



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 525**

51 Int. Cl.:
C07K 14/46 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06834636 .0**
96 Fecha de presentación : **06.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1970446**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Factor de reprogramación celular.**

30 Prioridad: **13.12.2005 JP 2005-359537**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73 Titular/es: **Kyoto University**
36-1, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP

72 Inventor/es: **Yamanaka, Shinya**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 525 T3

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

DESCRIPCIÓN

Factor de reprogramación celular

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un factor de reprogramación celular que tiene una acción de reprogramación de una célula somática diferenciada para derivar un citoblasto pluripotente inducido.

10 Técnica anterior

Los citoblastos embrionarios (células ES) son citoblastos establecidos de embriones tempranos de ser humano o ratón que tienen el rasgo característico de que pueden cultivarse durante un largo periodo de tiempo a la vez que mantienen la capacidad pluripotente de diferenciarse en todos los tipos de células existentes en los cuerpos vivos. Se espera que los citoblastos embrionarios humanos se usen como recursos para terapias de trasplante de células para diversas enfermedades tales como enfermedad de Parkinson, diabetes juvenil y leucemia aprovechándose las propiedades anteriormente mencionadas. Sin embargo, el trasplante de células ES tiene el problema de causar el rechazo del mismo modo que el trasplante de órganos. Además, desde un punto de vista ético, hay muchas opiniones discrepantes contra el uso de células ES que se establecen destruyendo embriones humanos. Si la desdiferenciación de pacientes que poseen células somáticas diferenciadas pudiera inducirse para establecer células que tienen pluripotencia y capacidad de crecimiento similar a la de las células ES (en esta memoria descriptiva estas células se denominan en lo sucesivo "citoblastos pluripotentes inducidos (células iPS)", aunque algunas veces se llaman "células similares a citoblastos embrionarios" o "células similares a ES"), se tiene previsto que tales células puedan usarse como células pluripotentes ideales, libres de rechazo o dificultades éticas.

Como procedimiento para la reprogramación de un núcleo somático se informó, por ejemplo, de una técnica de establecimiento de un citoblasto embrionario de un embrión clonado preparado trasplantando un núcleo de una célula somática en un óvulo (W.S. Hwang y col., Science, 303, pág. 1669-74, 2004; W.S. Hwang y col., Science, 308, pág. 1777-83, 2005; sin embargo, se demostró que estos artículos eran mentira y posteriormente se retiraron). Sin embargo, esta técnica de preparación del embrión clonado sólo con el fin de establecer células ES tiene bastantes más problemas éticos graves cuando se compara con células ES comunes usando embriones en excedente producidos en terapia de fecundación. También se informó de una técnica de reprogramación de un núcleo de célula somática fusionando una célula somática y una célula ES (M. Tada y col., Curr. Biol., 11, pág. 1553-1558, 2001; C.A. Cowan y col., Science, 309, pág. 1369-73, 2005). Sin embargo, este procedimiento produce el uso de células ES humanas, que fracasa en proporcionar una solución a las dificultades éticas. Además, se informó de una técnica de reprogramación de un núcleo de célula haciendo reaccionar un extracto de una cepa celular derivada de un tumor de la célula germinal generado en un ser humano con una célula diferenciada (C.K. Taranger y col., Mol. Biol. Cell, 16, pág. 5719-35, 2005). Sin embargo, era completamente desconocido que el componente en el extracto indujera la reprogramación en este procedimiento, y por tanto, este procedimiento tiene problemas de fiabilidad y seguridad técnica.

Se propuso un procedimiento para cribar un factor de reprogramación celular que tiene una acción de reprogramación de células somáticas diferenciadas para derivar citoblastos pluripotentes inducidos (publicación internacional WO2005/80598). Este procedimiento comprende las etapas de: poner en contacto células somáticas que contienen un gen, en el que un gen de marcador está posicionado de manera que reciba el control de la expresión por una región de control de la expresión de los genes ECAT (transcrito asociado a células ES) (es decir, una clase de genes específicamente expresados en células ES) con cada sustancia de prueba; examinar la presencia o ausencia de la aparición de una célula que expresa el gen de marcador; y elegir una sustancia de prueba que induzca la aparición de dicha célula como candidato de un factor de reprogramación celular para células somáticas. Un procedimiento para la reprogramación de una célula somática se desvela en el Ejemplo 6 y similares de la publicación anterior. Sin embargo, esta publicación fracasa en informar de una identificación real de un factor de reprogramación celular.

Documento de patente 1: publicación internacional WO2005/8059

Divulgación de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un factor de reprogramación celular. Más específicamente, es un objeto de la presente invención proporcionar un medio para inducir reprogramación de una célula diferenciada sin usar óvulos, embriones ni células ES para establecer convenientemente y de forma altamente reproducible un citoblasto pluripotente inducido que tiene pluripotencia y capacidad de crecimiento similar al de las células ES.

Los inventores de la presente invención realizaron diversas investigaciones para lograr el objeto anteriormente mencionado e intentaron identificar un factor de reprogramación celular usando el procedimiento de cribado para un factor de reprogramación celular desvelado en la publicación internacional WO2005/80598. Como resultado se encontraron 24 tipos de genes candidatos como genes relacionados con la reprogramación nuclear y, entre ellos, se

encontró que tres tipos de los genes eran genes esenciales para la reprogramación nuclear. La presente invención se logró basándose en los hallazgos anteriormente mencionados.

5 Por tanto, la presente invención proporciona un factor de reprogramación celular para una célula somática que comprende un producto génico de cada uno de los tres siguientes tipos de genes: un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Myc. Según una realización preferida de la invención se proporciona el factor anteriormente mencionado que comprende un producto génico de cada uno de los tres siguientes tipos de genes. Oct3/4, Klf4 y c-Myc.

10 Según otra realización preferida se proporciona el factor anteriormente mencionado que comprende además un producto génico del siguiente gen: un gen de la familia Sox y, como realización más preferida, se proporciona el factor anteriormente mencionado que comprende un producto génico de Sox2.

15 Según todavía otra realización preferida se proporciona el factor anteriormente mencionado que comprende una citocina junto con el producto génico del gen de la familia Myc o alternativamente en lugar del producto génico del gen de la familia Myc. Como una realización más preferida se proporciona el factor anteriormente mencionado en el que la citocina es factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) y/o factor de citoblastos (SCF).

20 Según realizaciones particularmente preferidas se proporciona un factor de reprogramación celular para una célula somática que comprende un producto génico del gen TERT, además de un producto génico de cada uno de un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Myc y un gen de la familia Sox; y el factor anteriormente mencionado que comprende un producto génico o productos génicos de uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes antígeno T grande del SV40, HPV16 E6, HPV16 E7 y Bmil, además de un producto génico de cada uno de el gen de la familia Oct, el gen de la familia Klf, el gen de la familia Myc, el gen de la familia Sox y el gen TERT.

25 Además de estos factores se proporciona el factor anteriormente mencionado que comprende además un producto génico o productos génicos de uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes: Fbx15, Nanog, ERas, ECAT15-2, Tcl1 y β -catenina.

30 Según otra realización preferida de la invención anteriormente mencionada también se proporciona el factor anteriormente mencionado que comprende un producto génico o productos génicos de uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes: ECAT1, Esg1, Dnmt3L, ECAT8, Gdf3, Sox15, ECAT15-1, Fthl17, Sal14, Rex1, UTF1, Stella, Stat3 y Grb2.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un citoblasto pluripotente inducido por reprogramación nuclear de una célula somática que comprende la etapa de poner en contacto el factor de reprogramación celular anteriormente mencionado con la célula somática.

40 Según una realización preferida de la invención se proporcionan el procedimiento anteriormente mencionado que comprende la etapa de añadir el factor de reprogramación celular anteriormente mencionado a un cultivo de la célula somática; el procedimiento anteriormente mencionado que comprende la etapa de introducir un gen que codifica el factor de reprogramación celular anteriormente mencionado en la célula somática; el procedimiento anteriormente mencionado que comprende la etapa de introducir dicho gen en la célula somática usando un vector recombinante que contiene al menos un tipo de gen que codifica el factor de reprogramación celular anteriormente mencionado; y el procedimiento anteriormente mencionado en el que una célula somática aislada de un paciente se usa como célula somática.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un citoblasto pluripotente inducido obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado. La presente invención también proporciona una célula somática derivada induciendo diferenciación del citoblasto pluripotente inducido anteriormente mencionado.

50 La presente descripción desvela adicionalmente un procedimiento para terapia con citoblastos que comprende la etapa de trasplantar una célula somática, en el que dicha célula se obtiene induciendo diferenciación de un citoblasto pluripotente inducido obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado usando una célula somática aislada y recogida de un paciente en dicho paciente.

55 La presente descripción desvela adicionalmente un procedimiento para evaluar una función fisiológica o toxicidad de un compuesto, un medicamento, un veneno o similares usando diversas células obtenidas induciendo diferenciación de un citoblasto pluripotente inducido obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado.

60 La presente invención también proporciona un procedimiento para mejorar la capacidad de diferenciación y/o crecimiento de una célula que comprende la etapa de poner en contacto el factor de reprogramación celular anteriormente mencionado con la célula y proporcionar además una célula obtenida por el procedimiento anteriormente mencionado, y una célula somática derivada induciendo diferenciación de una célula obtenida por el procedimiento anteriormente mencionado.

65

Usando el factor de reprogramación celular proporcionado por la presente invención, la reprogramación de un núcleo de célula diferenciada puede inducirse convenientemente y de forma altamente reproducible sin usar embriones o células ES, y puede establecerse un citoblasto pluripotente inducido, como una célula sin diferenciar que tiene capacidad de diferenciación, pluripotencia y capacidad de crecimiento similar al de células ES. Por ejemplo, un citoblasto pluripotente inducido que tiene alta capacidad de crecimiento y pluripotencia de diferenciación puede prepararse a partir de una célula somática del propio paciente usando el factor de reprogramación celular de la presente invención. Las células que pueden obtenerse diferenciando dicha célula (por ejemplo, células del músculo cardíaco, células productoras de insulina, células nerviosas y similares) son extremadamente útiles debido a que pueden utilizarse para terapias de trasplante de citoblastos para una variedad de enfermedades tales como insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Parkinson y lesión de la médula espinal, pudiendo así evitarse el problema ético referente al uso de embrión humano y rechazo después de trasplante. Además, diversas células obtenibles por diferenciación del citoblasto pluripotente inducido (por ejemplo, células del músculo cardíaco, células hepáticas y similares) son altamente útiles como sistemas para evaluar la eficacia o toxicidad de compuestos, medicamentos, venenos y similares.

Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 muestra un procedimiento de cribado para factores de reprogramación usando fibroblastos embrionarios (MEF) de un ratón que tiene el gen *Fbx15* activado en β geo.

La Fig. 2 representa fotografías que muestran la morfología de células iPS obtenidas introduciendo los 24 genes mostrados en la Tabla 4. También se muestran las morfologías de las células diferenciadas (MEF) y de citoblastos embrionarios normales (ES) como referencia.

La Fig. 3 muestra perfiles de expresión de genes de marcadores en células iPS. Se muestran los resultados de RT-PCR usando ARN totales extraídos de células iPS, células ES y células MEF como moldes.

La Fig. 4 muestra el estado de metilación de ADN en células iPS. Los ADN genómicos extraídos de células iPS, células ES y células MEF se trataron con bisulfito. Los ADN diana se amplificaron por PCR y luego se insertaron en plásmido. Se aislaron diez clones de plásmido para cada uno de los genes, y se secuenciaron. Los CpGs metilados se indican con círculos rellenos y los CpGs sin metilar con círculos blancos.

La Fig. 5 muestra números de colonias de células resistentes a G418 obtenidas por transducción de grupos de 24 genes y grupos de 23 genes en los que cada gen individual se sacó del grupo de 24 genes. Las partes inferiores de la gráfica muestran números de colonias obtenidos una semana después de la selección con G418, y las partes superiores de la gráfica muestran números de clones obtenidos en tres semanas. Cuando se sacó cada gen recuadrado (el número de referencia para cada gen es el mismo que se indica en la Tabla 1) no se obtuvieron colonias en absoluto, o solo se observaron unas pocas colonias después de 3 semanas.

La Fig. 6 muestra números de colonias de células resistentes a G418 obtenidas por transducción del grupo de 10 genes y grupos de 9 genes en los que cada gen individual se sacó del grupo de 10 genes. Cuando cada uno de los genes nº 14, nº 15 o nº 20 se sacó, no se obtuvo colonia. Cuando el gen nº 22 se sacó se obtuvieron algunas colonias resistentes a G418. Sin embargo, las células dieron morfología diferenciada que fue aparentemente diferente de la de las células iPS.

La Fig. 7 muestra números de colonias emergidas resistentes a G418 (colonia reprogramada) con el grupo de 10 genes, el grupo de 4 genes, grupos de 3 genes o grupos de 2 genes. Se muestran la morfología típica y los tamaños de las colonias.

La Fig. 8 representa fotografías que muestran resultados de tinción con hematoxilina-eosina (H & E) de tumores formados después del trasplante subcutáneo de células iPS derivadas de MEF en ratones sin pelo. Se observó diferenciación en una variedad de tejidos en un sistema triploblástico.

La Fig. 9 representa fotografías de embriones preparados trasplantando células iPS derivadas de fibroblastos dérmicos adultos en blastocistos de ratón y trasplantando las células en los úteros de ratones pseudopreñados. Puede observarse que, en el embrión izquierdo superior, las células derivadas de las células iPS (que emiten fluorescencia verde) se distribuyeron sistémicamente. En las fotografías inferiores puede observarse que casi todas las células del corazón, hígado y médula espinal del embrión fueron positivas para GFP y se derivaron de las células iPS.

La Fig. 10 representa fotografías que muestran resultados de RT-PCR que confirman la expresión de los genes de marcadores de células ES. En las fotografías, Sox2 menos indica células iPS establecidas por la transducción de 3 genes en MEF, 4ECAT indica células iPS establecidas por la transducción de 4 genes en MEF, 10ECAT indica células iPS establecidas por la transducción de 10 genes en MEF, fibroblasto de piel 10ECAT indica células iPS establecidas por la transducción de 10 genes en fibroblastos dérmicos, ES indica células ES de ratón y MEF indica células MEF sin transducción de genes. Los valores numéricos bajo los símbolos indican números de clones.

La Fig. 11 muestra un efecto de bFGF sobre el establecimiento de células iPS de MEF. Cuatro factores (fila superior) o tres factores, excepto c-Myc (fila inferior), se transdujeron retrovíricamente en MEF derivados de ratones *Fbx15* ^{β geo/ β geo} y se cultivaron en células nodrizas comunes (células STO) (izquierda) y células STO introducidas en el vector de expresión de bFGF (derecha). La selección con G418 se realizó durante 2 semanas y las células se tiñeron con Crystal Blue y se fotografiaron. Los valores numéricos indican el número de colonias.

La Fig. 12 representa explicaciones de los experimentos usando ratones Nanog-EGFP-IRES-Puro. A: Se aisló cromosoma artificial de *E. coli* (BAC) que contenía el gen Nanog de ratón en el centro, y el casete EGFP-IRES-

Puro se insertó en la dirección 5' de la región codificante de Nanog por ingeniería genética mediada por recombinación. B: Se prepararon ratones transgénicos con el BAC modificado. La expresión de GFP se observó limitadamente en masas celulares internas de blastocistos y gónadas.

La Fig. 13 representa explicaciones de los experimentos usando ratones Nanog-EGFP-IRES-Puro. De los embriones de ratones Nanog-EGFP-TRES-Puro (13,5 días después de la fecundación) se extirparon las cabezas, las vísceras y las gónadas para establecer MEF. Como resultado del análisis con un citómetro de flujo, casi no existieron células positivas para GFP en MEF derivados de los ratones Nanog-EGFP-IRES-Puro (Nanog) del mismo modo que los MEF derivados de ratones $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ ($Fbx15$) o MEF derivados de ratón de tipo natural (natural).

La Fig. 14 representa fotografías de células iPS establecidas de MEF de ratones Nanog-EGFP-IRES-Puro (izquierda) y MEF de ratones $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ (derecha). Las células se seleccionaron con puromicina y G418, respectivamente.

La Fig. 15 muestra resultados del crecimiento de células iPS. 100.000 células de cada una de las células ES, células iPS derivadas de los MEF de ratones Nanog-EGFP-IRES-Puro (Nanog iPS, izquierda) y células iPS derivadas de los MEF de ratones $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ (Fbx iPS) se sembraron en placas de 24 pocillos y se efectuaron pases cada 3 días. Se muestran los resultados de la cifra de células. Los valores numéricos representan tiempos de duplicación promedio.

La Fig. 16 muestra perfiles de expresión génica de células iPS. La expresión de genes de marcadores en MEF, células ES, células iPS derivadas de MEF de ratones Nanog-EGFP-IRES-Puro (Nanog iPS, izquierda) y células iPS derivadas de MEF de ratones $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ (Fbx iPS) se analizaron por RT-PCR. Los valores numéricos al final indican los números de pases.

La Fig. 17 muestra la formación de teratoma de las células iPS de Nanog. 1.000.000 de células de cada una de las células ES o células iPS de Nanog se inyectaron subcutáneamente en los lomos de ratones sin pelo, y se muestran la aparición de tumores formados después de 3 semanas (izquierda) e imágenes de tejido (derecha, teñidos con H & E).

La Fig. 18 muestra la preparación de ratones quiméricos con las células iPS de Nanog. Los ratones quiméricos que nacieron después del trasplante de las células iPS de Nanog (clon NPMF4EK-24, se efectuaron pases 6 veces) en los blastocistos. Nacieron cuatro ratones quiméricos de los 90 embriones trasplantados.

La Fig. 19 muestra la transmisión de la línea germinal de las células iPS de Nanog. El análisis de PCR de ADN genómico de ratones, nacidos apareando los ratones quiméricos mostrados en la Fig. 18 y ratones C57BL/6, revelaron la existencia de transgenes de Oct3/4 y Klf4 en todos los ratones, confirmando así la transmisión de la línea germinal.

