(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 733 909**

(51) Int. CI.:

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2014 PCT/US2014/011575**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14113415**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2014 E 14740745 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2946007**

(54) Título: **Reprogramación del endotelio humano en progenitores mulit-linaje hematopoyéticos mediante factores definidos**

(30) Prioridad:

15.01.2013 US 201361752688 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2019

(73) Titular/es:

CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Center for Technology Licensing at, Cornell University, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US

(72) Inventor/es:

SANDLER, VLADISLAV M. y
RAFII, SHAHIN

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

DESCRIPCIÓN

Reprogramación del endotelio humano en progenitores mulit-linaje hematopoyéticos mediante factores definidos

Antecedentes de la divulgación

Las células somáticas se han reprogramado en el estado pluripotente por transferencia nuclear (Gurdon, J. B. et al., Nature 182:64-65 (1958); Eggan, K. et al., Nature) 428:44-49 (2004), Noggle, S. et al, Nature 478:70-75 (2011)), fusión celular (Tada, M. et al., Curr Biol 11:1553-1558 (2001); Cowan, C. A. et al., Science 309:1369-1373 (2005); Blau, H. M. et al., Semin Cell Dev Biol 10:267-272 (1999)) y la expresión forzada de factores de transcripción (Takahashi, K. et al., Cell 131:861-872 (2007); Chen, M. J. et al., Cell Stem Cell 9:541-552 (2011)). Las células somáticas también se han reprogramado en células diferenciadas terminalmente tales como los mioblastos (Davis, R. L. et al, Cell 51:987-1000 (1987)), células de tipo macrófago (Xie, H. et al., Cell 117:663-676 (2004)), células beta (Zhou, Q. et al., Nature 455:627-632 (2008)), células similares a hepatocitos (Sekiya, S. et al., Nature 475:390-393 (2011)), neuronas (Vierbuchen, T. et al., Nature 463:1035-1041 (2010)) y células endoteliales (Ginsberg, M. et al., Cell 151:559-575 (2012)). Diversos grupos informaron recientemente la reprogramación directa de fibroblastos en células madre neurales/progenitores neurales multi-linaje (Han, D. W. et al., Cell Stem Cell 10:465-472 (2012); Lujan, E. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 109:2527-2532 (2012); Thier, M. et al., Cell Stem Cell 10:473-479 (2012)). Sin embargo, la conversión directa de las células somáticas en células madre y progenitoras hematopoyéticas multi-linaje funcionales injertables (HSPC, por sus siglas en inglés) funcionales ha sido difícil de lograr (Szabo, E. et al. Nature 468:521-526 (2010); Chambers, S. M. et al., Cell 145:827-830 (2011); Pereira, C. F. et al., Cell Stem Cell 13:205-218 (2013)).

Durante el desarrollo murino, las células madre hematopoyéticas definitivas (HSC, por sus siglas en inglés) se originan en la aorta dorsal dentro de la región aorta-gónada-mesonefros (AGM., por sus siglas en inglés) (North, T. E. et al., Immunity 16:661-672 (2002); de Bruijn, M. F. et al., EMBO J 192:465-2474 (2000); Medvinsky, A. et al., Cell 86:897-906 (1996)). En vertebrados, incluyendo peces cebra, murinos, y posiblemente humanos, se cree que las HSC emergen de la capa de células vasculares hemogénicas que recubren el suelo de la aorta dorsal y las arterias umbilicales (Zovein, A. C. et al., Cell Stem Cell 3:625-636 (2008); Boisset, J. C. et al., Nature 464:116-120 (2010); Bertrand, J. Y. et al., Nature 464:108-111 (2010); Kissa, K. et al., Nature 464:112-115 (2010)). Este proceso depende de la expresión del factor de transcripción (TF) RUNX1 (Chen, M. J. et al., Nature 457:887-891 (2009)). La asociación cercana de células endoteliales (EC) en desarrollo y HSPC en el concepto ha llevado a una teoría de transición EC-hematopoyética de la hematopoyesis (Zovein, A. C. et al., Cell Stem Cell 3:625-636 (2008)).

Aunque se sabe que las HSC y los progenitores eritroides/mieloides definitivos (EMP) surgen de múltiples sitios que contienen EC hemogénicas, ha sido difícil caracterizar los programas moleculares que impulsan la transición ontogenética espontánea de las EC hemogénicas primitivas a progenitores hematopoyéticos (Chen, M. J. et al., Nature 457:887-891 (2009); North, T. E. et al., Cell 137:736-748 (2009)) porque la identidad de las moléculas clave y la secuencia de su actividad sigue siendo difícil de alcanzar (Orkin, S. H. et al., Cell 132:631-644 (2008)). La expresión diferencial de los TF en la progenie de EC hemogénicas está vinculada a la decisión de desarrollo temprana de producir HSPC o EC definitivos (Chen, M. J. et al. Cell Stem Cell 9:541-552 (2011)). Sin embargo, no está claro si los TF dirigen estas decisiones sobre el destino celular o simplemente promueven programas predeterminados en las EC hemogénicas. Las señales microambientales proporcionadas por nichos anatómicos distintos, tales como los que se encuentran dentro de la AGM, el hígado fetal y la placenta, también son necesarios para la expansión fisiológica de las HSC primitivas y el desarrollo hematopoyético eficaz (Gekas, C. et al., Dev Cell 8:365-375 (2005)).

Los métodos modernos de tratamiento de trastornos sanguíneos dependen del trasplante de HSPC sanas. En la actualidad, hay dos métodos principales para producir un número suficiente de HSPC alogénicas y autólogas, ambos de los cuales tienen limitaciones: (1) expansión *ex vivo* de las HSPC (por ejemplo, HSPC de sangre de cordón umbilical); y (2) diferenciación dirigida de células pluripotentes en HSPC. La expansión *Ex vivo* de las HSPC sanas está limitada por la disponibilidad de los donantes y se complica por los métodos de purificación en el caso de trasplante autólogo y la compatibilidad con HLA en el caso de trasplante alogénico. La diferenciación dirigida de las células pluripotentes está limitada por nuestra comprensión del desarrollo del sistema hematopoyético así como la generación de EC estables, y aún no ha dado suficientes cantidades de HSPC trasplantables para adultos.

Breve resumen de la divulgación

La invención se dirige a la generación de progenitores hematopoyéticos de múltiples linajes (HMLP) a partir de células endoteliales (EC) mediante la expresión forzada de ciertos factores de transcripción en los EC y el cultivo de EC en medios libres de suero en presencia de células alimentadoras endoteliales. Los HMLP generados de acuerdo con esta invención pueden producir células eritroides, linfoides, mieloides y megacariocitos. Estos HMLP generados son capaces de injertarse en ratones y, por lo tanto, pueden usarse en el tratamiento terapéutico de trastornos que incluyen afecciones hematopoyéticas.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para generar HMLP a partir de EC humanas, que comprende cultivar EC que expresan cada uno de los factores de transcripción homólogo B de oncogén vírico de osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins (FOSB, por sus siglas en inglés), represor de transcripción factor de crecimiento independiente 1 (GFI1, por sus siglas en inglés), Factor de transcripción relacionado con Runt 1 (RUNX1, por sus siglas en inglés), oncogén de integración provírico del virus formador de foco del bazo (SPI1, por sus siglas en inglés) u homólogos funcionales o derivados de los mismos, en medios libres de suero con células alimentadoras endoteliales.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una población de HMLP producidos de acuerdo con el método de la invención, en donde los HM-LP comprenden células que son $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ o $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$ y en donde los HMLP comprenden uno o más vectores para la expresión de FOSB, GFI1, RUNX1 y/o SPI1.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende una población de HMLP de acuerdo con la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona de acuerdo con la invención una población de HMLP de acuerdo con la invención para uso en un método para tratar un trastorno hematopoyético, por ejemplo, un trastorno hematopoyético seleccionado de leucemia y linfoma.

Otras características y realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas y se describen a continuación.

En consecuencia, esta descripción proporciona métodos para generar células progenitoras de múltiples linajes hematopoyéticos humanos (HMLP) a partir de células endoteliales humanas (EC). Los métodos implican el cultivo de EC que se transforman para expresar cada uno de los factores de transcripción homólogo B de oncogén vírico de osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins (FOSB), represor de transcripción factor de crecimiento independiente 1 (GFI1), Factor de transcripción relacionado con Runt 1 (RUNX1), oncogén de integración provírico del virus formador de foco del bazo (SPI1) u homólogos funcionales o derivados de FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1, en medios libres de suero con células alimentadoras endoteliales.

Las EC que pueden usarse para generar HMLP incluyen EC fetales, neonatales, adultas y progenitoras. En algunas realizaciones, las EC se seleccionan de células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC) o células endoteliales microvasculares dérmicas adultas (hDMEC).

En algunas realizaciones, la expresión forzada de los factores de transcripción se efectúa por transducción de EC con uno o más vectores que dirigen la expresión de FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1. Al menos uno de estos vectores también puede incluir un marcador seleccionable, tales como un marcador de resistencia a los antibióticos, un marcador enzimático, un marcador de epítopo o un marcador visual. Antes de cultivar en presencia de las células alimentadoras endoteliales, las CE pueden enriquecerse para la expresión de FOSB, GFI1, RUNX1 y/o SPI1 seleccionando células que expresan al menos un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, la expresión de uno o más de FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 es inducible y/o transitoria.

Las células alimentadoras endoteliales pueden seleccionarse de una diversidad de EC. En algunas realizaciones, las células alimentadoras son células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC) transformadas para expresar un gen seleccionado de: el gen del marco de lectura abierto 1 del adenovirus E4 (E4ORF1) o el gen Akt.

Las EC se pueden cultivar en presencia de células alimentadoras endoteliales en un medio hematopoyético libre de suero, tal como un medio de células madre hematopoyéticas libres de suero. El medio hematopoyético libre de suero puede incluir factores de crecimiento y/o citocinas, particularmente bFGF, EGF, SCF, FLT3, TPO e IL-6. El medio hematopoyético libre de suero también puede incluir IGF-1, IGF-2 e IL-3. Las EC se pueden cultivar durante al menos cinco días para generar HMLP. Los HMLP se pueden aislar del cultivo celular basándose en la selección de células $CD45^+$. En algunas realizaciones, los HMLP se seleccionan por selección de células $CD45^+CD34^+$. Los HMLP generados son típicamente una mezcla heterogénea de células, pero en realizaciones particulares, una mezcla de HMLP incluye células que son $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ y/o $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$.

Además, en esta divulgación se proporcionan poblaciones de HMLP producidos de acuerdo con los métodos desvelados. Una composición que comprende HMLP producidos de acuerdo con el método de la reivindicación 1 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se proporcionan métodos para tratar trastornos hematopoyéticos, que implican la administración de HMLP generados por EC a un sujeto que necesita tratamiento. Los HMLP pueden diferenciarse en células hematopoyéticas después del trasplante en un receptor. El trastorno hematopoyético se puede seleccionar de, por ejemplo, leucemia o linfoma, Los HMLP administrados al sujeto pueden ser autólogos al sujeto o alogénicos al sujeto. Los HMLP generados de acuerdo con los métodos descritos no causan transformación maligna en un

receptor.

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1E. A. Esquema de la plataforma de reprogramación de HUVEC en progenitores multi-linaje hematopoyéticos (rEC-HMLP). Se aislaron HUVEC de cordón umbilical desechado, se clasificaron para una población pura de células endoteliales (EC) $CD45^-CD133^-cKit^-CD31^+$ marcadas fenotípicamente y expandidas para experimentación adicional (días -14 a 0). Las HUVEC se transdujeron con FGRS y se dejaron estabilizar la expresión de los transgenes (días 1-3). Las HUVEC transducidas se sembraron a $1/6^o$ densidad (día 4) y crecieron en una capa similar a un nicho vascular de $E4ORF1^+$ HUVEC (E4-HUVEC) en medios sin suero (días 12-40). Se observaron colonias planas distintas aproximadamente dos semanas después de sembrar células transducidas en una capa similar a un nicho vascular (días 12-16). A lo largo del tiempo (días 21-29), algunas de estas colonias dieron lugar a estructuras tridimensionales en forma de grapas que representan rEC-HMLP putativos. Después de un mes (días 29-40), los rEC-HMLP se expandieron profusamente, dando lugar a colonias hematopoyéticas prototípicas. El proceso de reprogramación se subdivide en dos fases: Fase I - Especificación y Fase II - Expansión. Los cultivos en expansión fueron ensayados rutinariamente para el cambio morfológico, número de células y expresión del marcador pan-hematopoyético CD45. La traza gris representa la dinámica del número de células en la reprogramación de HUVEC en rEC-HMLP. La línea negra ilustra el bajo potencial de expansión de diferenciación de las células hES-EC en progenitores hematopoyéticos. **B**. Aparición de células $CD45^+$ de tipo hematopoyético redondeadas de dos a tres semanas después de las HUVEC se transdujeran con un conjunto de TF (flechas blancas). La barra de escala es de 200 µm. **C**. La generación de agrupaciones de tipo hematopoyético a partir de HUVEC transducidas con FGRS se potencia mediante el co-cultivo con un nicho vascular y un entorno libre de suero y se bloquea por la presencia de suero**. D**. La eliminación uno por uno de los TF reveló un conjunto mínimo de factores (FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1) capaces de generar colonias de tipo hematopoyético en el cultivo HUVEC. Se evaluó un conjunto de 26 TF menos un TF para determinar la capacidad de evocar la formación de agrupaciones de tipo hematopoyético (n = 3). Los asteriscos muestran una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del número de agrupaciones de tipo hematopoyético en las HUVEC transducidas en comparación con el conjunto completo de TF. El control representa HUVEC no transducidas. Las células transducidas se cultivaron en una capa de E4-HUVEC no transducidas en medios hematopoyéticos libres de suero. **E**. La eliminación uno por uno de los factores FGRS muestra que los cuatro factores FGRS son necesarios y suficientes para la generación de colonias de tipo hematopoyético de larga duración.

Figuras 2A-2E. A. El análisis FACS de la monocapa vascular alimentadora de E4-HUVEC GFP HUVEC transducidas FGRS GFP^+ mixtas muestra que GFP^+ las células hematopoyéticas nacientes pierden la expresión de CD31 (un marcador de células endoteliales maduras) y adquieren fenotipo hematopoyético $CD45^+$ y $CD45^+$ $CD34^+$. Los porcentajes en los gráficos de puntos en fuente gris se refieren a la puerta en el gráfico de puntos superior izquierdo (células GFP^+). Los porcentajes en los gráficos de puntos en fuente negra se refieren a células GFP^-. **B**. Análisis inmunofenotípico de HUVEC reprogramadas FGRS. Las células hematopoyéticas emergentes se analizaron para determinar la expresión de marcadores de linaje, CD45RA, CD45, CD34, CD90 y CD38. Se muestran dos poblaciones de células $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ y $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-$ $CD34^+$, que satisfacen los criterios fenotípicos para células hematopoyéticas similares a células madre o progenitores multipotentes, respectivamente. **C**. Al final de la Fase I, cuatro semanas después de la transducción de FGRS y la inducción de nicho vascular, las células GFPCD45CD34 se clasificaron y se sembraron para los ensayos de UFC. Las colonias hematopoyéticas típicas surgieron en el ensayo UFC (aumento x4); campo ancho (columna izquierda) e imágenes fluorescentes correspondientes (columna derecha). De arriba hacia abajo: granulocítico-eritroide-monocítico-megacariocítico (GEMM), Colonias eritroides/mieloides y macrófagos granulocíticos (GM). Las imágenes del panel inferior muestran colonias hemoglobinizadas. El gráfico muestra la cuantificación del ensayo de UFC. **D**. La tinción de Wright-Giemsa de una citocentrífuga de células obtenidas a partir de las colonias del ensayo UFC confirmó la especificación del linaje de rEC-HMLP diferenciados (aumento x60). Los presentes inventores detectaron células con características morfológicas típicas de precursores eritroide, macrófago, granulocito y megacariocito. **E**. El análisis inmunofenotípico de células cultivadas en el ensayo UFC reveló la presencia de células $CD235^+$, $CD11b^+$, $CD14^+$, $CD83^+$ y $CD45^+$, sugiriendo que los rEC-HMLP se diferenciaron en progenies eritroides, de macrófago, de monocito y de células dendríticas.

Figuras 3A-3G. A. Se inyectaron células reprogramadas ($1,5X10^6$ de células $CD45^+GFP^+$) se inyectaron retro-orbitalmente en ratones irradiados sub-letalmente (275 Rad) (n = 9; un día después de la radiación). **B.** Se detectaron células $CD45^+$ humanas circulantes en la sangre periférica de los ratones inyectados a las 2, 5, 12 y 16 semanas. Las células $CD45^+$ humanas circulantes se detectaron las semanas 2 (n = 7; 17,38 ± 7,73 %), 5 (n = 6; 15,1 ± 13,39 %), 12 (n = 6; 14,14 ± 5,44 %) y 22-40 (n = 6; 21,23 ± 22,27 %). Los ratones injertados de 22-44 semanas (hasta 10 meses) se usaron para análisis adicionales de la mielodisplasia y los cambios fibróticos. **C**. El análisis de la sangre periférica, la médula ósea y el bazo 16 semanas después del trasplante revelaron la presencia de células $CD45^+$ humanas en los tres tejidos y células eritroides $hCD45^-hCD235^+$ en sangre periférica. Se muestran los resultados para BM. BM y el bazo estaban poblados por la progenie mieloide de rEC-HMLP ($CD45^+CD33^+$) con un número pequeño pero fácilmente detectable de células $CD41a^+$ (megacariocitos)**. D**. El análisis FACS del cultivo de metilcelulosa reveló que el compartimiento $CD45^-$ contenía células $CD235^+$

(Glicoforina A) y no Ter119$^+$ de ratón lo que sugieren una fuerte diferenciación eritroide de células CD45 $^+$CD34$^+$ humanas en el ensayo de UFC. **E**. Análisis fenotípico de rEC-HMLP injertados *in vivo* en médula ósea que muestran una pequeña población de células humanas que están marcadas fenotípicamente como CD45$^+$Lin$^-$ CD45RA$^-$CD38$^-$CD90$^-$CD34$^+$ y satisfacen la definición de progenitores multipotentes (MPP). **F**. Identificación de la integración vírica a nivel de una sola colonia. Se usaron células Lin$^-$CD45RA$^-$CD38$^-$CD90$^-$CD34$^+$ para un ensayo de UFC. Catorce días después del inicio del ensayo de UFC se detectaron 3 agregaciones/colonias celulares distintas. Se realizaron cuatro reacciones de PCR para cada colonia amplificada usando su ADN genómico como plantilla. Revelaron la integración de los cuatro vectores víricos de FGRS usados para la reprogramación (imagen inferior; Letras F-FOSB, G-GFI1, R-RUNX1, S-SPI1 muestran productos de PCR específicos para cada uno de estos factores en la primera colonia.). **G**. Identificación de la integración vírica a nivel de una sola célula. Amplificación del genoma completo (WGA) de 21 células CD45$^+$ humanas aisladas de un ratón hospedador 22 semanas después del trasplante. Las células se clasificaron en una placa de 96 pocillos, con 1 célula por pocillo, directamente en un tampón de lisis para la WGA basada en Phi29. WGA se siguió por una reacción de PCR con cebadores específicos para el promotor de CMV y el transgén. Se muestra la cuantificación del análisis. Diecinueve células mostraron integración de los cuatro virus (FGRS). Dos células mostraron integración de tres virus: FGS (RUNX1 era indetectable) y GRS (FOSB era indetectable).

