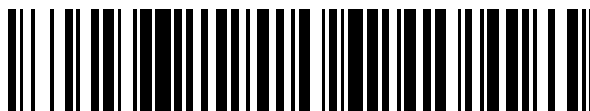


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 563**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013 PCT/US2013/040814**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013 E 13790064 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2850179**

54 Título: **Derivación sin alimentadores de células madre pluripotentes inducidas humanas con ARN mensajero sintético**

30 Prioridad:

13.05.2012 US 201261646292 P

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

04.11.2019

73 Titular/es:

**ALLELE BIOTECHNOLOGY AND
PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
9924 Mesa Rim Rd.
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**WANG, JIWU;
WARREN, LUIGI y
NI, YUHUI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 729 563 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

Derivación sin alimentadores de células madre pluripotentes inducidas humanas con ARN mensajero sintético

5 Solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad para la solicitud norteamericana provisional USSN 61/646.292 presentada el 13 de mayo de 2012.

10 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a nuevos métodos sin alimentadores para desdiferenciar o reprogramar una célula somática de mamífero.

15 Antecedentes

Lo siguiente incluye información que puede ser útil para comprender varios aspectos y realizaciones de la presente descripción. No se admite que ninguna de las informaciones proporcionadas en este documento sea de la técnica anterior o relevante para las invenciones actualmente descritas o reivindicadas, o que cualquier publicación o documento al que se haga referencia específica o implícitamente sea de la técnica anterior.

20 El potencial terapéutico de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) ha estimulado los esfuerzos para desarrollar métodos de reprogramación que eviten la necesidad de modificar genéticamente las células somáticas para efectuar la reprogramación al estado pluripotente. Los primeros enfoques "no integradores" para lograr el éxito en este sentido -la transducción de proteínas, la transfección de plásmidos y el uso de vectores adenovirales- fueron limitados en la aplicación debido a las bajas eficacias de la conversión iPSC lograda. Más recientemente, se ha demostrado que las técnicas que emplean el ADN episómico, el virus Sendai y el ARN mensajero sintético (ARNm) generan iPSC "sin huella" con eficacias comparables o superiores a las logradas mediante la integración de vectores virales. La transfección del ARN es, en principio, el más atractivo de estos métodos, ya que proporciona un control preciso sobre el curso del tiempo de expresión del factor de reprogramación (RF), a la vez que elimina completamente cualquier requisito de "limpieza" de las células reprogramadas para purgar las trazas residuales del vector. Sin embargo, los protocolos actuales para la reprogramación basada en ARNm son relativamente laboriosos, debido a la necesidad de retransfectar diariamente durante las aproximadamente 2 semanas requeridas para la inducción de pluripotencia en células humanas. Estos procedimientos también se basan en el uso de células alimentadoras, lo que agrega complejidad y variabilidad técnica al proceso, al tiempo que introduce una fuente potencial de contaminación con material biológico no derivado de humanos ("xeno"). Además, Warren et al., 2010, describen la reprogramación de células somáticas a pluripotencia utilizando un ARNm modificado que codifica cuatro o cinco factores de reprogramación. Yabukov et al., 2010, también describen la reprogramación de células utilizando ARNm sintético, aunque no está claro si las células reprogramadas son de hecho pluripotentes. Rosa y Brivanlou, 2010, resumen las revelaciones de Warren et al. y Yabukov et al. y analizan el uso del ARNm sintético para reprogramar células somáticas. Schmidt y Plath, 2012, muestran que los factores de reprogramación tienen un dominio de transactivación. El documento WO 2012012798 describe un método sin alimentadores para generar iPSC usando M_3O , pero no dice nada sobre el uso de ARNm para la transfección. Hirai et al., 2011, describe que los factores de reprogramación nuclear podrían acelerarse utilizando Oct4 fusionado con el dominio de transactivación de MyoD (M_3O).

Una dificultad importante de producir células madre pluripotentes inducidas (iPSC) ha sido la baja eficacia de la reprogramación de células diferenciadas en células pluripotentes. Anteriormente, se informó que el 5% de los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se reprogramaron en iPSC cuando se transdujeron con un gen de fusión compuesto por Oct4 y el dominio de transactivación de MyoD (llamado M_3O), junto con Sox2, Klf4, Klf4 y c-Myc (SKM). Además, M_3O facilitó la remodelación de la cromatina de los genes de la pluripotencia en la mayoría de los MEF transducidos, incluidas las células que no se convirtieron en iPSC. Estas observaciones sugirieron la posibilidad de que más del 5% de las células hubieran adquirido la capacidad de convertirse en iPSC en condiciones de cultivo más favorables.

55 Compendio de la invención

Por consiguiente, para abordar estas deficiencias, la presente descripción proporciona en un primer aspecto un método sin alimentadores para desdiferenciar o reprogramar una célula somática de mamífero que comprende transfectar la célula somática aislada con una composición que comprende: una cantidad eficaz de ARNm sintético que codifica M_3O ; y ARNm sintético que codifica los factores de reprogramación Sox2, Klf4, cMyc-T58A, Nanog y Lin28 en combinación; por lo que la célula somática es reprogramada o desdiferenciada. En el presente documento también se describen composiciones para generar células madre capaces de producir todos los tejidos diferentes del cuerpo humano. Usando moléculas de ARN mensajero y sin la necesidad de vectores virales, productos animales o células alimentadoras, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para reprogramar fibroblastos humanos en células madre pluripotentes inducidas (iPSC). El uso de los métodos y composiciones de

ejemplar dio como resultado una eficacia mejorada sorprendente e inesperada con respecto a las metodologías de reprogramación celular informadas previamente.

Por consiguiente, se describen métodos, agentes y/o composiciones útiles para acelerar la reprogramación mediada por ARNm mejorando el cóctel de factores de reprogramación (RF), en particular a través de la aplicación de variantes de ingeniería de los factores de reprogramación convencionales, como Oct4 (también conocido como Oct3/4), Sox 2, etc., que incorporan dominios de transactivación de factores de transcripción fuertes y conocidos, como VP16 y MyoD. Los métodos y composiciones descritos en este documento dan como resultado un protocolo libre de xeno, sin alimentadores, que reduce dramáticamente el tiempo, el costo y el esfuerzo involucrados en la reprogramación basada en ARNm.

En una realización, el método de la invención comprende: a) cultivar células diana en crecimiento a una densidad de 25 k a 250 k celdas/pocillo de una placa estándar de 6 pocillos en una superficie sin alimentadores; b) se proporciona transfectar células con dosis variables de 50 ng a 800 ng/ml de ARNm cada vez durante la reprogramación.

En una realización, las células diana se cultivan a una densidad de 50 k, 75 k, 100 k o 150 k células/pocillo de una placa estándar de 6 pocillos en una superficie libre de alimentadores; b) se transfectan células con dosis variables de 50 ng a 800 ng/ml de ARNm cada vez durante la reprogramación, mientras que las dosis más bajas se usan en puntos temporales más tempranos que en puntos temporales posteriores; c) se logran iPSC sin pasajes.

En una realización, las células diana se cultivan a una densidad de 50 k, 75 k 100 k, o 150 k células/pocillo de una placa estándar de 6 pocillos en una superficie libre de alimentadores, mientras que el volumen de cada pocillo se ajusta para que esté entre 0,5 ml y 5 ml de medio apropiado; b) se transfectan células con dosis variables de 50 ng a 800 ng/ml de ARNm cada vez durante la reprogramación, mientras que las dosis más bajas se usan en puntos temporales más tempranos que en puntos temporales posteriores; c) se logran iPSC sin pasajes.

En una realización, las células de mamífero son células humanas. En una realización, el método es sin xeno.

En una realización, los uno o más factores se seleccionan del grupo que consiste en ARNm, ARN reguladores, ARNsi, miARN y sus combinaciones.

En una realización, las células somáticas se transfectan con al menos dos ARN diferentes. En una realización, las células somáticas se seleccionan del grupo que consiste en células unipotentes, multipotentes, pluripotentes y diferenciadas. En una realización, los uno o más ARN inducen la desdiferenciación de las células somáticas a células unipotentes, multipotentes o pluripotentes.

En una realización, el al menos uno de los factores se selecciona del grupo que consiste en ARNm de OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y MYC. En una realización, el ARNm de OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 se administran en combinación. En una realización, el ARNm de OCT4, SOX2, KLF4 y MYC se administran en combinación.

En una realización, las células transfectadas se mantienen en cultivo como células madre pluripotentes inducidas (iPS). En una realización, las células transfectadas forman células madre pluripotentes inducidas, que comprenden, además, inducir a las células iPS a formar células diferenciadas.

Se describe un método para tratar o inhibir uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un paciente que comprende desdiferenciar células in vitro y administrar las células al paciente. Se describe una composición que comprende los dominios de activación de transacciones Rarg y LrH-1. La composición puede comprender Oct4 fusionado a un dominio de transactivación VP16.

Las invenciones descritas y reivindicadas en este documento tienen muchos atributos y realizaciones que incluyen, pero no se limitan a los establecidos o descritos o mencionados en este breve resumen. No se pretende que esté todo incluido y las invenciones descritas y reivindicadas en el presente documento no se limitan a las características o realizaciones identificadas en este breve resumen, que se incluyen solo con fines de ilustración y no de restricción. Se pueden divulgar realizaciones adicionales en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Colonias de iPSC derivadas de un cóctel de reprogramación de ARNm a base de M₃O. (A) 10x imágenes de campo luminoso de dos de los clones iPSC expandidos derivados del primer ensayo de reprogramación BJ a base de M₃O. (B) Inmunotinción de clones expandidos para marcadores de pluripotencia.

