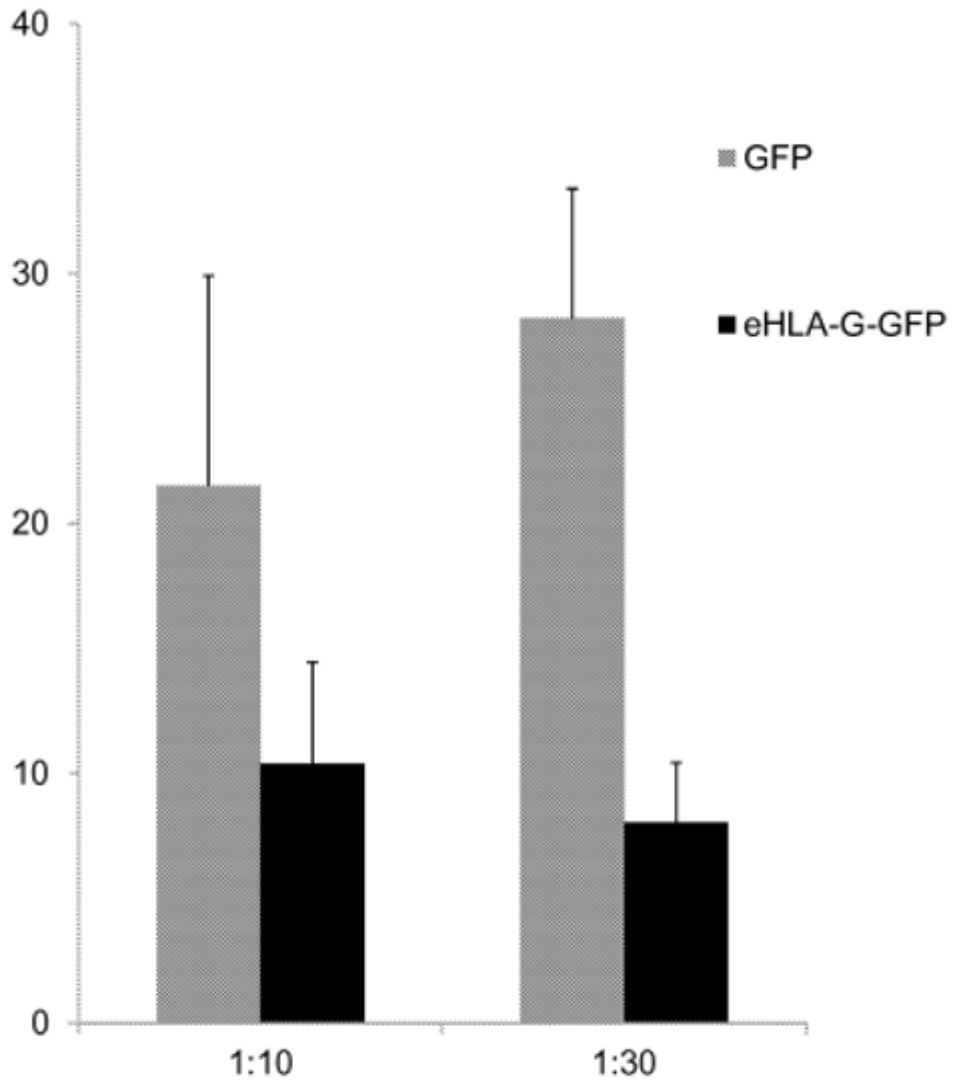


Figura 11

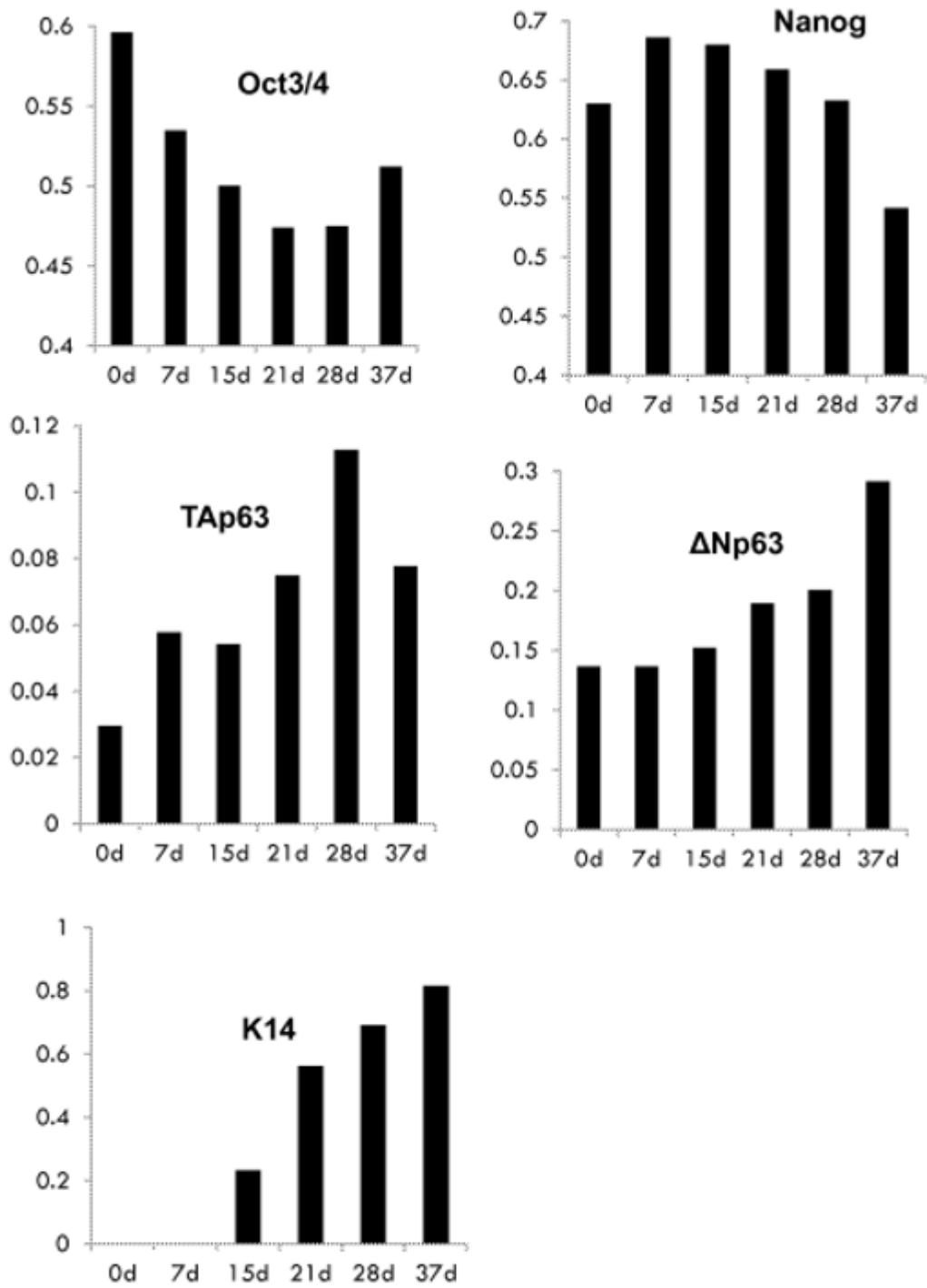