Figuras 4A-4F. A. Representación esquemática *in vitro* e *in vivo* de pruebas funcionales de los rEC-HMLP derivados de hDMEC. Al final de la Fase I, cuatro semanas después de la transducción de FGRS, los rEC-HMLP se clasificaron y se sembraron para los ensayos de UFC. Las colonias hematopoyéticas típicas surgieron en el ensayo UFC (la barra de escala es de 200 µm); campo ancho (fila superior). Las imágenes del panel inferior muestran colonias hemoglobinizadas. La tinción de Wright-Giemsa de una citocentrífuga de células obtenidas de las colonias de ensayo UFC (aumento x60) se muestra en la fila inferior. La gráfica en el panel de la derecha muestra la cuantificación del ensayo UFC (n = 3). **B**. Análisis inmunofenotípico de células cultivadas en el ensayo UFC. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación de la expresión del marcador de superficie en las células del ensayo UFC (n = 3). hD-MEC se diferenciaron en varios linajes, incluyendo progenie celular eritroide CD235$^+$, macrófago CD11b$^+$, monocito CD14$^+$, mieloide CD33$^+$, endotelial CD144$^+$ y dendrítico CD83$^+$. **C**. Ratones NSG inmunodeficientes neonatales de dos semanas de edad se irradiaron sub-letalmente (100 rads) y se trasplantaron con rEC-HMLP derivados de hDMEC ($5x10^4$ células). El análisis de la sangre periférica de ratones a las 4, 6 y 12 semanas después del trasplante primario reveló una progenie CD45$^+$ humana circulante así como su progenie mieloide y eritroide (n = 6). **D**. El análisis del bazo de ratones a las 14 semanas después del trasplante primario reveló la presencia de progenie humana CD45$^+$ así como sus progenies linfoide (CD19$^+$ y CD56$^+$) y mieloide (CD11b$^+$ y CD41a$^+$) (n = 3). Gráfico más a la derecha: primera columna, hCD45$^+$ (%) medido contra el eje y a mano izquierda; siguientes cuatro columnas, $\log_2$ (% de hCD45$^+$) medido contra el eje y a mano derecha. **E.** El análisis de la médula ósea de ratones a las 14 semanas después del trasplante primario reveló la presencia de células CD45$^+$ humanas con pequeñas poblaciones tanto de CD45$^+$Lin$^-$CD45RA$^-$CD38$^-$ CD90$^+$CD34$^+$ como de y/o CD45$^+$Lin$^-$CD45RA$^-$CD38$^-$CD90$^-$CD34$^+$ que satisfacen la definición fenotípica de HSC humanas y progenitores multipotentes (MPP), respectivamente (n = 3). **F.** Después de 12 semanas, toda la médula ósea de los ratones trasplantados con rEC-HMLP derivados de hDMEC se trasplantaron de forma secundaria en ratones NSG adultos (6-8 semanas de edad). El análisis de la sangre periférica de ratones a las 3 y 5 semanas después del trasplante secundario reveló progenie CD45$^+$ humana circulante así como su progenie mieloide (n = 6). Gráfico más a la derecha: primeras dos columnas, hCD45$^+$ (%) medido contra el eje y a mano izquierda; última columna, hCD33$^+$ (%) medido contra el eje y a mano derecha.

Figuras 5A-5C. A. El perfil global de transcripción de genes descubre los genes hematopoyéticos que están activados y los genes vasculares que se silencian en CD45$^+$ rEC-HLMP, así como en rEC-HMLP CD45$^+$CD34$^+$ injertados *in vivo* después de 22 semanas después del trasplante. Ambas poblaciones se comparan con la expresión génica de HUVEC y células CD34$^+$Lin$^-$ del cordón umbilical. Los datos se presentan como $\log_2$ (nivel de transcripción). **B.** Comparación de la expresión de genes prototípicos de pluripotencia en HUVEC, rEC-HLMP CD45$^+$, rEC-HMLP CD45$^+$CD34$^+$ después de 22 semanas después del trasplante y células CD34$^+$Lin$^-$ con células madre embrionarias humanas (hESC). Los genes prototípicos de pluripotencia, tales como Oct4, Nanog, Sox2 y Myc no se regularon positivamente en las células reprogramadas en comparación con hESC y HUVEC no diferenciadas, lo que indica que la reprogramación de HUVEC en rEC-HMPL se logró sin la transición a través de un estado pluripotente. **C**. Análisis de ontología de genes (GO) de los sitios vinculados por SPI1 junto con GFI1 y SPI1 por separado. Cada gráfico muestra grupos de genes GO que pueden estar implicados en el cambio de la identidad celular de EC a rEC-HMLP. Los motivos de unión al ADN consenso ($p<0,01$) para los factores de reprogramación y posibles candidatos se muestran debajo de cada gráfico de grupo. Todos los valores de los genes regulados positiva o negativamente son $|\log_2$ (rEC-HMLP/HUVEC)$| \geq 2$.

Figuras 6A-6B. A. rEC-HMLP se diferencian en células hematopoyéticas CD3$^+$, CD19$^+$ y CD14$^+$ en ausencia de expresión exógena de SPI1. Las células reprogramadas se transfirieron a una capa de células estromales de médula ósea (OP9) que expresan tipo Delta 4 (OP9-DL4) y se cultivaron en presencia de medios hematopoyéticos libres de suero (véase Métodos) suplementados con IL-7 (10 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml) e IL-2 (5 ng/ml) y ausencia de doxiciclina. **B.** Los macrófagos diferenciados de rEC-HMLP son capaces de realizar fagocitosis. Las imágenes muestran grupos de células CD11b$^+$GFP$^+$ firmemente adherentes al plástico con perlas ingeridas claramente visibles. Columnas de imágenes de izquierda a derecha: Fluorescencia de GFP;

núcleos de las células teñidas con DAPI, perlas fluorescentes; Tinción con CD11b; Imagen combinada de cuatro paneles a la izquierda. La barra de escala es de 15 µm.

Descripción detallada de la divulgación

En el presente documento se proporcionan métodos para reprogramar células endoteliales (EC) en progenitores multi-linaje hematopoyéticos (HMLP o rEC-HMLP). Los métodos incluyen el cultivo de células EC con un conjunto de factores de transcripción (TF), incluyendo FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 (FGRS) que reprograman eficazmente las EC tales como las EC de la vena umbilical humana (HUVEC) y las EC microvasculares dérmicas (hDMEC) de humanos adultos en HMLP.

Los progenitores hematopoyéticos multi-linaje (HMLP), como se hace referencia en el presente documento, son células que tienen la capacidad o el potencial de generar, o diferenciarse en, múltiples tipos de células del linaje hematopoyético. Los linajes hematopoyéticos y las células diferenciadas abarcadas por estos linajes, son células de linaje mieloide, que incluyen eritrocitos, monocitos, macrófagos, megacariocitos, mieloblastos, células dendríticas y granulocitos (basófilos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos); y las células del linaje linfoide, que incluyen linfocitos T/células T, linfocitos B/células B y linfocitos citolíticos naturales. Los HMLP generados por los métodos descritos en el presente documento tienen la capacidad de generar células hematopoyéticas de linajes mieloides y linfoides, incluyendo células T, células B, eritrocitos, monocitos, macrófagos, megacariocitos, mieloblastos, células dendríticas y granulocitos.

Los HMLP como se desvela en el presente documento tienen la capacidad de injertar (establecer residencia) y proporcionar una repoblación a largo plazo de células hematopoyéticas después del trasplante en un receptor. Los HMLP divulgados mantienen su potencial de linajes múltiples después del injerto y también son capaces de un injerto posterior de un receptor a uno o más receptores adicionales, sin dejar de mantener el potencial multi-linaje. La capacidad para el injerto a largo plazo (por ejemplo, durante 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 16 semanas o 20 semanas o más después del trasplante), el mantenimiento del potencial multilinaje y el injerto secundario, son cada uno altamente deseables en una población celular para la aplicación en el tratamiento de trastornos hematopoyéticos.

Los HMLP se pueden definir mediante la expresión de marcadores de superficie celular. Aunque los HMLP representan una población heterogénea de células, las células se caracterizan en parte por la expresión de CD45 (es decir, las células son $CD45^+$). En una realización particular, los HMLP son $CD45^+CD34^+$. Los HMLP pueden ser además $CD90^+$ y/o $CD38^+$.

Los HMLP generados de acuerdo con esta invención no son homogéneos y contienen una mezcla de tipos de células, mostrando cada tipo de celda distintos marcadores de celda, morfologías distintas y/o distintos niveles de diferenciación. En realizaciones específicas, los HMLP contienen al menos una célula progenitora capaz de diferenciarse en una célula de linaje mieloide y/o linfoide. En una realización particular, una población de HMLP contiene de al menos un 0,01 % a al menos un 0,4 % del número total de células en la población, o de al menos 10 células por millón a al menos 250 células por millón en la población, de células progenitoras que expresan los marcadores $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ y/o células progenitoras que expresan los marcadores $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$.

Métodos de Generación de HMLP

En los métodos desvelados en el presente documento, los HMLP se generan reprogramando las células endoteliales (EC) para proporcionar HMLP reprogramados derivados de células endoteliales (rEC-HMLP, también denominados en el presente documento HMLP). Como se usa en el presente documento, "reprogramación" se refiere a un proceso genético por el cual las células somáticas diferenciadas se convierten en células des-diferenciadas que tienen una mayor potencia que las células de las que derivaron. Las EC se reprograman obligando a las células a expresar factores de transcripción específicos que alteran el estado de diferenciación de las células en un tipo de célula progenitora hematopoyética.

Las células endoteliales que se pueden usar para generar HMLP incluyen EC maduras (por ejemplo, EC neonatales, fetales y adultas) y células progenitoras endoteliales (EPC). Las fuentes ejemplares de EC incluyen EC microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) de dermis adulta o prepucio neonatal, EC de vena umbilical humana/sangre de cordón umbilical (HUVEC), EC de la arteria umbilical humana (HUAEC), EC aórticas humanas (HAoEC), EC de la arteria coronaria humana (HCAEC), EC de la arteria pulmonar humana (HPAEC), EC de vena safena humana (HSVEC), EC de sangre dérmica humana (HDBEC), EC linfáticas dérmicas humanas (HDLEC), EC microvasculares de la vejiga humana (HBMEC), EC microvasculares cardiacas humanas (HCMEC), EC microvasculares pulmonares humanas (HPMEC), EC microvasculares uterinas humanas (HUMEC), EC microvasculares cerebrales humanas (HBMEC) y EC microvasculares de placenta fetal (HPMEC). Estas células son positivas al factor de Von Willebrand (vWF), CD31 positivas, CD144 positivas, negativas a alfa-actina del músculo liso (SMA). Las EC microvasculares fetales se definen además como células microvasculares fetales que tienen los marcadores $CD34^+CD133^+VEGFR2^+CD45^-$ (véase, Sölder E. et al., Microvasc. Res. 84:65-73 (2012)). Las células

progenitoras endoteliales incluyen aquellas células progenitoras capaces de diferenciarse en células endoteliales maduras y caracterizadas por $CD34^{+}VEGFR2^{+}$ y posiblemente también $CD133^{+}CD45^{-}$ (Urbich C. y Dimmeler S., Circ. Res. 95:343-353 (2004)). En una realización preferida, Las EC son HUVEC o hDMEC.

Las EC usadas en la invención pueden ser alogénicas (derivadas de un donante que es genéticamente similar, pero no idéntico, a un receptor que va a recibir células reprogramadas, por ejemplo, de la misma especie), singénicas (derivadas de un donante que es genéticamente idéntico o estrechamente relacionado, a un receptor que va a recibir células reprogramadas) o autólogas (el donante y el receptor son el mismo individuo).

Factores de reprogramación

La expresión (incluyendo la sobreexpresión y la expresión forzada) de los factores de transcripción (TF) identificados en el presente documento puede reprogramar EC a HMLP. La expresión de al menos FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 (estos cuatro factores se denominan colectivamente en el presente documento "FGRS" o "factores de reprogramación"), o sus respectivos homólogos funcionales o derivados funcionales, se requiere para generar HMLP desde EC.

El FOSB (homólogo B del oncogén vírico del osteosarcoma murino de Finkel-Biskis-Jinkins) es una proteína de cremallera de leucina que dimeriza con proteínas de la familia JUN para formar el complejo de factor de transcripción AP-1. FOSB también se conoce como AP-1, G0S3, GOS3 o GOSB. FOSB tiene al menos seis isoformas variantes de corte y empalme. Como ejemplo, la secuencia para una variante FOSB humana específica, isoforma 1 de FOSB, se establece en el N.º de registro de GenBank CAG46898.

GFI1 (represor de transcripción independiente del factor de crecimiento 1) es un miembro de una familia de proteínas de dedo de cinc que funcionan como represores transcripcionales. Los represores de dedos de zinc de la familia GFI forman complejos heterotriméricos como EHMT2-GFI1-HDAC1, AJUBA-GFI1-HDAC1 y RCOR-GFI-KDM1A-HDAC que reprimen mediante el reclutamiento de la histona desacetilasa una serie de genes responsables de la especificación del desarrollo de células sanguíneas de múltiples linajes. GFI1 también se conoce como SCN2, GFI-1, GFI1A y ZNF163. Hay al menos cuatro isoformas de variante de empalme conocidas de GFI1. Como ejemplo, la secuencia para una variante de GFI1 humana específica, isoforma 1, se establece en el N.º de registro de GenBank AAH32751.

RUNX1 (Factor de transcripción relacionado con Runt 1) es la subunidad alfa del factor de unión al núcleo (CBF), un factor de transcripción heterodimérico que se une al elemento central de muchos potenciadores y promotores. La familia RUNX comprende una serie de TF de unión a CBF, tales como RUNX2, RUNX3, CBFB, CEBP/Z, NFY/B, NFA/A, NFY/C y RBPJ. Hay al menos tres isoformas variantes de corte y empalme de RUNX1. RUNX1 también se conoce como AML1, AML1-EVI-1, AMLCR1, CBFA2, EVI-1 y PEBP2aB. Como ejemplo, la secuencia para una variante RUNX1 humana específica, isoforma 1, se establece en el N.º de registro de GenBank AAI36381.

SPI1 (oncogén de integración provírica del virus de formación de foco de bazo (SFFV)) es un factor de transcripción del dominio ETS. SPI1 pertenece a una familia de factores de transcripción con codificación de dominio ETS que incluye SPIB, ETV6, ETS1, ETV2 y ERG. Hay al menos tres variantes de corte y empalme de SPI1. SPI1 también se conoce como hCG_25181, OF, PU.1, SFPI1, SPI-1, y SPI-A. Como ejemplo, la secuencia para una variante SPI1 humana específica, isoforma 1, se establece en el N.º de registro de GenBank EAW67924.

Los derivados funcionales y los homólogos de los factores de transcripción a los que se hace referencia específicamente en el presente documento se contemplan adicionalmente para su uso en los métodos desvelados. Como se usa en el presente documento, un "derivado funcional" es una molécula que posee la capacidad de realizar la función biológica de un TF desvelado en el presente documento, es decir, una molécula que es capaz de sustituir funcionalmente el TF divulgado, por ejemplo, en la reprogramación de EC a HMLP. Los derivados funcionales incluyen fragmentos, partes, porciones, equivalentes, análogos, mutantes, miméticos de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes incluyendo proteínas de fusión. Los derivados pueden ser derivados de inserción, eliminación o sustitución de aminoácidos. Los derivados de inserción de aminoácidos incluyen fusiones terminales amino y/o carboxílicas, así como inserciones de secuencia intrínseca de aminoácidos sencillos o múltiples. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de inserción son aquellas en las que uno o más residuos de aminoácidos se introducen en un sitio predeterminado en la proteína aunque también es posible la inserción aleatoria con una selección adecuada del producto resultante. Las variantes de eliminación se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes de aminoácidos de sustitución son aquellas en las que se ha retirado al menos un residuo de la secuencia y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Las adiciones a las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones con otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

Una variante de una molécula pretende referirse a una molécula sustancialmente similar en estructura y función a la molécula completa, o a un fragmento de la misma. Por consiguiente, como el término variante se usa en el presente documento, dos moléculas son variantes entre sí si poseen una actividad similar incluso si la estructura de una de las moléculas no se encuentra en la otra, o si la secuencia de residuos de aminoácidos no es idéntica. El término variante incluye, por ejemplo, variantes de corte y empalme o isoformas de un gen. Debe entenderse que los

equivalentes incluyen una referencia a moléculas que pueden actuar como un análogo o agonista funcional. Los equivalentes pueden no necesariamente derivar de la molécula en cuestión, pero pueden compartir ciertas similitudes conformacionales. Los equivalentes también incluyen miméticos de péptidos.

Un "homólogo" es una proteína relacionada con una segunda proteína por el descenso de una secuencia de ADN ancestral común. Un miembro de la misma familia de proteínas (por ejemplo, la familia FOS, la familia GFI, la familia SPI o la familia RUNX) puede ser un homólogo. Un "homólogo funcional" es una proteína relacionada o un fragmento de la misma que es capaz de realizar la actividad biológica del gen deseado, es decir, es capaz de sustituir funcionalmente el TF divulgado en la reprogramación de EC a HMLP. Los homólogos y homólogos funcionales contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limita a, proteínas derivadas de diferentes especies.

Un derivado funcional u homólogo puede tener un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos FOSB, GFI1, RUNX1 o SPI1 conocidas, o un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con un miembro de la familia FOSB, GFI1, RUNX1 o SPI1 o variante de los mismos. Un derivado funcional u homólogo de FOSB puede tener, por ejemplo, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con el N.º de registro de GenBank CAG46898. Un derivado u homólogo funcional de GFI1 puede tener, por ejemplo, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con el N.º de registro de GenBank AAH32751. Un derivado funcional u homólogo de RUNX1 puede tener, por ejemplo, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con el N.º de registro de GenBank AAI36381. Un derivado funcional u homólogo de SPI1 puede tener, por ejemplo, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con el N.º de registro de GenBank EAW67924.

Se pueden usar otros TF además de los factores de reprogramación de FGRS. Por ejemplo, se puede usar uno o más de los siguientes TF además de FGRS: ZPF36 (proteína de dedo de cinc tristetraprolina), FOS (homólogo del oncogén vírico de osteosarcoma murino FBJ), JUNB (proto-oncogén jun B), GMFG (factor de maduración de la glía, gamma), KLF2 (factor 2 similar a Kruppel), NFE2 (factor nuclear, eritroide 2), KLF1 (factor 1 similar a Kruppel), KLF4 (factor 4 similar a Kruppel), LYL1 (secuencia derivada de leucemia linfoblástica 1), LMO2 (solo dominio LIM 2), TALI (leucemia linfocítica aguda de células T 1), GATA1 (proteína de unión a GATA 1), IKZF1 (dedo de cinc de la familia IKAROS 1), GFI1B (represor de transcripción 1B independiente del factor de crecimiento), VAV2 (factor de intercambio de nucleótidos de guanina vav 2), MEIS1 (Meis homeobox 1), MYB (homólogo del oncogén vírico de la mieloblastosis aviar v-myb), MLLT3 (leucemia mieloide/linfoide o de linaje mixto (homólogo a tritórax, Drosophila); translocado a, 3), HLF (factor de leucemia hepática), BEX1 (expresado en cerebro, ligado a X 1), BEX2 (expresado en cerebro, ligado a X 2) y/o PBX1 (homeobox 1 de la leucemia de células pre-B) o derivados funcionales u homólogos de cualquiera de estos TF.