Figura 2. Reprogramación sin alimentadores con un cóctel a base de M₃O. (A) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran el rendimiento de la colonia TRA-1-60⁺ a partir de derivaciones sin alimentadores en fibroblastos 50K XFF que comparan los cócteles a base de c-Myc y L-Myc y regímenes de transfección de 4 horas y 24 horas. Todos los pocillos fueron transfectados durante 9 días. Los cultivos de transfección de 4 horas se fijaron para la tinción en

5 el día 15 del experimento, los cultivos de transfección de 24 horas en el día 11. (B) Imágenes de campo luminoso 10x del pocillo de 400 ng/ml de Stemfect del mismo experimento que muestra colonias similares a hESC casi confluentes que superan el cultivo el día 9 de la derivación. (C) Tiempo de campo brillante 10x de un campo marcado en un ensayo de seguimiento en el que 100K XFF se transfectaron nuevamente durante 9 días utilizando un régimen de 400 ng/ml de Stemfect, que muestra epitelización y posterior aparición de colonias similares a hESC.

Figura 3. Comparación de la eficacia de la reprogramación utilizando 4 cócteles de ARNm diferentes. Diagrama de flujo que resume el experimento comparativo de cuatro cócteles.

10 Figura 4. Colonias similares a hESC en un cultivo de reprogramación sin alimentadores HDF-a. Imágenes de campo luminoso 10x de colonias emergentes similares a hESC el día 9 de una derivación sin alimentadores de fibroblastos adultos de 75K HDF-a, tratados durante 9 días con un cóctel de ARNm de 400 ng/ml (M_3O^+ c-Myc⁺ Nanog⁺) entregados como suplemento del medio utilizando reactivo de transfección Stemfect.

15 Figura 5. Generación de cócteles de ARNm sintéticos. (A) Esquema que resume el procedimiento para hacer cócteles de reprogramación de ARNm. (B) ARNm sintéticos que codifican varios RF e informantes fluorescentes en un gel SYBR E. Se cargaron 500 ng de ARN por carril.

20 Descripción detallada

Al describir la presente invención, todos los términos no definidos aquí tienen sus significados comunes reconocidos en la técnica. En la medida en que la siguiente descripción sea de una realización específica o un uso particular de la invención, se pretende que sea solo ilustrativa y no limitativa de la invención reivindicada. La siguiente descripción pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se incluyen en el espíritu y alcance de la invención.

25 Las células diferenciadas pueden revertirse a un estado pluripotente mediante la expresión de un grupo selecto de factores de transcripción, lo que abre la posibilidad de que se puedan usar células específicas del paciente para generar células de cualquier tipo deseado para el estudio de la enfermedad genética in vitro y, por último, para la terapia de reemplazo celular. La expresión de los factores de reprogramación se puede lograr mediante la aplicación de vectores virales que se integran en el genoma, y las derivaciones de iPSC todavía se realizan generalmente con retrovirus integrantes o lentivirus. La modificación concomitante del genoma representa un obstáculo importante para la aplicación terapéutica de las iPSC, mientras que la posibilidad de una expresión reactivada a partir de casetes virales integrados es una preocupación incluso para los estudios in vitro. Se han logrado avances considerables recientemente en la aplicación de nuevos vectores de expresión que alivian o evitan el problema de modificación del genoma. Ahora hay disponibles vectores lentivirales que codifican los múltiples factores requeridos para la inducción de iPSC en un único casete policistrónico flanqueado por sitios de recombinación lox, que permite una escisión casi perfecta del transgén después de la reprogramación a través de la expresión transitoria de la Cre recombinasa. La inserción de transgén con escisión posterior también puede efectuarse utilizando un vector transposón seguido de una breve expresión de transposasa. Se han empleado varios tipos diferentes de vectores de ADN no integradores que pueden expresar de manera transitoria los factores de reprogramación durante el tiempo suficiente para inducir la pluripotencia, incluyendo adenovirus, plásmido y ADN episomal. También se ha demostrado que es posible generar iPSC por transducción repetida de células con proteínas de RF recombinantes que incorporan péptidos que penetran en las células, aunque con baja eficacia. Ahora se puede lograr una conversión iPSC relativamente eficiente utilizando el virus Sendai, que tiene un ciclo reproductivo completamente a base de ARN, y mediante la transfección sostenida de transcritos de ARNm sintéticos que codifican los factores de Yamanaka.

30 La aplicación de la transfección de ARNm a la reprogramación (y potencialmente a la diferenciación dirigida y la transdiferenciación) es atractiva, ya que este sistema permite la expresión de cócteles de reprogramación e incluso factores componentes individuales para ser modulados a diario simplemente cambiando los transcritos que se agregan a los medios de cultivo celular. Una vez que termina la transfección de un factor particular, la expresión ectópica dentro de las células diana cesa en el corto plazo debido a la rápida desintegración del ARNm en el citoplasma. A diferencia de los vectores de ADN no integrantes o los virus de ARN, no se requiere limpieza con la transfección de ARNm, ni existe ningún riesgo de integración genómica aleatoria o infección viral persistente. Estas ventajas adquieren mayor importancia si prevemos que, en última instancia, se puedan emplear múltiples rondas de expresión de RF ectópica para pasar de una biopsia de paciente a células especializadas de un tipo deseado a través de un intermedio de iPSC. No obstante, hay inconvenientes en la reprogramación basada en ARNm como se practica actualmente. Si bien la expresión de las RF es típicamente robusta en el orden de las 24 horas después de la transfección del ARNm, se requieren aproximadamente dos semanas de expresión del factor para inducir la pluripotencia en las células humanas, por lo que el tiempo necesario para reprogramar las células con esta técnica es relativamente alto. No todos los tipos de células y medios de cultivo son igualmente propicios para una administración eficiente de ARNm, y esto es actualmente un impedimento para la reprogramación basada en el ARNm de ciertos tipos de células de interés, incluidos los glóbulos sanguíneos. También hasta ahora ha resultado necesario emplear una capa de alimentadores de fibroblastos mitóticamente detenidos para reprogramar con éxito las células en iPSC usando el método de ARNm. Estas células alimentadoras regulan la densidad de población del cultivo a medida que las células diana crecen a partir de una baja densidad inicial a lo largo del curso de tiempo

extendido requerido para la inducción de iPSC, nivelando la dosis administrada de ARN y el reactivo de transfección (ambos con toxicidades asociadas) y apoyando la viabilidad de las células diana frente a las fuerzas proapoptóticas y citostáticas engendradas por el proceso de reprogramación. Este requisito agrega complejidad y tiempo práctico al procedimiento e introduce una importante fuente de variabilidad técnica, especialmente dado que los alimentadores están sujetos a transfección. La presencia de una capa de alimentadores también impide el monitoreo y el análisis del proceso de reprogramación. Finalmente, aunque las células alimentadoras humanas son actualmente el estándar para la reprogramación de ARNm, incluso estas células son una fuente potencial de contaminación xeno-biológica cuando se utilizan productos animales no humanos en su derivación y expansión.

Por consiguiente, en vista de los problemas asociados con el procedimiento previamente conocido, se describen en el presente documento nuevos métodos, materiales y protocolos para producir iPSC con una eficacia mejorada de reprogramación y una calidad mejorada de las células resultantes. Las realizaciones de la presente invención se usaron con éxito para lograr mejoras significativas sorprendentes e inesperadas a través de la potenciación del cóctel de RF suministrado a las células. Las realizaciones de la presente invención también proporcionan uno o más protocolos novedosos que comprimen y agilizan el proceso de reprogramación del ARNm, y que apoyan la producción de iPSC sin huella a partir de fibroblastos humanos sin el uso de células alimentadoras o cualquier otro reactivo potencialmente contaminado con xeno. Los nuevos métodos y composiciones proporcionados en este documento ampliarán los beneficios del método de ARNm previamente conocido y ayudarán a eliminar los obstáculos restantes a la aplicación terapéutica de la tecnología iPSC.

La presente descripción se refiere en general a métodos de uso de uno o varios factores de reprogramación diseñados para la creación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) mediante un proceso controlado cinéticamente. Más específicamente, se describen combinaciones de factores de reprogramación, incluidas las fusiones entre los factores de reprogramación convencionales con dominios de transactivación, optimizados para reprogramar diferentes tipos de células; la introducción de estos factores como ARN mensajero sintético (ARNm) en células de mamíferos cultivadas a la densidad preferida mediante métodos que dan como resultado niveles apropiados de expresión transgénica; mantenimiento de las células en condiciones definidas para dar como resultado una eficacia de reprogramación previamente inalcanzable. En comparación con otros métodos que se conocen en la técnica, la presente invención reduce drásticamente el tiempo, el costo y el esfuerzo involucrados en la reprogramación, con las opciones de estar completamente sin alimentadores y sin xeno, y sin pasajes. Los materiales y procedimientos descritos en este documento son útiles para crear células madre pluripotentes inducidas a partir de diferentes tipos de células de mamíferos, incluidos los fibroblastos humanos.