Figura 12

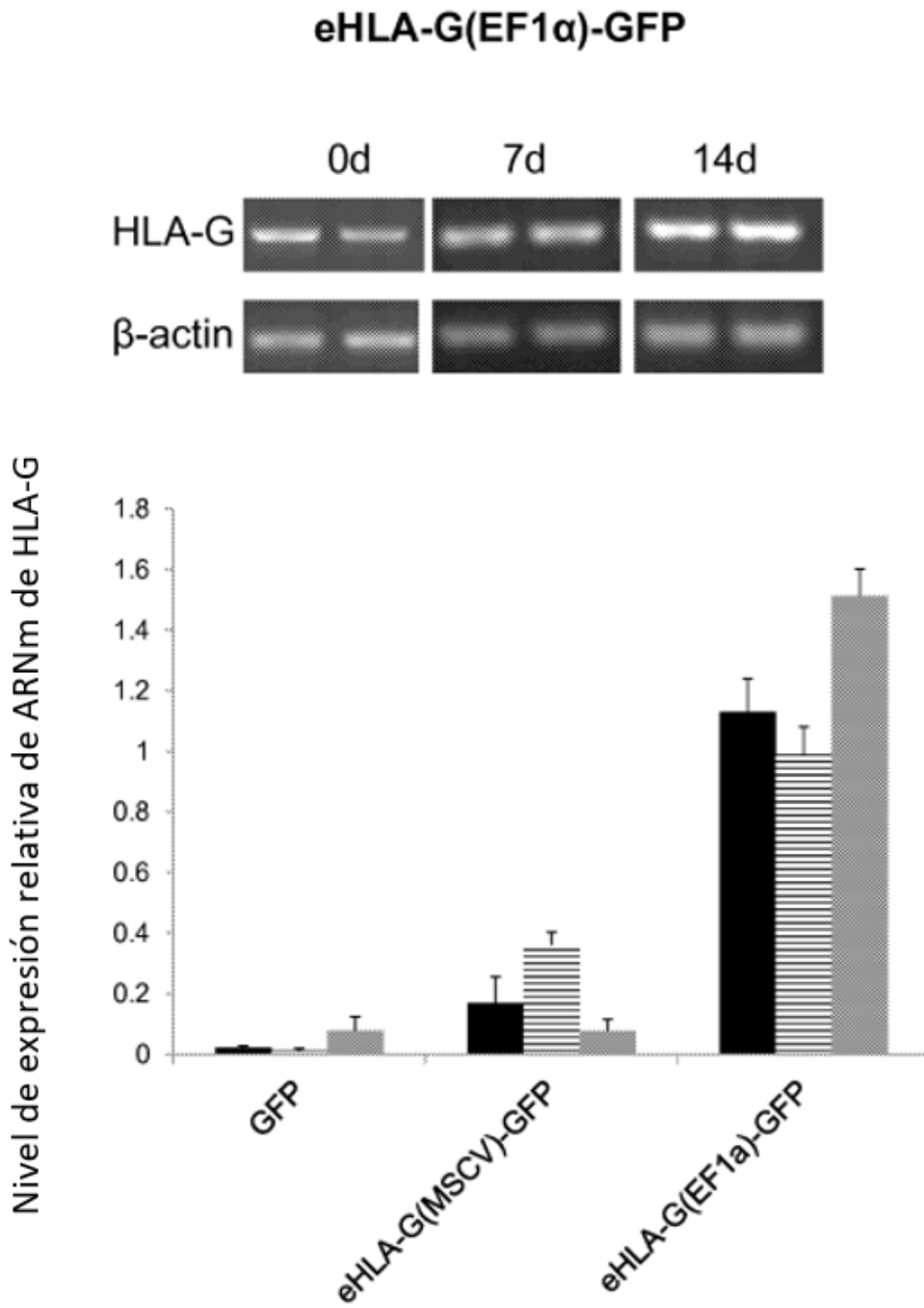


Figura 13