Vectores para expresión de factores de reprogramación

La expresión de los factores de reprogramación FGRS se efectúa mediante la introducción de ácidos nucleicos exógenos en una EC para dirigir la expresión de los factores deseados en la EC. Cada factor de reprogramación puede introducirse en la EC como un transgen polinucleotídico dentro de un vector que codifica el factor de reprogramación operativamente unido a un promotor heterólogo que puede dirigir la expresión del polinucleótido en la EC.

Hay disponibles muchos vectores útiles para transferir genes exógenos a células de mamíferos diana. Los vectores pueden ser episómicos, por ejemplo, plásmidos o vectores derivados de virus tales como el vector de citomegalovirus, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado (AAV), etc., o los vectores pueden ser integradores, por ejemplo, integrando el gen de reprogramación en el genoma de la célula diana, por recombinación homóloga o integración aleatoria, por ejemplo, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV (Virus de la Leucemia Murina de Moloney), VIH-1, ALV (virus de la leucosis aviar) o vectores lentivíricos. En una realización específica, el vector es un vector lentivírico.

En una realización, un vector para expresar el factor de reprogramación comprende un promotor unido operativamente al gen del factor de reprogramación. La frase "unido operativamente" o "bajo control transcripcional" como se usa en el presente documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido. Varios promotores son adecuados para su uso en los vectores para expresar el factor de reprogramación, incluyendo, pero no limitado a, promotor de ARN pol I, promotor de ARN pol II, promotor de ARN pol III y promotor de citomegalovirus (CMV). Otros promotores útiles son discernibles para un experto en la materia. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor inducible que permite controlar cuándo se expresa el factor de reprogramación. Los ejemplos adecuados de promotores inducibles incluyen promotores regulados por tetraciclina (tet on o tet off) y promotores regulados por esteroides derivados de receptores de glucocorticoides o estrógenos. La expresión constitutiva de TF se puede lograr usando, por ejemplo, vectores de expresión con un promotor de CMV, CAG (promotor de beta-actina de pollo con potenciador de CMV) o PGK (fosfoglicerato quinasa 1). La expresión inducible de TF se puede lograr usando, por ejemplo, un promotor sensible a la tetraciclina, tal como el promotor

inducible TRE3GV (elemento de respuesta a Tet de 3a generación) (Clontech Laboratories, Mountain View, CA). Como alternativa, el promotor unido operativamente al transgén puede ser un promotor que se activa en tipos de células específicos y/o en puntos particulares del desarrollo.

Dependiendo del promotor usado, la expresión de uno cualquiera, o todos, los factores de reprogramación de FGRS pueden ser constitutivos (expresión continua del factor) o inducibles (capaces de activarse y desactivarse). La expresión también puede ser transitoria, es decir, expresión temporal del gen de reprogramación de interés en EC a lo largo de un período de tiempo limitado. La expresión transitoria se puede lograr mediante el uso de un vector no integrador, donde el vector se pierde de la célula o de la población celular a lo largo del tiempo, o mediante el uso de un promotor inducible en un vector integrador o no integrador que puede manipularse para detener la expresión del gen de reprogramación después de un período de tiempo. En una realización específica, la expresión transitoria de uno o más de los factores de reprogramación de FGRS se emplea para generar la expresión durante no más de tres días, no más de cinco días, no más de 10 días o no más de una, dos o tres semanas.

Los vectores adecuados pueden contener marcadores para identificar y/o seleccionar células transformadas. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen marcadores visuales como la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína fluorescente roja (RFP) o la fluoresceína; marcadores de epítopo tales como His, c-myc, GST, Bandera, o etiquetas de alta disponibilidad; marcadores enzimáticos/nutricionales tales como DHFR (dihidrofolato reductasa); o marcadores de resistencia a los antibióticos tales como la neomicina, puromicina, blasticidina o higromicina.

Transformación de células endoteliales con factores de reprogramación

Se puede utilizar cualquier medio adecuado para transfectar o transducir células endoteliales con factores de reprogramación. Para diversas técnicas de transformación o transfección de células de mamíferos, véase Keown et al., 1990, Methods Enzymol., 185: 527-37; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vectores que llevan FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 pueden transfectarse en células usando métodos convencionales conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, transfección mediada por liposomas, transfección mediada por polibreno, transfección mediada por DEAE dextrano, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección o bombardeo de micropartículas. De forma similar, FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 se pueden administrar a las células endoteliales utilizando un sistema de administración vírico tal como el lentivirus, adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados o sistema de administración de herpesvirus. En una realización preferida, las EC se transfectan por uno, dos, tres o cuatro vectores lentivíricos que dirigen la expresión de FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1.

Las EC que expresan uno, dos, tres o los cuatro factores de reprogramación de FGRS pueden enriquecerse en la población seleccionando las células que expresan marcadores indicativos de células transformadas. Por ejemplo, cada factor de reprogramación se puede colocar en un vector separado con un marcador de selección distinto (por ejemplo, los vectores pueden proporcionar resistencia a diferentes antibióticos, diferentes marcadores visuales y/o diferentes marcadores nutricionales). Por selección para cada marcador que representa la transformación con los diferentes vectores, la población de EC transformada con los cuatro factores puede aumentarse. En un ejemplo específico, vectores distintos, codificando cada vector un factor de reprogramación diferente, están marcados por la resistencia a los antibióticos o la proteína verde fluorescente (GFP), respectivamente.

Condiciones de cultivo para la reprogramación de EC

Las EC transformadas con FGRS se cultivan preferentemente con suero mínimo o sin suero en los medios de cultivo (medios "sin suero"). Los inventores han descubierto que la presencia de suero en los medios reduce la producción de HMLP. Las EC transformadas se pueden cultivar en medios sin suero adecuados para el cultivo y la expansión de células hematopoyéticas. Tales medios pueden basarse, por ejemplo, en el Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM) u otros medios de cultivo adecuados, y puede incluir suplementos tales como la albúmina sérica bovina convencional, insulina, 2-mercaptoetanol y/o transferrina (por ejemplo, STEMSPAN SFEM, Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá). Los suplementos adicionales pueden incluir un suplemento de reemplazo de suero con una formulación definida para el crecimiento de células indiferenciadas, por ejemplo, Reemplazo de suero KNOCKOUT (GIBCO). Las EC se pueden cultivar durante tres días, cinco días, diez días, doce días, una semana, dos semanas, o tres semanas o más, para reprogramar las EC en HMLP.

Los suplementos de medios adicionales para lograr la reprogramación de EC pueden incluir factores de crecimiento y/o citocinas, tales como 2-8 ng/ml de bFGF, 5-15 ng/ml de EGF, 15-25 ng/ml de SCF, 15-25 ng/ml de FLT3, 15-25 ng/ml de TPO, 15-25 ng/ml de IGF-1, 5-15 ng/ml de IGF-2, 5-15 ng/ml de IL-3 y/o 5-15 ng/ml de IL-6. En un ejemplo preferido, el medio de cultivo incluye 2-8 ng/ml de bFGF, 5-15 ng/ml de EGF, 15-25 ng/ml de SCF, 15-25 ng/ml de FLT3, 15-25 ng/ml de TPO y 5-15 ng/ml de IL-6.

Células alimentadoras endoteliales

Las EC que expresan al menos los factores FGRS se cultivan con células alimentadoras endoteliales. Estas células alimentadoras proporcionan un entorno de nicho similar a AGM (aorta-gónada-mesonefros) que se asemeja al

entorno fisiológico en el que se produce la programación de EC. Preferentemente, las células alimentadoras endoteliales se hacen crecer para formar una monocapa confluente en el fondo del recipiente de cultivo de tejidos y después el recipiente de cultivo se siembra con EC transformadas. Cualquier célula endotelial se puede utilizar como una célula alimentadora, tales como EC maduras (por ejemplo, EC neonatales, fetales y adultas) y células progenitoras endoteliales (EPC). Las fuentes ejemplares de EC incluyen EC microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) de dermis adulta o prepucio neonatal, EC de la vena umbilical/sangre de cordón umbilical (HUVEC) y EC microvasculares de la placenta fetal (hPMEC). En una realización preferida, las HUVEC se utilizan como células alimentadoras endoteliales.

Las células alimentadoras son preferentemente capaces de crecer y sobrevivir en un entorno libre de suero para permitir el cultivo con EC en medios libres de suero. Muchos tipos de células endoteliales no pueden mantenerse en cultivo en ausencia de suero. La modificación de las células endoteliales para permitir la supervivencia y la proliferación para su uso como células alimentadoras en un cultivo sin suero puede superar esta barrera en las células endoteliales que de otro modo requerirían suero.

Las células endoteliales pueden modificarse, por ejemplo, por transformación de células con genes que impulsan el crecimiento y la proliferación en ausencia de suero. Los ejemplos de genes que soportan la supervivencia de células endoteliales en cultivo sin suero incluyen el gen Akt (proteína quinasa B o PKB) y el gen E4ORF1 de adenovirus. En una realización específica, Las HUVEC se transforman para expresar un gen seleccionado de Akt o el gen E4ORF1 de adenovirus. La transformación de HUVEC con E4ORF1 se describe en la Patente de EE.UU. N.º 8.465.732, los contenidos de la cual se incorporan en el presente documento por referencia. La transformación de HUVEC con Akt se desvela, por ejemplo, en Fujio y Walsh, J. Biol. Chem. 274:16349-16354 (1999), los contenidos del cual se incorporan en el presente documento por referencia.

Se puede usar cualquier medio adecuado para transfectar o transducir células endoteliales con genes que promuevan la supervivencia y la proliferación en un ambiente libre de suero. Por ejemplo, el gen E4ORF1 o Akt se puede transfectar en células usando métodos convencionales conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, transfección mediada por liposomas, transfección mediada por polibreno, transfección mediada por DEAE dextrano, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección o bombardeo de micropartículas. De forma similar, el gen E4ORF1 o Akt puede administrarse a las células endoteliales utilizando un sistema de administración vírica tales como el lentivirus, adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados o sistema de administración de herpesvirus. En una realización, el gen E4ORF1 o Akt se administra a las células endoteliales utilizando un sistema de administración de genes lentivíricos.

Las células alimentadoras se pueden cultivar en medios de crecimiento endoteliales (por ejemplo, Medio 199, Thermo Scientific: n.º FB-01), con 10-30 % de suero bovino fetal (Omega Scientific), suplemento de células endoteliales de 15-25 µg/ml (disponible, por ejemplo, de Biomedical Technologies: n.º BT-203), 0,5-2X Pen/Strep y 15-25 unidades/ml de heparina (por ejemplo, Sigma: n.º H3149-100KU). Las células alimentadoras pueden colocarse en una capa sobre la superficie de un recipiente de cultivo y, preferentemente una vez que se establece una capa confluente de células alimentadoras en el recipiente de cultivo, el medio de crecimiento endotelial se reemplaza por medio sin suero y las EC que expresan factores de reprogramación pueden colocarse en la parte superior de la capa de alimentación.

Por ejemplo, las HUVEC maduras (o hDMEC) pueden transducirse con los factores de reprogramación de FGRS y después, 2-3 días después, se lavaron y se volvieron a colocar en las monocapas establecidas de los alimentadores E4-HUVEC. La transducción de $5x10^4$ EC maduras puede generar múltiples colonias distintas de HMLP durante el co-cultivo sin suero con E4-HUVEC.

Aislamiento de HMLP del cultivo

Los HMLP se pueden aislar del cultivo para su uso posterior. En una realización, los HMLP se aíslan aislando células $CD45^+$. En otra realización, los HMLP se aíslan aislando células $CD45^+CD34^+$. Los HMLP pueden aislarse, por ejemplo, por clasificación celular y separación de células $CD45^+$ de un co-cultivo de HMLP con células alimentadoras endoteliales (que son CD45-).

Los HMLP pueden aislarse del cultivo como una población heterogénea/mixta (por ejemplo, una población de células en las que diferentes células de la población expresan marcadores distintos además de la expresión de $CD45^+$ o $CD45^+CD34^+$) o como una población relativamente homogénea/sustancialmente pura (por ejemplo, una población de células donde hay más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 % o más del 98 % de las células expresan un conjunto común de marcadores además de la expresión de $CD45^+$ o $CD45^+CD34^+$).

Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

Esta divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas de HMLP generados por EC con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede contener además de las células una matriz

fisiológicamente aceptable o un vehículo fisiológicamente aceptable. El tipo de matriz y/o vehículo dependerá, entre otras cosas, de la ruta de administración prevista. Las matrices y/o vehículos adecuados son conocidos en la técnica. Tales composiciones pueden congelarse y almacenarse, por ejemplo, en nitrógeno líquido, utilizando métodos establecidos para almacenar células madre o células de la sangre del cordón umbilical. En un ejemplo preferido, se proporcionan composiciones farmacéuticas para infusión intravenosa en un paciente.

Además, se proporcionan métodos de tratamiento que utilizan los HMLP generados por EC y las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento. Los HMLP proporcionados en el presente documento son adecuados para reconstituir células hematopoyéticas en un sujeto o para proporcionar poblaciones de células enriquecidas en los tipos de células hematopoyéticas deseadas. Los HMLP de la presente invención se pueden usar para reconstituir el abanico completo de células hematopoyéticas en un sujeto inmunocomprometido siguiendo terapias tales como, pero no limitado a, tratamiento de radioterapia y quimioterapia. La administración de los HMLP divulgados, tales como por infusión o trasplante en un sujeto, puede aumentar o reemplazar las células madre o progenitoras del hígado, de páncreas, de riñón, de pulmón, del sistema nervioso, del sistema muscular, de huesos, de médula ósea, de timo o de bazo. Los trasplantes de HMLP pueden ser autólogos o alogénicos, incluyendo trasplantes hematopoyéticos de tipo HLA coincidentes y no coincidentes. Se aprecia que puede ser necesario tratar al hospedador para reducir el rechazo inmunológico de las células del donante.

El sujeto o individuo puede ser cualquier animal que necesite terapia basada en células. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates no humanos, ratones, vacas, caballos, perros, gatos y similares. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la administración de las células expandidas proporcionadas en el presente documento a un paciente, una cantidad eficaz de células expandidas puede variar desde unos pocos cientos o menos hasta varios millones o más. Se apreciará que el número de células expandidas a administrar variará dependiendo de los aspectos específicos del trastorno a tratar, Incluyendo pero no limitado a tamaño o volumen total a tratar, así como las necesidades y condiciones del receptor, entre otros factores familiares al profesional médico. En algunas realizaciones, se administran o trasplantan entre 10^3 y 10^{10} células por 100 kg de persona al sujeto o individuo. Los métodos de administración o trasplante son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, infusión. Las células expandidas proporcionadas en el presente documento pueden administrarse, por ejemplo, por infusión intravenosa.

En una realización, los HMLP se usan para aumentar o reemplazar las células de la médula ósea en el trasplante de médula ósea. Los trasplantes de médula ósea autóloga y alogénica humana se utilizan actualmente como terapias para enfermedades tales como leucemia, linfoma y otros trastornos que amenazan la vida. El inconveniente de estos procedimientos, sin embargo, es que se debe extraer una gran cantidad de médula ósea del donante para asegurar que haya suficientes células para el injerto. La presente invención reduce o elimina la necesidad de una gran donación de médula ósea, sustituyendo o suplementando una donación de médula ósea con HMLP generados por EC para infusión o trasplante en un receptor.

En algunas realizaciones, se proporciona una sola administración de células. En otras realizaciones, se usan múltiples administraciones. Pueden proporcionarse múltiples administraciones durante periodos de tiempo periódicos tales como un régimen de tratamiento inicial de 3 a 7 días consecutivos y después repetirse en otros momentos.

Ejemplos

Cultivo celular. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron como se describe en Goldberg, A. D. et al., (Cell) 140:678-691 (2010). Las HUVEC se cultivaron en medios de crecimiento endotelial (EM): Medio 199 (Thermo Scientific: n.º FB-01), 20 % de suero bovino fetal (Omega Scientific), suplemento de células endoteliales de 20 µg/ml (Biomedical Technologies: n.º BT-203), IX Pen/Strep y 20 unidades/ml de heparina (Sigma: n.º H3149-100KU). Las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas primarias adultas (hDMEC) se adquirieron en ScienCell Research Laboratories (n.º de cat 2020). Se hicieron medios hematopoyéticos sin suero de StemSpan SFEM (Stemcell Technologies), 10 % de reemplazo de suero KnockOut (Invitrogen), 5 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de EGF, 20 ng/ml de SCF, 20 ng/ml de FLT3, 20 ng/ml de TPO, 20 ng/ml de IGF-1, 10 ng/ml de IGF-2, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de IL-6 (todos de Invitrogen, eBioscience o Peprotech).

Purificación de progenitores de sangre de cordón humano. La sangre del cordón umbilical humano se obtuvo bajo el protocolo IRB "Diferenciación específica de etapa de células madre hematopoyéticas en tejido hemangiogénico funcional" (Weill Cornell Medical College IRB n.º 09060010445). Las células mononucleares de sangre de cordón se purificaron por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (GE) y se enriquecieron para progenitores $CD34^+$ utilizando separación magnética utilizando microperlas anti-CD34 (Miltenyi). La purificación adicional se logró mediante la selección negativa de Lin^+ células que utilizan el kit de enriquecimiento de células progenitoras humanas (StemCell Technologies). El ARN se extrajo de células $Lin^-CD34^+CD45^+$ aisladas mediante FACS usando el kit de aislamiento de ARN Arcturus PicoPure (Applied Biosystems; este kit se usó para todos los procedimientos de extracción de ARN).

Citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó en un Becton Dickenson LSRII SORP y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se realizó en un Aria II SORP. Los anticuerpos usados se produjeron contra CD45, CD34, CD14, CD31, CD43, CD90, CD41a, CD33, CD19, CD3, CD4, CD8, CD235, CD45RA, CD83, CD11b, CD38, Cóctel LIN, CD117, CD133, CD144 humanos (BD Pharmingen, eBioscience) o CD45 de ratón (eBioscience). Los ajustes de voltaje y la compensación se realizaron con CompBeads (BD Pharmingen) y la selección se realizó en los controles de fluoróforo menos uno (FMO) y los controles sin teñir.

Identificación de factores de transcripción que se expresan diferencialmente entre células endoteliales y células progenitoras hematopoyéticas. Para identificar las condiciones que son esenciales para la especificación hematopoyética, los presentes inventores realizaron la secuenciación de ARN en HUVEC recién aisladas y progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón humano Lin^-CD34^+ para identificar TF expresados diferencialmente. Se identificaron 26 TF expresados diferencialmente (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de transcripción (TF) que se expresan diferencialmente entre HUVEC y células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón humano (CB) Lin^-CD34^+.