Los métodos de la invención permiten generar células madre capaces de producir una variedad de diferentes tejidos del cuerpo humano mediante el uso de moléculas de ARN mensajero sin la necesidad de vectores virales, productos animales o células alimentadoras. Los nuevos métodos descritos aquí se pueden usar para reprogramar fibroblastos humanos en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) con una eficiencia sorprendente e inesperada en condiciones óptimas.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, las células adecuadas para usar con el método incluyen, pero no se limitan a células primarias y líneas celulares establecidas, células embrionarias, células inmunes, células madre y células diferenciadas que incluyen, pero no se limitan a células derivadas de ectodermo, endodermo y mesodermo, incluyendo fibroblastos, células parenquimatosas, células hematopoyéticas y células epiteliales. Como se usa en el presente documento, las células madre incluyen células unipotentes, células multipotentes y células pluripotentes; células madre embrionarias y células madre adultas como células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre epiteliales y células satélite musculares. En una realización, las células somáticas se diferencian o se reprograman. Se puede utilizar cualquier célula somática adecuada. Las células somáticas representativas incluyen fibroblastos, queratinocitos, adipocitos, células musculares, células de órganos y tejidos, y varias células sanguíneas que incluyen, pero no se limitan a células hematopoyéticas, incluyendo células madre hematopoyéticas, y células que proporcionan injerto hematopoyético a corto o largo plazo. Los tipos de células más preferidos incluyen, pero no se limitan a fibroblastos humanos, queratinocitos y células madre hematopoyéticas. Los métodos son particularmente útiles para desdiferenciar y opcionalmente rediferenciar las células, sin alteración permanente de los genomas celulares.

Los ARN útiles en el método descrito incluyen ARNm, ARN reguladores o ARN pequeños, como ARNsi o MiARN, en donde uno o más ARNm codifican polipéptidos que funcionan para desdiferenciar o reprogramar la célula. La eficacia de la transfección es alta. Típicamente, más del 90% de la población de células transfectadas expresará el ARN introducido. Por lo tanto, es posible transfectar células con uno o más ARN distintos. Por ejemplo, la población de células puede transfectarse con uno o más ARNm distintos, uno o más ARNsi distintos, uno o más MiARN distintos o combinaciones de los mismos. La población de células puede transfectarse con múltiples ARN simultáneamente en una sola administración, o múltiples administraciones pueden ser escalonadas en minutos, horas, días o semanas. La transfección de múltiples ARN distintos puede ser escalonada. Por ejemplo, si es deseable que un primer ARN se exprese antes de la expresión de uno o más ARN adicionales.

El nivel de expresión del ARN transfectado se puede manipular en un amplio rango cambiando la cantidad de ARN de entrada, lo que hace posible regular individualmente el nivel de expresión de cada ARN transfectado. La cantidad eficaz de ARN de entrada se determina según el resultado deseado. Además, la técnica de producción de ARNm basada en PCR facilita el diseño de ARNm con diferentes estructuras y combinaciones de dominios. Los ARN útiles en los métodos descritos se conocen en la técnica, y se seleccionarán basándose en el tipo de célula huésped diana, así como la vía o la actividad celular por manipular, o la aplicación terapéutica. Los constructos útiles para

5 Las expresiones “polinucleótido” y “ácido nucleico”, usadas indistintamente en este documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, pero no se limita a ADN o ARN de cadena simple, doble o múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, química o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. “Oligonucleótido” en general se refiere a polinucleótidos de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 nucleótidos de ADN monocatenario o bicatenario. Sin embargo, para los fines de esta descripción, no hay límite superior para la longitud de un oligonucleótido. Los oligonucleótidos también se conocen como oligómeros u oligos y pueden aislarse de genes, o sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos en la técnica.

20 Como se usa en el presente documento, el término “microARN” se refiere a cualquier tipo de ARN interferentes, que incluyen, pero no se limitan a microARN endógenos y microARN artificiales (por ejemplo, miARN sintéticos). Los microARN endógenos son pequeños ARN codificados naturalmente en el genoma que son capaces de modular la utilización productiva del ARNm. Un microARN artificial puede ser cualquier tipo de secuencia de ARN, que no sea un microARN endógeno, que sea capaz de modular la actividad de un ARNm. Una secuencia de microARN puede ser una molécula de ARN compuesta por una o más de estas secuencias. Un “precursor de microARN” (o “pre-miARN”) se refiere a un ácido nucleico que tiene una estructura tronco-bucle con una secuencia de microARN incorporada en el mismo. Un “microARN maduro” (o “miARN maduro”) incluye un microARN que ha sido escindido de un precursor de microARN (un “pre-miARN”), o que se ha sintetizado (por ejemplo, sintetizado en un laboratorio mediante síntesis libre de células) y tiene una longitud de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 27 nucleótidos, por ejemplo, un microARN maduro puede tener una longitud de 19 nt, 20 nt, 21 nt, 22 nt, 23 nt, 24 nt, 25 nt, 26 nt o 27 nt. Un microARN maduro puede unirse a un ARNm diana e inhibir la traducción del ARNm diana.

Las secuencias genómicas de ARNm (ADNc) y de proteínas de ejemplo para OCT4 son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, (OCT4) POU5F1 POU clase 5 homeobox [*Homo sapiens*] ID del gen: 5460, que proporciona secuencias de ARNm (cADNc) Número de acceso a Genbank NM_001173531.1 titulado *Homo sapiens* POU clase 5 homeobox 1 (POU5F1), variante de transcripción 3, ARNm; Número de acceso a Genbank NM_002701.4 titulado *Homo sapiens* POU clase 5 homeobox 1 (POU5F1), variante de transcripción 1, ARNm; y Número de acceso a Genbank NM_203289.4 titulado *Homo sapiens* POU clase 5 homeobox 1 (POU5F1), variante de transcripción 2, ARNm. Las secuencias genómicas de ARNm (ADNc) y proteínas para SOX2 también se conocen en la técnica, por ejemplo, SOX2 SRY (región determinante del sexo Y)-box 2 [*Homo sapiens*], ID del gen: 6657, que proporciona la secuencia de ARNm (ADNc) Número de acceso a Genbank NM_003106.2 titulada secuencia de ARNm *Homo sapiens* SRY (región determinante del sexo Y)-box 2 (SOX2), ARNm. Las secuencias genómicas de ARNm (ADNc) y de proteínas de ejemplo para NANOG también se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, NANOG Nanog homeobox [*Homo sapiens*], ID del gen: 79923, que proporciona la secuencia de ARNm (ADNc) Número de acceso a Genbank NM_024865.2 titulado *Homo sapiens* Nanog homeobox (NANOG), ARNm. Las secuencias genómicas de ARNm (ADNc) y de proteínas de ejemplo para LIN28 también se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, LIN28A homólogo A (*C. elegans*) [*Homo sapiens*], ID del gen: 79727, que proporciona la secuencia de ARNm (ADNc) Número de acceso a Genbank NM_024674.4 titulado *Homo sapiens* lin-28 homólogo A (*C. elegans*) (LIN28A), ARNm. Las secuencias genómicas de ARNm (ADNc) y de proteínas de ejemplo para KLF4 se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, factor 4 de tipo KLF4 Kruppel (intestino) [*Homo sapiens*], ID del gen: 9314, que proporciona la secuencia de ARNm (ADNc) Número de acceso a Genbank NM_004235.4 titulado factor 4 de tipo Kruppel de *Homo sapiens* (intestino) (KLF4), ARNm. Las secuencias de ARNm para MYC también se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, homólogo de oncogén viral de mielocitomatosis MYC v-myc (aviario) [*Homo sapiens*], ID del gen: 4609, que proporciona la secuencia de ARNm (ADNc) Número de acceso a Genbank NM_002467.4 titulado homólogo de oncogén viral de mielocitomatosis v-myc viral de *Homo sapiens* aviario) (MYC), ARNm.

Una “estructura de tronco-bucle” se refiere a un ácido nucleico que tiene una estructura secundaria que incluye una región de nucleótidos de la que se sabe o se pronostica que forma una doble cadena (porción escalonada) que está unida en un lado por una región predominantemente de nucleótidos monocatenarios (porción de bucle). Las expresiones de estructuras en “horquilla” y “plegada hacia atrás” también se usan en este documento para referirse a estructuras de tronco-bucle. Tales estructuras son bien conocidas en la técnica y estas expresiones se usan de manera consistente con sus significados conocidos en la técnica. La secuencia primaria real de nucleótidos dentro de la estructura del tronco-bucle no es crítica para la práctica de la invención, siempre que la estructura secundaria esté presente. Como se conoce en la técnica, la estructura secundaria no requiere un par de bases exacto. Por lo tanto, el tronco puede incluir uno o más discordancias de base. Alternativamente, los pares de bases pueden ser exactos, es decir, no incluir ninguna discordancia.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula madre” se refiere a una célula no diferenciada que puede ser inducida a proliferar. La célula madre es capaz de automantenimiento, lo que significa que, con cada división celular, una célula hija también será una célula madre. Las células madre se pueden obtener a partir de tejido embrionario, fetal, posnatal, juvenil o adulto. La expresión “célula progenitora”, como se usa en este documento, se refiere a una célula no diferenciada derivada de una célula madre, y no es en sí misma una célula madre. Algunas células progenitoras pueden producir progenie que son capaces de diferenciarse en más de un tipo de célula.

La expresión “célula madre pluripotente inducida” (o “célula iPS”), como se usa en el presente documento, se refiere a una célula madre inducida a partir de una célula somática, por ejemplo, una célula somática diferenciada, y que tiene mayor potencia que dicha somática célula. Las células iPS son capaces de autorrenovación y diferenciación en células maduras, por ejemplo, células del músculo liso. iPS también puede ser capaz de diferenciarse en células progenitoras de músculo liso.