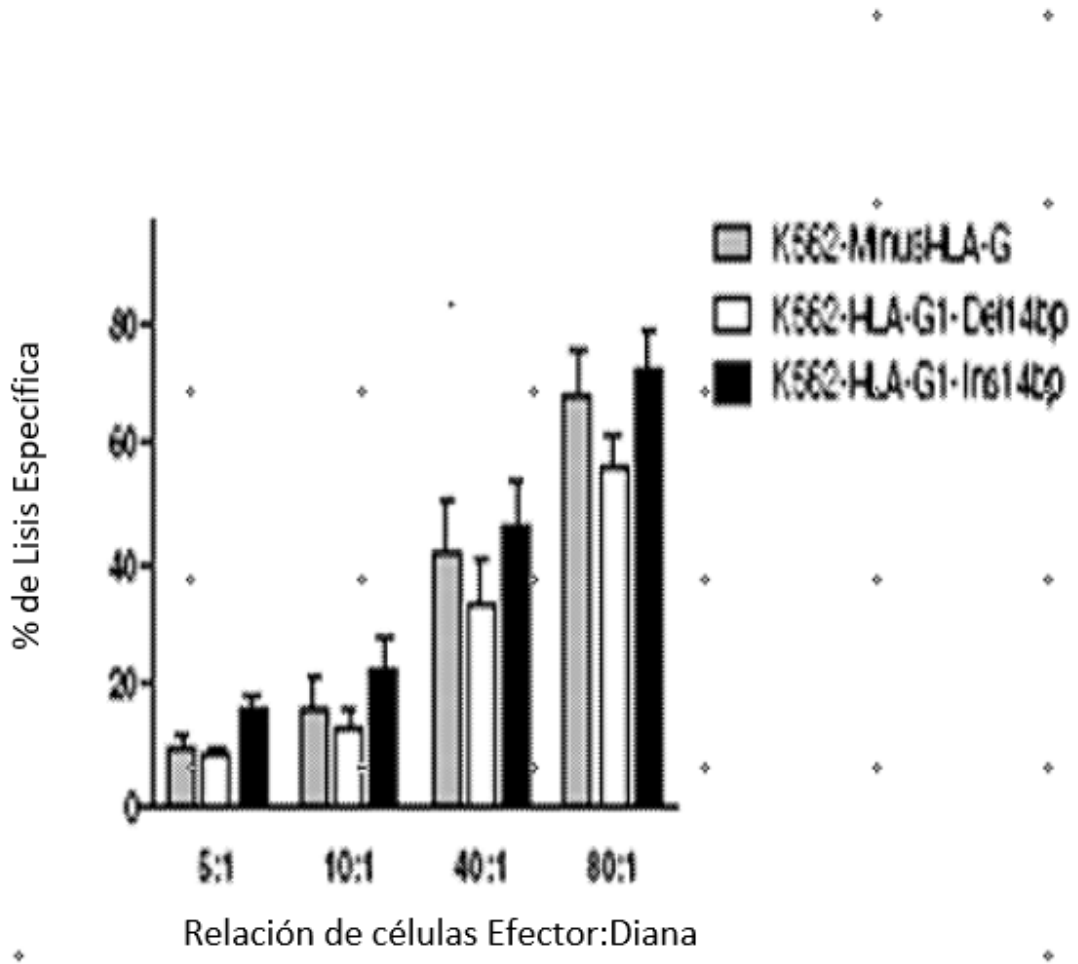


Figura 14



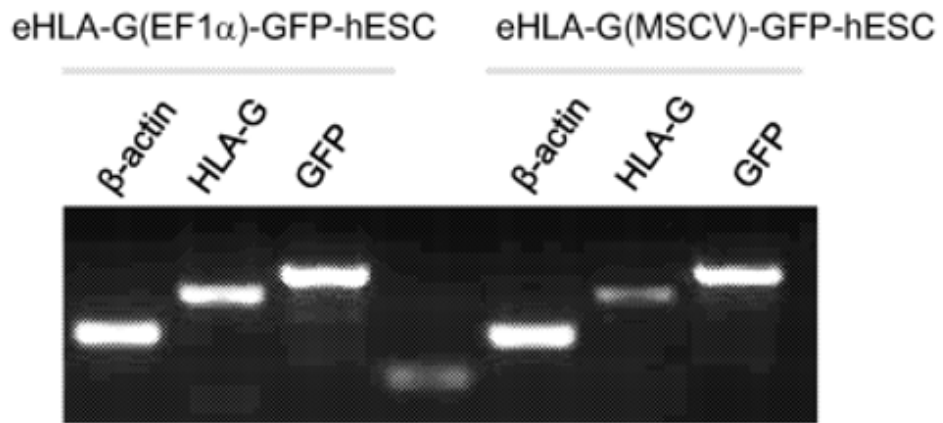