La Fig. 20 muestra la inducción de diferenciación en células nerviosas de células iPS. Se muestran células nerviosas (parte superior, positivas para β III-tubulina), oligodendrocitos (izquierda, positivas para O4) y astrocitos (derecha, positivas para GFAP) diferenciados *in vitro* de células iPS derivadas de fibroblastos dérmicos.

La Fig. 21 representa explicaciones del establecimiento de células iPS sin usar selección de fármaco. Se sembraron MEF a 10.000 a 100.000 células por placa de 10 cm, y los 4 factores se transdujeron retrovíricamente. No aparecieron colonias en el control (vacías, izquierda), mientras en la placa con la transducción por los 4 factores se obtuvieron colonias de hinchazón similares a las de las células iPS (centro), además de colonias transformantes planas. Cuando se efectuaron pases de las células se obtuvieron células similares a las células iPS (derecha).

La Fig. 22 muestra perfiles de expresión génica de células establecidas sin usar selección de fármaco. El ARN se extrajo de las células establecidas como se muestra en la Fig. 21, y la expresión de los genes de marcadores de las células ES se analizó por RT-PCR.

La Fig. 23 muestra células similares a células iPS derivadas de fibroblastos humanos. Se muestran las colonias obtenidas por transducción retrovírica con genes homólogos humanos de los 4 factores en fibroblastos derivados de embriones humanos (izquierda), y las células después de dos pases (derecha).

La Fig. 24 muestra el establecimiento de las células iPS de fibroblastos dérmicos adultos humanos. Los factores mencionados en la columna izquierda se transdujeron retrovíricamente en fibroblastos dérmicos adultos humanos infectados con el receptor retrovírico de ratón con lentivirus. Las fotografías muestran imágenes de contraste de fases (objeto x 10) en el día 8 después de la infección vírica.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

El factor de reprogramación celular de la presente invención se caracteriza porque comprende un producto génico de cada uno de los tres siguientes tipos de genes un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Myc; y según una realización preferida se caracteriza porque comprende un producto génico de un gen de la familia Sox, además de los tres tipos de genes anteriormente mencionados.

Como medio de confirmación del factor de reprogramación celular de la presente invención puede usarse, por ejemplo, el procedimiento de cribado para factores de reprogramación celular desvelados en la publicación internacional documento WO 2005/80598. Toda la divulgación de la publicación anteriormente mencionada se incorpora en la divulgación de la memoria descriptiva por referencia. Con referencia a la publicación anteriormente mencionada, los expertos en la materia pueden realizar el cribado de factores de reprogramación celular para

confirmar la existencia y la acción del factor de reprogramación de la presente invención.

Por ejemplo, como sistema experimental que permite la observación del fenómeno de reprogramación puede usarse un ratón en el que β geo (un gen de fusión del gen β -galactosidasa y el gen de resistencia a neomicina) está activado en el sitio Fbx15. Los detalles se describen en los ejemplos de la memoria descriptiva. El gen Fbx15 de ratón es un gen específicamente expresado en células pluripotentes de diferenciación tales como células ES y embriones tempranos. En un ratón homomutante en el que β geo está activado en el gen Fbx15 de ratón de manera que sea deficiente en la función de Fbx15, generalmente no se observan fenotipos anormales que incluyan aquellos que se relacionan con la diferenciación de pluripotencia o generación. En este ratón, la expresión de β geo está controlada por el potenciador y promotor del gen Fbx15, y las células somáticas diferenciadas en las que β geo no se expresa tienen sensibilidad a G418. A diferencia, las células ES homomutantes activadas en β geo tienen resistencia contra G418 a una concentración extremadamente alta (igual a o superior a 12 mg/ml). Utilizando este fenómeno puede construirse un sistema experimental para visualizar la reprogramación de células somáticas.

Aplicando el sistema experimental anteriormente mencionado, los fibroblastos (MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}) pueden aislarse primero de un embrión del ratón homomutante activado en β geo (13,5 días después de la fecundación). Los MEF no expresan el gen Fbx15 y, por consiguiente, tampoco expresan β geo para dar sensibilidad a G418. Sin embargo, cuando los MEF se fusionan con células ES libres de manipulación genética (también tienen sensibilidad para G418), β geo se expresa y las células se vuelven resistentes a G418 como resultado de la reprogramación de núcleos de MEF. Por tanto, utilizando este sistema experimental, el fenómeno de reprogramación puede visualizarse como resistencia a G418.

Los factores de reprogramación celular pueden seleccionarse usando el sistema experimental anteriormente mencionado. Como candidatos a genes relevantes para factores de reprogramación celular pueden seleccionarse una pluralidad de genes que muestra expresión específica en células ES o de los cuales se sugieren funciones importantes en el mantenimiento de la pluripotencia de diferenciación de células ES, y puede confirmarse si cada gen candidato puede inducir o no reprogramación nuclear sola o en una combinación apropiada de los mismos. Por ejemplo, se confirma que una combinación de todos los genes candidatos primarios seleccionados puede inducir la reprogramación de células diferenciadas en un estado próximo al de las células ES. Entonces, las combinaciones se preparan sacando cada gen individual de la combinación anteriormente mencionada, y las mismas acciones de las combinaciones se confirman con el fin de seleccionar cada gen candidato secundario cuya ausencia produce una reducción de la capacidad de inducción de reprogramación o pérdida de la capacidad de inducción de reprogramación. Repitiendo etapas similares para los genes candidatos secundarios seleccionados como se ha descrito anteriormente puede seleccionarse una combinación esencial de genes de reprogramación nuclear, y puede confirmarse que una combinación de productos génicos de cada uno de los tres tipos de genes, un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, y un gen de la familia Myc, actúa de factor de reprogramación celular. Puede confirmarse adicionalmente que una combinación de un producto génico de un gen de la familia Sox adicionalmente con los productos génicos de los tres tipos de genes anteriormente mencionados tiene características extremadamente superiores como factor de reprogramación celular. Ejemplos específicos del procedimiento de selección para los factores de reprogramación celular se demuestran en los ejemplos de la memoria descriptiva. Por tanto, con referencia a las explicaciones generales anteriores y la explicación específica de los ejemplos, los expertos en la materia pueden confirmar fácilmente que la combinación de estos tres tipos de genes induce la reprogramación de células somáticas, y que la combinación de estos tres tipos de productos génicos es esencial para la reprogramación nuclear.

El factor de reprogramación celular proporcionado por la presente invención comprende al menos una combinación de productos génicos de un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Myc, por ejemplo, una combinación de productos génicos de los tres tipos de genes Oct3/4, Klf4 y c-Myc. Ejemplos del gen de la familia Oct incluyen, por ejemplo, Oct3/4, Oct1A, Oct6 y similares. Oct3/4 es un factor de transcripción que pertenece a la familia POU y se informa como un marcador de células sin diferenciar (K. Okamoto y col., Cell, 60, pág. 461-72, 1990). También se informa que Oct3/4 participa en el mantenimiento de la pluripotencia (J. Nichols y col., Cell, 95, pp379-91, 1998). Ejemplos del gen de la familia Klf incluyen Klf1, Klf2, Klf4, Klf5 y similares. Klf4 (factor 4 similar a Kruppel) se informa como un factor represor de tumores (A.M. Ghaleb y col., Cell Res., 15, pág. 92-6, 2005). Ejemplos del gen de la familia Myc incluyen c-Myc, N-Myc, L-Myc y similares. c-Myc es un factor de control de la transcripción que participa en la diferenciación y la proliferación de células (S. Adhikary, M. Eilers, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6, pág. 635-45, 2005), y también se informa que participa en el mantenimiento de la pluripotencia (P. Cartwright y col., Development, 132, pág. 885-96, 2005). Los números de acceso de NCBI de los genes de las familias distintas de Oct3/4, Klf4 y c-Myc son los siguientes:

Tabla 1

		Ratón	Ser humano
Klf1	Factor 1 similar a Kruppel (eritroide)	NM_010635	NM_006563
Klf2	Factor 2 similar a Kruppel (pulmón)	NM_008452	NM_016270
Klf5	Factor 5 similar a Kruppel	NM_009769	NM_001730
c-Myc	oncogén de la mielocitomatosis	NM_010849	NM_002467
N-Myc	oncogén relacionado vírico con la mielocitomatosis v-Myc, derivado de neuroblastoma (aviar)	NM_008709	NM_005378
L-Myc	homólogo 1 del oncogén vírico de la mielocitomatosis v-Myc, derivado de carcinoma de pulmón (aviar)	NM_008506	NM_005376
Oct1A	dominio POU, clase 2, factor de transcripción 1	NM_198934	NM_002697
Oct6	dominio POU, clase 3, factor de transcripción 1	NM_011141	NM_002699

5 Todos estos genes son aquellos comúnmente existentes en mamíferos que incluyen seres humanos, y para el uso de los productos génicos anteriormente mencionados en la presente invención pueden usarse genes derivados de mamíferos arbitrarios (aquellos derivados de mamíferos tales como ratón, rata, bovino, ovino, caballo y mono y similares). Además de los productos génicos naturales también pueden usarse productos génicos mutantes que incluyen sustitución, inserción y/o delección de varios aminoácidos (por ejemplo, 1 a 10, preferentemente 1 a 6, más preferentemente 1 a 4, todavía más preferentemente 1 a 3, y lo más preferentemente 1 ó 2) y que tienen función similar a los productos génicos naturales. Por ejemplo, como producto génico de c-Myc puede usarse un producto de tipo estable (T58A), además del producto natural. La explicación anterior puede aplicarse similarmente a los otros productos génicos.

15 El factor de reprogramación celular de la presente invención puede comprender un producto génico distinto de los tres tipos de productos génicos anteriormente mencionados. Un ejemplo de tal producto génico incluye un producto génico de un gen de la familia Sox. Ejemplos del gen de la familia Sox incluyen, por ejemplo, Sox1, Sox3, Sox7, Sox15, Sox17 y Sox18, y un ejemplo preferido incluye Sox2. Un factor de reprogramación celular que comprende al menos una combinación de los productos génicos de los cuatro tipos de genes, un gen de la familia Oct (por ejemplo, Oct3/4), un gen de la familia Klf (por ejemplo, Klf4), un gen de la familia Myc (por ejemplo, c-Myc) y un gen de la familia Sox (por ejemplo, Sox2) es una realización preferida de la presente invención desde un punto de vista de eficiencia de reprogramación y, en particular, algunas veces se prefiere una combinación de un producto génico de un gen de la familia Sox para obtener pluripotencia. Sox2, expresado en un proceso de desarrollo temprano, es un gen que codifica un factor de transcripción (A.A. Avilion y col., Genes Dev., 17, pp. 126-40, 2003). Los números de acceso de NCBI de los genes de la familia Sox distintos de Sox2 son los siguientes.

Tabla 2

		Ratón	Ser humano
Sox1	Gen 1 que contiene la caja SRY	NM_009233	NM_005986
Sox3	Gen 3 que contiene la caja SRY	NM_009237	NM_005634
Sox7	Gen 7 que contiene la caja SRY	NM_011446	NM_031439
Sox15	Gen 15 que contiene la caja SRY	NM_009235	NM_006942
Sox17	Gen 17 que contiene la caja SRY	NM_011441	NM_022454
Sox18	Gen 18 que contiene la caja SRY	NM_009236	NM_018419

Además, un producto génico de un gen de la familia Myc puede sustituirse por una citocina. Como citocina se prefiere, por ejemplo, SCF, bFGF o similares. Sin embargo, las citocinas no se limitan a estos ejemplos.

30 Como realización más preferida, un ejemplo incluye un factor que induce inmortalización de células, además de los tres tipos de productos génicos anteriormente mencionados, preferentemente los cuatro tipos de productos génicos. Por ejemplo, un ejemplo incluye una combinación de un factor que comprende un producto génico del gen TERT con un factor que comprende un producto génico o productos génicos de uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes: antígeno T grande del SV40, HPV16 E6, HPV16 E7 y Bmil. TERT es esencial para el mantenimiento de la estructura telomérica en el extremo del cromosoma en el momento de la replicación de ADN, y el gen se expresa en citoblastos o células tumorales en seres humanos, mientras que no se expresa en muchas células somáticas (I. Horikawa, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, pág. 18437-442, 2005). Se informaron antígeno T grande del SV40, HPV16 E6, HPV16 E7 o Bmil para inducir inmortalización de células somáticas humanas en combinación con antígeno T grande (S. Akimov y col., Stem Cells, 23, pág. 1423-1433, 2005; P. Salmon y col., Mol. Ther., 2, pág. 404-414, 2000). Estos factores son particularmente extremadamente útiles cuando las células iPS se inducen de células humanas. Los números de acceso de NCBI de genes TERT y Bmil son los siguientes.

Tabla 3

		Ratón	Ser humano
TERT	transcriptasa inversa de la telomerasa	NM_009354	NM_198253
Bmil	región 1 de inserción de Mo-MLV del linfoma B	NM_007552	NM_005180

Además, puede combinarse un producto génico o productos génicos de uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes Fbx15, Nanog, ERas, ECAT15-2, Tcl1 y β -catenina. Como realización particularmente preferida desde un punto de vista de eficiencia de reprogramación, un ejemplo incluye un factor de reprogramación celular que comprende un total de diez tipos de productos génicos, en el que los productos génicos de Fbx15, Nanog, ERas, ECAT15-2, Tcl1 y β -catenina se combinan con los cuatro tipos de productos génicos anteriormente mencionados. Fbx15 (Y Tokuzawa y col., Mol. Cell Biol., 23, pág. 2699-708, 2003), Nanog (K. Mitsui y col., Cell, 113, pág. 631-42, 2003), ERas (K. Takahashi, K. Mitsui, S. Yamanaka, Nature, 423, pág. 541-5, 2003) y ECAT15-2 (A. Bortvin y col., Development, 130, pág. 1673-80, 2003) son genes específicamente expresados en células ES. Tcl1 participa en la activación de Akt (A. Bortvin y col., Development, 130, pág. 1673-80, 2003) y β -catenina es un factor importante que constituye la ruta de transmisión de señales de Wnt y también se informa que participa en el mantenimiento de la pluripotencia (N. Sato y col., Nat. Med., 10, pág. 55-63, 2004).

Además, el factor de reprogramación celular de la presente invención puede comprender, por ejemplo, un producto génico o productos génicos de uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes: ECAT1, Esg1, Dnmt3L, ECAT8, Gdf3, Sox15, ECAT15-1, Fthl17, Sal14, Rex1, UTF1, Stella, Stat3 y Grb2. ECAT1, Esg1, ECAT8, Gdf3 y ECAT15-1 son genes específicamente expresados en células ES (K. Mitsui y col., Cell, 113, pág. 631-42, 2003). Dnmt3L es un factor relacionado con enzimas metilantes de ADN y Sox15 es una clase de genes expresados en un proceso de desarrollo temprano y que codifica factores de transcripción (M. Maruyama y col., J. Biol. Chem., 280, pág. 24371-9, 2005). Fthl17 codifica proteína 17 similar a polipéptido pesado de ferritina (A. collLoriot, T. Boon, C. De Smet, Int. J. Cancer, 105, pág. 371-6, 2003), Sal14 codifica una proteína de dedos de Zn abundantemente expresada en citoblastos embrionarios (J. Kohlhasse y col., Cytogenet. Genome Res., 98, pág. 274-7, 2002) y Rex1 codifica un factor de transcripción que se localiza en la dirección 3' de Oct3/4 (E. Ben-Shushan, J.R. Thompson, L.J. Gudas, Y. Bergman, Mol. Cell Biol., 18, pág. 1866-78, 1998). UTF1 es un cofactor de la transcripción que se localiza en la dirección 3' de Oct3/4, y se informa que la supresión de la proliferación de células ES se induce cuando este factor se suprime (A. Okuda y col., EMBO J., 17, pág. 2019-32, 1998). Stat3 es un factor de señalización para la proliferación y diferenciación de células. La activación de Stat3 desencadena la operación de LIF, y así el factor desempeña una función importante para el mantenimiento de la pluripotencia (H. Niwa, T. Burdon, I. Chambers, A. Smith, Genes Dev., 12, pág. 2048-60, 1998). Grb2 codifica una proteína que media entre diversos receptores de factores de crecimiento que existen en membranas celulares y la cascada de Ras/MAPK (A.M. Cheng y col., Cell, 95, pág. 793-803, 1998).

Sin embargo, los productos génicos que pueden incluirse en el factor de reprogramación celular de la presente invención no se limitan a los productos génicos de los genes específicamente explicados anteriormente. El factor de reprogramación celular de la presente invención puede contener uno o más factores que se relacionan con la diferenciación, desarrollo, proliferación o similares y factores que tienen otras actividades fisiológicas, además de otros productos génicos que pueden servir de factor de reprogramación celular. Se entiende que tales realizaciones se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Usando células somáticas en las que solo se expresan uno o dos genes entre los tres tipos del gen Oct3/4, Klf4 y c-Myc, los otros productos génicos que pueden servir de factor de reprogramación celular pueden identificarse por, por ejemplo, realizando el cribado de un producto génico que puede inducir reprogramación nuclear de dichas células. Según la presente invención, el procedimiento de cribado anteriormente mencionado también se proporciona como un procedimiento novedoso para cribar un factor de reprogramación celular.

Los productos génicos contenidos en el factor de reprogramación celular de la presente invención pueden ser, por ejemplo, una proteína producida por sí misma a partir del gen anteriormente mencionado o, alternativamente, en una forma de un producto génico de fusión de dicha proteína con otra proteína, péptido o similares. Por ejemplo, también puede usarse una proteína de fusión con proteína de fluorescencia verde (GFP) o un producto génico de fusión con un péptido tal como una marca de histidina. Además, preparando y usando una proteína de fusión con el péptido TAT derivado del virus VIH puede promoverse la captación intracelular del factor de reprogramación celular mediante membranas celulares, permitiendo así la inducción de reprogramación sólo añadiendo la proteína de fusión a un medio, evitando así operaciones complicadas tales como la transducción de genes. Como los procedimientos de preparación de tales productos génicos de fusión son muy conocidos para los expertos en la materia, los expertos pueden diseñar y preparar fácilmente un producto génico de fusión apropiado dependiendo del fin.