Como se usa en el presente documento, el término “aislado”, con referencia a una célula, se refiere a una célula que se encuentra en un entorno diferente al que la célula produce naturalmente, por ejemplo, donde la célula ocurre naturalmente en un organismo multicelular, y la célula se elimina del organismo multicelular, la célula está “aislada”. Una célula huésped modificada genéticamente aislada puede estar presente en una población mixta de células huésped modificadas genéticamente, o en una población mixta que comprende células huésped modificadas genéticamente y células huésped que no están modificadas genéticamente. Por ejemplo, una célula huésped modificada genéticamente aislada puede estar presente en una población mixta de células huésped modificadas genéticamente in vitro, o en una población mixta in vitro que comprende células huésped modificadas genéticamente y células huésped que no están modificadas genéticamente.

Una “célula huésped”, como se usa en el presente documento, denota una célula in vivo o in vitro (por ejemplo, una célula eucariota cultivada como una entidad unicelular), célula eucariota que puede ser o ha sido utilizada como receptores de un nucleico ácido (por ejemplo, un ácido nucleico exógeno), e incluye la progenie de la célula original que ha sido modificada genéticamente por el ácido nucleico. Se entiende que no es necesario que la progenie de una sola célula sea completamente idéntica en morfología o en complemento genómico o de ADN total al progenitor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

La expresión “modificación genética” y se refiere a un cambio genético permanente o transitorio inducido en una célula después de la introducción de un nuevo ácido nucleico (es decir, un ácido nucleico exógeno a la célula). El cambio genético (“modificación”) se puede lograr mediante la incorporación del nuevo ácido nucleico en el genoma de la célula huésped, o mediante el mantenimiento transitorio o estable del nuevo ácido nucleico como un elemento extracromosómico. Cuando la célula es una célula eucariota, se puede lograr un cambio genético permanente mediante la introducción del ácido nucleico en el genoma de la célula. Los métodos adecuados de modificación genética incluyen infección viral, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, tecnología de pistola de partículas, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico exógeno” se refiere a un ácido nucleico que no se encuentra normal o naturalmente en y/o producido por una célula en la naturaleza, y/o que se introduce en la célula (por ejemplo, por electroporación, transfección, infección, lipofección o cualquier otro medio para introducir un ácido nucleico en una célula).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar” y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, como se usa en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero aún no ha sido diagnosticado por tenerla; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

Los términos “individuo”, “sujeto”, “huésped” y “paciente”, usados indistintamente en este documento, se refieren a un mamífero, que incluye, pero no se limita a un ser humano, un primate no humano, un roedor (por ejemplo, un ratón, una rata, etc.), un ungulado, un canino, un lagomorfo, un felino, etc. Un sujeto de interés puede ser un humano. Un animal no humano puede ser un roedor o un lagomorfo.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” significa la cantidad de un compuesto, un ácido nucleico o un número de células que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La “cantidad terapéuticamente eficaz” variará dependiendo del compuesto o la célula, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto por tratar.

Antes de que se describa con más detalle la presente invención, debe entenderse que esta invención no está

limitada a realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, esto puede variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

5 Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor en ese intervalo establecido, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también se incluyen dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento también se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

20 Como se describe en el presente documento, la reprogramación basada en ARNm podría mejorarse mediante el uso de variantes de ingeniería de Oct4 o Sox 2 que incorporan un dominio de transactivación MyoD N-terminal (Hirai et al., Stem Cells, 2011) o una repetición triple C-terminal del dominio de transactivación de VP16 (Wang et al, EMBO Reports, 2011; en el que se prepararon factores de reprogramación sintéticos al fusionar el dominio de transactivación de VP16 a OCT4 (también conocido como Pou5f1), NANOG y SOX2, respectivamente, estos factores sintéticos podrían reprogramar ambos fibroblastos humanos y de ratón con mayor eficiencia y cinética acelerada, o aumentando el cóctel de RF "estándar" con dos factores adicionales, Rarg y Lrh-1 (Wang et al., PNAS, 2011). Los activadores de transcripción fuertes pueden reclutar efectivamente múltiples complejos de remodelación de cromatina cuando se unen al ADN en sitios específicos. Un buen ejemplo es MyoD, un factor de transcripción maestro para la miogénesis esquelética que puede cambiar el destino de las células diferenciadas. Hirai et al. especularon que, dado que MyoD es un factor de transcripción tan fuerte, puede aumentar la accesibilidad de la cromatina a los factores iPS si se fusionan. Cuando las células humanas o de ratón se transducen con vectores retrovirales que llevan un gen de fusión OctMyoD TAD, junto con Sox2 y Klf4, aumentan el número de colonias de iPSC en -50 veces en comparación con los factores de iPS canónicos. De manera similar, VP16, ampliamente conocido por ser un robusto activador de transcripción, puede exhibir fuertes efectos de estimulación en la reprogramación cuando se fusiona con diferentes factores de iPS.

35 Preparación de ejemplo de iPSC humanas

40 El método también se puede usar ampliamente para rediferenciar o reprogramar células, por ejemplo, para producir células iPS que pueden modularse aún más para formar células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimáticas, células madre epiteliales y células satélite musculares, o células diferenciadas de tejidos humanos, que incluyen, pero no se limitan a glóbulos rojos, glóbulos blancos, linfocitos, plaquetas, células estromales, células grasas, células óseas, incluyendo osteoclastos, tejido epitelial, como células de la piel, tejido muscular, músculo liso, músculo esquelético y músculo cardíaco, tejido vascular, incluyendo células endoteliales, tejido del hígado, incluyendo hepatocitos, y tejido nervioso, incluyendo neuronas. Los métodos para inducir la diferenciación de células iPS en distintos tipos de células diferenciadas, que incluyen, pero no se limitan a cardiomiocitos, células madre hematopoyéticas, células óseas como osteoclastos, hepatocitos, células retinianas y neuronas, células madre que incluyen, pero no se limitan a células madre embrionarias aisladas, células madre hematopoyéticas y células madre pluripotentes inducidas se pueden inducir para que se diferencien por transfección transitoria con ARN que induzcan la diferenciación. Adicional o alternativamente, las células se pueden rediferenciar mediante el cultivo de las células en condiciones específicas del tipo de célula. Por ejemplo, las células iPS se pueden mantener en los alimentadores de CF-1 y posteriormente adaptarse a las condiciones libres de alimentador. Las células iPS se pueden inducir para formar células retinianas diferenciadas mediante el cultivo de las células en presencia de noggin, Dkk-1 e IGF-1.

55 Las metodologías informadas anteriormente se basaban en la integración de vectores, es decir, virus o plásmidos, para llevar los factores modificados. En una realización, se realizó un ensayo de reprogramación comparando el rendimiento de seis cócteles de combinación de ARNm diferentes que comprenden transcripciones de cinco factores para la reprogramación de ARNm (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc-T58A y Lin28), o un cóctel de 7 factores de reprogramación RF que incluye Rarg y Lrh-1, cada combinación se probó en tres variaciones basadas en los constructos de fusión de tipo salvaje Oct4 y MyoD- y VP16-Oct4 (designadas como M₃O y VPx3, respectivamente). Los fibroblastos BJ se transfectaron en cultivos de reprogramación basados en alimentadores durante 11 días, momento en el cual aparecieron morfologías avanzadas en varios de los pocillos. Durante los días siguientes, surgieron colonias con morfologías hESC características en los pocillos transfectados con los cócteles basados en Oct4 y M₃O de tipo salvaje. Las células diana en los cultivos transfectados con VPx3 mantuvieron una morfología fibroblástica, aunque mostraron un crecimiento acelerado y cierta tendencia a agregarse a los focos, y no surgieron colonias. Las realizaciones de 5 factores y 7 factores de los cócteles basados en Oct4 y M₃O de tipo salvaje

mostraron una productividad de colonia similar, por lo que no se obtuvieron ventajas de la inclusión de Rarg y Lrh-1 en los cócteles. Sin embargo, el cóctel de M₃O dio varias veces el número de colonias producidas con Oct4 de tipo salvaje. A la luz de este resultado, las colonias se seleccionaron del pocillo de M₃O de 5 factores para la expansión y el análisis adicional (Figura 1). La pluripotencia de las colonias derivadas de M₃O se confirmó mediante la inmunotinción para los marcadores nucleares y de la superficie celular, y mediante la diferenciación in vitro en las tres capas germinales primarias. Seis clones iPSC expandidos se sometieron a análisis de cariotipo y huella dactilar de ADN, confirmando la normalidad cariotípica de las células y el linaje BJ en todos los casos.