Figura 15

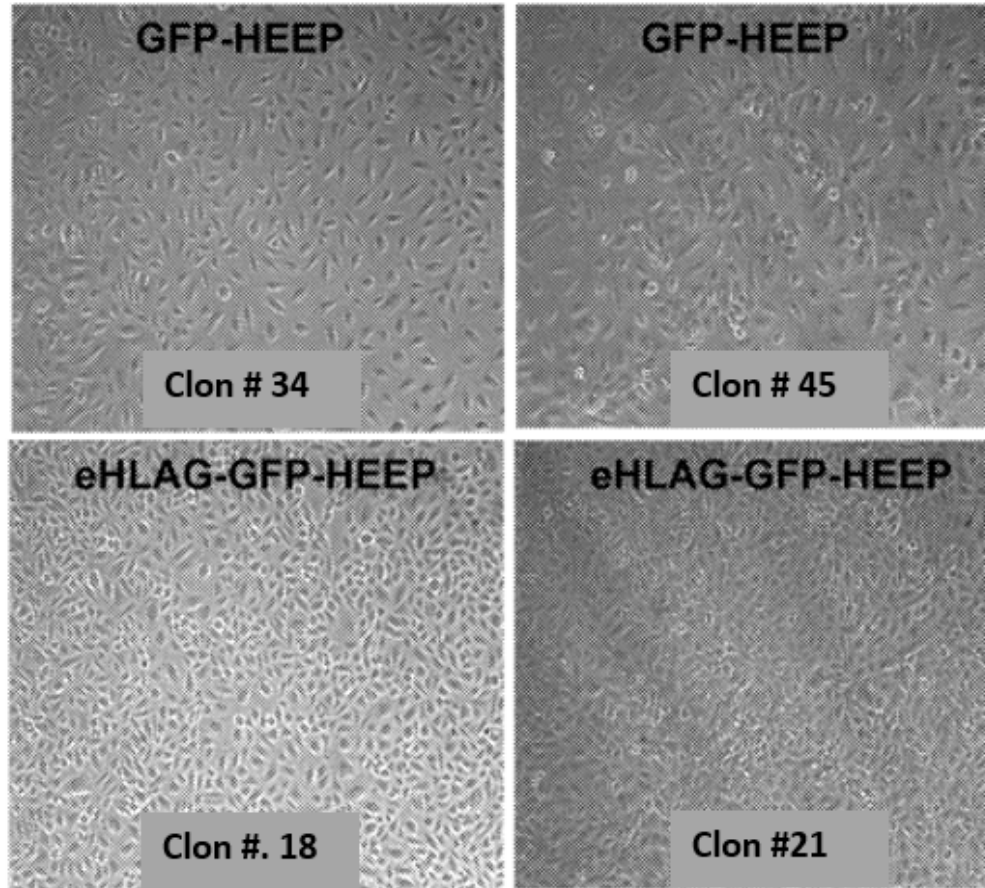


Figura 16