Usando el factor de reprogramación celular de la presente invención, el núcleo de una célula somática puede reprogramarse para obtener un citoblasto pluripotente inducido. En la memoria descriptiva, el término "citoblastos pluripotentes inducidos" significa células que tienen propiedades similares a las de células ES, y más específicamente, el término engloba células sin diferenciar que tienen pluripotencia y capacidad de crecimiento. Sin embargo, el término no debe interpretarse restringidamente en cualquier sentido, y debe interpretarse en el sentido

más amplio. El procedimiento para preparar citoblastos pluripotentes inducidos usando un factor de reprogramación celular se explica en la publicación internacional WO2005/80598 (el término “células similares a ES” se usa en la publicación), y un medio para aislar citoblastos pluripotentes inducidos también se explica específicamente. Por tanto, con referencia a la publicación anteriormente mencionada, los expertos en la materia pueden preparar fácilmente citoblastos pluripotentes inducidos usando el factor de reprogramación celular de la presente invención.

El procedimiento para preparar citoblastos pluripotentes inducidos de células somáticas usando el factor de reprogramación celular de la presente invención no está particularmente limitado. Cualquier procedimiento puede emplearse mientras que el factor de reprogramación celular pueda ponerse en contacto con células somáticas bajo un entorno en el que pueden proliferar las células somáticas y los citoblastos pluripotentes inducidos. Por ejemplo, un producto génico contenido en el factor de reprogramación celular de la presente invención puede añadirse a un medio. Alternativamente, usando un vector que contiene un gen que puede expresar el factor de reprogramación celular de la presente invención puede emplearse un medio de transducción de dicho gen en una célula somática. Si se usa tal vector, dos o más tipos de genes pueden incorporarse en el vector, y cada uno de los productos génicos puede expresarse simultáneamente en una célula somática. Si uno o más de los productos génicos contenidos en el factor de reprogramación celular de la presente invención ya están expresados en una célula somática que va a reprogramarse, dichos productos génicos pueden excluirse del factor de reprogramación celular de la presente invención. Se entiende que tal realización se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

En la preparación de citoblastos pluripotentes inducidos usando el factor de reprogramación celular de la presente invención, los tipos de células somáticas que van a reprogramarse no están particularmente limitados, y puede usarse cualquier tipo de células somáticas. Por ejemplo, pueden usarse células somáticas maduras, además de células somáticas de un periodo embrionario. Si los citoblastos pluripotentes inducidos se usan para el tratamiento terapéutico de enfermedades, se desea usar células somáticas aisladas de pacientes. Por ejemplo, pueden usarse células somáticas implicadas en enfermedades, células somáticas que participan en el tratamiento terapéutico de enfermedades y similares. Un procedimiento para seleccionar citoblastos pluripotentes inducidos que aparecen en un medio según el procedimiento de la presente invención no está particularmente limitado, y un medio muy conocido puede emplearse adecuadamente, por ejemplo, puede usarse un gen de resistencia a fármaco o similares como gen de marcador para aislar citoblastos pluripotentes inducidos usando resistencia a fármacos como índice. En este campo se conocen diversos medios que pueden mantener el estado sin diferenciar y la pluripotencia de células ES y diversos medios que no pueden mantener tales propiedades, y los citoblastos pluripotentes inducidos pueden aislarse eficientemente usando una combinación de medios apropiados. Las capacidades de diferenciación y de proliferación de citoblastos pluripotentes inducidos aislados pueden confirmarse fácilmente por los expertos en la materia usando medios de confirmación ampliamente aplicados a células ES.

Los usos de los citoblastos pluripotentes inducidos preparados mediante el procedimiento de la presente invención no están particularmente limitados. Las células pueden usarse para cualquier experimento e investigación realizada con células ES, tratamientos terapéuticos que utilizan células ES y similares. Por ejemplo, células diferenciadas deseadas (por ejemplo, células nerviosas, células del músculo cardíaco, células de hemocito y similares) pueden derivarse tratando citoblastos pluripotentes inducidos obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención con ácido retinoico, factores de crecimiento tales como EGF, glucocorticoide o similares, y puede lograrse terapia con citoblastos basada en autotrasplante celular devolviendo las células diferenciadas obtenidas como se ha descrito anteriormente al paciente. Sin embargo, los usos de los citoblastos pluripotentes inducidos de la presente invención no se limitan a las realizaciones específicas anteriormente mencionadas.

Ejemplos

La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Selección del factor de reprogramación

Con el fin de identificar factores de reprogramación se requiere un sistema experimental para la fácil observación del fenómeno de reprogramación. Como sistema experimental se usó un ratón en el que β geo (un gen de fusión del gen β -galactosidasa y el gen de resistencia a neomicina) se activó en el sitio Fbx15. El gen Fbx15 de ratón es un gen específicamente expresado en células pluripotentes de diferenciación tales como células ES y embriones tempranos. Sin embargo, en un ratón homomutante en el que β geo se activó en el gen Fbx15 de ratón de manera que se eliminara la función de Fbx15 no se observaron fenotipos anormales que incluyeran aquellos que se relacionan con la pluripotencia de diferenciación o desarrollo. En este ratón, el control de expresión de β geo se consigue por el potenciador y promotor del gen Fbx15. Específicamente, β geo no se expresa en células somáticas diferenciadas, y tienen sensibilidad a G418. A diferencia, las células ES homomutantes de activación de β geo tienen resistencia contra G418 a una concentración extremadamente alta (igual a o superior a 12 mg/ml). Utilizando el fenómeno anterior se construyó un sistema experimental para visualizar la reprogramación de células somáticas.

En el sistema experimental anteriormente mencionado, los fibroblastos (MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}) se aislaron primero

de un embrión del ratón homomutante que activa β geo (13,5 días después de la fecundación). Como los MEF no expresan el gen Fbx15, las células tampoco expresan β geo y por tanto tienen sensibilidad a G418. Mientras que, cuando los MEF están fusionados con células ES que no han sido genomanipuladas (es decir, que tienen sensibilidad a G418), los núcleos de MEF se reprograman y, como resultado, β geo se expresa para dar resistencia a G418. Por tanto, la reprogramación del fenómeno puede visualizarse como resistencia a G418 usando este sistema experimental (publicación internacional WO2005/80598). Las búsquedas de factores de reprogramación se realizaron usando el sistema experimental anteriormente mencionado (Fig. 1), y se seleccionaron 24 tipos de genes totales como factores de reprogramación candidatos que incluían genes que mostraban expresión específica en células ES y se sugirió que los genes tenían funciones importantes en el mantenimiento de la pluripotencia de diferenciación de células ES. Estos genes se muestran en la Tablas 4 y 5 a continuación. Para β -catenina (nº 21) y c-Myc (nº 22) se usaron mutantes de tipo activo (catenina: S33Y, c-Myc: T58A).

Tabla 4

Número	Nombre del gen	Explicación del gen
1	ECAT1	transcrito 1 asociado a células ES (ECAT1)
2	ECAT2	proteína 5 asociada a pluripotencia del desarrollo (DPPA5), gen 1 específico de células ES (ESG1)
3	ECAT3	proteína 15 de la caja F (Fbx15),
4	ECAT4	factor de transcripción de homeocaja Nanog
5	ECAT5	Ras expresada en células ES (ERas),
6	ECAT7	proteína similar a ADN (citosina-5-)-metiltransferasa (Dnmt31), variante 1
7	ECAT8	transcrito 8 asociado a células ES (ECAT8)
8	ECAT9	factor 3 de diferenciación del crecimiento (Gdf3)
9	ECAT10	gen 15 que contiene la caja SRY (Sox15)
10	ECAT15-1	proteína 4 asociada a pluripotencia del desarrollo (Dppa4), variante 1
11	ECAT15-2	proteína 2 asociada a pluripotencia del desarrollo (Dppa2)
12	Fthl17	proteína 17 similar al polipéptido pesado de ferritina (Fth117)
13	Sal14	proteína 4 similar a Sal (<i>Drosophila</i>) (Sal14), variante a del transcrito
14	Oct3/4	dominio POU, clase 5, factor 1 de transcripción (Pou5f1)
15	Sox2	gen 2 que contiene la caja SRY (Sox2)
16	Rex1	proteína 42 de dedos de cinc (Zfp42)
17	Utf1	factor 1 de transcripción de células embrionarias sin diferenciar (Utf1)
18	Tell	punto 1 de ruptura de linfoma de linfocitos T (Tell)
19	Stella	proteína 3 asociada a pluripotencia del desarrollo (Dppa3)
20	Klf4	factor 4 similar a Kruppel (intestino) (Klf4)
21	β -catenina	catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88 kDa (Ctnnb1)
22	c-Myc	oncogén de la mielocitomatosis (Myc)
23	Stat3	transductor de señales y activador de la transcripción 3 (Stat3), variante 1 del transcrito
24	Grb2	proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2)

15

Tabla 5

Número	Nombre del gen	Rasgo característico	Número de acceso de NCBI	
			Ratón	Ser humano
1	ECAT1	Gen específicamente expresado en célula ES	AB211060	AB211062
2	ECAT2	Gen específicamente expresado en célula ES	NM_025274	NM_001025290
3	ECAT3	Gen específicamente expresado en célula ES	NM_015798	NM_152676
4	ECAT4	Factor de transcripción que tiene homeodominio, factor esencial para el mantenimiento de la pluripotencia de diferenciación	AB093574	NM_024865
5	ECAT5	Proteína de la familia Ras, factor promotor del crecimiento de células ES	NM_181548	NM_1,81532
6	ECAT7	Factor relacionado con la enzima de metilación de ADN, esencial para la expresión	NM_019448	NM_013369
7	ECAT8	Gen específicamente expresado en célula ES, que tiene dominio Tudor	AB211061	AB211063
8	ECAT9	Gen específicamente expresado en célula ES, que pertenece a la familia TGF β	NM_008108	NM_020634
9	ECAT10	Gen específicamente expresado en célula ES, factor de transcripción de la familia SPRY	NM_009235	NM_006942
10	ECAT15-1	Gen específicamente expresado en célula ES	NM_028610	NM_018189
11	ECAT15-2	Gen específicamente expresado en célula ES	NM_028615	NM_138815

Número	Nombre del gen	Rasgo característico	Número de acceso de NCBI	
			Ratón	Ser humano
12	Fthl17	Gen específicamente expresado en célula ES, similar a la cadena pesada de ferritina	NM_031261	NM_031894
13	Sal14	Gen específicamente expresado en célula ES, proteína de dedos de Zn	NM_175303	NM_020436
14	Oct3/4	Factor de transcripción de la familia POU, esencial para el mantenimiento de la pluripotencia	NM_013633	NM_002701
15	Sox2	Factor de transcripción de la familia SRY, esencial para el mantenimiento de la pluripotencia	NM_011443	NM_003106
16	Rex1	Gen específicamente expresado en célula ES, proteína de dedos de Zn	NM_009556	NM_174900
17	Utf1	Factor de regulación de la transcripción altamente expresado en célula ES, promotor del crecimiento de ES	NM_009482	NM_003577
18	Gen Tel1	AKT activador de oncogenes, expresado abundantemente en célula ES	NN-009337	NM_021966
19	Célula Stella	Gen específicamente expresado en célula ES	NM_139218	NM_199286
20	Tanto Klf4 como Wnt	Expresados abundantemente en célula ES, se informan acciones tanto antioncogénicas como oncogénicas	NM_010637	NM_004235
21	β -catenina	Factor de transcripción activado por la señal de Wnt, se informa mejora del mantenimiento de la pluripotencia	NM_007614	NM_001904
22	c-Myc y	Factor de control de la transcripción que participa en la diferenciación de la proliferación celular y oncogén, se informa participación en el mantenimiento de la pluripotencia	NM_010849	NM_002467
23	Stat3 LSI ES	Factor de transcripción activado por la señal LSI, considerado esencial para mantenimiento de la pluripotencia de células ES de ratón	NM-213659	NM_139276
24	Grb2	Receptores del factor de crecimiento que median en las proteínas adaptadoras y cascada de Ras/MAPK	NM_008163	NM_002086

Los ADNc de estos genes se insertaron en el vector retroviral pMX-gw por tecnología de Gateway. Primero, cada uno de los 24 genes se infectó en MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo} y luego se realizó la selección por G418 bajo condiciones de cultivo de células ES. Sin embargo, no se obtuvieron colonias resistentes a G418. A continuación, los vectores retrovirales de los 24 genes se infectaron simultáneamente en MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}. Cuando la selección de G418 se realizó bajo condiciones de cultivo de células ES se obtuvo una pluralidad de colonias resistentes a fármacos. Estas colonias se aislaron, y el cultivo continuó. Se encontró que podría realizarse el cultivo de estas células durante un largo periodo de tiempo, y que estas células tenían morfología similar a la de las células ES (Fig. 2). En la figura, células iPS representan citoblastos pluripotentes inducidos (también llamadas "células similares a ES" o "células ESL"), ES representa citoblastos embrionarios y MEF representa células diferenciadas (fibroblastos embrionarios).

Cuando se examinaron los perfiles de expresión de genes de marcadores por RT-PCR se encontró que se expresaban marcadores sin diferenciación tales como Nanog y Oct3/4 (Fig. 3). Se encontró que la expresión de Nanog era próxima a la de las células ES, mientras que la expresión de Oct3/4 era inferior a la de las células ES. Cuando el estado de metilación de ADN se examinó por el procedimiento de secuenciación con bisulfito se encontró que el gen Nanog y el gen Fbx15 estaban altamente metilados en MEF, mientras que estaban desmetilados en las células iPS (Fig. 4). Aproximadamente el 50% del gen IGF2, un gen de expresión, se metiló tanto en células MEF como iPS. Como se sabía que la memoria de expresión estaba borrada y el gen IGF2 se había desmetilado casi completamente en las células germinales primordiales 13,5 días después de la fecundación de las que se aislaron los MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}, se concluyó que las células iPS no se derivaban de células germinales primordiales contaminadas en MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}. Los resultados anteriores demostraron que la reprogramación de las células diferenciadas (MEF) en un estado próximo al de células ES podía inducirse con la combinación de los 24 tipos de factores.

Entonces se hicieron estudios en cuanto a si los 24 tipos de genes se requerían para la reprogramación o no. Al sacar cada gen individual, 23 genes se transfectaron en los MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}. Como resultado, para 10 genes se encontró que la formación de colonias era inhibida al sacar cada uno de los mismos (Fig. 5, los números de genes se corresponden con los números de genes mostrados en la Tabla 4, y los genes son los siguientes 10 tipos de genes: n° 3, n° 4, n° 5, n° 11, n° 14, n° 15, n° 18, n° 20, n° 21 y n° 22). Cuando estos diez genes se transfectaron simultáneamente en los MEF de Fbx15 ^{β geo/ β geo}, las colonias resistentes a G418 se obtuvieron significativamente más eficientemente con respecto a la transfección simultánea con los 24 genes.

Además, 9 genes, al sacar cada gen individual de los 10 genes, se transfectaron en MEF de Fbx15^{βgeo/βgeo}. Como resultado se encontró que las colonias de células iPS resistentes a G418 no se formaron cuando cada uno de los 4 tipos de genes (nº 14, nº 15, nº 20, o nº 22) se sacó (Fig. 6). Por tanto, se sugirió que estos cuatro tipos de genes, entre los diez genes, tenían funciones particularmente importantes en la inducción de reprogramación.

5

Ejemplo 2: Inducción de reprogramación con combinación de 4 tipos de genes

Se examinó si podía conseguirse o no la inducción de la reprogramación de células somáticas con los cuatro tipos de genes de los que se sugirió importancia particular entre los 10 genes. Usando la combinación de los 10 tipos de genes anteriormente mencionados, la combinación de los 4 tipos de genes anteriormente mencionados, combinaciones de sólo 3 tipos de genes de entre los 4 tipos de genes y combinaciones de sólo 2 tipos de genes de entre los 4 tipos de genes, estos conjuntos de genes se transdujeron retrovéricamente en las células MEF como células somáticas en las que βgeo se activó en el gen Fbx15.

Como resultado, cuando los 4 tipos de genes se transdujeron se obtuvieron 160 colonias resistentes a G418. Aunque este resultado fue casi el mismo que se obtuvo por la transducción con los 10 tipos de genes (179 colonias), las colonias obtenidas por la transducción de 4 genes fueron más pequeñas que las obtenidas por la transducción de 10 genes. Cuando estas colonias se sometieron a pases, el número de colonias que tenía morfología de células iPS fue 9 clones de entre los 12 clones en el caso de la transducción de 10 genes, mientras que hubo una tendencia algo más baja de 7 clones de entre los 12 clones en el caso de la transducción de 4 genes. Al igual que para los 4 genes, casi los mismos números de células iPS se obtuvieron con tanto aquellas derivadas de ratón como aquellas derivadas de ser humano.

Cuando los 3 genes seleccionados de los 4 genes anteriormente mencionados se transdujeron se obtuvieron 36 colonias planas con una combinación (nº 14, nº 15 y nº 20). Sin embargo, no se observaron células iPS cuando se sometieron a pases. Con otra combinación (nº 14, nº 20 y nº 22) se obtuvieron 54 colonias pequeñas. Cuando 6 de la colonias relativamente grandes de entre aquellas colonias se sometieron a pases se obtuvieron células similares a las células ES para estos 6 clones. Sin embargo, pareció que la adhesión de las células entre sí y la placa de cultivo fue más débil que la de las células ES. La tasa de proliferación de las células también fue más lenta que la observada en el caso de la transducción con los 4 genes. Además, cada colonia se formó con cada uno de los otros dos tipos de combinaciones de 3 genes de entre los 4 genes. Sin embargo, no se observó proliferación de las células cuando las células se sometieron a pases. Con ninguna de las combinaciones de 2 genes seleccionados de los 4 genes (6 combinaciones) se formaron colonias no resistentes a G418. Los resultados anteriores se muestran en la Fig. 7.