El método también se puede usar ampliamente para rediferenciar o reprogramar células, por ejemplo, para producir células iPS que pueden modularse aún más para formar células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimáticas, células madre epiteliales y células satelitales musculares, o células diferenciadas de tejidos humanos, que incluyen, pero no se limitan a glóbulos rojos, glóbulos blancos, linfocitos, plaquetas, células estromales, células grasas, células óseas, incluyendo osteoclastos, tejido epitelial, incluidas células de la piel, tejido muscular, incluyendo músculo liso, músculo esquelético y músculo cardíaco, tejido vascular incluyendo células endoteliales, tejido hepático incluyendo hepatocitos y tejido nervioso incluyendo neuronas. Los métodos para inducir la diferenciación de las células iPS en diversos tipos de células diferenciadas, incluidos, entre otros, cardiomiocitos, células madre hematopoyéticas, células óseas como osteoclastos, hepatocitos, células retinianas y neuronas, son conocidos en la técnica (Song et al., *Cell Res.*, 19(11): 1233-42 (2009), Lamba et al., *PLoS One*, 5(1):e8763 (2010), Gai et al., *Cell Biol Int.* 200933(11): 1184-93 (2009). Grigoriadis et al., *Blood*, 115(14): 2769-76 (2010)). Las células madre que incluyen, pero no se limitan a células madre embrionarias aisladas, células madre hematopoyéticas y células madre pluripotentes inducidas pueden inducirse para diferenciarse mediante transfección transitoria con ARN que inducen la diferenciación. Adicional o alternativamente, las células se pueden rediferenciar mediante el cultivo de las células en condiciones específicas del tipo de célula. Por ejemplo, las células iPS se pueden mantener en los alimentadores de CF-1 y posteriormente adaptarse a las condiciones sin alimentadores. Las células iPS se pueden inducir para formar células retinianas diferenciadas mediante el cultivo de las células en presencia de noggin, Dkk-1 e IGF-1. La potencia del cóctel de ARNm podría mejorarse aún más mediante la inclusión de transcritos de Nanog. En este ejemplo, cuatro pocillos que contenían 50K de fibroblastos BJ en los alimentadores se transfectaron con Oct4 de tipo salvaje o con cócteles de 5 factores o 6 factores a base de M₃O durante seis días, y cada cultivo se pasó 1:6 a alimentadores nuevos para poblar una placa de 6 pocillos (4). La transfección se continuó durante 0-5 días más dentro de cada placa. Los cultivos se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos TRA-1-60 el día 18 (donde el día 0 corresponde a la primera transfección) para evaluar el impacto de los diferentes cócteles y los cursos de tiempo de transfección en la productividad de la iPSC. Los resultados mostraron que agregar Nanog al cóctel fue muy beneficioso independientemente de la variante de Oct4 empleada, mientras que la mayor eficacia de conversión se logró cuando M₃O y Nanog se usaron juntos.

La eficacia de los cócteles de 5 factores o 6 factores basados en M₃O se confirmó en experimentos adicionales en base a alimentadores utilizando tres líneas adicionales de fibroblastos humanos (HDF-f, HDF-n y XFF). La cinética y la eficacia de la reprogramación mejoraron notablemente con estas tres líneas de paso bajo, que mostraron una población nativa más rápida que BJ en el cultivo de expansión normal. En algunos casos, obtuvimos colonias similares a hESC a partir de tan solo seis días de transfección, aunque los rendimientos fueron mucho mayores en los experimentos en los que la transfección se continuó durante unos pocos días más. Los experimentos que implican el refuerzo periódico de la capa de alimentadores mediante la adición de células nuevas sugirieron que, si bien esta estrategia podría brindar algunos beneficios, se vería contrarrestada por la complejidad del protocolo resultante. Por lo tanto, decidimos centrarnos en aplicar los cócteles más potentes al desarrollo de un protocolo simplificado, sin alimentadores.

La descripción actual se refiere a la creación de iPSC sin alimentadores. La derivación de iPSC independiente del alimentador generalmente ha demostrado ser algo desafiante independientemente de la tecnología de reprogramación empleada, pero plantea dificultades especiales en el contexto de un régimen de transfección sostenida. Hay un límite inferior a la densidad a la que se pueden colocar los fibroblastos sin comprometer la viabilidad celular y la actividad proliferativa. La propensión de las células a sufrir detención mitótica o apoptosis en cultivos dispersos se ve agravada cuando las células se someten a estrés por transfección y por expresión ectópica de factores de reprogramación. Además, las dosis de ARN que son bien toleradas en las altas densidades celulares características de la reprogramación basada en los alimentadores producen efectos citotóxicos más severos cuando se distribuyen entre menos células. Al mismo tiempo, la penetrancia de la expresión que se puede lograr con la transfección de ARNm disminuye considerablemente después de que los fibroblastos alcanzan la confluencia, tal vez debido a una regulación negativa de la endocitosis asociada con la inhibición de contacto y la detención de G1. Esta reducción de la permisividad a la transfección en cultivos apiñados parece aliviarse durante la reprogramación después de que las células se someten a una transición mesenquimatosa a epitelial (MET). Sin embargo, los ~ 7 días típicamente requeridos para que los fibroblastos humanos alcancen el MET cuando se usan los cócteles de ARNm actuales hacen difícil evitar el problema del sobrecrecimiento fibroblástico, incluso si las células se colocan en placas con las densidades iniciales más bajas de supervivencia. Las células se pueden adelgazar pasándolas para posponer este destino, pero es difícil predecir la eficacia de la siembra de los intermediarios de reprogramación altamente estresados y, en cualquier caso, un protocolo de derivación basado en pasajes sacrificaría la conveniencia y escalaría poco a las aplicaciones de alto rendimiento.

La descripción actual se refiere a las indicaciones fenotípicas de MET (involución del proceso fibroblástico y la aparición de focos y morfologías de adoquines). En una realización, MET fue acelerado por nuestra invención utilizando cócteles mejorados, permitiendo la reprogramación libre de alimentadores utilizando el cóctel M₃O de 6 factores sin pasajes, sembrando células diana a una variedad de bajas densidades (50K vs 100K vs 150K por pocillo).

El destino de estos cultivos de reprogramación demostró ser altamente sensible a la densidad de siembra, presumiblemente debido a que los efectos de la citotoxicidad excesiva y del sobrecrecimiento fibroblástico se refuerzan a sí mismos a lo largo del curso del régimen de transfección. En un experimento con dosificación de ARN "estándar" (1200 ng por pocillo), se obtuvieron docenas de colonias similares a hESC de fibroblastos HDF-n y XFF sembrados a 100K por pocillo, mientras que los cultivos correspondientes de 50K y 150K dieron solo unas pocas colonias después de sucumbir a un desplome de la población y al sobrecrecimiento fibroblástico, respectivamente. En las derivaciones que se intentaron con otras dos líneas de fibroblastos, BJ y HDF-a, incluso los cultivos más prometedores (150K) se volvieron prácticamente inactivos poco después de alcanzar la confluencia, y posteriormente se obtuvieron colonias esporádicas con cinética tardía.

En un ejemplo, cambiamos de ambiente a 5% de cultivo de oxígeno y aumentamos a la dosis completa de ARN de un cuarto de dosis durante los primeros cuatro días de transfección en un esfuerzo por minimizar la senescencia celular inducida por estrés.

En un ejemplo, usando estas nuevas condiciones, los inventores probaron si la sustitución de L-Myc por c-Myc podría mejorar aún más el cóctel de reprogramación.

En otro ejemplo, evaluamos un esquema de transfección simplificado mediante el cual el ARN se agregó a las células con cambios diarios en los medios, en lugar de administrarse en una etapa separada cuatro horas antes. La dosis de ARN se redujo en pocillos de "transfección de 24 horas" para compensar el aumento esperado de la citotoxicidad, y se analizaron dos reactivos de transfección diferentes (RNAiMAX y Stemfect). Las células XFF se sembraron a 50K por pocillo y se transfectaron durante 9 días. El régimen convencional de "transfección de 4 horas" dio en el orden de cien colonias TRA1-60⁺ por pocillo con el cóctel a base de c-Myc, mientras que el cóctel de L-Myc tuvo un desempeño comparativamente deficiente (Figura 2). Los resultados de los cultivos de "transfección de 24 horas" fueron aún más impresionantes. En el más productivo de estos pocillos (que corresponde a la condición de 400 ng/ml de Stemfect de c-Myc), el cultivo casi había crecido con células similares a hESC el día 9, 24 horas después de la última transfección. La base mecánica para el rendimiento superior de la "transfección de 24 horas" podría haber tenido el efecto de aumentar la densidad efectiva de los cultivos delgados al concentrar los factores difusivos liberados por las células. Cuando estas condiciones de protocolo preferidas se aplicaron en otros experimentos de ejemplo, la derivación utilizando fibroblastos HDF-a, en cultivos sembrados a 75K de células por pocillo, la productividad fue menos espectacular que la lograda con las células XFF altamente proliferativas, pero nuevamente surgieron numerosas colonias similares a hESC tan temprano como el día 9 del protocolo (Figura 4).

Cuando las células se sembraron en un volumen de medio más bajo que el volumen comúnmente utilizado, por ejemplo, 1 ml, 0,75 ml, 0,5 ml, o la cantidad mínima de medio que aún puede sostener el cultivo celular, la eficiencia de la reprogramación utilizando las condiciones descritas con anterioridad se mejora claramente. Tales condiciones de bajo volumen durante la reprogramación se utilizan en una realización de la presente invención.

Las realizaciones que se han descrito en este documento de ninguna manera son las únicas aplicaciones de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también es útil para reprogramar otras células en condiciones ligeramente variables o con combinaciones similares de factores convencionales o diseñados para la reprogramación, diferenciación dirigida o transdiferenciación.