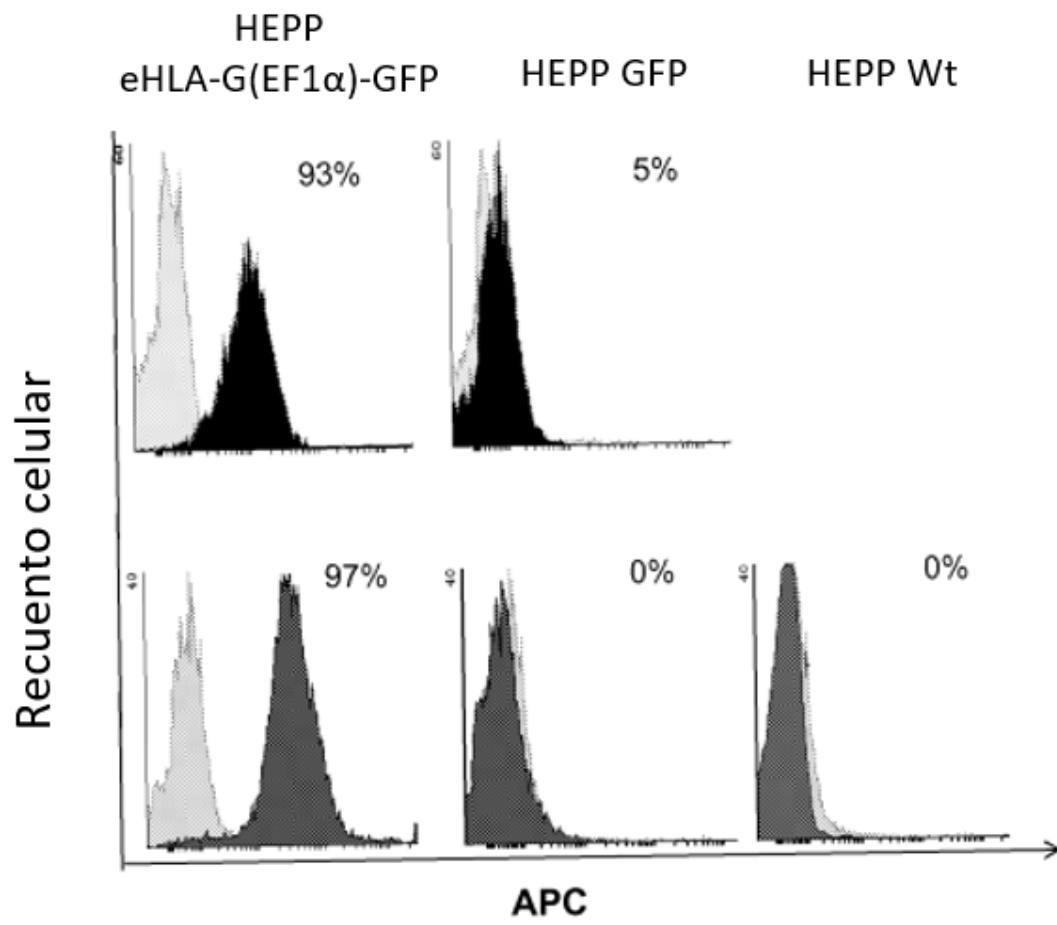


Figura 17

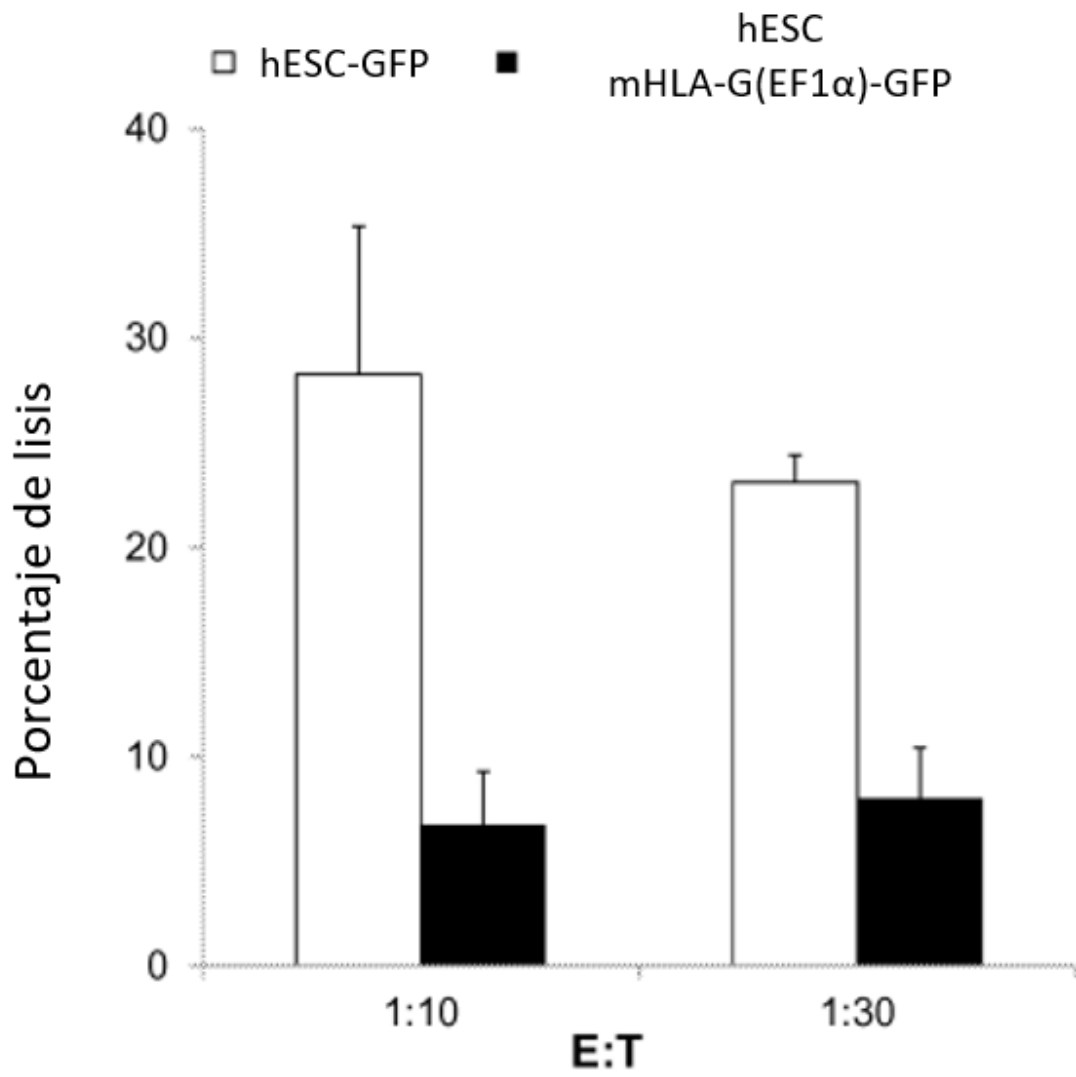