35

Además, los resultados de observación de perfiles de expresión de los genes de marcadores de células ES por RT-PCR se muestran en la Fig. 10. Los detalles del procedimiento son los siguientes. A partir de células iPS establecidas transduciendo 3 genes (Oct3/4, Klf4 y c-Myc: representados como "Sox2 menos"), 4 genes (Sox2 se añadió a los tres genes: representado como "4ECAT") y 10 genes (nº 3, nº 4, nº 5, nº 11, nº 18 y nº 21 en la Tabla 4 se añadieron a los cuatro genes: representados como "10ECAT") en MEF de Fbx15^{βgeo/βgeo}, las células iPS establecidas transduciendo 10 genes en fibroblastos se establecieron desde la punta de la cola de un ratón adulto en el que βgeo se activó en el gen Fbx15 (representado como "fibroblasto de piel 10EAT"), células ES de ratón y células MEF sin transducción de genes, los ARN totales se purificaron y se trataron con ADNsAl para eliminar la contaminación de ADN genómico. Los ADNs de la primera cadena se prepararon por una reacción de transcripción inversa, y los perfiles de expresión de los genes de marcadores de células ES se examinaron por PCR. Para Oct3/4, Nanog y ERas, la PCR se realizó usando cebadores que sólo amplificaron un producto de transcrito de un gen endógeno, no del retrovirus transducido. Las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 6.

45

Tabla 6

ECAT1	ECAT1-RT-S	TGT GGG GCC CTG AAA GGC GAG CTG AGA T
	ECAT1-RT-AS	ATG GGC CGC CAT ACG ACG ACG CTC MAC T
Esg1	pH34-U38	GAA GTC TGG TTC CTT GGC AGG ATG
	pH34-L394	ACT CGA TAC ACT GGC CTA GC
Nanog	6047-S1	CAG GTG TTT GAG GGT AGC TC
	6047-AS1	CGG TTC ATC ATG GTA CAG TC
ERas	45328-S118	ACT GCC CCT CAT CAG ACT GCT ACT
	ERas-AS304	CAC TGC CTT GTA CTC GGG TAG CTG
Gdf3	Gdf3-U253	GTT CCA ACC TGT GCC TCG CGT CTT
	GDF3 L16914	AGC GAG GCA TGG AGA GAG CGG AGC AG
Fgf4	Fgf4-RT-S	CGT GGT GAG CAT CTT CGG AGT GG

	Fgf4-RT-AS	CCT TCT TGG TCC GCC CGT TCT TA.
Cripto	Cripto-S	ATG GAC GCA ACT GTG AAC ATG ATG TTC GCA
	Cripto-AS	CTT TGA GGT CCT GGT CCA TCA CGT GAC CAT
Zfp296	Zfp296-S67	CCA TTA GGG GCC ATC ATC GCT TTC
	Zfp296-AS350	CAC TGC TCA CTG GAG GGG GCT TGC
Dax1	Dax1-S1096	TGC TGC GGT CCA GGC CAT CAA GAG
	Dax1-AS1305	GGG CAC TGT TCA GTT CAG CGG ATC
Owt3/4	Oct3/4-S9	TCT TTC CAC CAG GCC CCC GGC TC
	Oct3/4-AS210	TGC GGG CGG ACA TGG GGA GAT CC '
NAT1	NAT1 U283	ATT CTT CGT TGT CAA GCC GCC AAA GTG GAG
	NAT1 L476	AGT TGT TTG CTG CGG AGT TGT CAT CTC GTC

Los resultados mostrados en esta figura revelaron que, por transducción de los 3 genes, la expresión de cada uno de ERas y Fgf4 se indujo eficientemente, pero la expresión de cada uno de Oct3/4 y Nanog, factores esenciales para el mantenimiento de la pluripotencia, no se indujo, o fue muy débil incluso cuando se indujeron. Sin embargo, cuando los 4 genes se transdujeron, hubo un clon (nº 7) en el que Oct3/4 y Nanog se indujeron relativamente fuertemente entre los 4 clones examinados. Además, cuando los 10 genes se transdujeron se observó una fuerte inducción de cada uno de Oct3/4 y Nanog en los 3 clones de entre los 5 clones examinados.

Estos resultados revelaron que una combinación de al menos 3 genes (nº 14, nº 20 y nº 22) fue esencial para la reprogramación y que en los casos del grupo de 4 genes y el grupo de 10 genes que incluía los 3 tipos de genes, la eficiencia de reprogramación aumentó en proporción al aumento del número de genes.

Ejemplo 3: Análisis de pluripotencia de células reprogramadas

Con el fin de evaluar la pluripotencia de diferenciación de las células iPS establecidas, las células iPS establecidas con 24 factores, 10 factores y 4 factores se trasplantaron subcutáneamente en ratones sin pelo. Como resultado, en todos los animales se formaron tumores que tenían un tamaño similar al observado con células ES. Histológicamente, los tumores consistieron en una pluralidad de tipos de células, y se observaron tejidos cartilagosos, tejidos nerviosos, tejidos musculares, tejidos adiposos y tejidos similares al tracto intestinal (Fig. 8), que verificaron la pluripotencia de las células iPS. A diferencia, aunque se formaron tumores cuando las células establecidas con los 3 factores se trasplantaron en ratones sin pelo, sólo se formaron histológicamente a partir de células sin diferenciar. Por tanto, se encontró que un gen de la familia Sox era esencial para la inducción de pluripotencia de diferenciación.

Ejemplo 4: Reprogramación de fibroblastos derivados de colas de ratones adultos

Los 4 factores identificados en los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se transdujeron en fibroblastos derivados de colas de ratones adultos Fbx15 activados en β geo que expresan sistémicamente la proteína verde fluorescente (GFP). Entonces, las células se cultivaron en células nodrizas bajo las mismas condiciones que las condiciones de cultivo de células ES, y se realizó la selección con G418. En aproximadamente dos semanas después del inicio de la selección con fármaco se obtuvo una pluralidad de colonias de células iPS. Cuando estas células se trasplantaron subcutáneamente a ratones sin pelo se formaron teratomas consistentes en una variedad de tres tejidos de la capa germinal. Además, cuando las células iPS derivadas de fibroblastos dérmicos adultos se trasplantaron a los blastocistos, y luego se trasplantaron en los úteros de ratones pseudopreñados, se observaron embriones en los que las células positivas para GFP se distribuyeron sistémicamente entre aquellos 13,5 días después de la fecundación (Fig. 9), demostrando que las células iPS tenían pluripotencia y podían contribuir a la embriogénesis de ratón. Estos resultados indican que la clase identificada de factores tenía una capacidad para inducir reprogramación de no sólo células somáticas en un periodo embrionario, sino también células somáticas de ratones maduros. Prácticamente es extremadamente importante que la reprogramación pueda inducirse en células derivadas de piel adulta.

Ejemplo 5

Se investigó un efecto de la citocina sobre el establecimiento de células iPS. El vector de expresión (vector retroviral) para el factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) o el factor de citoblastos (SCF) se transdujo en células nodrizas pMX (células STO) para establecer células que expresaban permanentemente las citocinas. Los MEF derivados del ratón Fbx15 β ^{geo/ β geo} (500.000 células/placa de 100 mm) se cultivaron en estas células STO y se transdujeron con los 4 factores, y luego se sometieron a selección con G418. Como resultado, el número de colonias

formadas aumentó 20 veces o más en las células STO que producen bFGF (Fig. 11) o SCF (datos no mostrados) en comparación con el cultivo en células STO normales. Además, aunque no se formaron colonias de células iPS en las células STO normales cuando se transdujeron los 3 factores distintos de c-Myc, la formación de colonias se observó en las células STO que producen bFGF (Fig. 11) o SCF (datos no mostrados). Estos resultados revelaron que la estimulación con la citocina aumentó la eficiencia del establecimiento de células iPS de MEF, y la reprogramación nuclear pudo conseguirse usando una citocina en lugar de c-Myc.

Ejemplo 6

Los genes de familias existen para todos los genes Oct3/4, Klf4, c-Myc y Sox2 (Tablas 1 y 2). Por consiguiente, se hicieron estudios en cuanto a si las células iPS podrían establecerse o no con los genes de familias en lugar de con los 4 genes. En la Tabla 7 se muestran resultados experimentales combinados por triplicado. Con respecto a la familia Sox, Sox1 dio casi el mismo número de colonias resistentes a G418 formadas y la eficiencia de establecimiento de células iPS que aquellas con Sox2. Al igual que para Sox3, el número de colonias resistentes a G418 formadas fue aproximadamente 1/10 de las formadas con Sox2; sin embargo, la eficiencia de establecimiento de células iPS de las colonias recogidas fue de hecho superior a la de con Sox2. Al igual que para Sox15, tanto el número de colonias resistentes a G418 formadas como la eficiencia de establecimiento de células iPS fueron inferiores a aquellos con Sox2. Al igual que para Sox7, el número de colonias resistentes a G418 formadas fue casi el mismo que con Sox2; sin embargo, la eficiencia de establecimiento de células iPS fue baja. Con respecto a la familia Klf, Klf2 dio un menor número de colonias resistentes a G418 que Klf4; sin embargo, dieron casi la misma eficiencia de establecimiento de células iPS. Con respecto a la familia Myc se encontró que c-Myc natural era casi el mismo que un mutante T58A tanto en el número de colonias resistentes a G4318 formadas como en la eficiencia de establecimiento de células iPS. Además, cada uno de N-Myc y L-Myc (cada uno natural) fue casi el mismo que c-Myc en tanto el número de colonias resistentes a G418 formadas como en la eficiencia de establecimiento de células iPS.

Tabla 7

Gen transducido	Número de colonias formadas	Número de colonias recogidas	Número de cepa de células iPS establecidas	Eficiencia de establecimiento de células iPS (%)
4 Factores (cMycT58A)	85	12	5	42
Sox1	84	12	7	58
Sox3	8	8	7	92
Sox15	11	11	1	8
Sox17	78	12	2	17
Klf2	11	10	5	50
c-MycWT	53	11	8	72
N-MycWT	40	12	7	58
L-MycWT	50	12	11	92
3 Factores (-Sox2)	6	6	2	17

Ejemplo 7

Se hicieron estudios en cuanto a si las células iPS podrían establecerse o no con un gen indicador distinto de Fbx15- β geo. Se aisló cromosoma artificial de *Escherichia coli* (BAC) que contenía el gen Nanog en el centro, y luego el gen GFP y el gen de resistencia a puromicina se activaron por recombinación en *E. coli* (Fig. 12A). Posteriormente, el BAC anteriormente modificado se introdujo en células ES para confirmar que las células fueran positivas para GFP en un modo específico del estado sin diferenciar (datos no mostrados). Entonces, estas células ES se trasplantaron en blastocistos de ratón para crear ratones transgénicos mediante ratones quiméricos. En estos ratones, las células positivas para GFP se observaron específicamente en masas de células internas de los blastocistos o gónadas de embriones 13,5 días después de fecundación (Fig. 12B). Las gónadas se extirparon de los embriones 13,5 días después de la fecundación (híbrido de ratones DBA, 129 y C57BL/6), y los MEF se aislaron. Se confirmó que los MEF aislados eran negativos para GFP (Fig. 13) por citometría de flujo. Estos MEF se transdujeron retrovíricamente con los 4 factores y se sometieron a selección con puromicina y como resultado se obtuvo una pluralidad de colonias resistentes. Sólo aproximadamente el 10 al 20% de las colonias fueron positivas para GFP. Cuando las colonias positivas para GFP se sometieron a pases, dieron morfología (Fig. 14) y proliferación (Fig. 15) similar a la de las células ES. El examen del patrón de expresión génica reveló que el patrón de expresión era más próximo al de células ES con respecto a las células iPS aisladas de MEF de Fbx15 β geo/ β geo por selección con G418 (Fig. 16). Cuando estas células se trasplantaron a ratones sin pelo se indujo la formación de teratoma, así se confirmaron que las células eran células iPS (Fig. 17). Además, los ratones quiméricos nacieron trasplantando las células iPS obtenidas por la selección con Nanog-GFP a los blastocistos de ratones C57BL/6 (Fig. 18). Cuando estos ratones quiméricos se aparearon se observó la transmisión de la línea germinal (Fig. 19). En estas células iPS establecidas por selección con Nanog-GFP, que estuvieron próximas a las células ES, las expresiones de los 4 factores de los retrovirus estuvieron casi completamente silenciadas, sugiriendo que la autorreplicación se mantuvo por Oct3/4 y Sox2 endógeno.

Ejemplo 8

5 Células iPS confluentes en placas de 10 cm se tripsinaron y se suspendieron en medio de células ES (las células
 10 STO se eliminaron por adhesión a una placa recubierta de gelatina durante 10 a 20 minutos después de la
 suspensión). 2×10^6 células se cultivaron durante cuatro días en una placa de cultivo de *E. coli* recubierta con HEMA
 (metacrilato de 2-hidroxietilo) como cultivo en suspensión para formar cuerpos embrinoides (EB) (día 1 a 4). En el 4º
 día de la formación del EB (día 4), todos los EB se transfirieron a una placa de cultivo de tejido de 10 cm y se
 15 cultivaron en medio de células ES durante 24 horas para permitir la adhesión. Después de 24 horas (día 5), el medio
 se cambió a un medio que contenía ITS/fibronectina. El cultivo se realizó durante 7 días (el medio se cambió cada 2
 días) y se seleccionaron células positivas para nestina (las células de otros pedigrís estaban muriendo hasta un
 cierto grado en un cultivo bajo condición sin suero) (día 5 a 12). Entonces se indujeron células positiva para A2Bo.
 Después de 7 días (día 12), las células se separaron por tripsinación y los EB restantes se eliminaron. 1×10^5
 20 células se sembraron en una placa de 24 pocillos recubierta de poli-L-ornitina/fibronectina y se cultivaron durante 4
 días en un medio que contenía N2/bFGF (el medio se cambió cada 2 días) (día 12 a 16). Después de 4 días (día
 16), el medio se cambió a un medio que contenía N2/bFGF/EG y el cultivo continuó durante 4 días (el medio se
 cambió cada 2 días) (día 16 a 20). Después de 4 días (día 20), el medio se cambió a un medio que contenía
 N2/bFGF/PDGF y el cultivo continuó durante 4 días (el medio se cambió cada 2 días) (día 20 a 24). Durante este
 periodo (día 12 a 24), cuando las células habían aumentado excesivamente y alcanzado la confluencia, se
 25 sometieron a pases en momentos apropiados, y 1 a 2×10^5 células se sembraron (el número de las células varió
 dependiendo del momento adecuado del pase). Después de 4 días (día 24), el medio se cambió a un medio N2/T3 y
 el cultivo continuó durante 7 días (día 24 a 31) con cambio de medio cada 2 días. En el día 31, las células se fijaron
 y se sometieron a inmunotinción. Como resultado se observó la diferenciación de las células iPS en células
 nerviosas positivas para β III-tubulina, oligodendrocitos positivos para O4 y astrocitos positivos para GFAP (Fig. 20).

Ejemplo 9

Con el fin de establecer células iPS a partir de células somáticas de ratón arbitrarias distintas de aquellas derivadas
 del ratón activado en Fbx15- β geo se desarrolló un procedimiento para el establecimiento sin uso de selección con
 30 fármaco. Se cultivaron fibroblastos de embrión de ratón (MEF) en placa de 10 cm (en células nodrizas STO) en un
 número más pequeño que el usado anteriormente (10.000, 50.000 ó 100.000 células), y un ADN de control o los 4
 factores se transdujeron retrovíricamente. Cuando el cultivo se realizó durante 2 semanas en el medio de células ES
 (sin selección con G418) no se observó formación de colonias en la placa en la que se transdujo el ADN de control,
 35 mientras en la placa en la que se transdujeron los 4 factores se formó una pluralidad de colonias compactas,
 además de colonias planas consideradas que estaban transformadas (Fig. 21). Cuando se recogieron 24 colonias de
 estas colonias y el cultivo continuó se observó morfología similar a células ES. Los perfiles de expresión génica de
 las mismas se examinaron por RT-PCR y como resultado se observó la expresión de Esg1, un marcador de células
 ES, en 7 clones. Se observó la inducción de muchos marcadores de células ES tales como Nanog, ERas, GDF3,
 40 Oct3/4 y Sox2 en el clon 4 y, por tanto, se consideró que las células eran células iPS (Fig. 22). Los resultados
 anteriores demostraron que la selección con fármaco usando el ratón activado Fbx15- β geo o similares no era
 indispensable para el establecimiento de células iPS, y las células iPS podrían establecerse a partir de células
 somáticas derivadas de ratón arbitrarias. Esto también sugirió la posibilidad de que las células iPS pudieran
 establecerse a partir de células somáticas de un ratón de modelo por la técnica anteriormente mencionada.

Ejemplo 10

Como se indujeron células a partir de células iPS, se examinaron hepatocitos y células de la mucosa gástrica que
 eran células distintas de fibroblastos. Los hepatocitos se aislaron a partir del hígado de ratones Fbx15 ^{β geo/ β geo} por
 50 perfusión. Estos hepatocitos se introdujeron retrovíricamente con los 4 factores, y luego se sometieron a selección
 con G418 para obtener una pluralidad de colonias de células iPS. Como resultado del análisis del patrón de
 expresión génica usando una micromatriz de ADN se encontró que las células iPS derivadas del hígado eran más
 similares a las células ES que las células iPS derivadas de fibroblastos dérmicos o fibroblasto embrionario. Las
 células iPS también se obtuvieron de células de la mucosa gástrica del mismo modo que las de hepatocitos.

Ejemplo 11

PD98059 es un inhibidor de MAP cinasa que suprime la proliferación de diversas células diferenciadas. Sin
 embargo, es conocido por promover el mantenimiento del estado sin diferenciar y la proliferación de células ES. Por
 tanto, se examinaron los efectos de PD98059 sobre el establecimiento de células iPS. Los MEF establecidos de un
 60 ratón que tiene los marcadores selectivos de Nanog-EGFP-IRES-Puro se introdujeron retrovíricamente con los 4
 factores y se sometieron a selección con puromicina. Cuando PD98059 no se añadió, el porcentaje de colonias
 positivas para GFP fue el 8% de las colonias de células iPS obtenidas. Sin embargo, en el grupo al que se añadió
 continuamente PD98059 (concentración final: 25 μ M) a partir del día siguiente de la transfección retroviral, el 45%
 de las colonias obtenidas fueron positivas para GFP. Los resultados fueron interpretados como debidos a que
 65 PD98059 promueve la proliferación de las células iPS positivas para GFP, que están más próximas a las células ES,
 mientras que PD98059 suprimía la proliferación de las células iPS negativas para GFP o células diferenciadas. A

partir de estos resultados se demostró que PD98059 podía usarse para el establecimiento de las células iPS más próximas a las células ES o el establecimiento de células iPS sin usar selección con fármaco.