TF	HUVEC	$CD34^+Lin^-$ (CB)
ZFP36	4,81	12,4
FOS	3,82	12,36
JUNB	6,26	12,17
GMFG	5,33	10,3
KLF2	7,7	10,28
FOSB	1,51	10,28
NFE2	0	9,45
KLF1	0	9,29
KLF4	0	9,22
LYL1	8,55	9,03
LMO2	7,24	8,87
TAL1	6,2	8,31
GATA1	0	8,18
SPI1	0	8,04
IKZF1	0	7,83
GFI1B	0	7,7
VAV1	0	7,67
MEIS1	3,23	6,75
MYB	0,23	6,47
MLLT3	4,21	6,4
RUNX1	0,21	6,23
GFI1	0	5,54
HLF	0	4,67
BEX1	2,52	4,47
PBX1	4,24	4,88
BEX2	0,03	3,95

Vectores lentivíricos. Los factores de transcripción candidatos se subclonaron en cualquiera de los lentivectores pLVX-IRES-Zs Green1 (Clontech), lentivector pLOC (OpenBiosystems) o lentivector LV105 (Genecopoeia). Las

partículas lentivíricas se empaquetaron como se describe en Sandler, V. M. et al., PLoS One 6:e18265 (2011). En resumen, células de riñón embrionario humano 293FT (HEK293FT) se co-transfectaron con un lentivector y dos plásmidos auxiliares, psPAX2 y pMD2.G (Trono Lab a través de Addgene), en una proporción molar igual. El sobrenadante se recogió 48-52 horas después de la transfección, se filtró y se concentró usando un concentrador Lenti-X (Clontech). Los títulos víricos se determinaron en experimentos de dilución limitante usando HUVEC como células diana. Los presentes inventores usaron el número de células GFP^+ o el número de colonias formadas en presencia de antibióticos de selección (puromicina) como una lectura del número de partículas víricas infecciosas por volumen. Los presentes inventores usaron MOI 5-10 para la infección de HUVEC o células hES derivadas de EC y 10-25 para la infección de fibroblastos.

Las HUVEC y los HEF (fibroblastos embrionarios humanos) se transdujeron con lentivirus que expresan SPI1 y se expandieron en presencia de puromicina (0,5 a 1 µg/ml) durante 10-14 días para obtener un número suficiente de células. Los cuatro lentivirus que expresaban FGRS se re-suspendieron en medios de cultivo de células endoteliales y se aplicaron a las células alimentadoras. 12-24 horas más tarde las EC transducidas se suministraron con medios de cultivo de EC adicionales. 2-3 días después, las EC transducidas después de la transducción se volvieron a colocar encima de las células alimentadoras.

Se examinaron varias combinaciones de los 26 TF identificados para identificar aquellos capaces de reprogramar HUVEC en células hematopoyéticas. Para eliminar la contaminación potencial de los cultivos de HUVEC iniciales con células hematopoyéticas, los presentes inventores clasificaron HUVEC recién aisladas para obtener EC $CD45^-CD133^-cKit^-CD31^+$ maduras (Figura 1A). En ausencia de TF expresados exógenamente, estas HUVEC nunca dan lugar a células hematopoyéticas $CD45^+$. Por lo tanto, los presentes inventores usaron la emergencia de células $CD34^+CD45^+$ como la lectura inicial para identificar las células que adquirieron potencial hematológico. Los vectores lentivíricos que expresan los TF identificados con un marcador de proteína fluorescente verde (GFP) o un gen resistente a la puromicina se usaron para transducir HUVEC (Figura 1A). Las HUVEC transducidas se propagaron después sin suero en presencia de citocinas hematopoyéticas (TPO, KITL, FLT3L; véase Métodos). Aproximadamente 2 semanas después de la transducción, los cultivos de HUVEC revelaron la emergencia de células GFP^+CD45^+ redondas (Figura 1B) y comenzaron a emerger colonias redondeadas tipo uva de células GFP^+CD45^+ a partir de la monocapa endotelial (Figura 1A, Día 12-16).

Identificación de los factores de transcripción necesarios para la reprogramación de EC. Las HUVEC se transformaron con 25 TF a la vez, careciendo cada transformación de un TF diferente como se identifica en la Tabla 1. Este "abandono uno por uno" sistemático de los TF candidatos demostró que la reprogramación hematopoyética requería la expresión forzada de FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 (esta combinación denominada "FGRS") (Figura 1D, n = 3). Los otros TF candidatos no fueron requeridos. Los presentes inventores descubrieron que los TF FGRS solos fueron suficientes para la generación de colonias de tipo hematopoyético (Figura 1E, n = 3). La retirada de uno cualquiera de los factores FGRS no eliminó completamente la formación de agrupaciones de tipo hematopoyético, pero redujo significativamente el número de agrupaciones ($p < 0,05$) y las células de tipo hematopoyético emergentes no se dividieron activamente.

Diseño de una capa de alimentación para mejorar y mantener el crecimiento de las EC transducidas con FGRS. Las EC y las HSPC se desarrollan en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM). Debido a que las HSC primitivas requieren un nicho adecuado para la expansión en el feto en desarrollo, las células alimentadoras de nichos vasculares pueden mejorar la supervivencia y sostener la especificación de las células de tipo hematopoyético emergentes. Para probar esta hipótesis, los presentes inventores usaron un modelo *in vitro* del nicho vascular para permitir el cultivo libre de suero y factor de crecimiento de HUVEC mediante la expresión del gen E4ORF1 del complejo E4 de adenovirus (E4-HUVEC), según lo descrito por Butler, J. M. et al., (Blood) 120:1344-1347 (2012). El presente grupo y otros han demostrado que las E4-HUVEC mantienen su soporte de nicho para células hematopoyéticas primitivas, HSPC $cKit^+Lin^-Sca1^+CD34^-Flt3^-$ de ratón y $Lin^-CD45RA^-CD38^-CD34^+CD49f^+$ de humano, que son capaces de injertar receptores primarios y secundarios letalmente irradiados.

Usando este sistema de co-cultivo de nicho vascular, los presentes inventores idearon una plataforma libre de xenobióticos en la que las HUVEC (o hDMEC) maduras se transdujeron con los factores de reprogramación de FGRS y después, 2-3 días después, se lavaron y se volvieron a colocar en las monocapas establecidas de los alimentadores E4-HUVEC. La transducción de $5x10^4$ HUVEC maduras produjo 32,3 ± 10,5 (n = 8) colonias distintas durante el cocultivo sin suero con E4-HUVEC pero no se observaron colonias si se añadió suero. Las HUVEC indiferenciadas no eran adecuadas como nicho vascular porque no podían sobrevivir en un cultivo sin suero durante más de 1-2 semanas, previniendo que los FGRSEC se beneficien del soporte de nicho vascular durante la reprogramación. De hecho, las colonias de tipo hematopoyético GFP^+ emergentes de co-cultivos con HUVEC indiferenciadas (3,4 ± 3,2 colonias por $5X10^4$ HUVEC transducidas; n = 5) no fueron más comunes que el crecimiento a partir de FGRS-EC en ausencia de células alimentadoras.

Los E4-HUVEC proporcionan un entorno necesario para el cultivo de los FGRS-EC. El co-cultivo de EC transducidas con FGRS (FGRS-EC) con E4-HUVEC aumentó significativamente el rendimiento y la persistencia de las colonias de tipo hematopoyético que finalmente manifestaron características morfológicas y moleculares de rEC-HMLP. Por consiguiente, la generación eficiente de células hematopoyéticas a partir de FGRS-EC requirió señales de apoyo a

largo plazo de EC con función de tipo nicho.

Por estas razones, los presentes inventores usaron la plataforma de alimentación de nicho vascular E4-HUVEC para una mayor caracterización de la reprogramación hematopoyética de EC transducidas con FGRS. La transducción de $5x10^4$ EC durante 2 días y el posterior co-cultivo con E4-HUVEC durante 3 semanas, dio lugar a la emergencia de 32,3 ± 10,5 (n = 8) colonias distintas (Figura 1C). Estos datos sugieren que las células vasculares de soporte son esenciales para la emergencia de células hematopoyéticas de las EC transducidas con FGRS.

Confirmación de la expresión de FGRS TF en células cultivadas. Sin tener en cuenta la estequiometría adecuada del FGRS que se introdujo en las EC sin diferenciar, la eficiencia de la reprogramación fue muy baja y se acercó a menos del 0,07 %. Por lo tanto, para mejorar la eficiencia de la reprogramación, los presentes inventores desarrollaron una estrategia para seleccionar aquellos subconjuntos de EC transducidas con FGRS que se transdujeron con una estequiometría adecuada de los TF. Inicialmente los presentes inventores se centraron en generar EC con la estequiometría adecuada de GFI1, SPI1 y FOSB TF, porque su expresión nativa en EC es despreciable (véase la Tabla 1). Para hacer esto, los presentes inventores transdujeron $5x10^6$ EC con "cóctel" lentivírico FGRS marcado por resistencia a la puromicina (SPI1) o GFP (FOSB y GFI1). Después los presentes inventores aplicaron la selección de puromicina durante 2 días para enriquecer las células que expresan SPI1 y las clasificaron para que la expresión de GFP se enriqueciera para $SPI1^+GFP^+$ (FOSB/GFI1) EC. Después sembraron estas células GFP^+ en placas de 12 pocillos y las expandieron durante dos días en un cultivo sin suero (10^5 células por placa, n = 3).

Después volvieron a colocar en placa 10^4 de las células resistentes a puromicina GFP^+ en una capa alimentadora de E4-HUVEC en medios hematopoyéticos y cuantificaron el número de grupos hematopoyéticos después de ~ 20 días de co-cultivo. Los presentes inventores descubrieron que estas células resistentes a puromicina GFP^+ produjeron 156,0 ± 3,6 (n = 3) colonias de tipo hematopoyético por 10^4 células re-colocadas en placa sugiriendo que la eficiencia de la reprogramación fue de al menos el 1,5 %. Este cálculo supone que cada colonia se origina a partir de una única célula reprogramada y que las EC transducidas, que se sabe expresan dos de los factores (SPI1 y cualquiera/ambos de FOSB o GFI1), expresan cada una los cuatro FGRS TF. La eficiencia es probablemente mucho más alta en las células que expresan las cantidades estequiométricas apropiadas de cada factor. Por lo tanto, es muy poco probable que el presente enfoque de reprogramación se deba a la diferenciación espontánea de una población preexistente muy escasa de EC hemogénicas/hemangioblásticas presentes dentro de las monocapas de HUVEC.

Un nicho vascular de apoyo facilita la reprogramación de FGRS-EC en progenitores eritroide-megacariocítico-mieloide multi-linaje proliferativos. Dentro de tres a cuatro semanas de co-cultivo con E4-HUVEC, los FGRS-EC comenzaron a proliferar rápidamente y formaron racimos en forma de uva GFP^+ parcialmente unidos a monocapas E4-HUVEC. La tinción de Wright-Giemsa de las agrupaciones similares a uvas reveló células morfológicamente reminiscentes a los progenitores hematopoyéticos y su progenie (Figura 1B, panel derecho). Ocasionalmente los presentes inventores también observaron la formación de grandes estructuras de nichos de múltiples colonias que se separaron físicamente de las colonias hematopoyéticas en desarrollo de su entorno (n = 4). La citometría de flujo mostró que la mayoría de la progenie de FGRS-EC (células GFP^+) perdió la expresión del marcador EC maduro, CD31, y un subconjunto adquirió la expresión del marcador pan-hematopoyético CD45, a veces en combinación con CD34 co-expresado (Figura 2A, n = 9). Por el contrario, la E4-HUVEC GFP^- retuvo la expresión de CD31 de alto nivel y se mantuvo $CD34^+CD45^-$. Un subconjunto de la progenie GFP^+CD45^+ FGRS-EC expresó otros marcadores hematopoyéticos, tales como $CD43^+$ (8,96 % ± 2,3; n = 3), $CD90^+$ (Thy-1^+) (6,15 % ± 1,13; n = 3) y $CD14^+$ (40,0 % ± 4,95; n = 3). La proliferación de las células GFP^+ aumentó cerca del final de un co-cultivo de cuatro a cinco semanas con E4-HUVEC, dando como resultado la generación de hasta $20x10^6$ células GFP^+CD45^+, aproximadamente una expansión de 400 veces los EC de entrada (Figura 3A; $17,2x10^6$±2,4; n = 6). De tres a cinco días después, tanto la tasa de proliferación como el número de células viables disminuyeron rápidamente, Aunque la generación de GFP^+CD45^+ continuó a un ritmo disminuido. Por lo tanto, un nicho vascular de soporte de células E4-HUVEC facilita la reprogramación de FGRS-EC en progenitores eritroide-megacariocíticos-mieloides multi-linaje proliferativos (rEC-HMLP).

rEC-HMLP pueden generar células precursoras eritroides, de macrófago, de granulocito y de megacariocito. Para evaluar la funcionalidad de rEC-HMLP, los presentes inventores realizaron ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando ensayos convencionales de metilcelulosa. Si las HUVEC se convirtieran efectivamente en rEC-HMLP funcionales, entonces estas células deberían poder diferenciarse en al menos dos linajes hematopoyéticos distintos en el ensayo de UFC. Cuatro semanas después de la transducción de HUVEC con FGRS y co-cultivos de nicho vascular, los rEC-HMPL $GFP^+CD45^+CD34^+$ se clasificaron y sembraron a una densidad de 1200-1600 células/cm^2 (5000-7000 células/placa de 35 mm) para ensayos de UFC (n = 3). En 14 días las células dieron lugar a agregaciones de células GFP que se parecen morfológicamente a UFC-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos), UFC-GEMM (unidades formadoras de colonias de granulocitos/eritrocitos/monocitos/megacariocitos) y colonias hematopoyéticas de tipo BFU-E parcialmente hemoglobinizadas (unidad de formación de estallido-eritroide, un tipo de progenitor eritroide) (Figura 2C). La especificación del linaje en el ensayo de UFC se verificó tiñendo las colonias con Wright-Giemsa (Figura 2D). Los presentes inventores pudieron detectar células con características morfológicas típicas de precursores de eritroide,

de macrófago, granulocitos y megacariocitos como se define en Beutler, E., ed., Williams Hematology; McGraw Hill, Inc. (Quinta edición, 1995).

El análisis inmunofenotípico de las colonias obtenidas de cultivos de metilcelulosa reveló la presencia de CD235, CD11b, CD14, CD83 y células CD45 que sugieren que los rEC-HMLP se diferenciaron en progenie eritroide, de macrófago, de monocito y de células dendríticas. Las células $CD235^+$ (glicoforina A) también fueron $CD45^-$ sugiriendo la diferenciación eritroide (Figura 2E).

Las células endoteliales microvasculares dérmicas adultas humanas son capaces de formar HSC autólogas. Para probar si el presente método es aplicable para la reprogramación de EC que no sean HUVEC, los presentes inventores usaron células endoteliales microvasculares dérmicas adultas humanas (hDMEC). La reprogramación de hDMEC en rEC-HMLP trasplantables es más relevante para posibles aplicaciones clínicas futuras porque podría permitir la generación de progenitores hematopoyéticos autólogos trasplantables para la reconstitución de la médula ósea. Además, como las EC de adultos pueden contener un número decrecientemente bajo de EC hemogénicas, este enfoque muestra que una CE madura, pero no una EC hemogénica o hemangioblástica, está siendo reprogramado a células hematopoyéticas.

Las hDMEC se transdujeron con los factores FGRS y se sometieron a inducción vascular en un entorno sin suero (el mismo protocolo utilizado para la reprogramación de HUVEC). Para evaluar la funcionalidad *in vitro* de las hDMEC reprogramadas, los presentes inventores realizaron un ensayo de UFC. Cuatro semanas después de la transducción de hDMEC con FGRS, las células $GFP^+CD45^+CD34^+$ se clasificaron y sembraron a la densidad de 1200-1600 células/cm^2 para ensayos de UFC (n = 3). En 12-14 días, las células dieron lugar a agregaciones celulares que se parecen morfológicamente a UFC-GM, UFC-GEMM, BFU-E parcialmente hemoglobinizado y colonias mixtas (Figura 4A). La especificación del linaje en el ensayo de UFC se verificó tiñendo las colonias con Wright-Giemsa. Los presentes inventores fueron capaces de detectar células con morfologías de precursores típicos eritroides, de macrófago, de granulocitos y de megacariocitos (Figura 4A). El análisis inmunofenotípico de las colonias obtenidas a partir de cultivos de metilcelulosa reveló la capacidad de las rEC-HMLP derivadas de las hDMEC para diferenciarse en varios linajes, incluyendo progenie celular eritroide $CD235^+$ (58,66 ± 3,47 %), macrófago $CD11b^+$ (10,39 ± 3,05 %), monocito $CD14^+$ (10,87 ± 1,28) y células dendríticas $CD83^+$ (7,94 ± 0,80 %) (Figura 4B).

Las HUVEC no pueden generar espontáneamente células similares a rEC-HMLP. Para excluir la posibilidad de que las HUVEC puedan contener células hemogénicas o hemangioblásticas que puedan generar espontáneamente células de tipo rEC-HMLP, los presentes inventores realizaron dos series de experimentos.

En primer lugar, los presentes inventores generaron cultivos clonales mediante la clasificación fenotípicamente marcada de HUVEC maduras en densidades de una sola célula, dos células, cinco células y 10 células por pocillo. Para lograr esto, los presentes inventores realizaron una citometría de flujo de varios colores y se clasificaron las HUVEC CD144 (cadherina VE)$^+$$CD31^+$E-selectina$^+$$CD45^-$ en la configuración de 1, 2, 5 y 10 células en placas de 96 pocillos. La E-selectina (CD62E) solo se expresa en las EC maduras y está ausente en cualquier célula hematopoyética o no vascular. Estas colonias se expandieron luego en cultivos celulares >10000 (para clones de 5 y 10 células), > 5000 células (clon de 1 célula n.º 1 y clones de 2 células) y >3000 células (clon de 1 célula n.º 2). La transducción de cultivos de una célula, de dos células, de cinco células y cultivos de diez células con FGRS seguidos de un co-cultivo con E4-HUVEC dieron como resultado la aparición de colonias de tipo hematopoyético similares a las colonias observadas en experimentos de cultivos de HUVEC mixtos. Debido a que la E-selectina solo se expresa en EC activadas diferenciadas terminalmente maduras, es poco probable que las EC "hemogénicas o hemangioblásticas" contaminantes estuvieran presentes en las poblaciones clonales de HUVEC transducidas con FGRS y pudieran haber dado lugar a células hematopoyéticas.

En el segundo conjunto de experimentos, los presentes inventores cultivaron HUVEC en medios libres de suero que se usaron para experimentos de reprogramación. Los presentes inventores compararon la proliferación, así como la expresión de CD45 y CD34 en las HUVEC en respuesta a la eliminación del suero y la adición combinatoria de citocinas hematopoyéticas en los medios de cultivo. Ni extracción de suero, ni la adición de cócteles óptimos de citocinas hematopoyéticas causó ninguna expresión detectable de CD45 en HUVEC. Sin embargo, tanto las extracciones de suero solas y/o como combinadas con la inhibición de la señalización de TGFβ causaron un aumento significativo de la expresión de CD34 en las HUVEC que mantienen su identidad vascular. En su conjunto, estos datos indican que es poco probable que FGRS reprograme células precursoras hemogénicas o hemangioblásticas preexistentes dentro de las HUVEC, sino más bien que el protocolo de inducción vascular FGRS TF + dirige la conversión de las EC $CD144^+CD31^+$E-selectina$^+$$CD45^-$ diferenciadas terminalmente en células hematopoyéticas.

Los rEC-HMLP pueden generar HSPC fenotípicamente correctas y células progenitoras multipotentes. Un análisis fenotípico más detallado de los rEC-HMLP reveló pequeñas poblaciones de células que eran $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-$ $CD90^+CD34^+$ o $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$, satisfaciendo así los criterios para HSPC marcados fenotípicamente o progenitores multipotentes, respectivamente, como lo define Chao, M. P. et al., (Cold Spring Harb Symp Quant Biol) 73:439-449 (2008) (Figura 2B, n = 3).