Figura 18

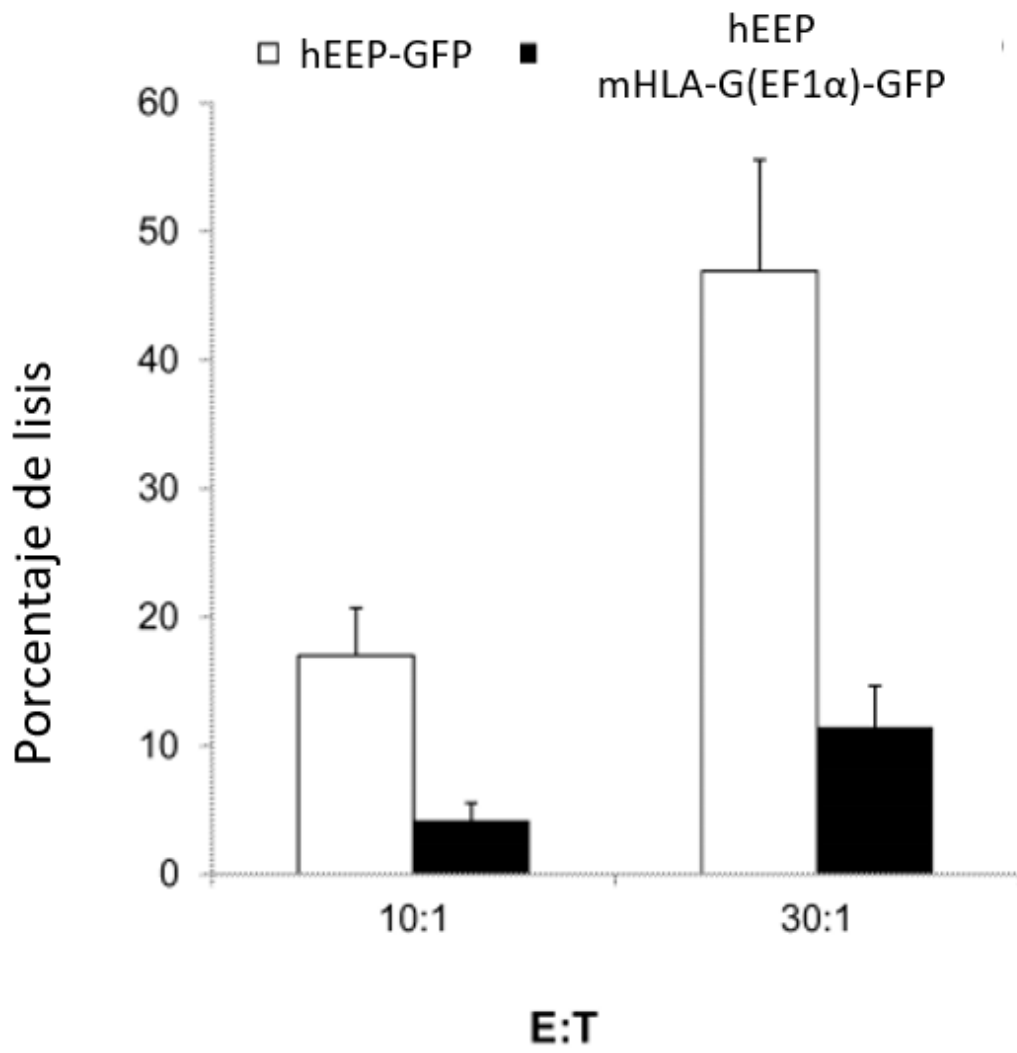


Figura 19