Ejemplo 12

5 Un plásmido que contiene el gen de la proteína de fluorescencia roja en la dirección 3' del promotor del gen Oct3/4 de ratón y el gen de resistencia a higromicina en la dirección 3' del promotor PGK se introdujo por nucleofección en fibroblastos dérmicos humanos embrionarios (HDF) en los que se expresaron la familia 7 de transportadores de soluto (Slc7a1, número de acceso a NCBI NM_007513) como receptor de virus ecotrópico de ratón por transducción lentivírica. Se realizó selección con higromicina para establecer cepas con expresión estable. Se sembraron 800.000 células en las células STO tratadas con mitomicina, y al día siguiente, Owt3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (cada uno derivado de un ser humano) se transdujeron retrovíricamente en las células. Se recogieron 24 colonias a partir de las obtenidas después de 3 semanas (Fig. 23, izquierda) y se transfirieron a una placa de 24 pocillos en los que se sembraron las células STO y luego se cultivaron. Después de 2 semanas, un clon cultivado se sometió a pases en una placa de 6 pocillos en los que se sembraron células STO y se cultivaron. Como resultado se obtuvieron células morfológicamente similares a las células ES (Fig. 23, derecha), sugiriendo que las células fueron células iPS. El medio de células ES de ratón se usó como cualquier medio.

Ejemplo 13

20 Se transdujeron fibroblastos dérmicos adultos humanos (HDF adultos) con Slc7a1 (receptor retrovírico de ratón) usando lentivirus, y las células resultantes se sembraron en 800.000 células nodrizas (células STO tratadas con mitomicina). Los genes se transdujeron retrovíricamente como las siguiente combinaciones.

- 25 1. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT y antígeno T grande del SV40
2. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, HPV16 E6
3. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, HPV16 E7
4. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7
5. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, Bmil
- 30 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc y TERT se derivaron de ser humano, y Bmil se derivó de ratón)

El cultivo continuó bajo las condiciones de cultivo para células ES de ratón sin selección con fármaco. Como resultado, colonias consideradas que eran las de las células iPS emergieron en el 8º día después de la transfección con virus en la placa en la que se introdujeron los factores según la Combinación 1 (Fig. 24). Las colonias similares a células iPS también emergieron con las otras combinaciones (2 a 5), aunque no fueron tan evidentes cuando se compararon con la Combinación 1. Cuando sólo se transdujeron los 4 factores no emergieron colonias.

Aplicabilidad industrial

40 Usando el factor de reprogramación celular proporcionado por la presente invención, la reprogramación de núcleos de células diferenciadas puede inducirse convenientemente y de forma altamente reproducible sin usar embriones ni células ES, y pueden establecerse citoblastos pluripotentes inducidos como células sin diferenciar que tienen capacidad de diferenciación, pluripotencia y capacidad de crecimiento similar al de células ES.

45 Listado de secuencias

- <110> Universidad de Kioto
- <120> Factor de reprogramación celular
- 50 <130> A61682M
- <140> PCT/JP2006/324881
- <141> 06/12/2006
- 55 <150> JP 2005-359537
- <151> 13/12/2005
- <160> 25
- 60 <210> 1
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>

<223> Cebador
 <400> 1
 cgtggggccc tgaaaagcga gctgagat 28
 5
 <210> 2
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 atgggccc atacgacgac gctcaact 28
 15
 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 3
 gaagtctggt tcctggcag gatg 24
 25
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4
 actcgataca ctggcctagc 20
 35
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 5
 caggtgttg agggtagctc 20
 45
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 cgttcacatca tggtagctc 20
 55
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 7
 actgccctc atcagactgc tact 24
 <210>
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 8
 cactgccttg tactcgggta gctg 24
 20 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 30 gttccaacct gtgcctcgcg tctt 24
 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 40 agcgaggcat ggagagagcg gagcag 26
 <210> 11
 <212> 23
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 11
 cgtggtgagc atcttcggag tgg 23
 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 12
 ccttcttggc cgcgccgttc tta 23

5 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 13
 atggacgcaa ctgtgaacat gatgttcgca 30

 15 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 14
 ctttgaggtc ctggtccatc acgtgacct 30

 25 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 15
 ccattagggg ccatcatcgc ttc 24

 35 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 40 <400> 16
 cactgccac tggagggggc ttgc 24

 45 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador

 <400> 17
 tgctgcggtc caggccatca agag 24

 55 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18

		gagcactggt cagttcagcg gate	24
5		<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		<220> <223> Cebador	
		<400> 19 tcttccacc aggcccccgg ctc	23
15		<210> 20 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		<220> <223> Cebador	
		<400> 20 tgcgggcgga catggggaga tcc	23
25		<210> 21 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30		<220> <223> Cebador	
		<400> 21 attcttcgtt gtcaagccgc caaagtggag	30
35		<210> 22 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		<220> <223> Cebador	
		<400> 22 agtgtttgc tgcggagtgc tcatctctgc	30
45		<210> 23 <211> 2127 <212> ADN <213> Virus simio 40	
50		<400> 23	

```

atggataaaag tttttaaacag agaggaatct ttgcagctaa tggaccttct aggtcttgaa 60
aggagtgcct gggggaatat tccctctgat agaaaggcat atttaaaaaa atgcaaggag 120
tttccatcctg ataaaggagg agatgaagaa aaaatgaaga aaatgaatac tctgtacaag 180
aaaaatggag atggagtaaa atatgctcat caacctgact ttggaggctt ctgggatgca 240
actgagattc caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt ggtggaatgc ctttaatgag 300
gaaaacotgt tttgctcaga agaaatgcca tctagtgatg atgaggctac tgcctgactct 360
caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag accccaagga ctctcttca 420
gaattgctaa gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata gaactcctgc ttgctttgct 480
atttacacca caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga aaattatgga aaaatatct 540
gtaaccttta taagttagca taacagttat aatcataaca tactgttttt ccttactcca 600
cacaggtata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa aattgtgtac ctttagcttt 660
ttaatttcta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcca 720
ttttctgtta ttgaggaaag tttgccaggt ggggttaaagg agcatgattt caatccagaa 780
gaagcagagg aaactaaaca agtgcctctg aagcttgtaa cagagtatgc aatggaaca 840
aaatgtgatg atgtgttgtt attgcttggg atgtacttgg aatttcagta cagtttgaa 900
atgtgtttaa aatgtattaa aaaagaacag cccagccact ataagtacca tgaaaaagcat 960
tatgcaaatg ctgctatatt tgcctgacgc aaaaacccaa aaaccatag ccaacaggct 1020
gttgatactg tcttagctaa aaagcgggtt gatagcctac aattaactag agaacaatg 1080
ttaacaaaca gatttaatga tcttttggat aggatggata caatgtttgg tctacagggc 1140
tctgctgaca tagaagaatg gategctgga gtgcttggc tacactgttt gttgccaaa 1200
atggatccag tgggtgatga ctttttaaaa tgcctggtgt acaacattcc taaaaaaga 1260
tactggctgt ttaaaaggacc aattgatagt ggtaaaaacta cattagcagc tgccttgctt 1320
gaattatgtg ggggaaagc tttaaatgtt aatttgcct tggacaggct gaacttgag 1380
ctaggagtag ctattgacca gtttttagta gttttgagg atgtaaaggg cactggaggg 1440
gagtcagag atttgccttc aggtcaggga attaataacc tggacaattt aagggtatt 1500
ttggatggca gtgttaaggt aaacttagaa aagaaacacc taaataaaag aactcaata 1560
tttccctctg gaatagtcac catgaatgag tacagtgtgc ctaaaacact gcaggccaga 1620
tttgtaaaac aaatagattt taggcccana gattatttaa agcattgctt ggaangcagt 1680
gagttttgt tagaaaagag aataatcaa agtggcattg ctttgcctct tatgttaatt 1740
tggtagagac ctgtggtga gtttgctcaa agtatcaga gcagaattgt ggagtggaaa 1800
gagagattgg acaaaagatt tagtttgcga gtgtatcaaa aaatgaagtt taatgtggct 1860
atgggaactg gagttttaga ttggctaaga aacagtgatg atgatgatga agacagccag 1920
gaaaatgctg ataaaaatga agatggtggg gagaagaaca tggagactc agggcatgaa 1980
acaggcattg attcacagtc ccaaggctca tttcaggccc ctcagtcctc acagtctgtt 2040
catgatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa aaaacctccc 2100
acacctcccc ctgaaactga aacataa 2127

```

<210> 24
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 16

5

```

<400> 24
atgtttcagg acccacagga ggcacccaga aagttaccac agttatgca agagctgcaa 60
acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgogacgt 120
gaggtatatg actttgcttt tgggatttta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat 180
gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt 240
tatagtttgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta 300
attagttgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaag acatctggac 360
aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cgggtgaccg gtccatgtat gtcttgtgc 420
agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgtaa 456

```

10

<210> 25
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 16

15

```

<400> 25
atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact 60
gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg agggagatga aatagatggt 120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180
tctgactcta cgtctcgggt gtcgctacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgcctcatct gttctcagaa accataa 297

```

REIVINDICACIONES

1. Un factor de reprogramación celular para una célula somática que comprende:
 - 5 a) un gen de la familia Oct o producto génico;
 - b) un gen de la familia Klf o producto génico; y
 - c) un gen de la familia Myc o producto génico, y/o una citocina.
- 10 2. El factor según la reivindicación 1 que comprende cada uno de los tres siguientes tipos de genes o productos génicos: Oct3/4, Klf4 y c-Myc.
3. El factor según la reivindicación 1 ó 2 que comprende además un gen de la familia Sox o producto génico.
- 15 4. El factor según la reivindicación 3 que comprende el siguiente gen o producto génico: Sox2.
5. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la citocina es bFGF y/o SCF.
- 20 6. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende cada uno de los tres siguientes tipos de genes o productos génicos: Oct3/4, Klf4 y Sox2, y bFGF.
7. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además el siguiente gen o producto génico: TERT.
- 25 8. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además uno o más tipos de genes o productos génicos seleccionados del grupo que consiste en antígeno T grande del SV40, HPV16 E6, HPV16 E7 y Bmil.
9. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además uno o más tipos de genes o productos génicos seleccionados del grupo que consiste en Fbx15, Nanog, ERas, ECAT15-2, Tcl1 y β -catenina.
- 30 10. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende además uno o más tipos de genes o productos génicos seleccionados del grupo que consiste en ECAT1, Esg1, Dnmt3L, ECAT8, Gdf3, Sox15, ECAT15-1, Fthl17, Sal14, Rex1, UTF1, Stella, Stat3 y Grb2.
- 35 11. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que Klf4 se sustituye por Klf2.
12. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que Sox2 está sustituido por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en Sox1, Sox3, Sox15 y Sox17.
- 40 13. El factor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que c-Myc está sustituido por L-Myc o N-Myc.
14. Uso de un factor de reprogramación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la reprogramación de una célula somática.

Fig. 1

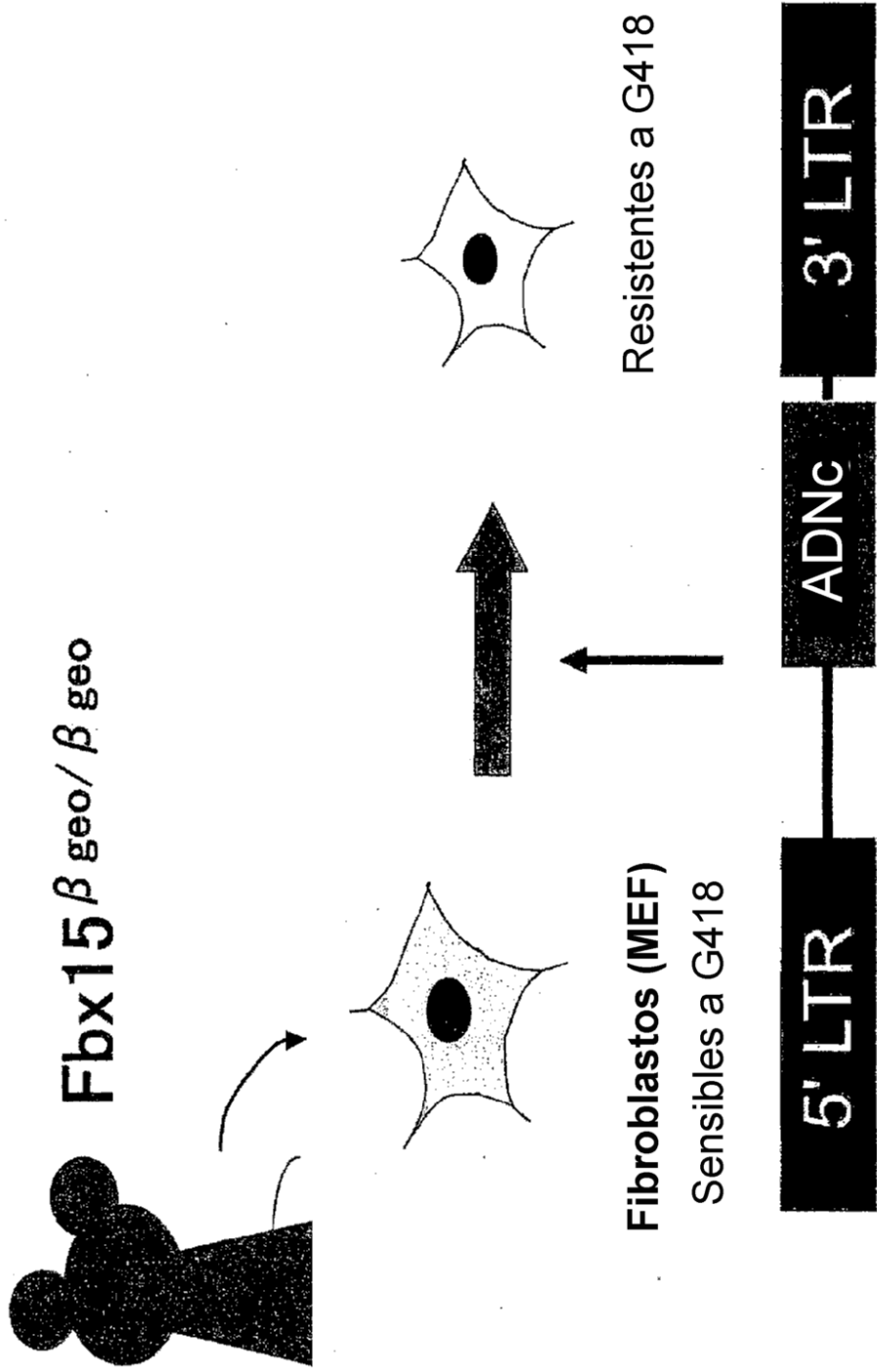
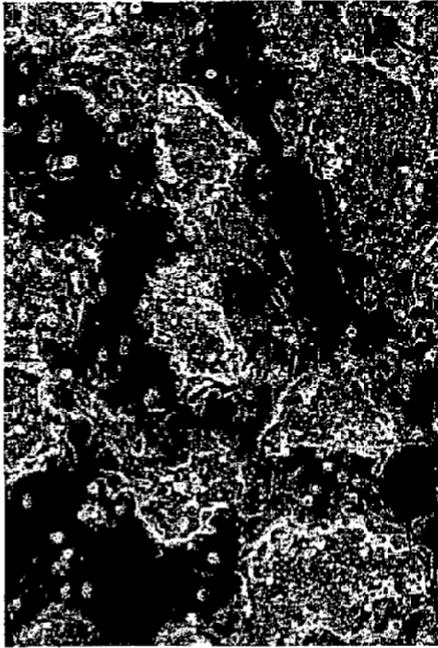
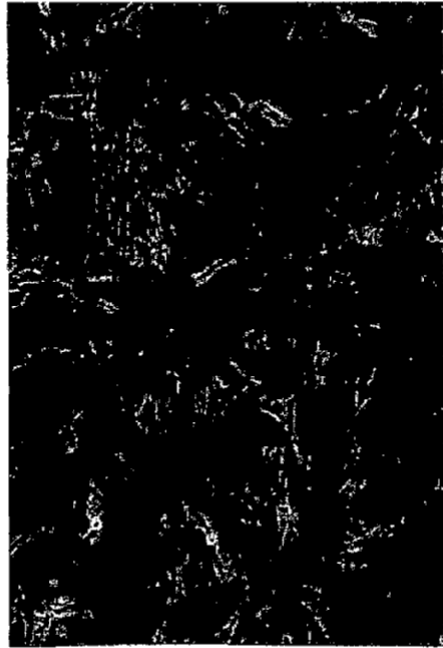