Las células $CD45^+$ tienen potencial de expansión. Los presentes inventores compararon el potencial de expansión de células $CD45^+$ y $CD45^-$ en medio hematopoyético libre de suero. Las células $CD45^+$ ($12x10^3$) y $CD45^-$ ($60x10^3$) se clasificaron en pocillos separados y se expandieron durante dos días. Los presentes inventores observaron una expansión de 5 veces de células $CD45^+$ ($56,6\ x10^3 \pm 7,9\ x10^3$; n = 3) y una dramática reducción de células $CD45^-$ ($4,6\ x10^3 \pm 1,0\ x\ 10^3$; n = 3). Para examinar el potencial de las células $CD45^+$ y $CD45^-$ para la expansión clonal, se clasificaron en placas de 96 pocillos con una densidad de 1 o 2 células/pocillo. Después de siete días de cultivo los presentes inventores observaron una expansión celular $CD45^+$ en 6,3 ± 2,1 pocillos (93,1 ± 14,5 células/pocillo) de clasificación de 1 célula y 29,0 ± 4,3 pocillos (112,1 ± 21,2 células/pocillo) de clasificación de 2 células (n = 3). La diferencia entre el número de células/pocillo en la clasificación de 1 y 2 células no fue estadísticamente significativa (p = 0,78), lo que sugiere que la diferencia en la cantidad de pocillos con expansión celular detectada se debió a la supervivencia de las células clasificadas en lugar de a un reflejo de la cantidad de celdas clasificadas en un pocillo. Los presentes inventores no detectaron ninguna expansión significativa de células $CD45^-$.

Diferenciación e intento de reprogramación de células madre embrionarias humanas. Los presentes inventores usaron una línea indicadora hESC transgénica que identifica específicamente derivados de EC diferenciados a través de un reportero fluorescente conducido por un fragmento del promotor de la cadherina VE humana, como se describe en Rafii, S. et al., Blood 121:770-780 (2013). Para aumentar el compromiso endotelial, la diferenciación de hESC se inició en el co-cultivo con células alimentadoras vasculares. En resumen, se aislaron HUVEC y se transdujeron con AdE4ORF1 lentivírico como se describe en Seandel, M. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 105:19288-19293 (2008). Un día antes de sembrar hESC para comenzar la diferenciación, el medio acondicionado con MEF se reemplazó con medio de cultivo hESC sin FGF-2 y se suplementó con 2 ng/ml de BMP4. Al día siguiente, Los hESC se colocaron en placas directamente sobre una capa confluente al 80 % de E4ORF1 + EC en medio de cultivo de hESC (sin FGF-2, más 2 ng/ml de BMP4) y se dejó reposar durante 48 horas. Este punto de cultivo se consideró el día de diferenciación cero. Las células se estimularon secuencialmente con citocinas recombinantes en el siguiente orden: días 0 a 7 - suplementados con 10 ng/ml de BMP4; días 2 a 14 - suplementados con 10 ng/ml de VEGFA; días 2 a 14 - suplementados con 5 ng/ml de FGF-2; días 7 a 14 - suplementado con SB-431542 10 µM. La fracción de células derivadas de hESC que expresan conjuntamente el indicador vascular específico y CD31 se recogieron en el día 14 mediante FACS. Estas células se transdujeron con el cóctel de FGRS y se colocaron en placas 2-3 días después sobre una capa de HUVEC E4ORF1. La extensión de la reprogramación se evaluó mediante citometría de flujo.

Las células madre embrionarias humanas carecen de capacidad para formar HSC altamente proliferativas. En la actualidad, la diferenciación de células madre pluripotentes, incluyendo células madre embrionarias (ES) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en células hematopoyéticas de repoblación, muestra un éxito limitado. Por lo tanto, los FGRS pueden ser los factores faltantes que podrían aumentar la diferenciación de las EC derivadas de las ES humanas en las HSC. Con este fin, los presentes inventores diferenciaron las hES en EC (hES-EC)[38]. Después los presentes inventores purificaron HES-EC positivas para VEGFR2 y las transdujeron con FGRS. De forma notable, las hES-EC transducidas con FGRS podrían generar un número significativo de células $CD45^+CD144^-$. Sin embargo, estas células $CD45^+CD144^-$ no lograron formar colonias hematopoyéticas estables distintas y no entraron en una fase de crecimiento altamente proliferativo. Estos resultados indican que las hES-EC no son tan permisivas como las HUVEC al ser reprogramadas en rEC-HMPL.

Los rEC-HMLP generados a partir de EC se pueden trasplantar y funcionan *in vivo* para reemplazar las células hematopoyéticas. Para determinar si los rEC-HMLP eran capaces de injertarse *in vivo*, los presentes inventores trasplantaron $1,5x10^6$ de rEC-HMLP $CD45^+GFP^+$ a través de inyección retro-orbital en ratones deficientes en el receptor de NOD-SCID-IL2y (NSG) inmunocomprometidos irradiados sub-letalmente (275 Rad) adultos (NSG) (n = 9; un día después de la radiación). La sangre periférica de los ratones inyectados se analizó a las 2, 5, 12, 16 y 22 a 44 semanas después del trasplante para detectar la presencia de células $CD45^+$ humanas (Figura 3B). Los presentes inventores detectaron células humanas $CD45^+$ circulantes a 2 (n = 7; 17,38 ± 7,73 %), 5 (n = 6; 15,1 ± 13,39 %), 12 (n = 6; 14,14 ± 5,44 %), 16 (n = 6; 22,36 ± 17,95 %) y de 22 a 44 (n = 6, 21,23 ± 22,27 %) semanas. El análisis de sangre periférica, la médula ósea (BM) y el bazo 16 semanas después del trasplante revelaron la presencia de células humanas $CD45^+$ en los tres tejidos y células eritroides humanas $CD45^-$ $CD235^+$ en sangre periférica. BM y el bazo fueron poblados por la progenie mieloide de rEC-HMLP ($CD45^+CD33^+$) con un número pequeño pero detectable de células $CD41a^+$ (megacariocitos) (Figura 3C).

Los rEC-HMLP trasplantados conservan su capacidad para generar progenie eritroide, de megacariocito, de macrófago, de monocito y de células dendríticas. Para determinar si el rEC-HMLP injertado aislado del hospedador retuvo su potencial de linaje múltiple, los presentes inventores llevaron a cabo un ensayo de UFC secundario. Los presentes inventores aislaron $CD45^+$ humanos ($hCD45^+$) de médula ósea de ratones trasplantados a las 22 (n = 1) y 24 (n = 4) semanas después del trasplante. Estas células se expandieron *in vitro* durante 24 horas y se clasificaron por células $hCD45^+hCD34^+$ para el ensayo de UFC. En 14 días, las células en placas dieron origen a colonias con morfologías similares a UFC-GM, UFC-GEMM y BFU-E. La tinción de Wright-Giemsa de la citocentrífuga de las células reveló la morfología típica de la progenie mieloide humana de las células ensayadas. El análisis inmunofenotípico del cultivo de metilcelulosa reveló que el compartimiento $CD45^+$ humano contenía células $CD41a^+$, $CD14^+$, $CD83^+$ y $CD33^+$, sugiriendo la presencia de progenies de megacariocitos, macrófagos, monocitos y células dendríticas. El compartimiento $CD45^-$ contenía células $CD235^+$ y $Ter119^+$ no de ratón, sugiriendo la diferenciación

eritroide robusta de células $CD45^+CD34^+$ humanas en el ensayo UFC (Figura 3E).

El análisis de los rEC-HMLP injertados en la médula ósea de los ratones NSG reveló una pequeña población de células $Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$ que satisfacen la definición de progenitores multipotentes humanos (Figura 3E). Para verificar que estas células conserven su potencial de linajes múltiples y sean derivados de los rEC-HMLP reprogramados, los presentes inventores las colocaron en placas para el ensayo de UFC y verificaron la integración vírica en colonias individuales. El ADN genómico aislado de colonias separadas se analizó para determinar la presencia de cuatro factores de reprogramación. Todas las colonias analizadas (n = 3) fueron positivas para los vectores lentivíricos que expresan FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1 (Figura 3F). Para cuantificar la frecuencia de integración vírica a nivel de una sola célula, los presentes inventores analizaron células $CD45^+$ humanas de la médula ósea del hospedador. Las células se clasificaron en una placa de 96 pocillos (1 célula/pocillo) para la amplificación del genoma completo (WGA). El ADN genómico amplificado se examinó para la integración vírica. Todas las células (n = 21) fueron positivas para la integración del vector vírico. Dos células mostraron la integración de tres (FGS con RUNX1 indetectable y GRS con FOSB indetectable) de los cuatro virus usados para la reprogramación (Figura 3G). Los resultados de la integración vírica de una sola célula y de una única colonia confirmaron que las células hematopoyéticas humanas aisladas de ratones hospedadores se originan a partir de rEC-HMLP injertados en los ratones NSG.

Los rEC-HMLP trasplantados retienen la integridad genómica. Para evaluar la integridad genómica de rEC-HMLP $CD45^+$ (en el día 35 posterior a la transducción) y rEC-HMLP $CD45^+CD34^+$ injertados en la médula ósea de los ratones NSG (24 semanas después del trasplante), los presentes inventores realizaron un análisis comparativo de hibridación genómica (CGH) usando Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarray (sondas 1 M). El análisis no reveló anomalías genéticas, sugiriendo que la proliferación de rEC-HLMP permanece genéticamente estable tanto *in vitro* como *in vivo.*

Los rEC-HMLP trasplantados no dan lugar a una transformación maligna *in vivo.* Para abordar la preocupación de una posible transformación maligna de los rEC-HMLP trasplantados, incluyendo la predisposición al síndrome mielodisplásico (SMD), los presentes inventores analizaron la médula ósea, bazo e hígado de ratones receptores hasta 10 meses después del trasplante (Figura 3A). La sangre periférica se analizó por primera vez para detectar la presencia de células $hCD45^+$ circulante. Los ratones que mostraban injerto fueron sacrificados y su bazo, el hígado y la tibia se analizaron para detectar signos de SMD. Ninguno de los ratones manifestó evidencia de leucemias y linfomas, tales como linfadenopatía, esplenomegalia u organomegalia. Los presentes inventores también realizaron análisis exhaustivos empleando un panel de tinción en la médula ósea, bazo e hígado de los ratones injertados con rEC-HMLP. No observaron ninguna indicación de deposición excesiva de colágeno o desmina. Además, la arquitectura microscópica de la médula ósea no manifiesta evidencia de remodelación fibrótica que recuerde al síndrome mielodisplásico. Las regiones osteoblásticas, vasculares y perivasculares estaban morfológicamente intactas. Los presentes inventores concluyen que su enfoque no conduce a la inducción de células hematopoyéticas con potencial leucomogénico.

Los rEC-HMLP trasplantados generan células linfoides. El número de la progenie linfoide de los rEC-HMLP trasplantados derivados de HUVEC (en el bazo, la médula ósea y la sangre periférica) eran insignificantes, lo que sugiere que los rEC-HMLP trasplantados no contribuyeron suficientemente al quimerismo de las células T *in vivo.* Para abordar la posibilidad de que la expresión residual constitutiva de SPI1 impida que rEC-HMLP se diferencie en células T, los presentes inventores usaron una combinación de factores de FGR expresados constitutivamente y SPI1 inducible (SPI1-Tet-On). Las HUVEC se transdujeron con lentivirus FGR^+SPI1-Tet-On y crecieron en una capa de monocapas alimentadoras HUVEC durante 27 días en presencia de doxiciclina. Los presentes inventores observaron la formación de colonias de tipo hematopoyético y un aumento del número de células $CD45^+$. Los alimentadores HUVEC fueron resistentes a la doxiciclina y mantuvieron su función de nicho vascular a lo largo de la inducción de las células hematopoyéticas nacientes. A continuación, las células reprogramadas se transfirieron a una capa de células estromales de médula ósea (OP9) que expresan tipo Delta 4 (OP9-DL4) y se cultivaron en presencia de medios hematopoyéticos libres de suero suplementados con IL-7 (10 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml) e IL-2 (5 ng/ml). Las células fueron analizadas para la expresión de CD3, CD19 y CD14 (3 semanas de co-cultivo OP9-DL4; Figura 6A). De forma notable, los presentes inventores fueron capaces detectar de manera confiable una pequeña fracción de células $CD3^+$ (0,16 ± 0,01 %; n = 3), un número mayor de $CD19^+$ (1,17 ± 0,13 %; n = 3) y una población muy significativa de células que expresan CD14 (16,46 ± 1,02 %; n = 3), lo que indica la generación de células T.

Los rEC-HMLP trasplantados generan macrófagos funcionales. Para llevar a cabo una evaluación funcional de los macrófagos diferenciados de los rEC-HMLP, los presentes inventores llevaron a cabo un ensayo de fagocitosis. Los rEC-HMLP se cultivaron en presencia de M-CSF (10 ng/ml), SCF (10 ng/ml), Flt-3 (10 ng/ml), TPO (10 ng/ml) y 10 % de FBS durante dos semanas sin una capa de alimentación E4-HUVEC. Los presentes inventores observaron un aumento en el tamaño y la granularidad de las células cultivadas. El cultivo se lavó con PBS dos veces para retirar las células no adherentes. Se aplicaron medios de crecimiento mezclados con perlas fluorescentes rojas a una concentración baja de 1 µl/ml a las células unidas durante una hora a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y las células vivas se tiñeron con anticuerpo CD11b. Las células se fijaron y se tiñeron con DAPI para visualización nuclear. La microscopía confocal reveló grupos de células $CD11b^+GFP^+$ firmemente adheridas con perlas ingeridas claramente visibles (Figura 6B). Por consiguiente, los rEC-HMLP pueden

dar lugar a macrófagos funcionales.

Los rEC-HMLP generados a partir de hDMEC se pueden trasplantar y funcionan *in vivo* para reemplazar las células hematopoyéticas. Para determinar si los rEC-HMLP generados a partir de hDMEC fueron capaces de injerto *in vivo* los presentes inventores trasplantaron $1x10^5$ de rEC-HMLP $CD45^+GFP^+$ a través de inyección retro-orbital en ratones NSG neonatales de dos semanas de edad irradiados sub-letalmente (100 Rad). La sangre periférica de los ratones inyectados se analizó a las 4, 6 y 12 semanas posteriores al trasplante para detectar la presencia de células $CD45^+$ humanas (Figura 4C). Los presentes inventores detectaron células $CD45^+$ humanas circulantes a 4 (2,09 ± 1,27 %, n = 6), 6 (4,46 ± 3,66 %, n = 6) y 12 (4,05 ± 3,50 %, n = 6) semanas. El análisis de sangre periférica, la médula ósea y el bazo 14 semanas después del trasplante reveló la presencia de células $CD45^+$ humanas en los tres tejidos y células eritroides $CD45^-CD235^+$ humanas en sangre periférica (Figura 4C, D, E). El análisis del bazo a las 14 semanas posteriores al trasplante reveló poblaciones pequeñas pero distintas de células $CD19^+$ (10,13 ± 4,98 %; células B) y $CD56^+$ (1,62 ± 0,67 %; células NK) de la progenie linfoide. Estos fueron además de las células mieloides $CD11b^+$ (27,66 ± 8,92 %; macrófagos) y $CD41a^+$ (4,90 ± 1,51 %; megacariocitos) (Figura 4D).

Los rEC-HMLP derivados de hDMEC trasplantados también conservan la capacidad de generar células funcionales similares a HSC *in vivo*. Para probar funcionalmente si las rEC-HMLP derivadas de hDMEC trasplantadas generaron células similares a HSC funcionales *in vivo* los presentes inventores llevaron a cabo trasplantes secundarios. Los presentes inventores trasplantaron médula ósea completa desde fémures de ratones injertados primarios 12 semanas después del trasplante (n = 10). El análisis fenotípico de los rEC-HMLP injertados en la médula ósea de ratones donantes a las 14 semanas después del trasplante primario, reveló poblaciones significativas tanto de células $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ (10,37 ± 2,55 %) como $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$ (13,83 ± 2,14 %) que satisfacen la definición fenotípica de HSPC humanas y progenitores multipotentes (MPP), respectivamente (Figura 4E). Los presentes inventores detectaron $hCD45^+$ en PB (sangre periférica) de los receptores secundarios tres (n = 6; 14,61 ± 15,7 %) y cinco (n = 6; 2,01 ± 1,5 %) semanas después del trasplante con una población significativa de progenie mieloide (n = 6; 44,32 ± 23,21 %) (Figura 4F). El injerto primario a largo plazo y el injerto secundario exitoso a corto plazo respaldan la existencia de células similares a HSPC/MPP de auto-renovación en la población de los hDMEC reprogramados.

Los rEC-HMLP muestran la regulación positiva de los genes hematopoyéticos y la regulación negativa de los genes vasculares. A continuación, los presentes inventores compararon los perfiles de transcripción del genoma completo de rEC-HMLP con los perfiles de expresión génica de HUVEC cultivadas y células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical $CD34^+CD45Lin^-$ recién aislados para evaluar el alcance de la reprogramación a nivel del transcriptoma del genoma completo (Figura 5A). El análisis reveló la regulación positiva de los genes hematopoyéticos y el silenciamiento de la expresión génica vascular en células CD45 antes del trasplante y rEC-HMLP $CD45^+CD34^+$, 22 semanas después del trasplante, en comparación con HUVEC indiferenciadas y células de CB Lin^-CD34^+. Los genes prototípicos de pluripotencia, tales como Oct4, Nanog, Sox2 y Myc no estaban regulados positivamente en las células reprogramadas en comparación con las células madre embrionarias humanas (hESC) y las HUVEC indiferenciadas, lo que indica que la reprogramación de HUVEC en rEC-HMPL se logró sin la transición a través de un estado pluripotente (Figura 5B). El agrupamiento jerárquico de los transcriptomas completos HUVEC, rEC-HMLP $CD45^+$, rEC-HMLP $CD45^+CD34^+$ después de 22 semanas posteriores al trasplante y células $CD34^+Lin^-$ con agrupamiento más compacto de rEC-HMLP $CD45^+CD34^+$ y células de CB sugirieron "educación/reprogramación" adicional *in vivo* de rEC-HMLP.

ChIP-Seq y análisis de datos. ChIP-Seq se realizó como se describe en Goldberg, A. D. et al., Cell 140:678-691 (2010). En resumen, las células se reticularon durante 15 min en paraformaldehído al 1 %, se lavaron y se lisaron. La cromatina se cizalló usando Bioruptor en fragmentos de aproximadamente 150 pares de bases, se lavó y se eluyó. La cromatina eluida se reticuló inversamente y se purificó en columna (los anticuerpos SPI1 y GFI se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology; números de catálogo sc-352 y sc-8558). Las muestras de ChIP se prepararon para la secuenciación usando el kit de preparación de muestras de ADN Illumina TruSeq de acuerdo con el protocolo de preparación convencional (Illumina). El servicio de secuenciación se realizó en un secuenciador Illumina Hiseq 2000 de acuerdo con el protocolo convencional de Illumina. Las lecturas de ChIP-seq se alinearon con el genoma humano de referencia (hg19, NCBI Build 37) utilizando el programa BWA (Li, H. et al., Bioinformatics 25:1754-1760 (2009)) y los duplicados de PCR se retiraron mediante Picard (disponible en línea en sourceforge). Las lecturas únicas asignadas a una ubicación única de mejor coincidencia con no más de dos no coincidencias se mantuvieron y se usaron para generar la distribución de SPI1 y GFI1 en todo el genoma y para la identificación del pico. El software ChIPseeqer 2.0 (Giannopoulou, E. G. et al., BMC Bioinformatics 12:277 (2011) se aplicó a los datos de ChIP-Seq con datos de secuenciación del ADN de entrada como control para identificar el enriquecimiento genómico de las señales de SPI de SPI1 y GFI1 con FDR <0,005. Enriquecimiento dentro de $^+/-$ 2kb del sitio de inicio de la transcripción (TSS) se definieron como picos de promotor. Los genes seleccionados se presentaron para el análisis de ontología de genes (GO) por DAVID (disponible en línea en el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID), NIH) y análisis de motivos por HOMER (disponible en línea en biowhat, Universidad de California, San Diego).