En otras realizaciones, la optimización adicional del factor de estequiometría también debería mejorar el ritmo de la reprogramación; de hecho, el método de ARNm ofrece la oportunidad de definir cócteles que abordan las fases tempranas y tardías de la inducción de iPSC en forma independiente. Los beneficios obtenidos del uso de M₃O proporcionan una nueva validación para la aplicación reciente de nuevos factores de reprogramación diseñados por ingeniería genética para la generación de iPSC. Otros factores de reprogramación diseñados por ingeniería incluyen la fusión de SOX2, KLF4, CMYC, LMYC, LIN28, NANOG, etc. a dominios de transactivación de factores distintos de VP16 o MYOD, tales como GAL4, GATA1, P53, etc. Debe señalarse que los reactivos y la metodología utilizada para administrar ARNm también se puede usar para cotransfectar ARNsi y miARN, que ya han demostrado su valía en la generación de iPSC. No obstante, el protocolo sin alimentadores descrito en el presente documento representa un avance sustancial sobre los protocolos actuales, reduciendo el tiempo requerido para la reprogramación hasta en la mitad con una reducción igual o mayor en los costos de mano de obra y materiales, eliminando las etapas problemáticas del procedimiento, y permitiendo que el ARNm se administre a las células con casi la misma facilidad que los factores de crecimiento o las citoquinas, es decir, como un suplemento de medios.

En algunas realizaciones, las células se reprograman para modular la respuesta inmune. Por ejemplo, los linfocitos pueden reprogramarse en células T reguladoras que pueden administrarse a un paciente que lo necesite para aumentar o transferir la tolerancia inmune, especialmente la autotolerancia. La inducción o administración de células

T positivas para Foxp3 puede ser útil para reducir las respuestas autoinmunes como el rechazo del injerto y/o reducir, inhibir o mitigar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno autoinmune como diabetes, esclerosis múltiple, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, tiroiditis, enfermedad renal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad del oído interno autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmune (ATP), enfermedad de Behcet, penfigoide ampoloso, cardiomiopatía, dermatitis-espúe celiaco, síndrome de deficiencia inmune del síndrome de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de Crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Deigo, dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes insulino dependiente (Tipo I), artritis juvenil, enfermedad de Menière, enfermedad del tejido conectivo mixta, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Los métodos pueden usarse para generar células que pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, que incluyen, pero no se limitan a enfermedades como Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cicatrización de heridas y esclerosis múltiple. Los métodos también son útiles para la regeneración de órganos y para la restauración o suplementación del sistema inmunológico. Por ejemplo, las células en diferentes etapas de diferenciación, como las células iPS, las células madre hematopoyéticas, las células multipotentes o las células unipotentes, como las células precursoras, por ejemplo, las células precursoras epiteliales, y otras pueden administrarse por vía intravenosa o mediante cirugía local. Los métodos pueden utilizarse en combinación con otros métodos convencionales, como un régimen de medicamentos recetados, cirugía, terapia hormonal, quimioterapia y/o radioterapia.

En este documento se describe un kit que incluye ARN, células y un medio para transfectar el ARN en las células. Los ARN pueden estar liofilizados o en solución. Los kits pueden incluir opcionalmente otros materiales tales como reactivos de cultivo celular. Un kit puede proporcionar células redistribuidas, desdiferenciadas o reprogramadas preparadas de acuerdo con los métodos descritos, y almacenadas y/o enviadas refrigeradas o congeladas para su uso posterior. Las células normalmente se almacenan en una solución manteniendo la viabilidad. Los kits que contienen células deben almacenarse o enviarse utilizando un método consistente con la viabilidad, como en un refrigerador que contenga hielo seco, de modo que las células se mantengan a menos de 4°C, y preferiblemente a menos de -20°C.

Los kits incluyen opcionalmente uno o más de los siguientes: agentes bioactivos, medios, excipientes y uno o más de: una jeringa, una aguja, hilo, gasa, un vendaje, un desinfectante, un antibiótico, un anestésico local, un agente analgésico, hilo quirúrgico, tijeras, un bisturí, un fluido estéril y un vaso estéril. Los componentes del kit se pueden empaquetar individualmente y pueden ser estériles. Los kits generalmente se proporcionan en un contenedor, por ejemplo, un contenedor de plástico, cartón o metal adecuado para la venta comercial. Cualquiera de los kits puede incluir instrucciones de uso. Los métodos pueden usarse para generar células que pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, que incluyen, pero no se limitan a enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. Los métodos también son útiles para la regeneración de órganos y para la restauración o suplementación del sistema inmunológico. Por ejemplo, las células en diferentes etapas de diferenciación, como las células iPS, las células madre hematopoyéticas, las células multipotentes o las células unipotentes, como las células precursoras, por ejemplo, las células precursoras epiteliales, y otras pueden administrarse por vía intravenosa o mediante cirugía local. Los métodos pueden utilizarse en combinación con otros métodos convencionales, como un régimen de medicamentos recetados, cirugía, terapia hormonal, quimioterapia y/o radioterapia.

Se divulgan los sistemas de cultivo de células madre y los métodos de diferenciación para producir células del tejido de la piel para el tratamiento de heridas, y la terapia con células madre para el tratamiento de artritis, lupus y otras enfermedades relacionadas con la autoinmunidad.

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y la invención no se limita a estos ejemplos, sino que abarca todas las variaciones que son evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en este documento.

Ejemplo 1 - Generación de plantillas de IVT

Los constructos de plásmidos para generar plantillas de transcripción in vitro (IVT) de productos de PCR lineal se construyeron utilizando la clonación independiente de ligadura (LIC). Primero construimos un plásmido parental

(pIVT) que incorpora las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' que flanquean un sitio de inserción diseñado para aceptar un inserto de marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína de interés. Las secuencias flanqueantes de ORF son las descritas en Warren et al., Cell Stem Cell, 2010, que comprenden un líder de estructura secundaria baja y un sitio de Kozak fuerte (5' UTR) y la α -globina 3' UTR. Se produjo una versión linealizada del vector pIVT que tiene salientes de 5' mediante la reconexión de dos productos de PCR amplificados del plásmido utilizando cebadores de cola. Los productos de PCR de ORF con salientes complementarios se produjeron mediante un procedimiento análogo, se combinaron con los productos de PCR del vector y se transformaron en bacterias DH5 α mediante choque térmico para clonar constructos específicos de genes (pIVT-KLF4, etc.). Los plásmidos resultantes se usaron para moldear reacciones de PCR para hacer plantillas de IVT lineales que incorporan un promotor T7, un ORF flanqueado por UTR y una cola de T₁₂₀ para impulsar la adición de una cola poliA, como se describe en Warren et al., Cell Stem Cell, 2010. The región de cola T₁₂₀ se introdujo mediante el uso de un cebador inverso de cola (T120CTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA).

Para los constructos de fusión M₃O y VPx3, las secuencias que codifican el dominio de transactivación se adjuntaron a los ORF por PCR utilizando cebadores de cola. Las existencias de plantillas de productos de PCR se mantuvieron a una concentración de ~100 ng/uL.

Ejemplo 2 - Producción de cócteles de ARNm

El proceso de síntesis de ARNm se resume en la Figura 5. El ARNm sintético se generó en las reacciones de la IVT utilizando una relación de 4:1 de análogo del cierre ARCA a GTP para generar un alto porcentaje de transcritos cerrados. La sustitución completa de 5m-CTP por CTP y Pseudo-UTP por UTP en la mezcla de nucleótido trifosfato (NTP) se empleó para reducir la inmunogenicidad de los productos de ARN. El análogo del cierre y los NTPs modificados se compraron de Trilink Biotechnologies. Se preparó una mezcla de NTP 2.5x (ARCA:ATP:5m-CTP:GTP:Pseudo-UTP a 15:15:3,75:3,75:3,75 mM) para reemplazar los NTP estándar provistos con el kit MEGAscript T7 (Ambion) utilizado para realizar las reacciones de IVT. Cada reacción de 40 uL de IVT comprendía 16 uL de mezcla de NTP, 4 uL de regulador T7 de 10x, 16 uL de plantilla de ADN y 4 uL de enzima T7. Las reacciones se incubaron 4-6 horas a 37°C y luego se trataron con 2 uL de TURBO ADNasa durante 15 minutos más a 37°C antes de purificarse en columnas de centrifugación MEGAclean (Ambion), los productos de ARN se eluyeron en un volumen de 100 uL. Para eliminar las unidades estructurales 5' de trifosfatos inmunogénicos de los transcritos no cerrados, se agregaron 10 uL de tampón de reacción de fosfatasa antártica y 3 uL de fosfatasa antártica (NEB) a cada preparación. Las reacciones de fosfatasa se incubaron durante 30 minutos a 37°C y los productos de IVT se repurificaron. Nanodrop (Thermo Scientific) cuantificó el rendimiento de ARN y, en consecuencia, las preparaciones se ajustaron a una concentración de trabajo estandarizada de 100 ng/uL mediante la adición de TE pH 7.0 (Ambion). Los cócteles de ARN se ensamblaron agrupando preparaciones que representan los diversos RF en las proporciones estequiométricas deseadas. La fracción de cada RF utilizada tuvo en cuenta el peso molecular previsto del transcripto respectivo, siendo todos los RF equimolares, excepto Oct4 y sus derivados, que se incluyeron a una concentración molar de 3x. Se añadió a los cócteles un pico del 10% de ARNm que codificaba una proteína fluorescente LanYFP monomérica nuclear de corta vida para facilitar el monitoreo de la eficacia de la transfección durante los ensayos de reprogramación.