Fig. 2

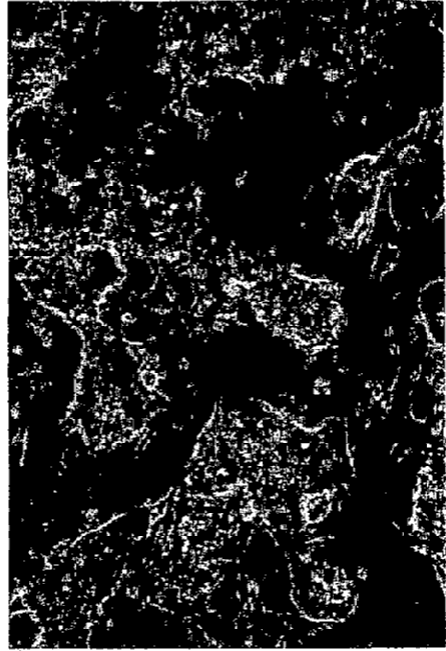
IPS

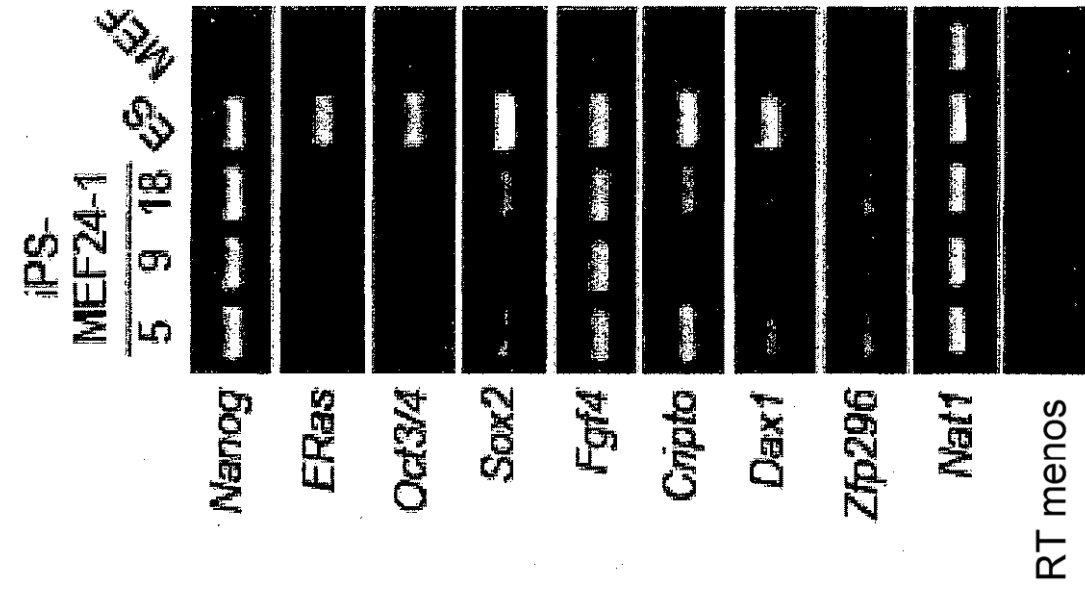


MEF



ES





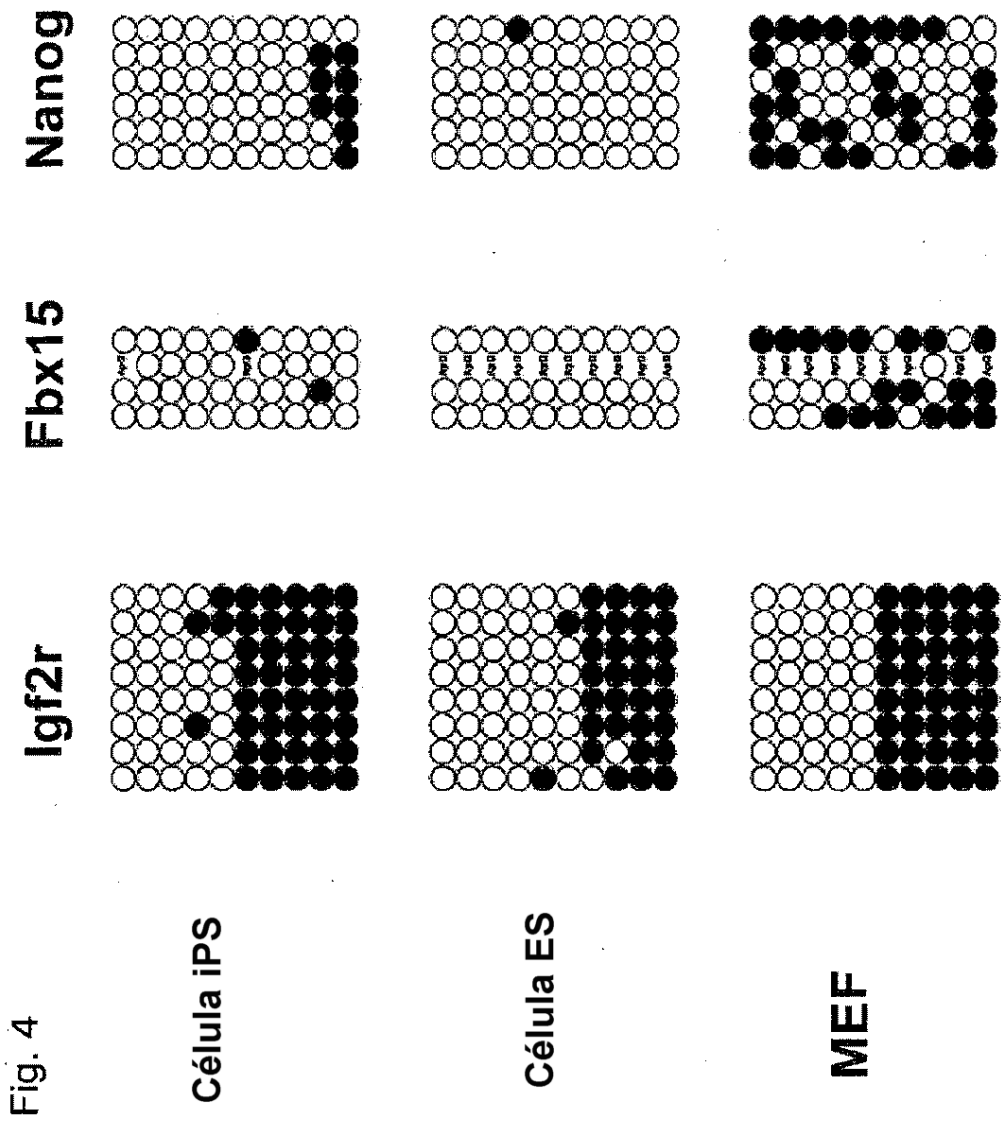


Fig. 5

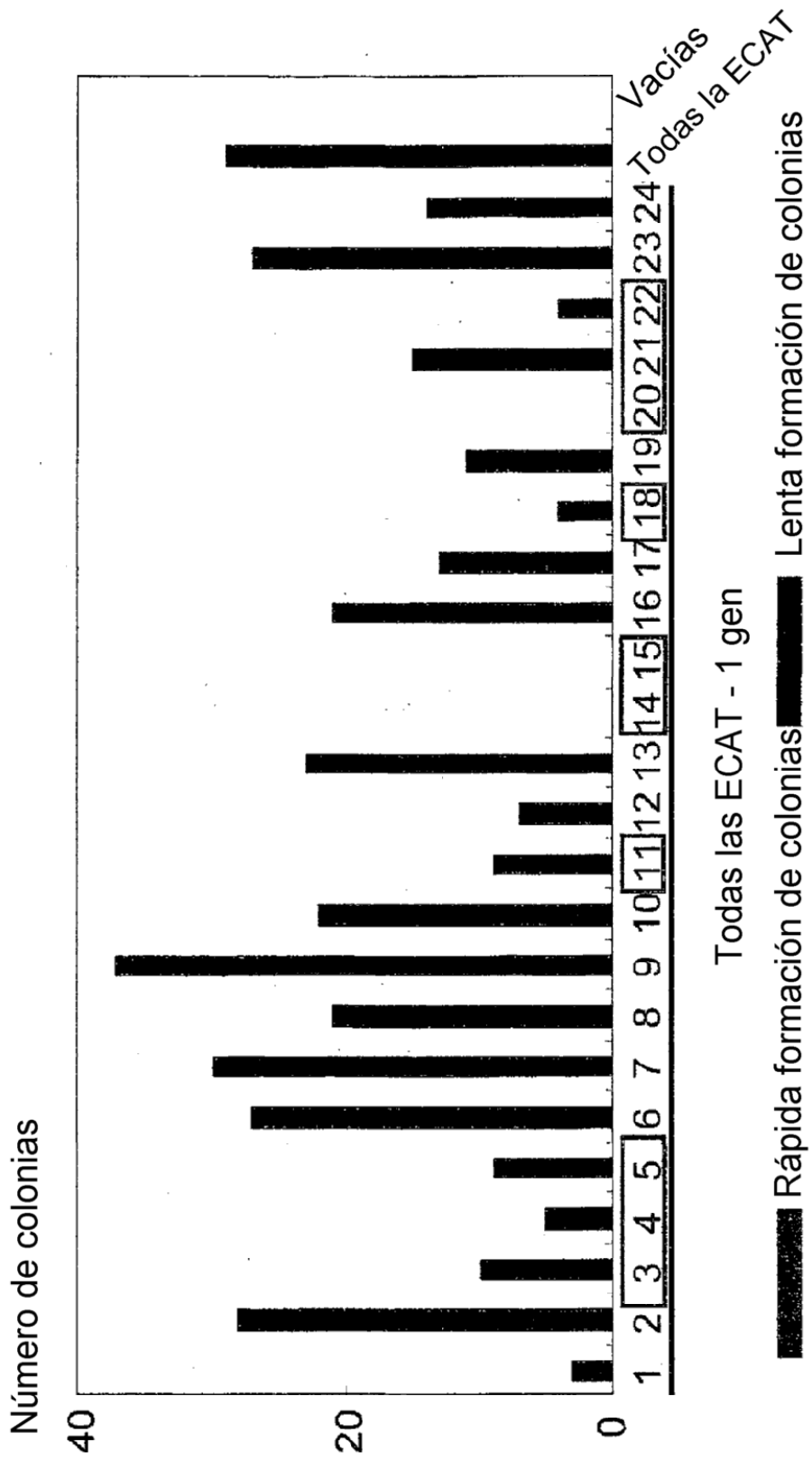


Fig. 6

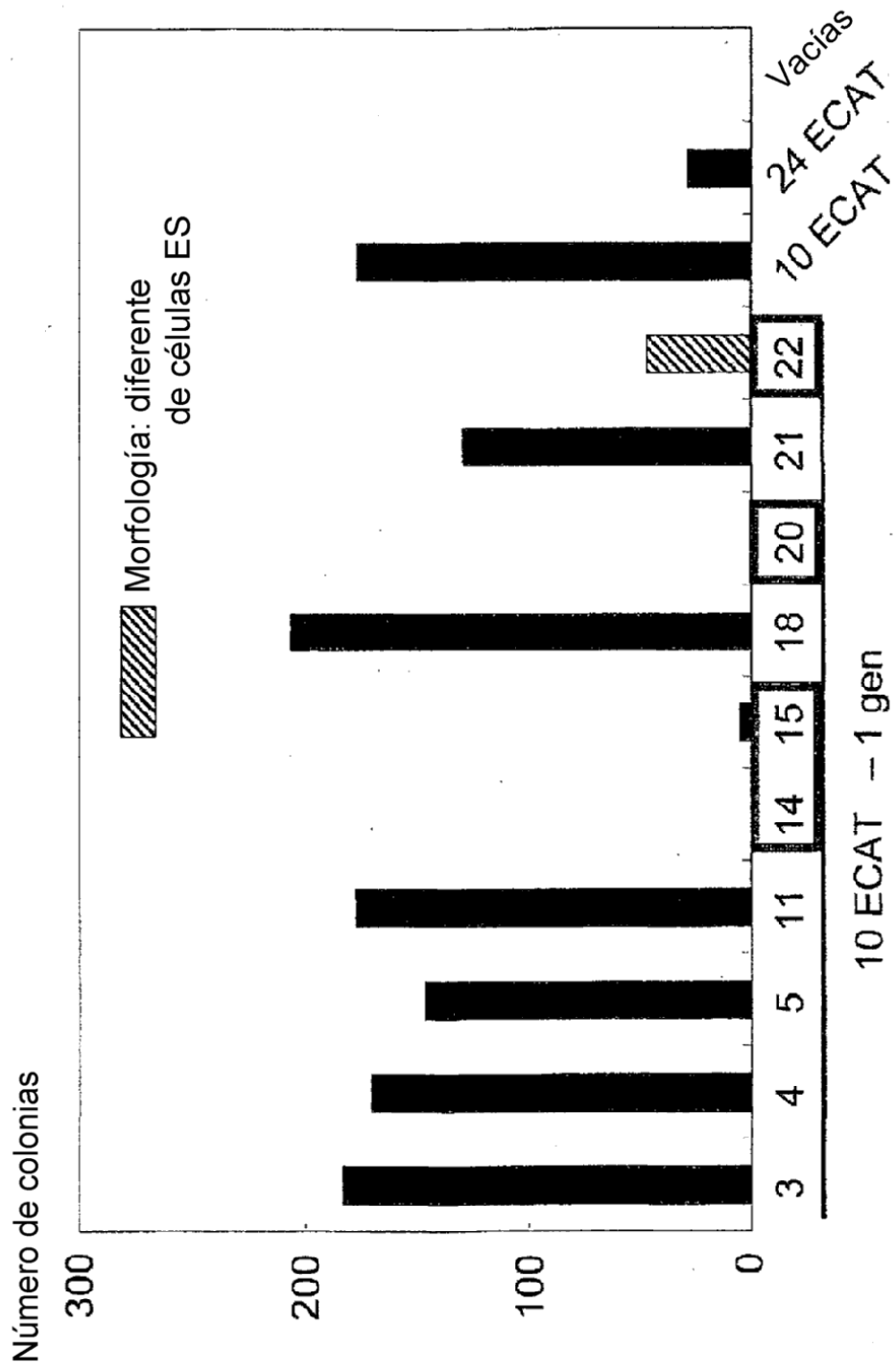


Fig. 7

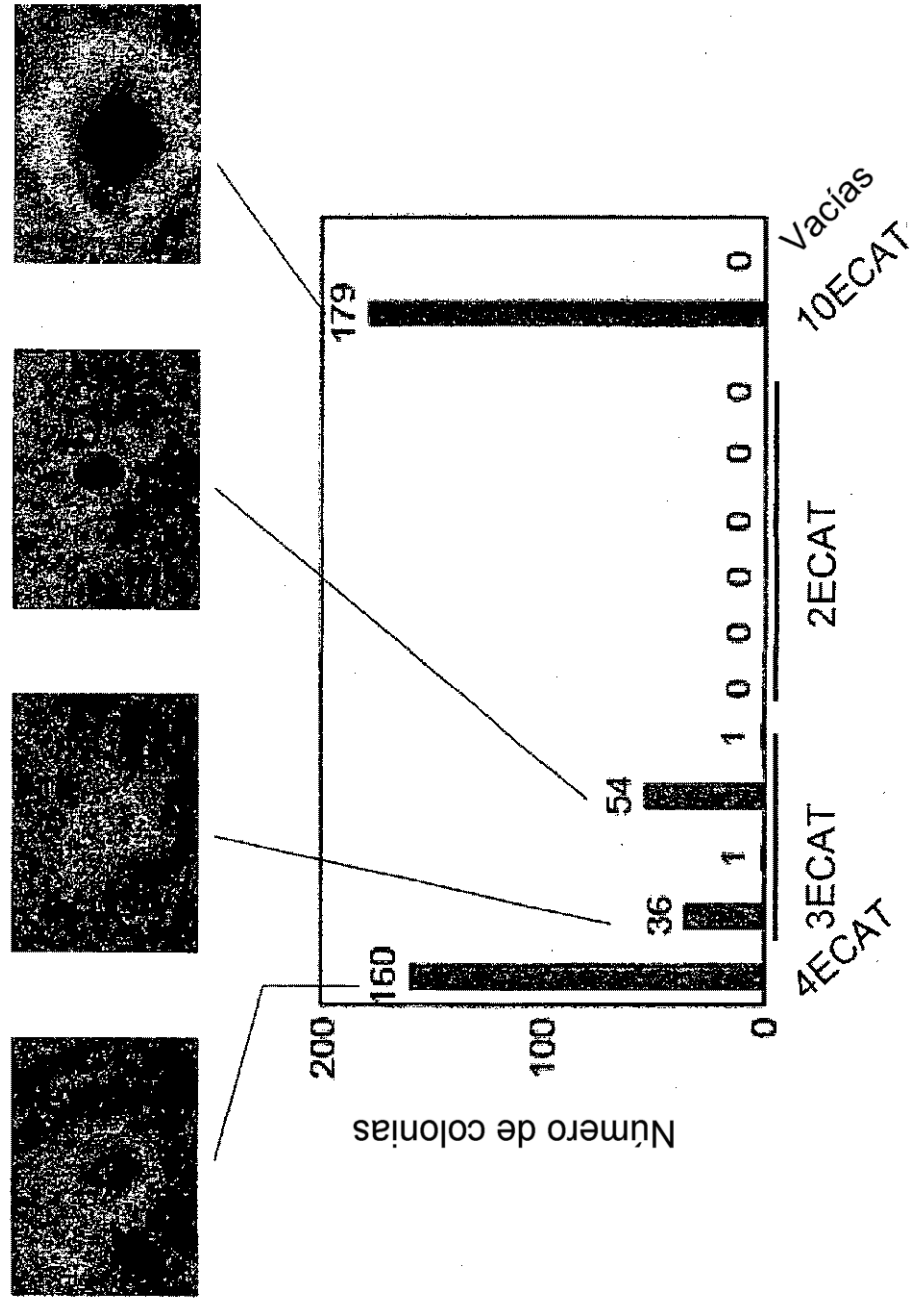
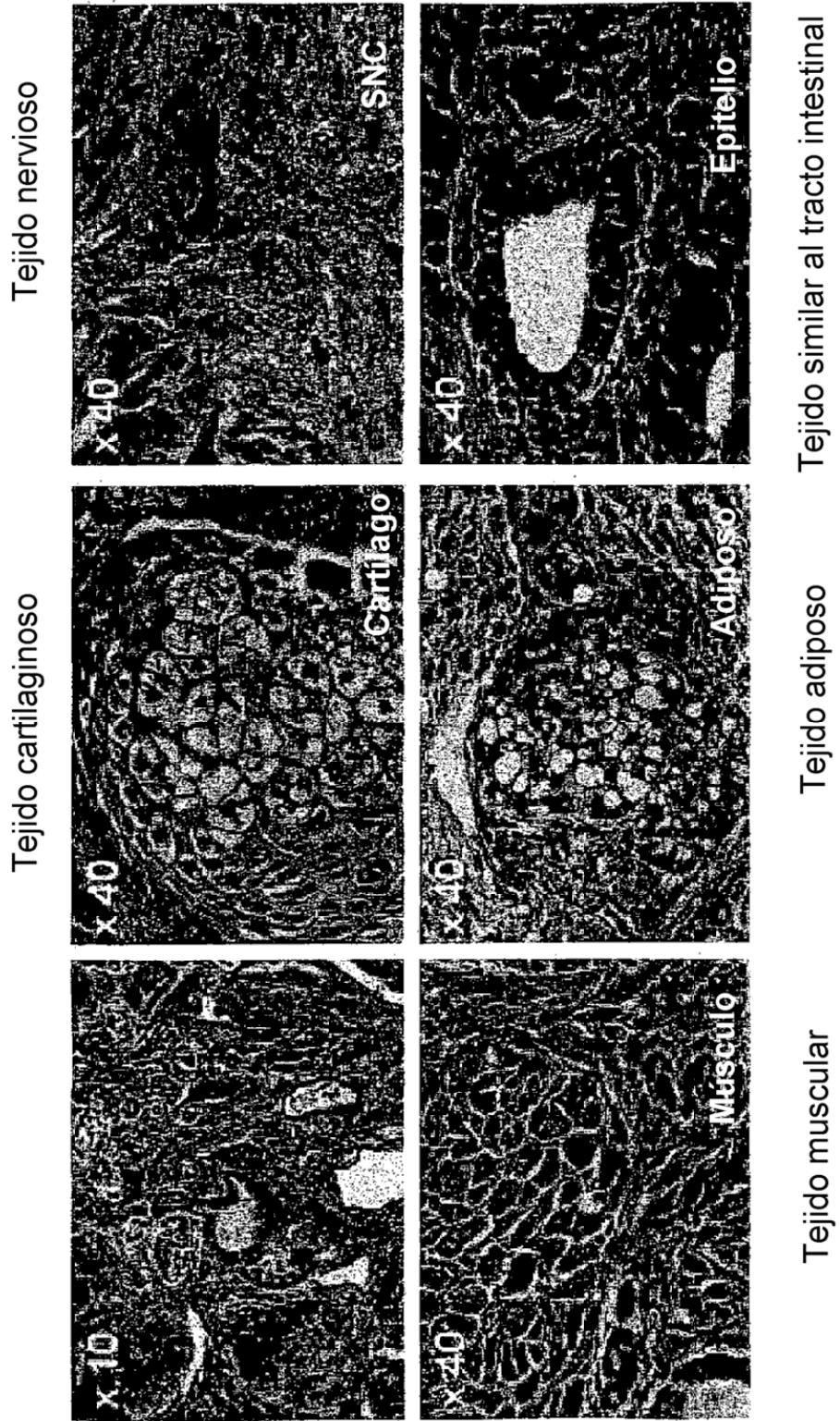