Identificación de los sitios de unión al ADN de SPI1 y GFI1. Para dilucidar los posibles mecanismos de la reprogramación mediada por FGRS transcripcional de EC en los rEC-HMLP, los presentes inventores compararon la

unión al ADN del genoma completo de SPI1 y GFI1 en HUVEC utilizando la secuenciación profunda acoplada a la precipitación inmune de cromatina (ChIP-Seq). Los presentes inventores identificaron 23587 sitios genómicos unidos a SPI1 y 10999 unidos a GFI1 en la región promotora de +/- 2 kb de sitios de inicio de transcripción (TSS). De forma notable, el 91,6 % del TSS unido a GFI1 (10079 de 10999) se superpuso con el TSS unido a SPI1. Sin embargo, el 57,3 % de los promotores unidos a SPI1 no estaban ocupados por GFI. La comparación de los niveles de transcripción de genes unidos por SPI1, GFI1, o SPI1 y GFI1 juntos (dianas comunes o "CT") revelaron que la mayoría de los genes que están unidos por GF11 solo exhiben niveles reducidos de expresión, mientras que los genes que están unidos por SPI1 solo o SPI1 en combinación con GFI1 están regulados positivamente. El análisis de ontología génica (GO) de los sitios unidos descubrió una serie de agrupaciones de genes que podrían estar implicadas en el cambio de la identidad celular de los EC a los rEC-HMLP (Figura 5C). GO reveló que los CT regulados positivamente (log_2 (rEC-HMLP/HUVEC) ≥2) pertenecía a grupos de genes con funciones conocidas en el desarrollo del sistema hematopoyético y la diferenciación mieloide, mientras que se sabe que un gran número de CT regulados negativamente están implicados en el desarrollo de la vasculatura (Figura 5C). La búsqueda de los motivos de unión al ADN conocidos ocupados por las dianas TSS SPI1 y GFI1 reveló que los CT regulados negativamente ($(log)_2$ (HUVEC/rEC-HMLP) ≥2) contenía un subconjunto de genes con GFIIb (72 genes, p = 0,001) y motivos de unión a FOSB (64 genes, p = 0,0001). Un subconjunto de TSS de genes regulados positivamente (log_2 (rEC-HMLP/HUVEC) ≥2) unidos por SPI1 contenían motivos conocidos de unión al ADN de RUNX1 (133 genes, p = 0,0001) y FLI1 (264 genes, p = 0,01). Además, un subconjunto de CT contenía un motivo de unión al ADN conocido de EBF (factor temprano de células B) (130 genes, p = 0,01).

El perfil de unión a genoma completo de SPI1 y GFI1 combinado con la búsqueda de motivos de unión a ADN y el análisis de expresión de transcriptoma completo sugieren que SPI1 solo y SPI1 en combinación con GFI1 regulan la expresión de genes hematopoyéticos. De forma notable, la expresión de los genes vasculares fue suprimida por SPI1 y GFI1, así como posiblemente por FOSB. La regulación positiva de los genes hematopoyéticos depende de la expresión de SPI1 que sinergiza con la expresión de RUNX1 y FLI1. Cabe destacar que, FLI1 se expresa igualmente en HUVEC indiferenciadas, rEC-HMLP $CD45^+$, rEC-HMLP $CD45^+CD34^+$ 22 semanas después del trasplante y células de CB Lin^-CD34^+; la expresión normalizada es 7,4, 7,9, 7,2 y 7,6, respectivamente.

Para determinar si la reprogramación inducida por FGRS desencadena la expresión endógena de los FGRS TF, los presentes inventores determinaron la expresión de las regiones no traducidas 5 'y 3' (UTR) por RNA-Seq. Debido a que las construcciones lentivíricas utilizadas para la reprogramación expresan marcos de lectura abiertos de los factores FGRS sin UTR, los presentes inventores fueron capaces de identificar las transcripciones expresadas endógenamente por la presencia de sus secuencias UTR. El análisis de los factores FGRS 5 'y 3' de la rEC-HMLP humana injertada utilizando el transcriptoma completo RNA-Seq reveló la activación de la expresión endógena de los cuatro factores FGRS. La expresión endógena de los FGRS TF se calculó como una fracción de las lecturas de RNA-Seq que provienen de las UTR como Fracción (%) = UTR/(UTR + ORF), donde UTR es el número de lecturas RNA-seq que se alinean con las UTR 5 'y 3', ORF es el número de lecturas de RNA-seq que se alinean con el marco de lectura abierto del gen de interés. Este análisis sugiere que la expresión endógena de los factores FGRS se activa en las células reprogramadas tanto *in vitro* (rEC-HMLP $CD45^+$) como después de un período de educación mediada por microentorno mental *in vivo* ($CD45^+CD34^+$ *in vivo*).

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar células progenitoras multi-linaje hematopoyéticas humanas (HMLP) a partir de células endoteliales humanas (EC), que comprende cultivar EC que expresan cada uno de los factores de transcripción homólogo B de oncogén vírico de osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins (FOSB), represor de transcripción factor de crecimiento independiente 1 (GFI1), factor de transcripción relacionado con Runt 1 (RUNX1), oncogén de integración provírico del virus formador de foco del bazo (SPI1) u homólogos funcionales o derivados de los mismos, en medios libres de suero con células alimentadoras endoteliales.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas EC se seleccionan de EC fetales, neonatales, adultas y progenitoras, por ejemplo, seleccionadas de células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC) y células endoteliales microvasculares dérmicas adultas (hDMEC).

3. El método de la reivindicación 1, en donde las células alimentadoras endoteliales son células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC) transformadas para expresar el gen del marco de lectura abierto 1 del adenovirus E4 (E4ORF1) o bien el gen Akt.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dichas EC se transducen con uno o más vectores que dirigen la expresión, por ejemplo, la expresión inducible o transitoria, de FOSB, GFI1, RUNX1 y SPI1.

5. El método de la reivindicación 4, en donde al menos uno de dichos vectores comprende además un marcador seleccionable, por ejemplo, un marcador de resistencia a antibióticos, un marcador enzimático, un marcador de epítopo o un marcador visual.

6. El método de la reivindicación 5, en donde antes de cultivar en presencia de las células alimentadoras endoteliales, las CE están enriquecidas para la expresión de FOSB, GFI1, RUNX1 y/o SPI1 seleccionando células que expresan al menos un marcador seleccionable.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dichos HMLP pueden producir células eritroides, linfoides, mieloides y megacariocitos.

8. El método de la reivindicación 1, que comprende además aislar HMLP en base a la selección de células $CD45^+$, por ejemplo, HLMP que son $CD45^+CD34^+$.

9. El método de la reivindicación 1, en donde los HMLP comprenden células que son $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^+CD34^+$ o $CD45^+Lin^-CD45RA^-CD38^-CD90^-CD34^+$.

10. El método de la reivindicación 1, en donde dichos HMLP pueden diferenciarse en células hematopoyéticas después del trasplante en un receptor.

11. El método de la reivindicación 1, en donde dichas EC se cultivan durante al menos cinco días para generar HMLP.

12. El método de la reivindicación 1, en donde dichas EC se hacen crecer en presencia de células alimentadoras endoteliales en un medio hematopoyético libre de suero que comprende bFGF, EGF, SCF, FLT3, TPO e IL-6 y en donde dicho medio comprende además opcionalmente IGF-1, IGF-2 e IL-3.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho medio es un medio de células madre hematopoyéticas.

14. Una población de células progenitoras multi-linaje hematopoyéticas humanas (HMLP) producida de acuerdo con el método de la reivindicación 9, en donde los HMLP comprenden uno o más vectores para la expresión de FOSB, GFI1, RUNX1 y/o SPI1.

15. Una composición que comprende una población de células progenitoras multi-linaje hematopoyéticas humanas (HMLP) de acuerdo con la reivindicación 14 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Una población de células progenitoras multi-linaje hematopoyéticas humanas (HMLP) de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso en un método para tratar un trastorno hematopoyético, por ejemplo, un trastorno hematopoyético seleccionado de leucemia y linfoma.

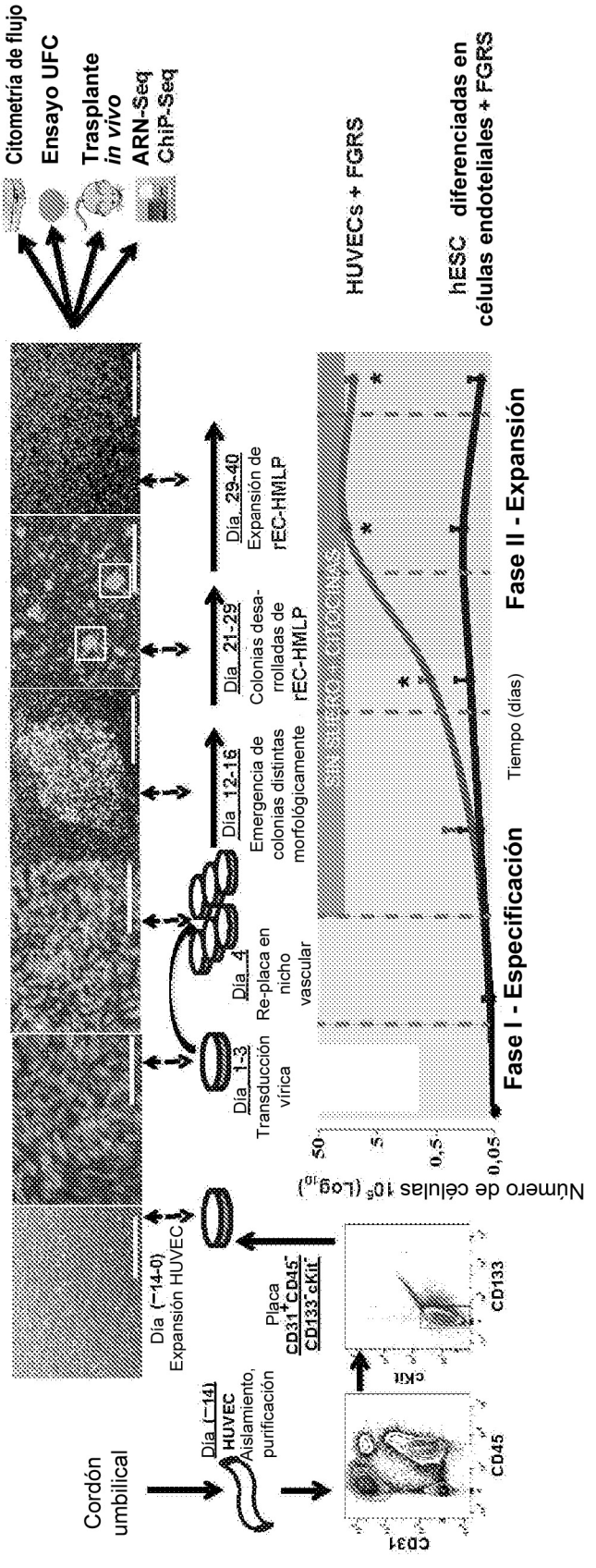

Citometría de flujo
Ensayo UFC
Trasplante in vivo
ARN-Seq
ChiP-Seq
Cordón umbilical
Día (−14)
HUVEC
Aislamiento, purificación
Día (−14-0)
Expansión HUVEC
Placa
CD31+CD45-
CD133-cKit-
CD31
CD45
cKit
CD133
Día 1-3
Transducción vírica
Día 4
Re-placa en nicho vascular
Día 12-16
Emergencia de colonias distintas morfológicamente
Día 21-29
Colonias desarrolladas de rEC-HMLP
Día 29-40
Expansión de rEC-HMLP
HUVECs + FGRS
hESC diferenciadas en células endoteliales + FGRS
Número de células 10^5 (Log10)
50
5
0,5
0,05
Fase I - Especificación
Tiempo (días)
Fase II - Expansión

Fig. 1A

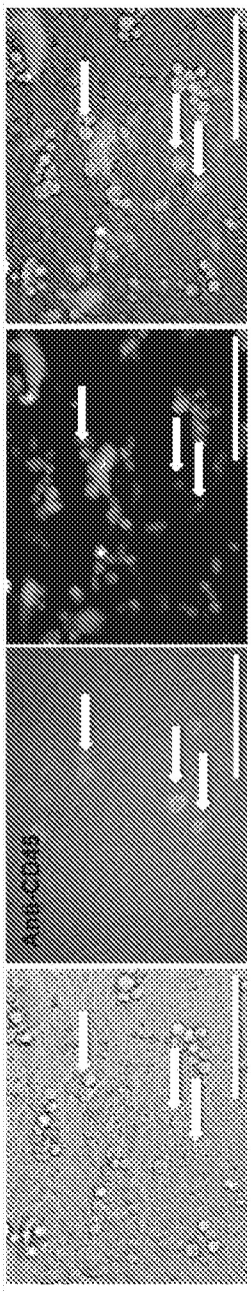


Fig. 1B

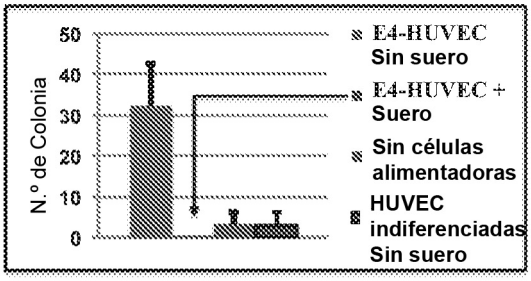
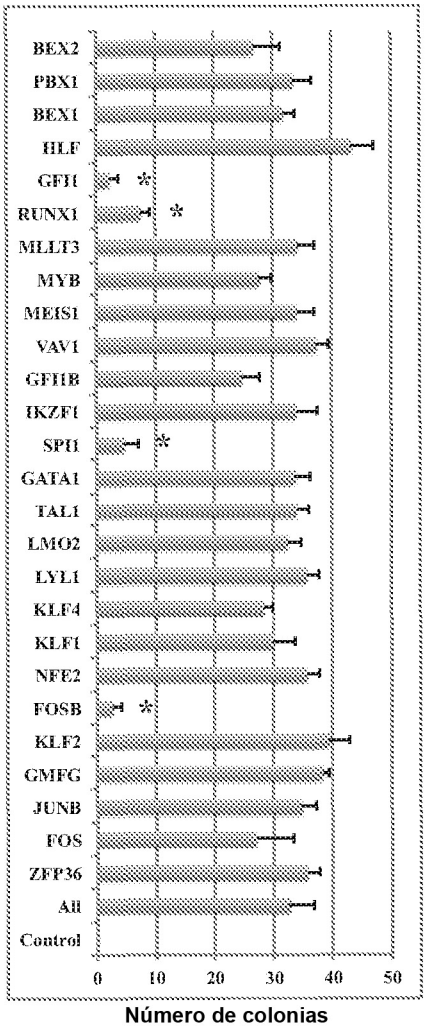

N.º de Colonia
50
40
30
20
10
0
E4-HUVEC
Sin suero
E4-HUVEC +
Suero
Sin células
alimentadoras
HUVEC
indiferenciadas
Sin suero

Fig. 1C


BEX2
PBX1
BEX1
HLF
GFI1
RUNX1
MLLT3
MYB
MEIS1
VAV1
GFI1B
IKZF1
SPI1
GATA1
TAL1
LMO2
LYL1
KLF4
KLF1
NFE2
FOSB
KLF2
GMFG
JUNB
FOS
ZFP36
All
Control
0
10
20
30
40
50
Número de colonias

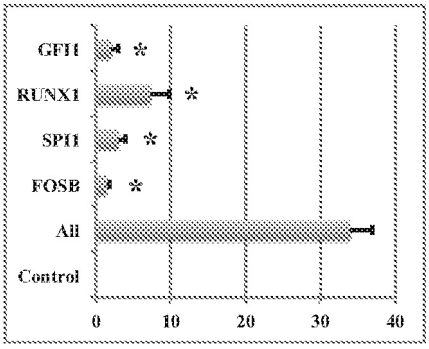

GFI1
RUNX1
SPI1
FOSB
All
Control
0
10
20
30
40
Número de colonias

Fig. 1E

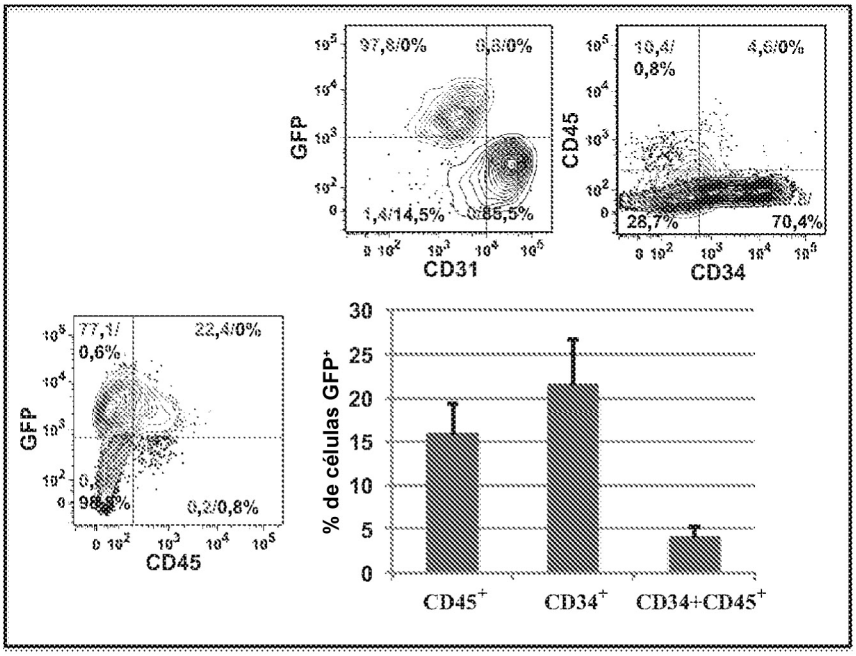

GFP
CD31
97,8/0%
1,4/14,5%
0,85,5%
CD45
CD34
28,7%
70,4%
77,1/
0,6%
22,4/0%
98,2%
0,2/0,8%
% de células GFP+
30
25
20
15
10
5
0
CD45+
CD34+
CD34+CD45+