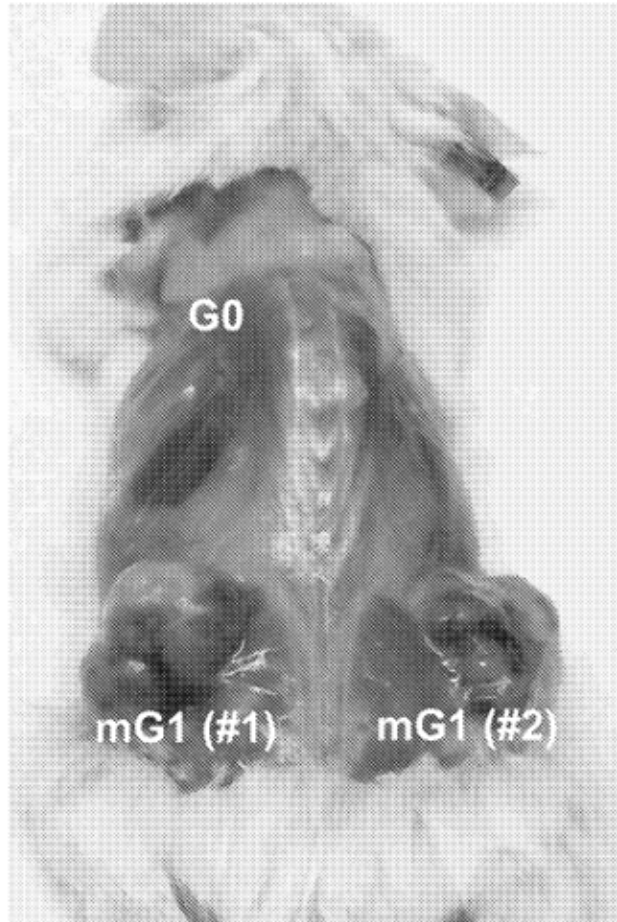


Figura 20

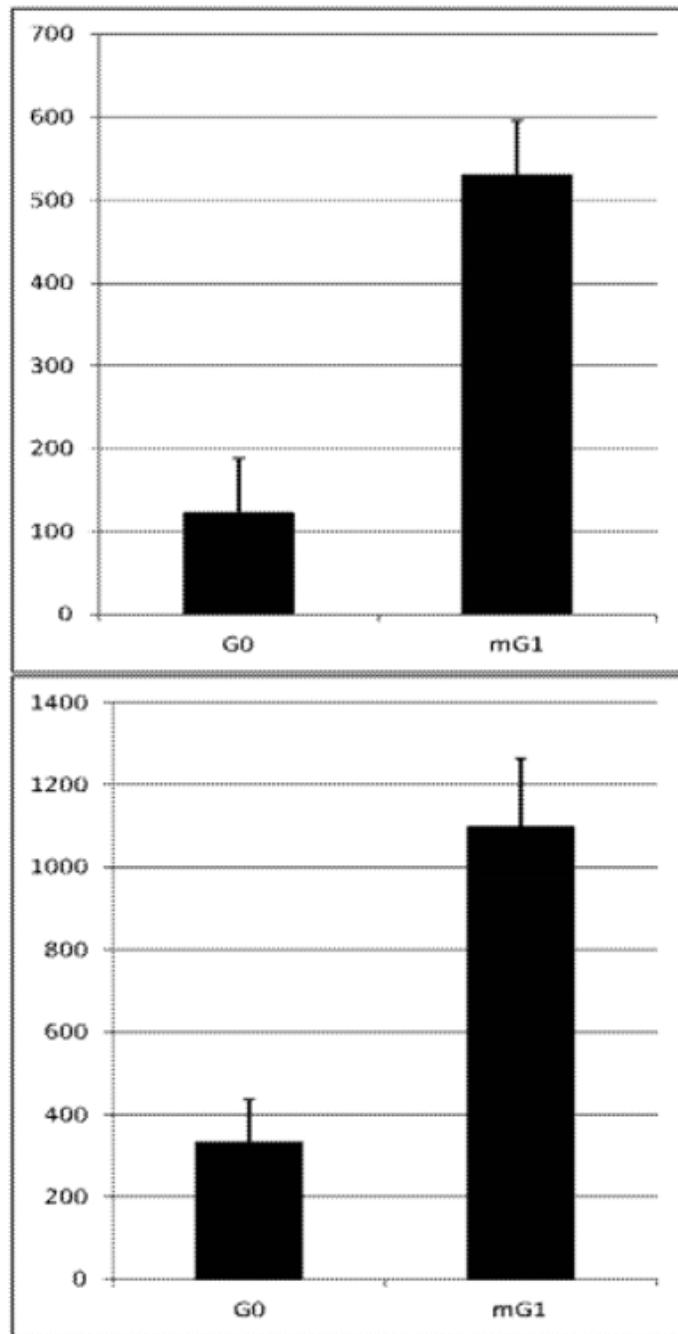