Fig. 8



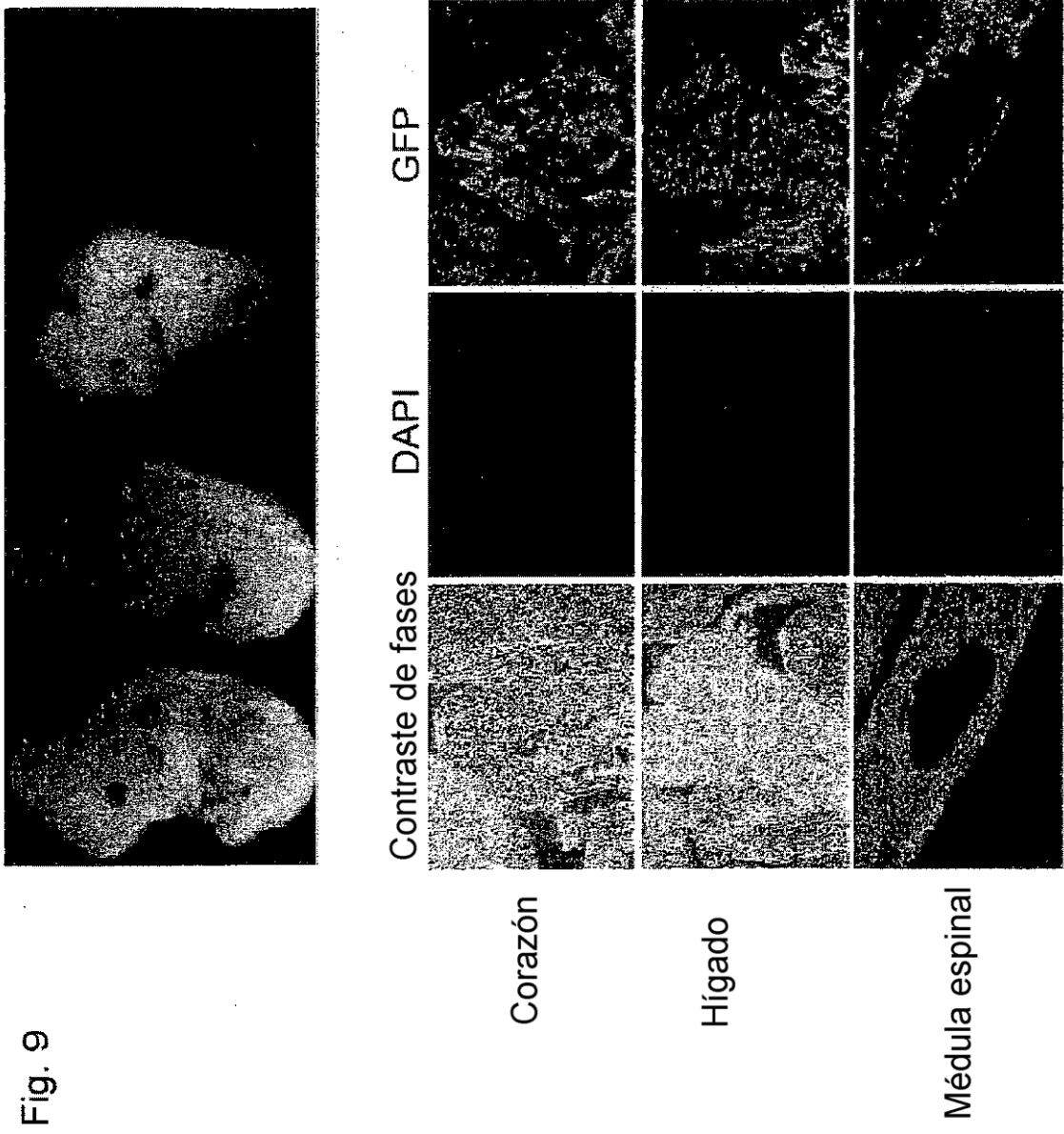
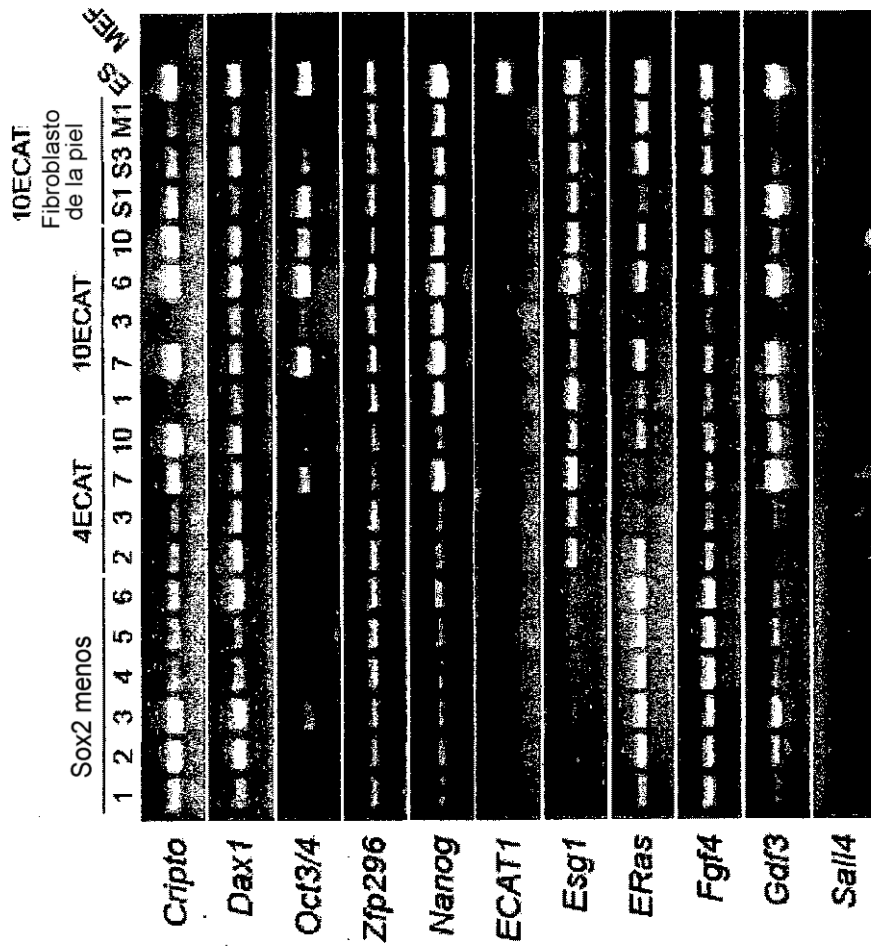


Fig. 10



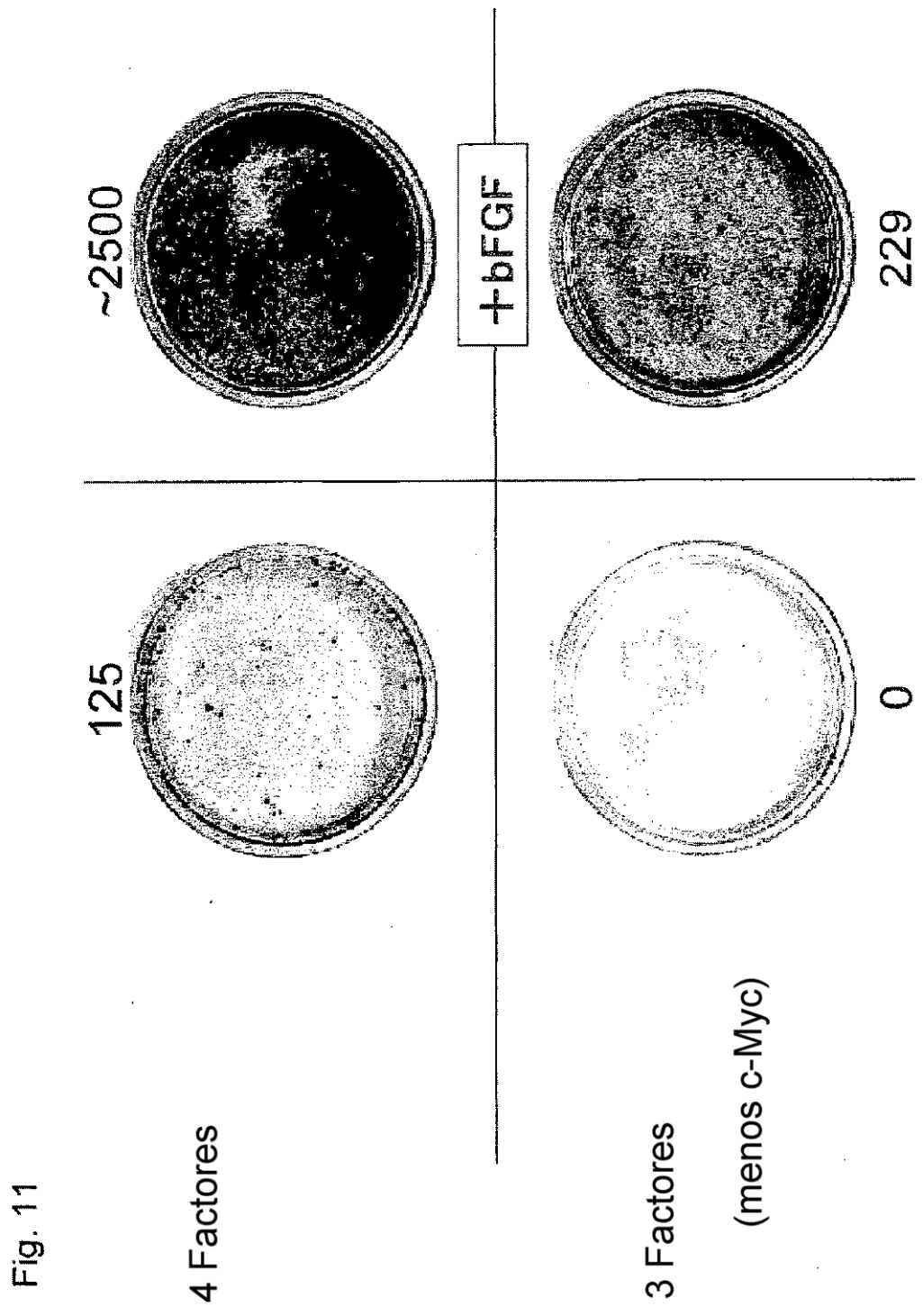
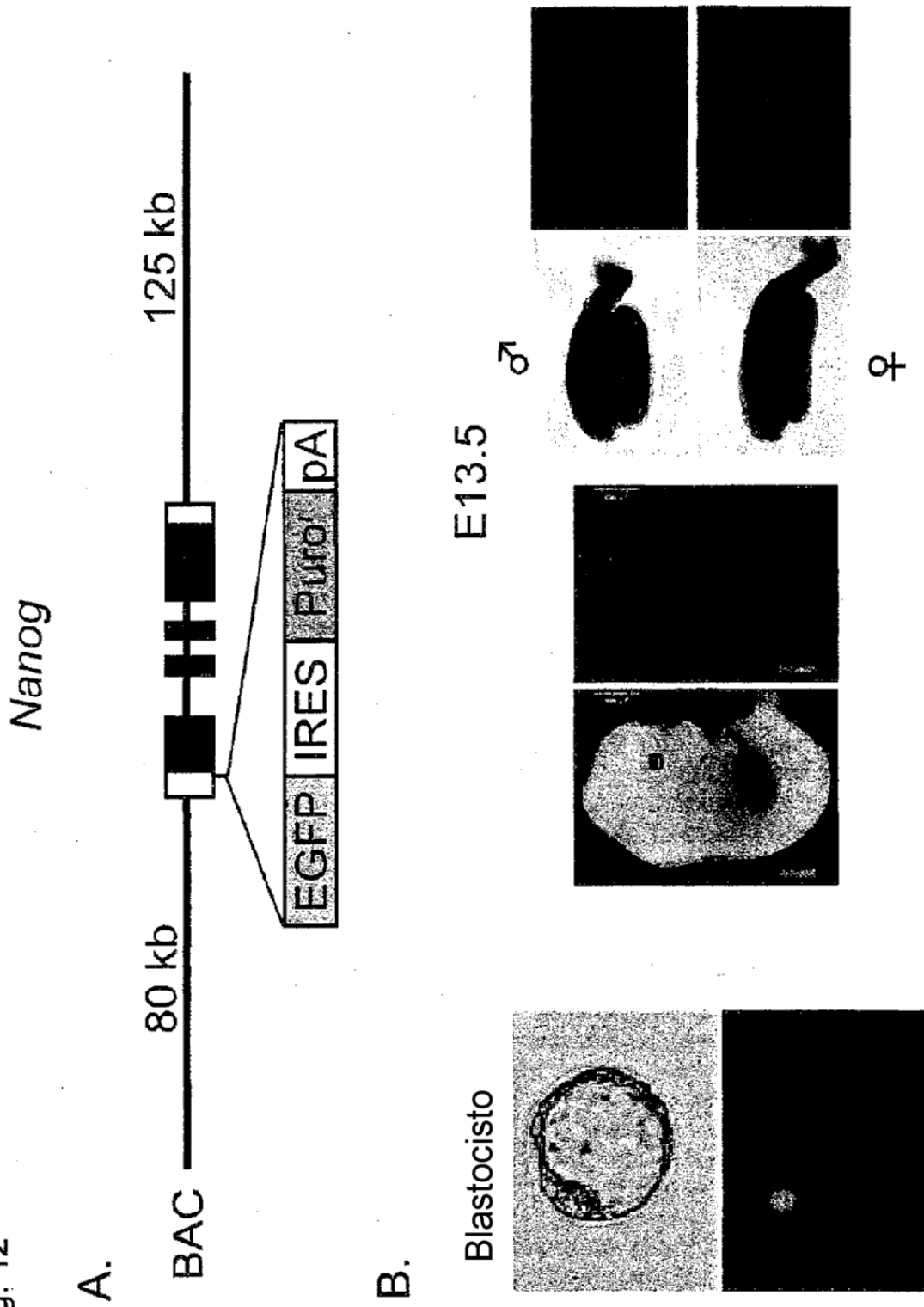