Fig. 2A

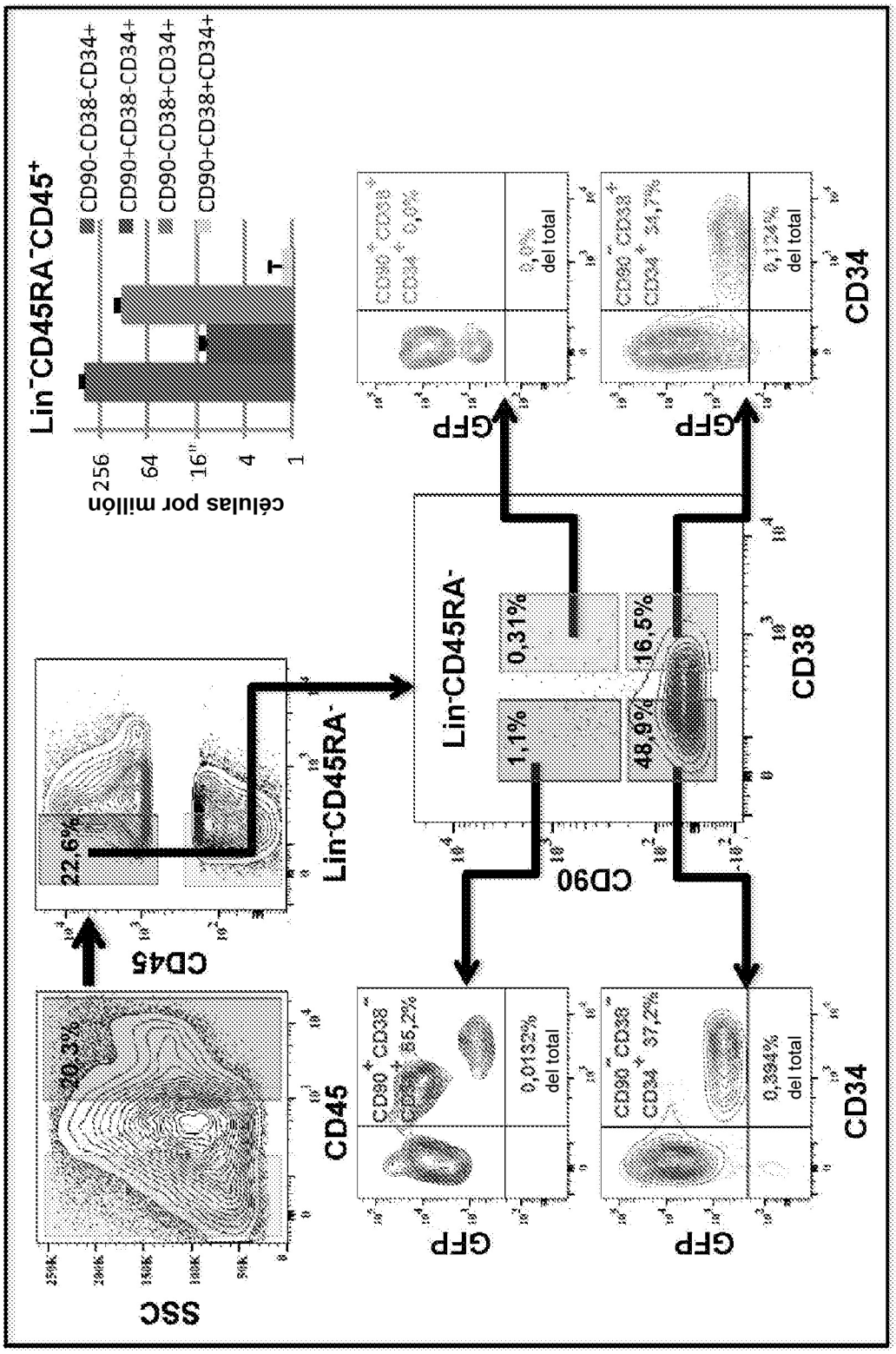

Lin-CD45RA-CD45+
CD90-CD38-CD34+
CD90+CD38-CD34+
CD90-CD38+CD34+
CD90+CD38+CD34+
células por millón
256
64
16
4
1
SSC
CD45
20,3%
22,6%
Lin-CD45RA-
CD90
CD38
CD34
GFP
1,1%
0,31%
48,9%
16,5%
0,0132% del total
0,3384% del total
0,0% del total
0,126% del total

Fig. 2B

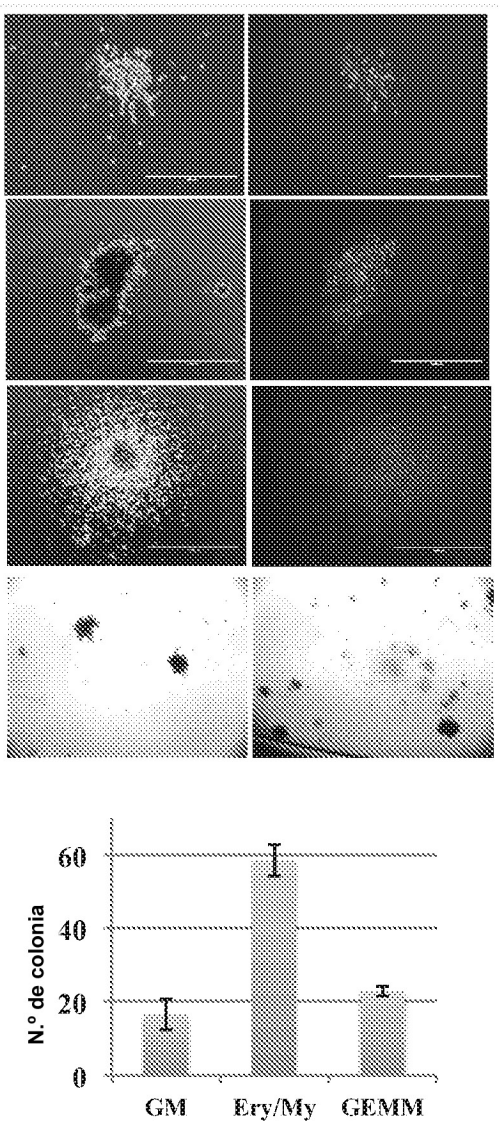


Fig. 2C

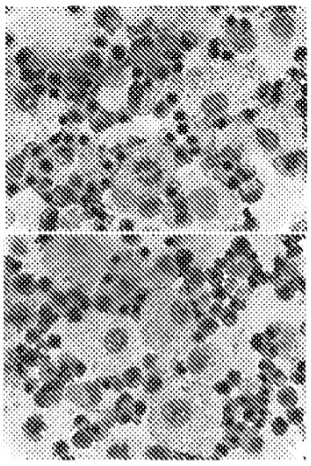


Fig. 2D

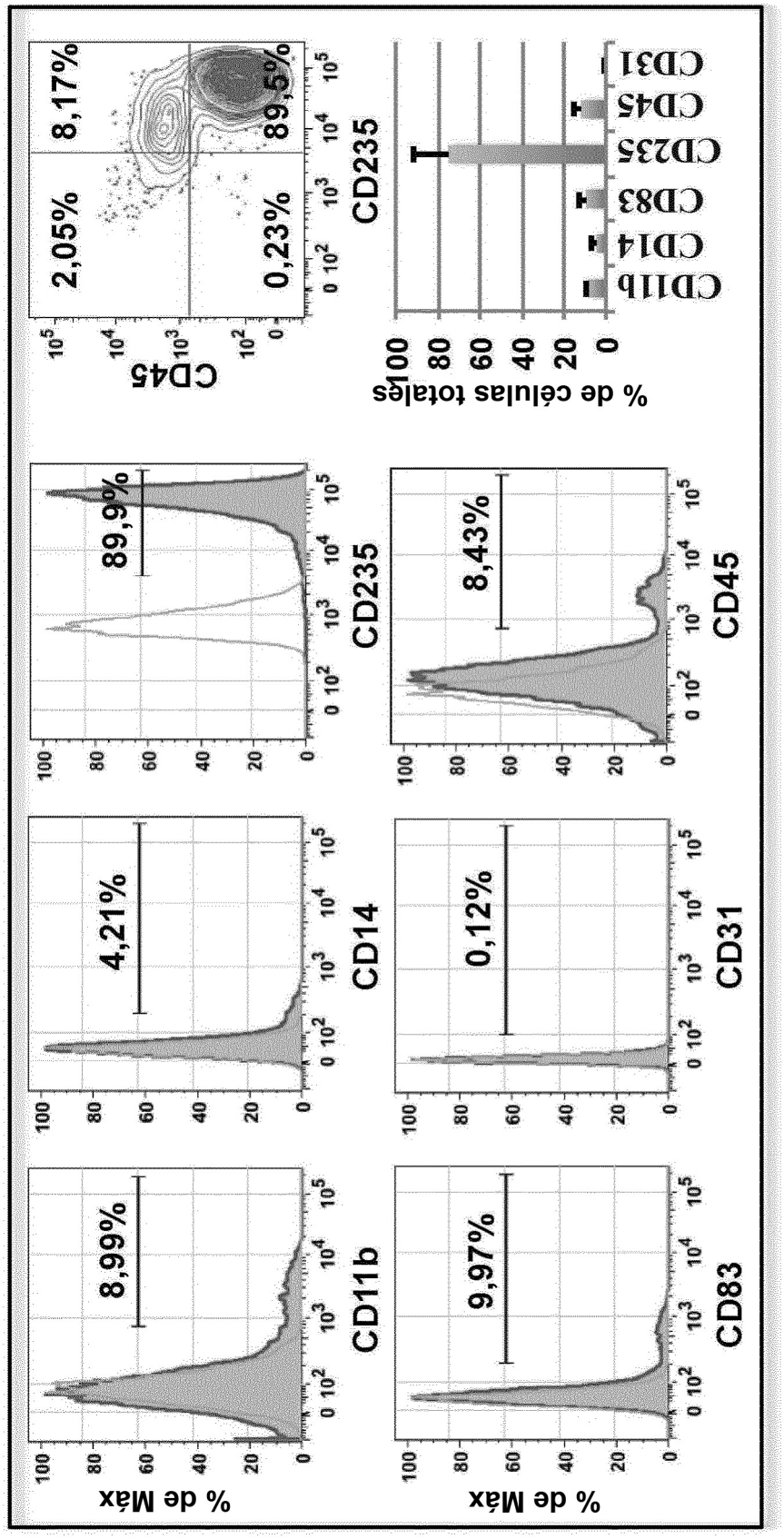

% de Máx
CD11b
8,99%
CD14
4,21%
CD235
89,9%
CD83
9,97%
CD31
0,12%
CD45
8,43%
CD45
2,05%
8,17%
0,23%
89,5%
CD235
% de células totales
CD11b
CD14
CD83
CD235
CD45
CD31

Fig. 2E

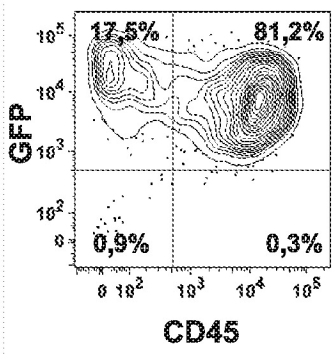


Fig. 3A

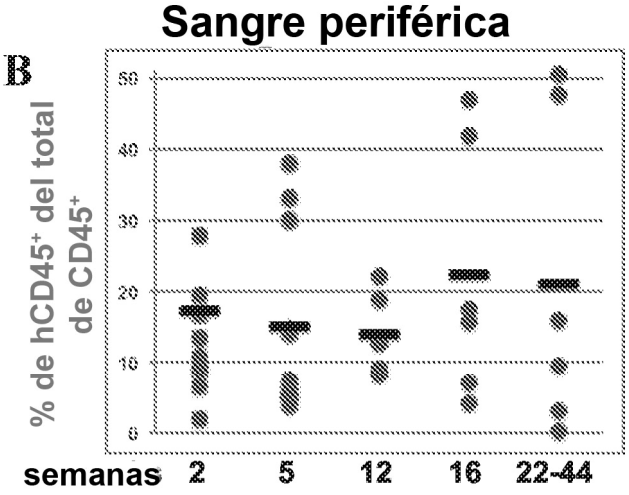

Sangre periférica
B
% de hCD45+ del total de CD45+
50
40
30
20
10
0
semanas
2
5
12
16
22-44

Fig. 3B

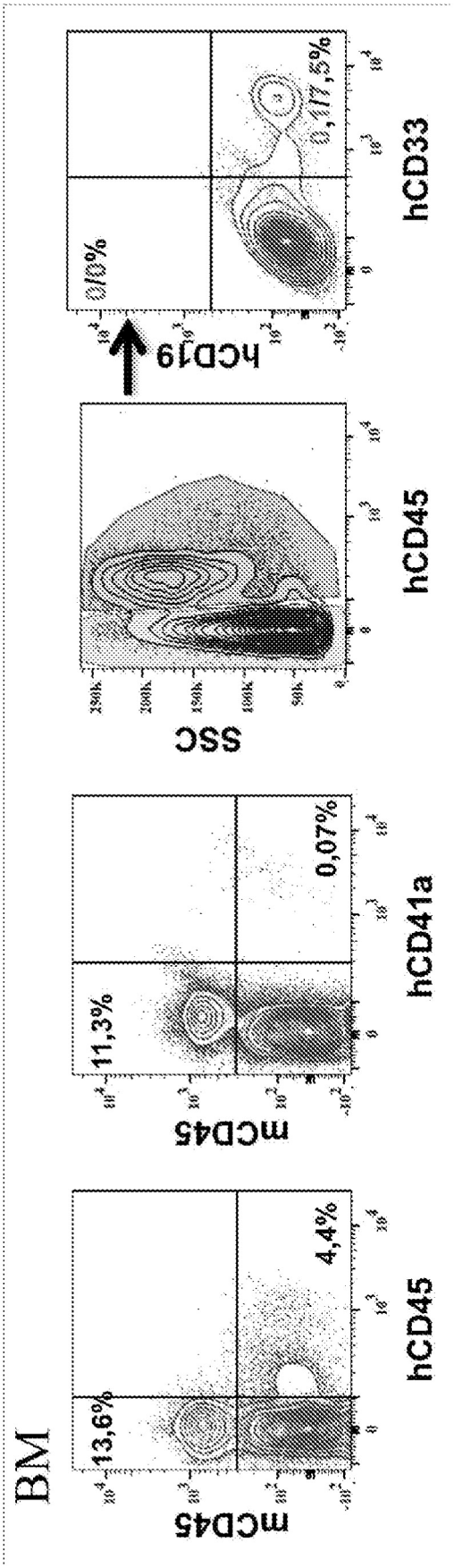

BM
mCD45
13,6%
4,4%
hCD45
mCD45
11,3%
0,07%
hCD41a
SSC
hCD45
hCD19
0%
0,11,5%
hCD33