Ejemplo 3 - Células y medios de cultivo

Las células seleccionadas para la reprogramación incluyeron fibroblastos neonatales BJ (ATCC), fibroblastos fetales HDF-f, fibroblastos neonatales HDF-n y fibroblastos adultos HDF-a (ScienCell), y fibroblastos neonatales sin xeno XFF (Millipore). El cultivo de expansión se llevó a cabo en medio BJ (DMEM + 10% de FBS), medio de fibroblastos ScienCell y medio de expansión de fibroblastos humanos libres de xeno fibroGRO (Millipore) para las células BJ, HDF y XFF, respectivamente. Las células alimentadoras utilizadas eran fibroblastos de prepucio humano neonatal irradiado 3001G (GlobalStem) y fibroblastos neonatales humanos libres de xeno inactivados con mitomicina C FibroGRO (Millipore). Las etapas de pasaje de células pertinentes a los ensayos de reprogramación basados en alimentadores libres de xeno y libres de alimentadores se realizaron utilizando TrypLE Select (Gibco), un reactivo de disociación celular libre de productos animales.

Ejemplo 4 - Reprogramación de fibroblastos humanos

Todos los experimentos de reprogramación descritos se realizaron en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos recubiertas con sustrato libre de xeno CELLstart (Gibco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los alimentadores GlobalStem se colocaron en placas a 250K por pocillo en los experimentos iniciales de reprogramación de BJ, utilizando medios BJ que contenían FBS. En algunos de los ensayos más recientes a base de alimentadores, la densidad de siembra se incrementó y los alimentadores se complementaron ad hoc durante los cambios de los medios en un esfuerzo por mantener capas de alimentadores casi confluentes en respuesta a las altas tasas de desgaste encontradas con los nuevos cócteles de RF. Los alimentadores sin xeno, cuando se utilizaron, se colocaron en medio de reprogramación a base de Pluriton sin suero. Las células diana se sembraron en placas en medio sin suero de Pluriton (Stemgent) más antibióticos, suplemento de Pluriton e inhibidor de interferón B18R 200 ng/ml (eBioscience). Los medios se reemplazaron diariamente durante y después de la reprogramación, y la suplementación con B18R se suspendió el día después de la transfección final. En

5 experimentos en los que las células se dividieron en alimentadores nuevos durante la reprogramación, se incluyó Y27632 (Stemgent) 10 μ M en el medio utilizado para resembrar. Las transfecciones comenzaron el día después de la siembra de las células diana y se repitieron a intervalos de 24 horas en las duraciones indicadas en el texto. Se administró una dosis de ARN de 1200 ng a cada pocillo utilizando RNAiMAX (Invitrogen) 4 horas antes del cambio diario de los medios, excepto que se indicara lo contrario. Los cócteles de transfección basados en RNAiMAX se prepararon mediante la dilución de 100 ng/uL de ARN 5x en DPBS libre de calcio/magnesio y 5 uL de RNAiMAX por μ g de ARN 10x en el mismo diluyente, combinando para producir una suspensión de ARN/vehículo de 10 ng/uL y dispensar a medios de cultivo después de una incubación a temperatura ambiente de 15 minutos. Para las transfecciones que utilizan el reactivo Stemfect (Stemgent), se mezclaron ARN y Stemfect (4 uL por μ g de ARN) en el tampón Stemfect para obtener una concentración de ARN de 10 ng/uL. La mezcla se incubó durante 15 minutos, luego se suministró a medios de cultivo o se refrigeró para su uso posterior.

Ejemplo 5. Caracterización de colonias iPSC

15 Para evaluar la productividad de las colonias de iPSC, los cultivos de reprogramación se fijaron usando paraformaldehído al 4% en DPBS (con calcio/magnesio) y se inmunotifieron con anticuerpo StainAlive TRA-1-60 Alexa 488 (Stemgent) diluido 100x en DPBS (con calcio/magnesio). Se realizaron ensayos de selección, expansión y posterior inmunotinción y diferenciación de colonias para la validación molecular y funcional de la pluripotencia. Se llevaron a cabo análisis de huella de ADN y de cariotipos. La formación de teratoma se realizó y confirmó en más de 20 un conjunto de modelos de ratón. De este modo, se demuestra la pluripotencia de las células madre.

25 Se describe un método novedoso para la reprogramación altamente eficiente de células no madre en células madre pluripotentes al poner en contacto las células diana con combinaciones de factores de reprogramación diseñados por ingeniería genética y factores de reprogramación no diseñados por ingeniería genética de manera tal que se puedan producir iPSCs en aproximadamente 9 días, a veces 6 o incluso 5 días. Estas células iPS se pueden producir como iPSC sin alimentadores, sin xeno y sin huella. Además de la eficiencia dramáticamente incrementada de la reprogramación por el proceso de la invención, la nueva tecnología también difiere de todas las tecnologías previamente conocidas en que las iPSC así creadas están "limpias" porque no han estado en contacto con ningún virus o vector. La utilidad de la invención se puede encontrar en prácticamente todas las áreas que involucran el 30 establecimiento de células madre, la diferenciación, la utilidad en la investigación celular y del desarrollo, así como las aplicaciones clínicas. Los procedimientos similares también pueden ser útiles en la diferenciación dirigida o la transdiferenciación.

REIVINDICACIONES

1. Un método libre de alimentadores para desdiferenciar o reprogramar una célula somática de mamífero que comprende:
- 5 transfectar la célula somática aislada con una composición que comprende: una cantidad eficaz de un ARNm sintético que codifica M_3O ; y ARNm sintético que codifica los factores de reprogramación Sox2, Klf4, cMyc-T58A, Nanog y Lin28 en combinación; por el cual la célula somática es reprogramada o diferenciada.
2. Un método para reprogramar células de mamífero usando los ARNm sintéticos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- 10 a) cultivar células diana en crecimiento a una densidad de 25k a 250k celdas/pocillo de una placa estándar de 6 pocillos en una superficie sin alimentadores o a números proporcionalmente reducidos de celdas/pocillos en pocillos de otras áreas superficiales; y
- 15 b) transfectar células con dosis variables de 50 ng a 800 ng/ml de ARNm cada vez durante la reprogramación.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las células diana se cultivan a una densidad de 50 k, 75 k, 100 k o 150 k células/pocillo de una placa estándar de 6 pocillos en una superficie sin alimentadores;
- 20 a) transfectar células con dosis variables de 50 ng a 800 ng/ml de ARNm cada vez durante la reprogramación, mientras que las dosis más bajas se usan en puntos temporales más tempranos que en puntos temporales posteriores; y
- 25 b) lograr iPSC sin pasajes.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las células diana se cultivan a una densidad de 50 k, 75 k, 100 k o 150 k células/pocillo de una placa estándar de 6 pocillos en una superficie sin alimentadores, mientras que el volumen de cada pocillo se ajusta para que esté entre 0,5 y 5 ml de medio apropiado;
- 30 a) transfectar células con dosis variables de 50 ng a 800 ng/ml de ARNm cada vez durante la reprogramación, mientras que las dosis más bajas se usan en puntos temporales más tempranos que en puntos temporales posteriores; y
- 35 b) lograr iPSC sin pasajes.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las células de mamífero son células humanas.
6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el método está libre de Xenó.
- 40 7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células somáticas se transfectan con al menos dos ARN diferentes.
8. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células somáticas se seleccionan del grupo que consiste en células unipotentes, multipotentes, pluripotentes y diferenciadas.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde uno o más ARN inducen la desdiferenciación de las células somáticas en células unipotentes, multipotentes o pluripotentes.
- 50 10. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células transfectadas se mantienen en cultivo como células madre pluripotentes inducidas (iPS).
11. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células transfectadas forman células madre pluripotentes inducidas, que comprende, además, inducir a las células iPS para que formen células diferenciadas.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende, además, los dominios de activación de transacción Rarg y LrH-1.