Figura 21

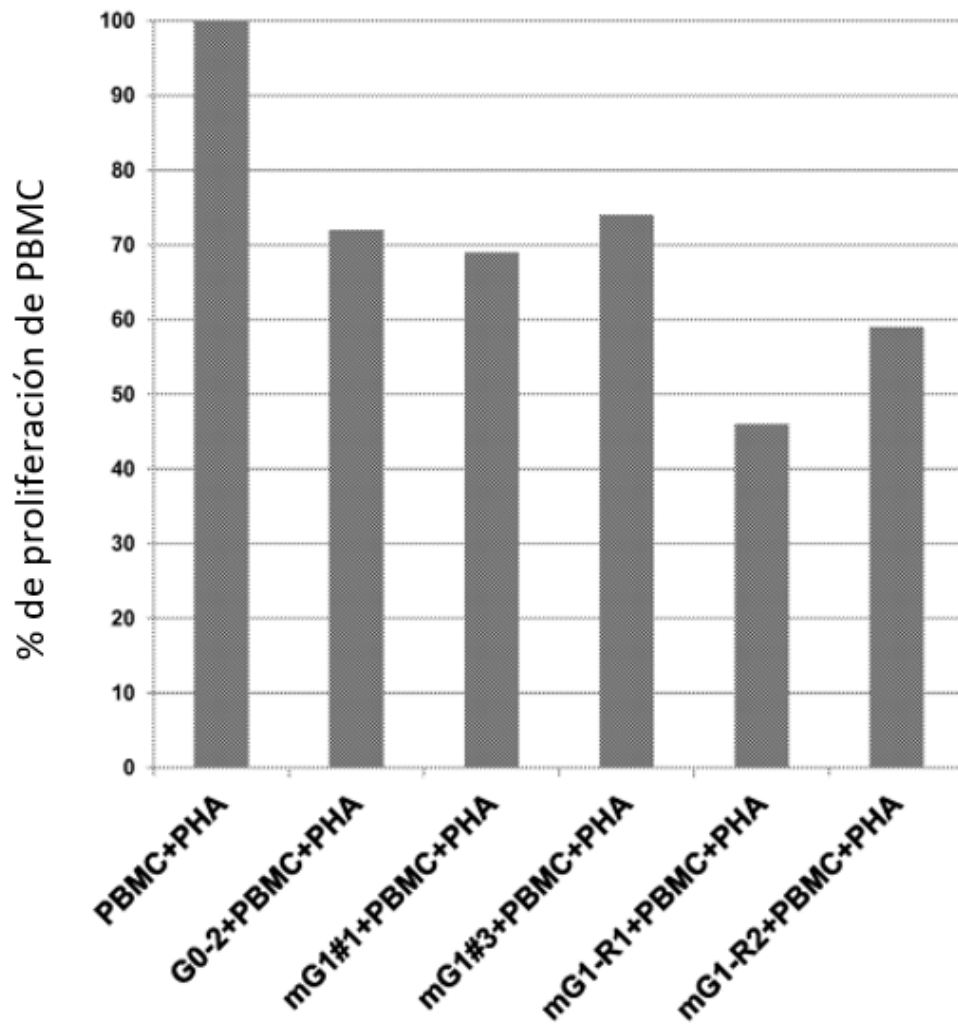


Figura 22