Fig. 3C

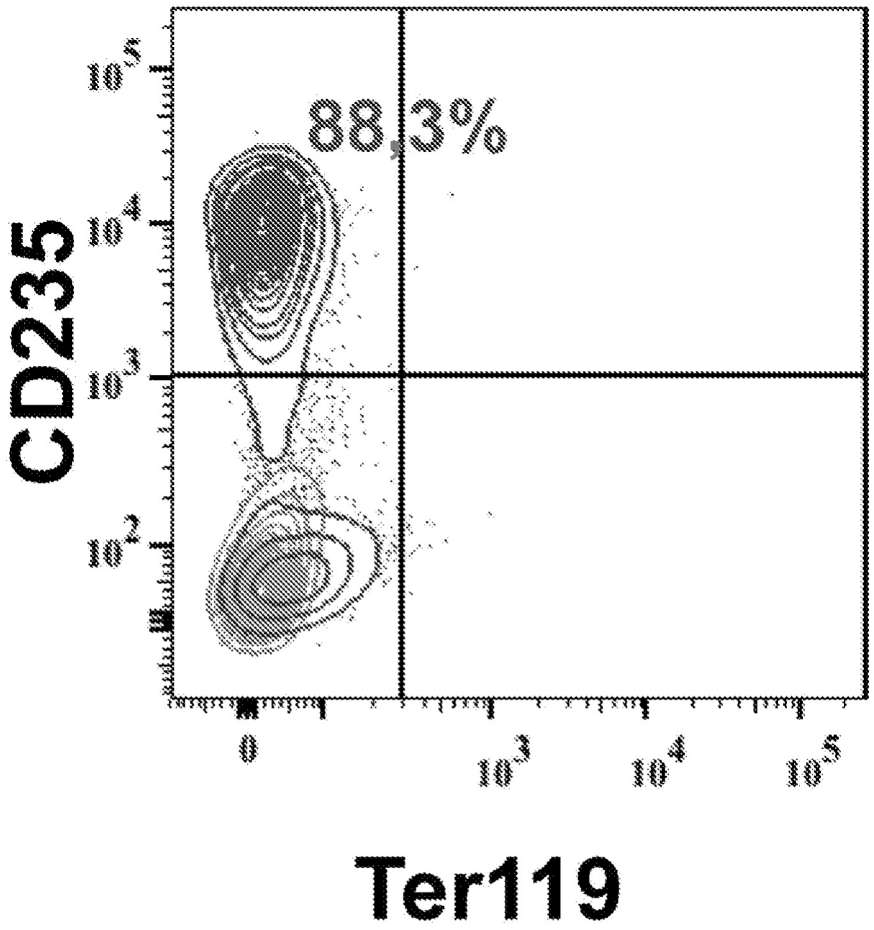


Fig. 3D

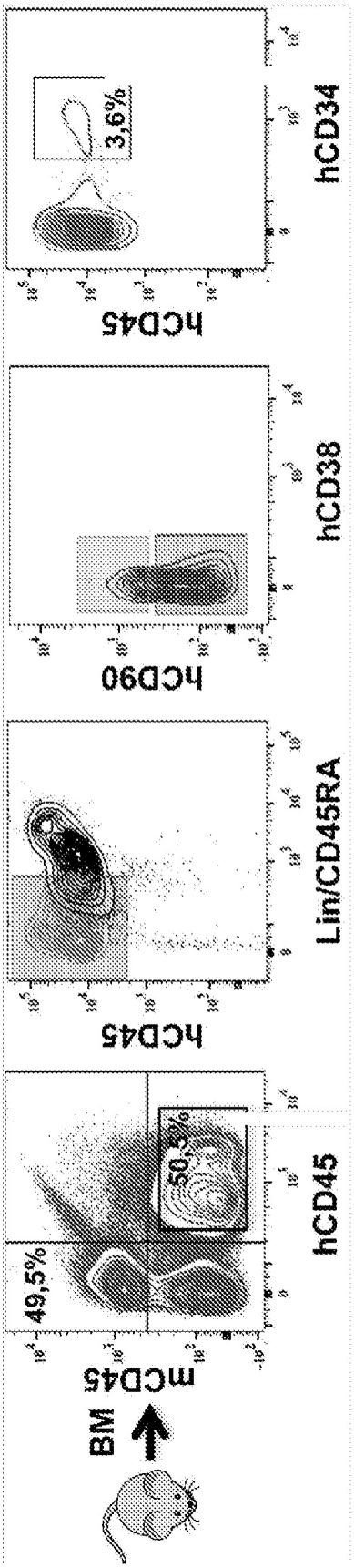

BM
mCD45
49,5%
hCD45
hCD45
Lin/CD45RA
hCD90
hCD38
hCD45
hCD34
3,6%

Fig. 3E

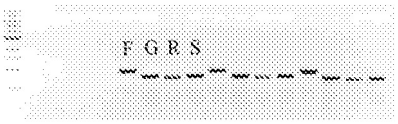


Fig. 3F

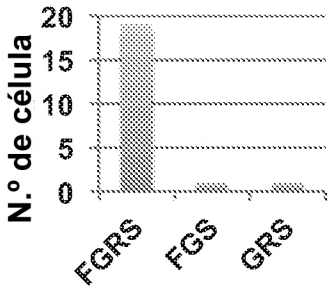


Fig. 3G

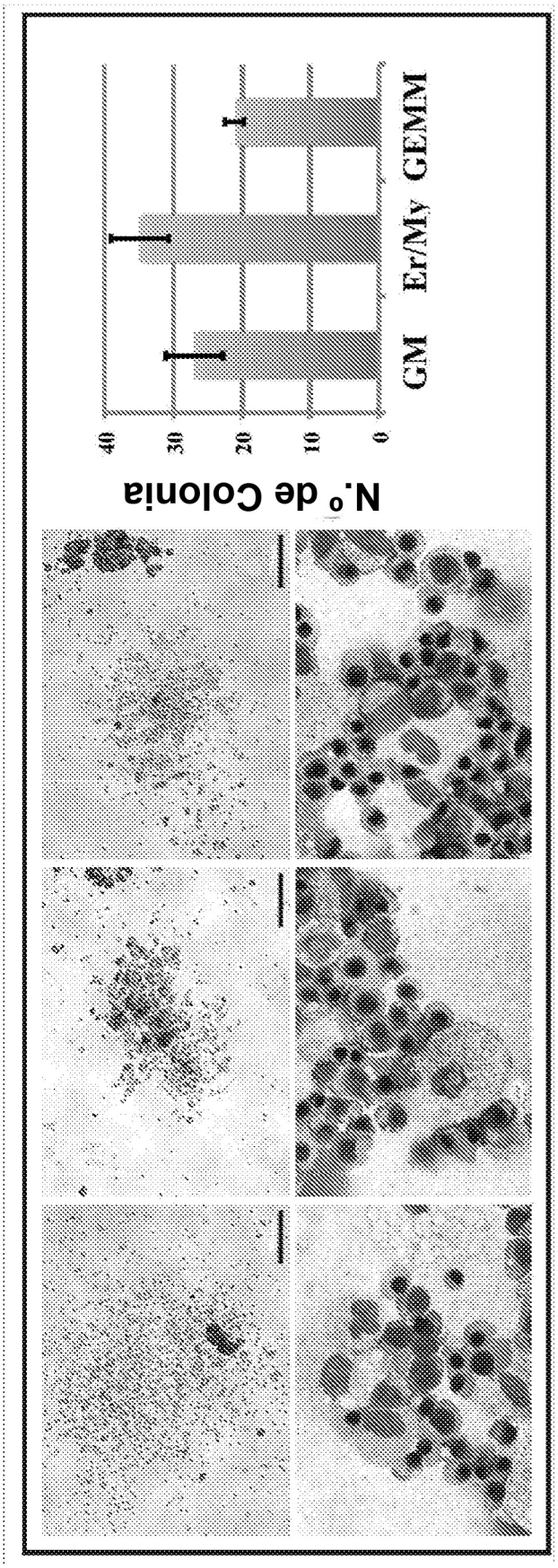


Fig. 4A

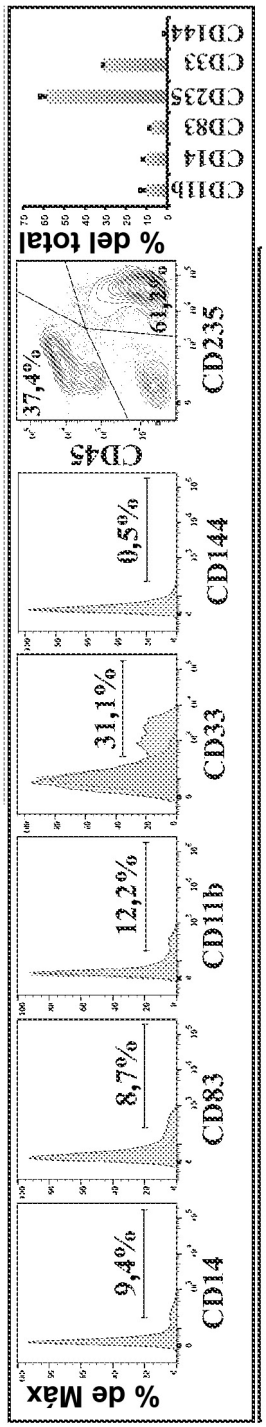

% de Máx
CD14
9,4%
CD83
8,7%
CD11b
12,2%
CD33
31,1%
CD144
0,5%
CD45
37,4%
61,2%
CD235
% del total
CD11b
CD14
CD83
CD235
CD33
CD144

Fig. 4B

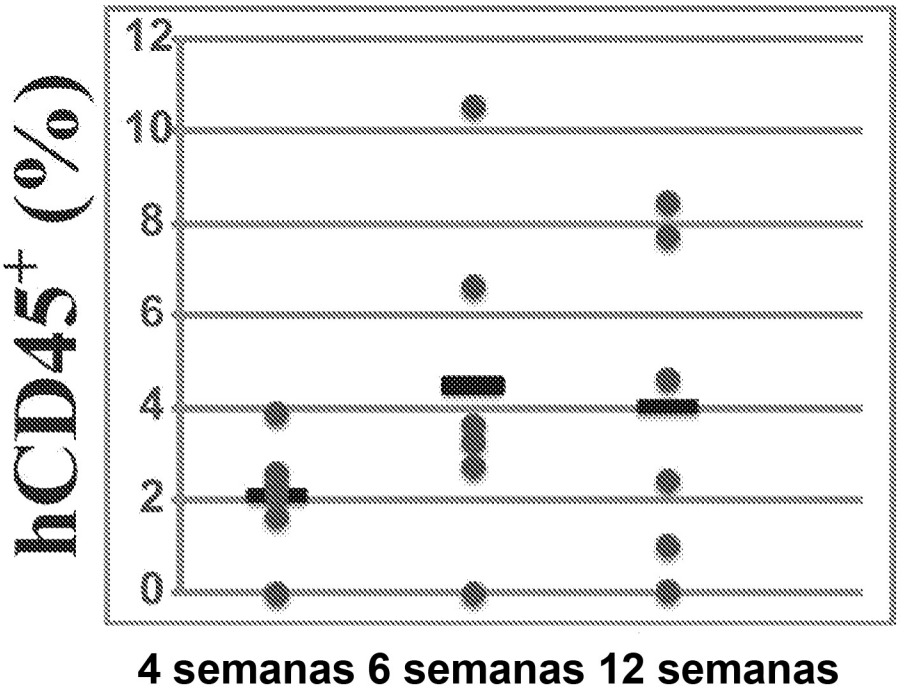


Fig. 4C

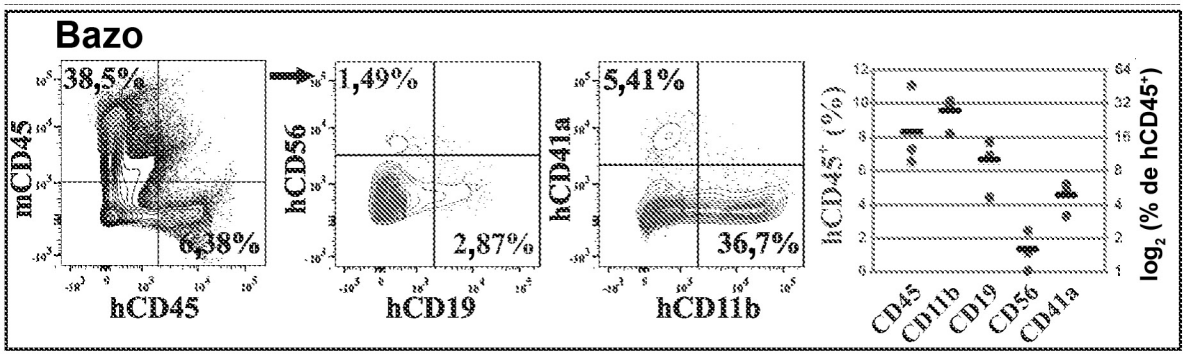

Bazo
38,5%
6,38%
mCD45
hCD45
1,49%
2,87%
hCD56
hCD19
5,41%
36,7%
hCD41a
hCD11b
hCD45+ (%)
log2 (% de hCD45+)
CD45
CD11b
CD19
CD56
CD41a

Fig. 4D

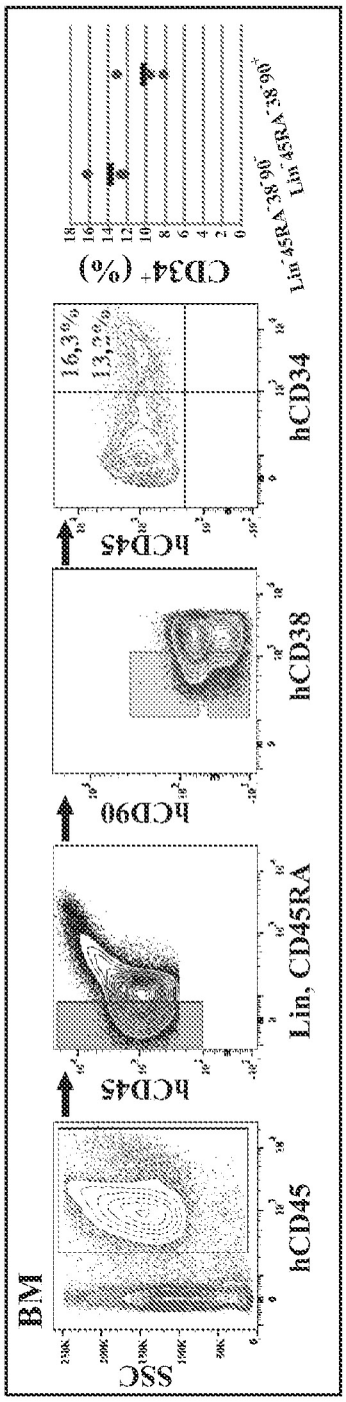

BM
SSC
hCD45
hCD45
Lin, CD45RA
hCD90
hCD38
hCD45
16,3%
13,2%
hCD34
CD34+ (%)
Lin-45RA-38-90-
Lin-45RA-38-90+

Fig. 4E

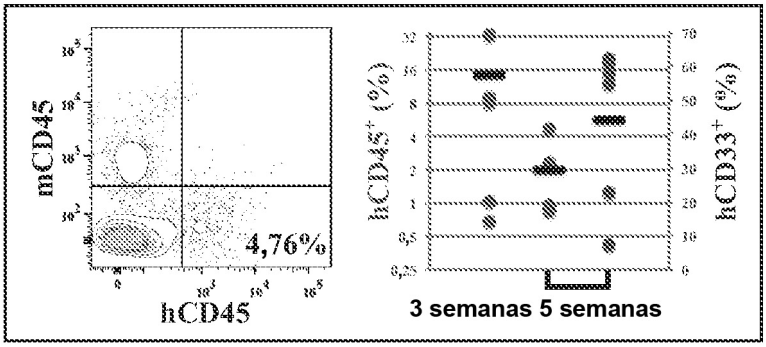


Fig. 4F

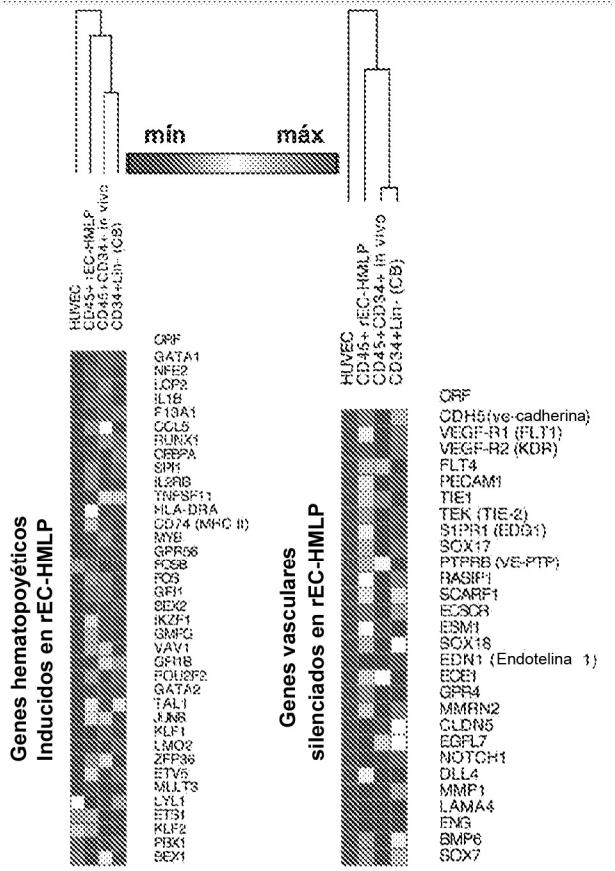

mín
máx
HUVEC
CD45+ rEC-HMLP
CD45+CD34+ in vivo
CD34+Lin- (CB)
Genes hematopoyéticos
Inducidos en rEC-HMLP
ORF
GATA1
NFE2
FLOP2
IL1B
F13A1
CCL5
RUNX1
CEBPA
SPI1
IL6RB
TNFSF11
HLA-DRA
CD74 (MHC II)
MYB
GPR56
FCER
FOS
GFI1
SEX2
IKZF1
GMFG
VAV1
GFI1B
POU2F2
GATA2
TAL1
JUNB
KLF1
LMO2
ZFP36
ETV5
MLLT3
LYL1
ETS1
KLF2
PBX1
SEX1
HUVEC
CD45+ rEC-HMLP
CD45+CD34+ in vivo
CD34+Lin- (CB)
Genes vasculares
silenciados en rEC-HMLP
ORF
CDH5 (ve-cadherina)
VEGF-R1 (FLT1)
VEGF-R2 (KDR)
FLT4
PECAM1
TIE1
TEK (TIE-2)
S1PR1 (EDG1)
SOX17
PTPRB (VE-PTP)
RASIP1
SCARF1
EGFR
ESM1
SOX18
EDN1 (Endotelina 1)
ECE1
GPR4
MMRN2
CLDN5
EGFL7
NOTCH1
DLL4
MMP1
LAMA4
ENG
BMP6
SOX7

Fig. 5A

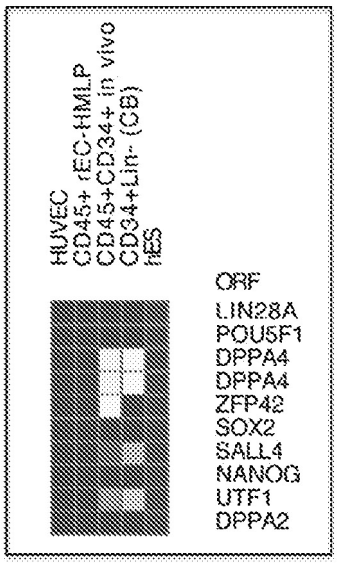

HUVEC
CD45+ rEC-HMLP
CD45+CD34+ in vivo
CD34+Lin- (CB)
hES
ORF
LIN28A
POU5F1
DPPA4
DPPA4
ZFP42
SOX2
SALL4
NANOG
UTF1
DPPA2

Fig. 5B

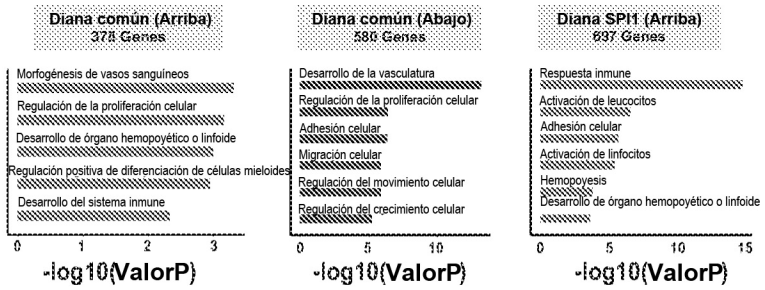

Diana común (Arriba)
378 Genes
Morfogénesis de vasos sanguíneos
Regulación de la proliferación celular
Desarrollo de órgano hemopoyético o linfoide
Regulación positiva de diferenciación de células mieloides
Desarrollo del sistema inmune
0
1
2
3
-log10(ValorP)
Diana común (Abajo)
580 Genes
Desarrollo de la vasculatura
Regulación de la proliferación celular
Adhesión celular
Migración celular
Regulación del movimiento celular
Regulación del crecimiento celular
0
5
10
-log10(ValorP)
Diana SPI1 (Arriba)
697 Genes
Respuesta inmune
Activación de leucocitos
Adhesión celular
Activación de linfocitos
Hemopoyesis
Desarrollo de órgano hemopoyético o linfoide
0
5
10
15
-log10(ValorP)

Fig. 5C

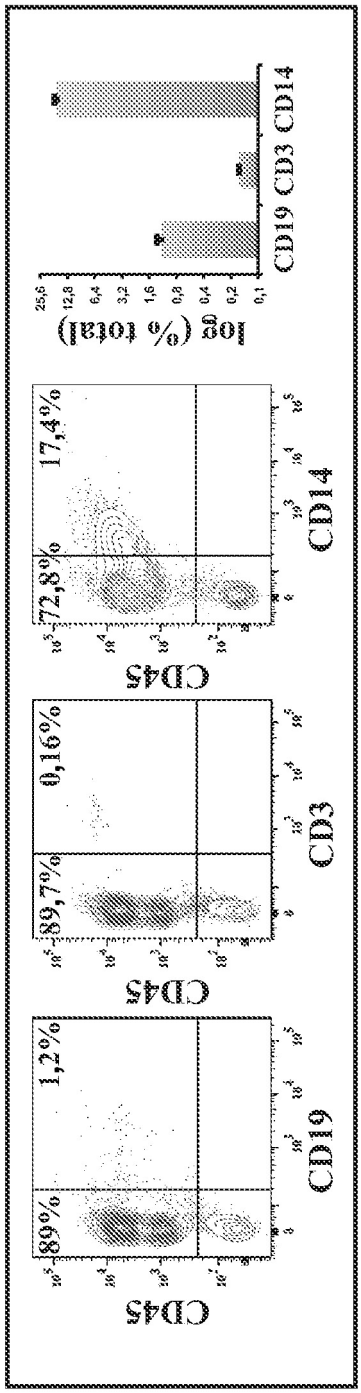

CD45
89%
1,2%
CD19
CD45
89,7%
0,16%
CD3
CD45
72,8%
17,4%
CD14
log (% total)
25,6
12,8
6,4
3,2
1,6
0,8
0,4
0,2
0,1
CD19 CD3 CD14

Fig. 6A

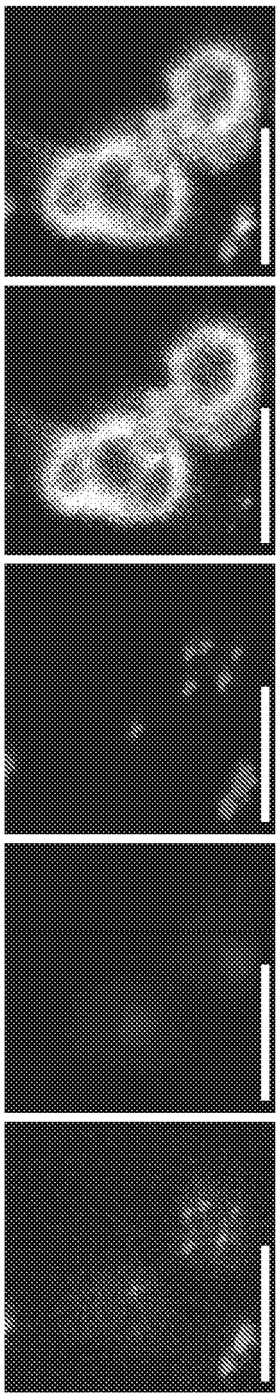


Fig. 6B