FIG. 1A

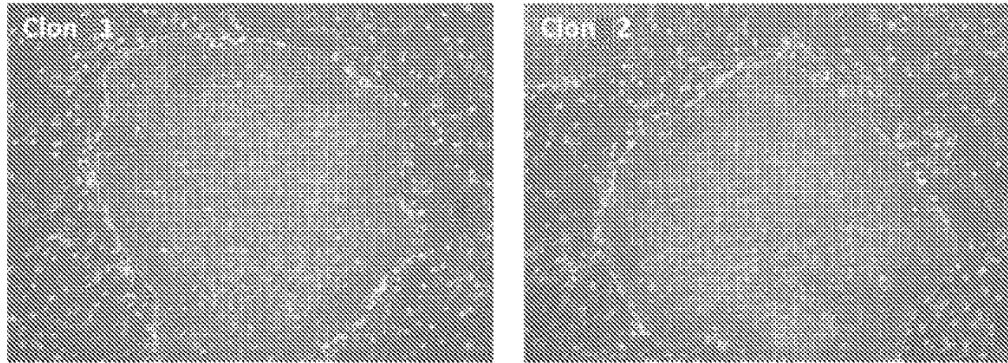


FIG 1B

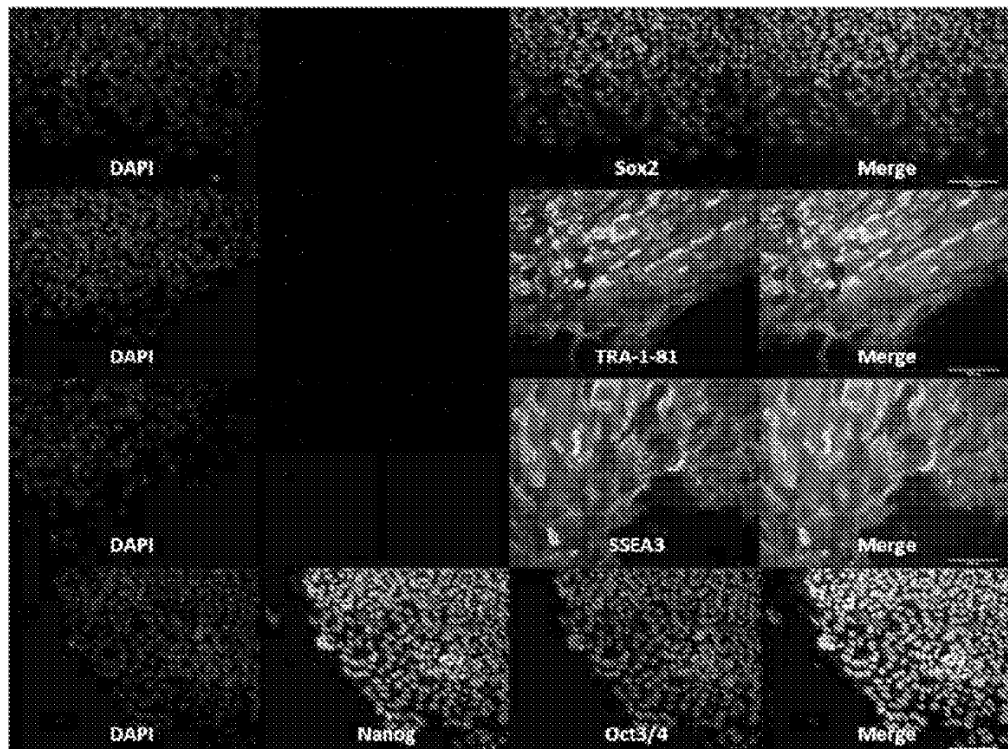


Fig. 2A

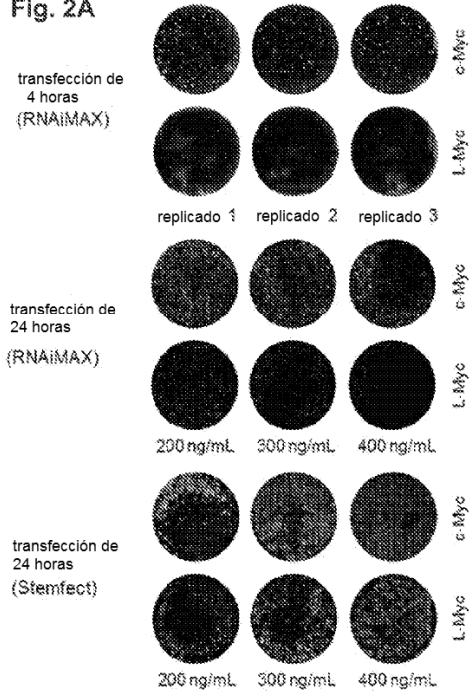


Fig. 2B

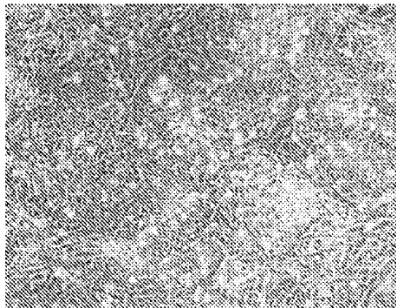
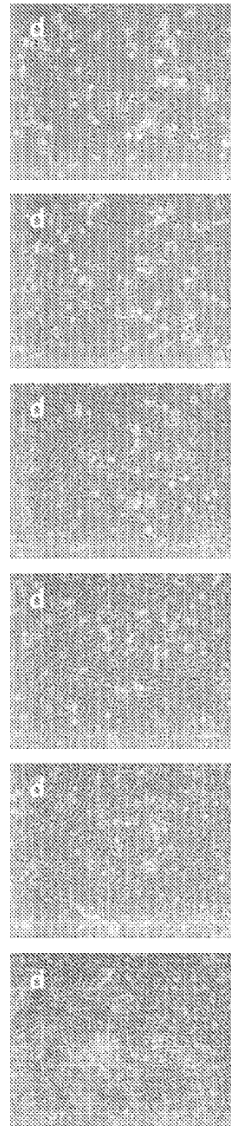
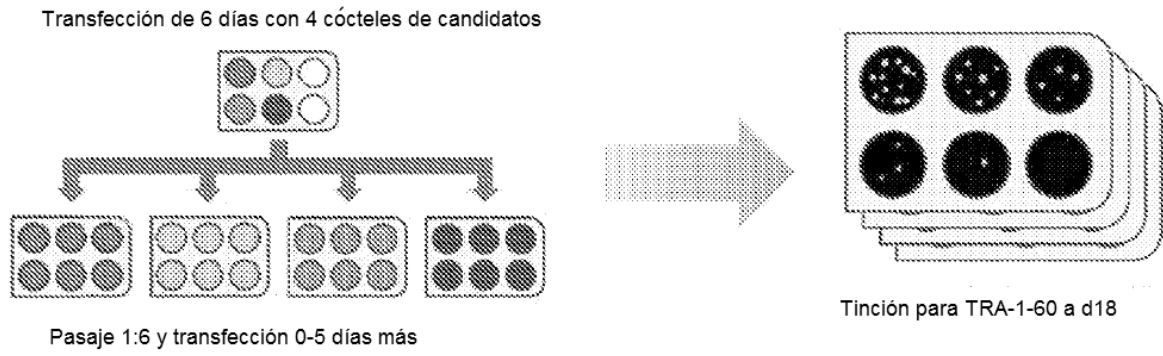


Fig 2C





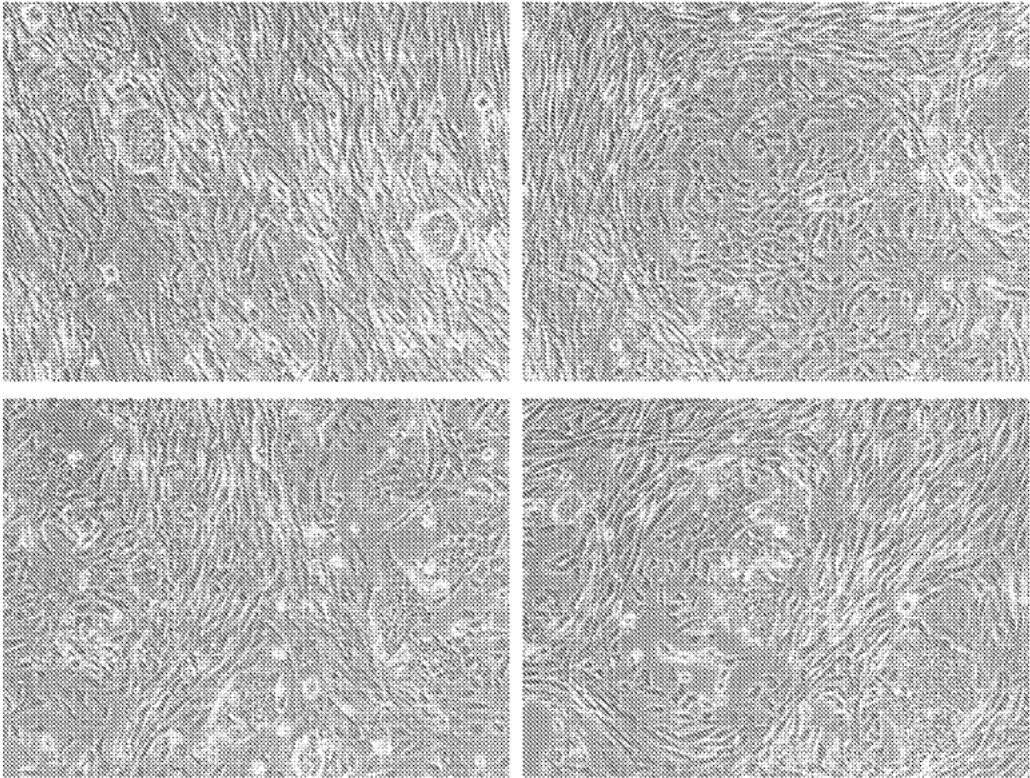


Fig. 5A

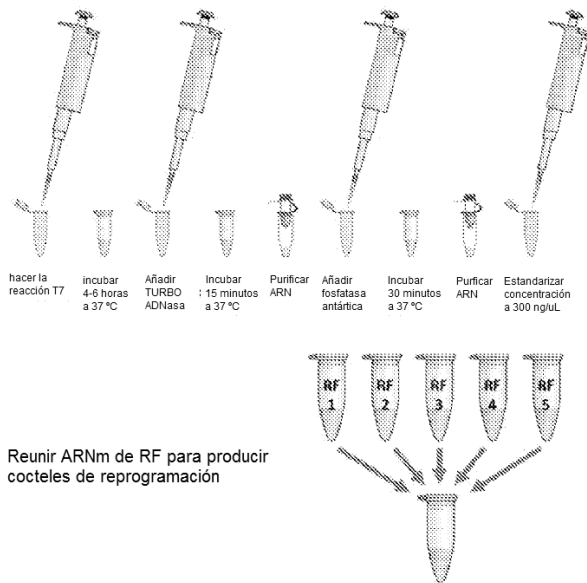


Fig 5B