Fig. 11

Fig. 12



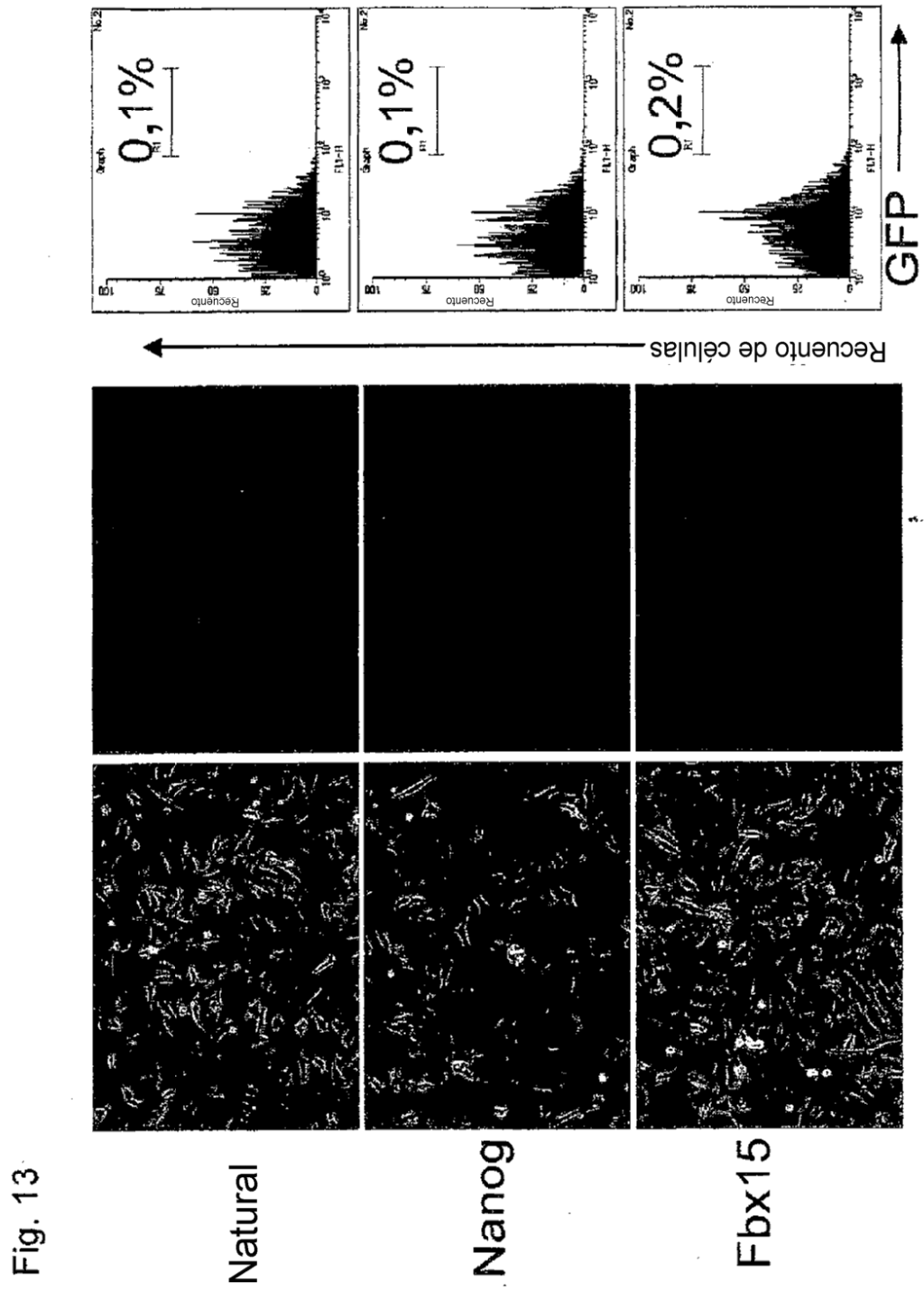
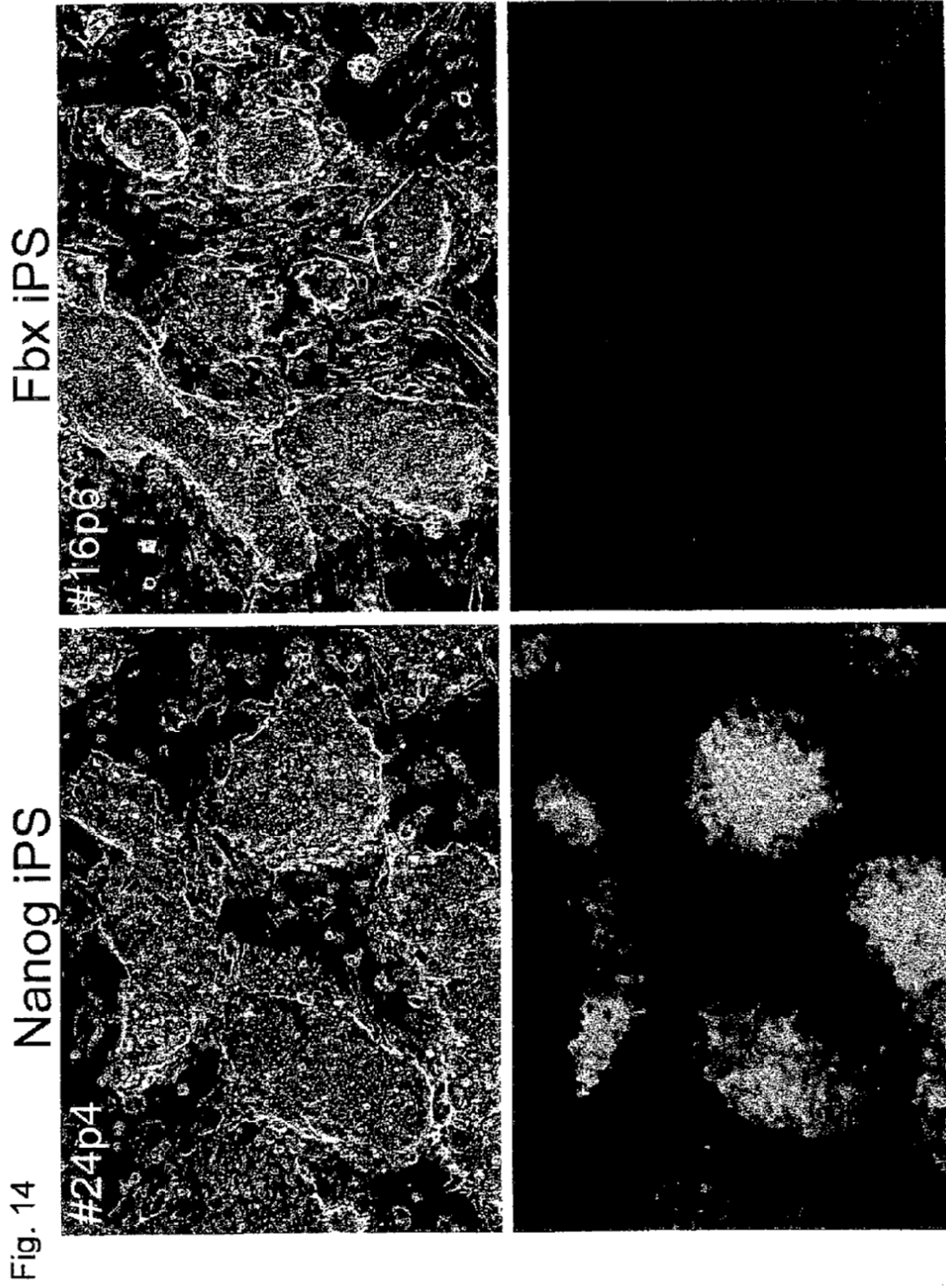


Fig. 13



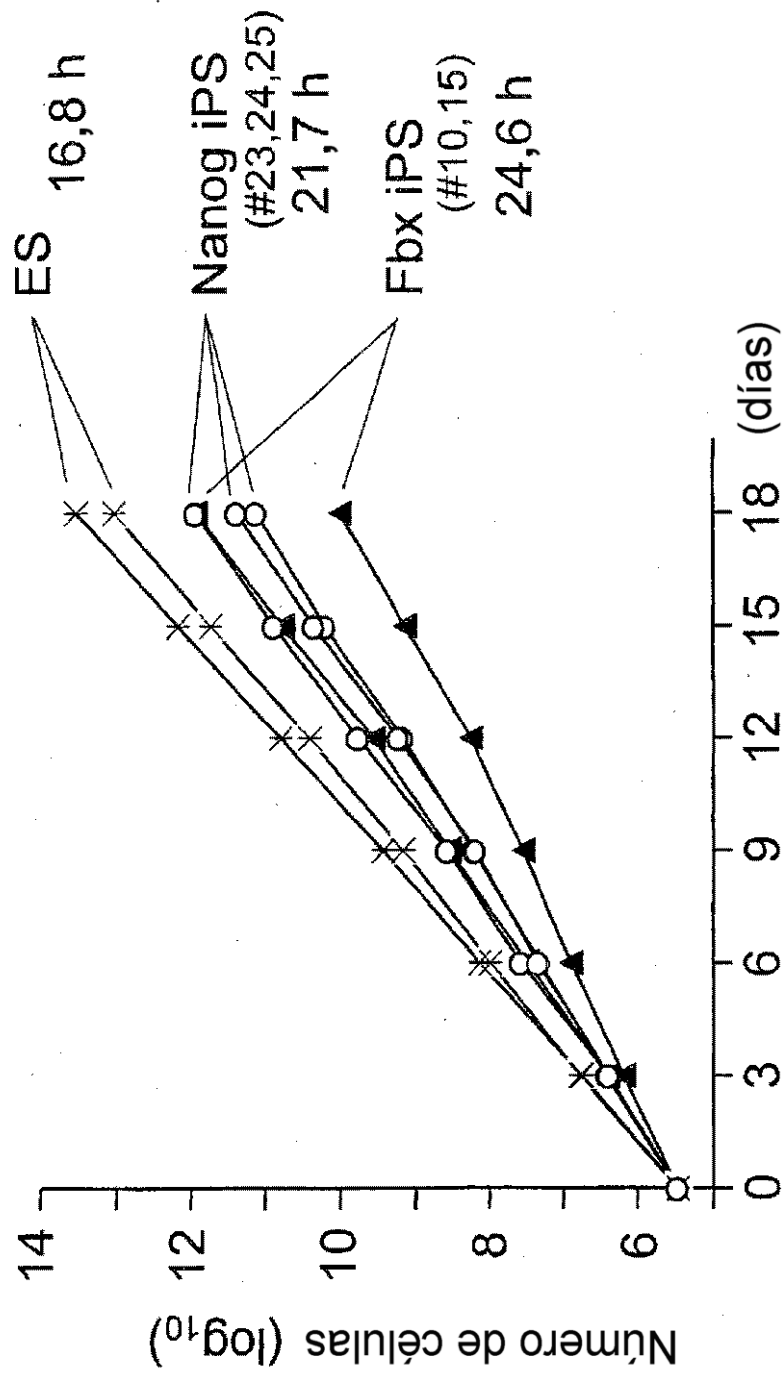
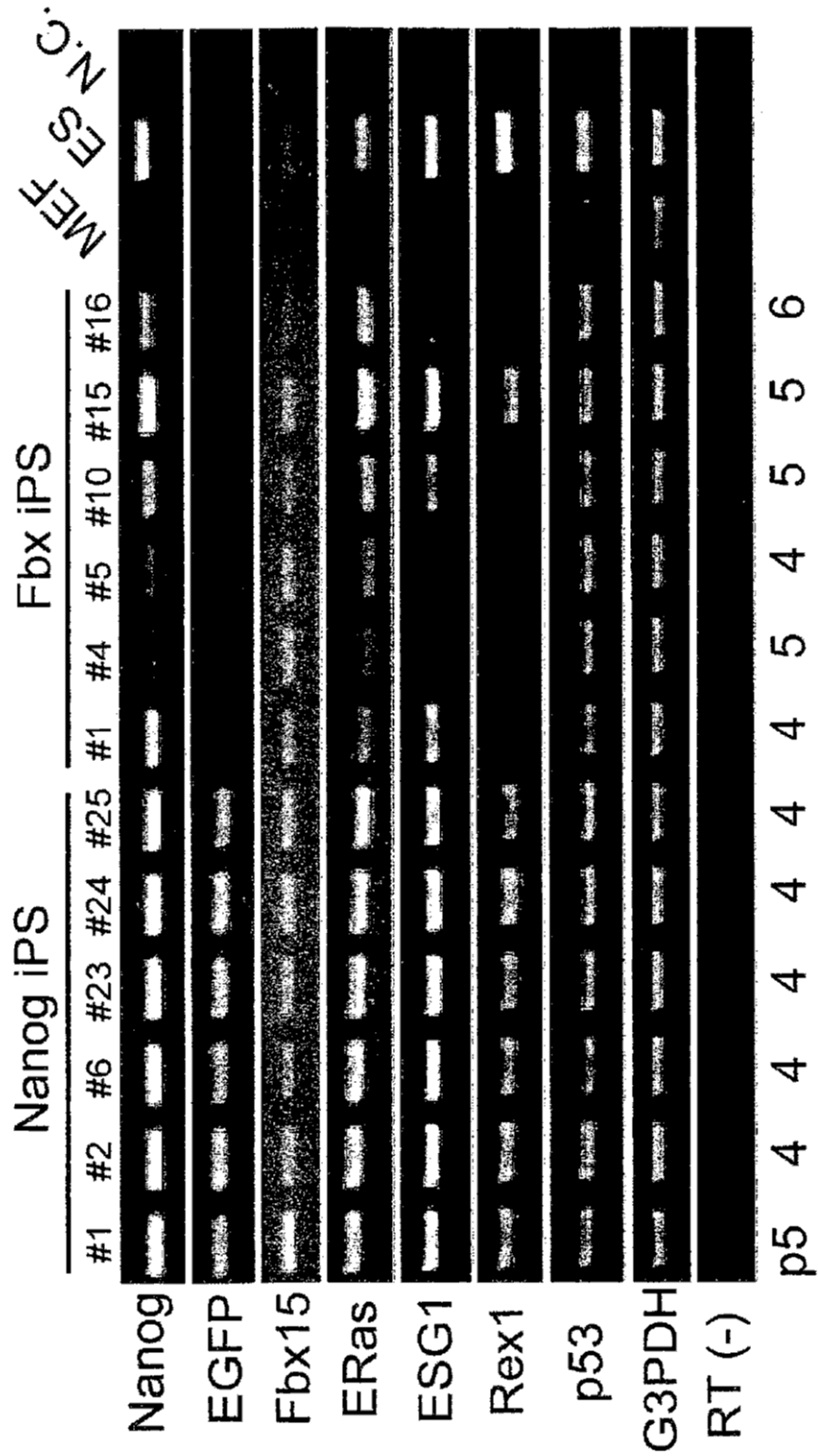
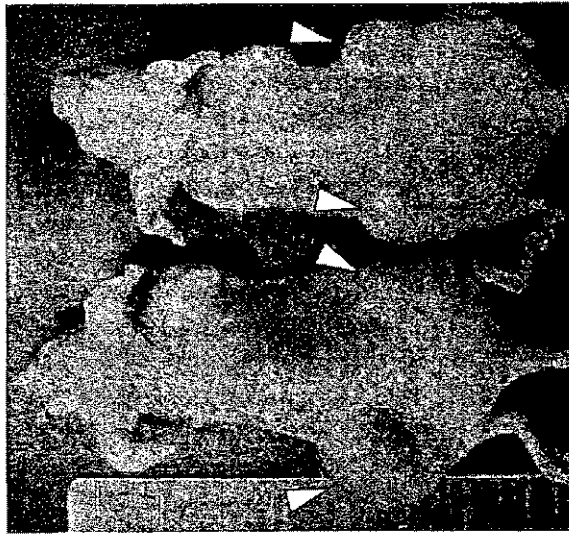
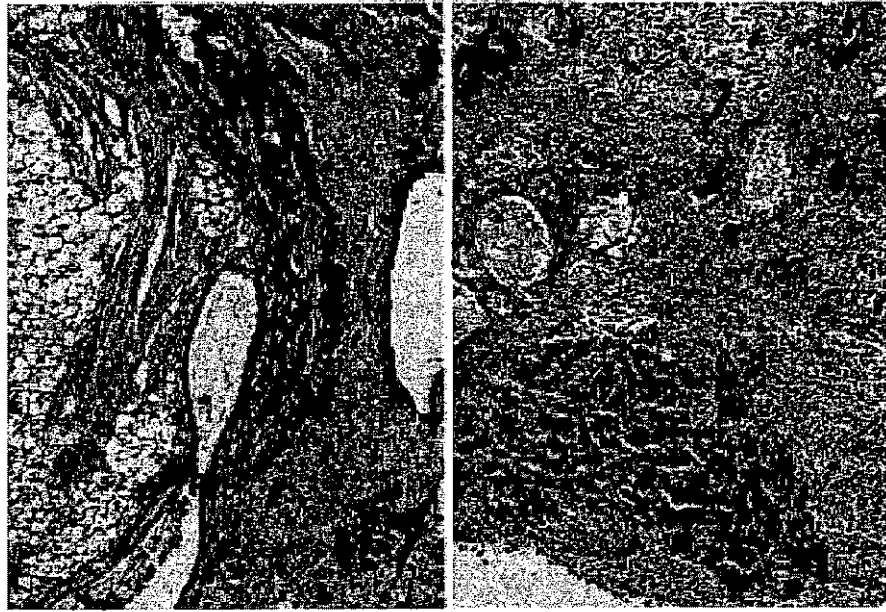


Fig. 15

Fig. 16





ES Nanog iPS
#24(p8)

Fig. 17

Fig. 18



Fig. 19

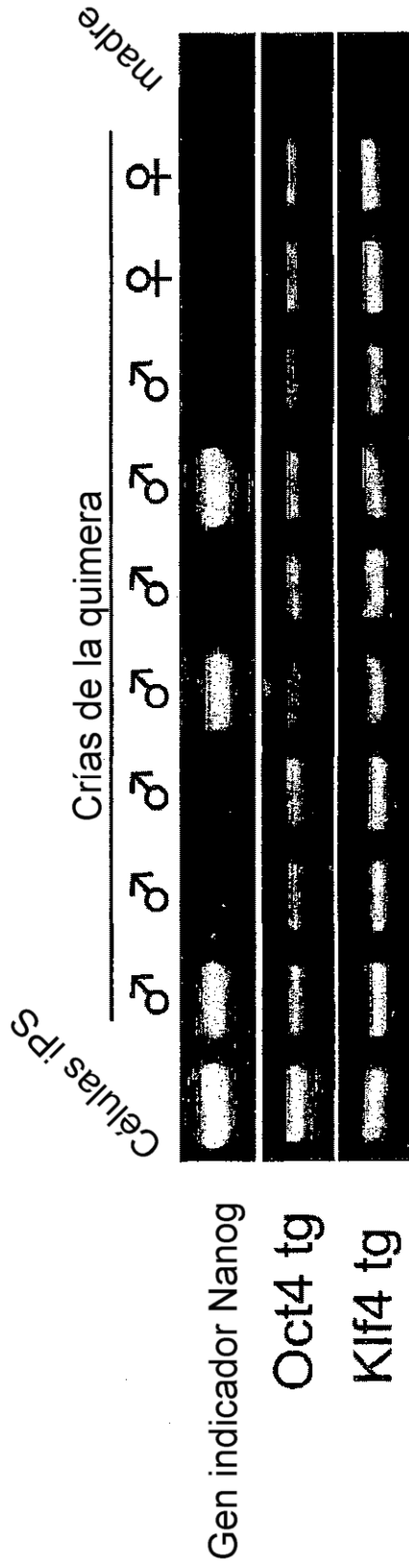
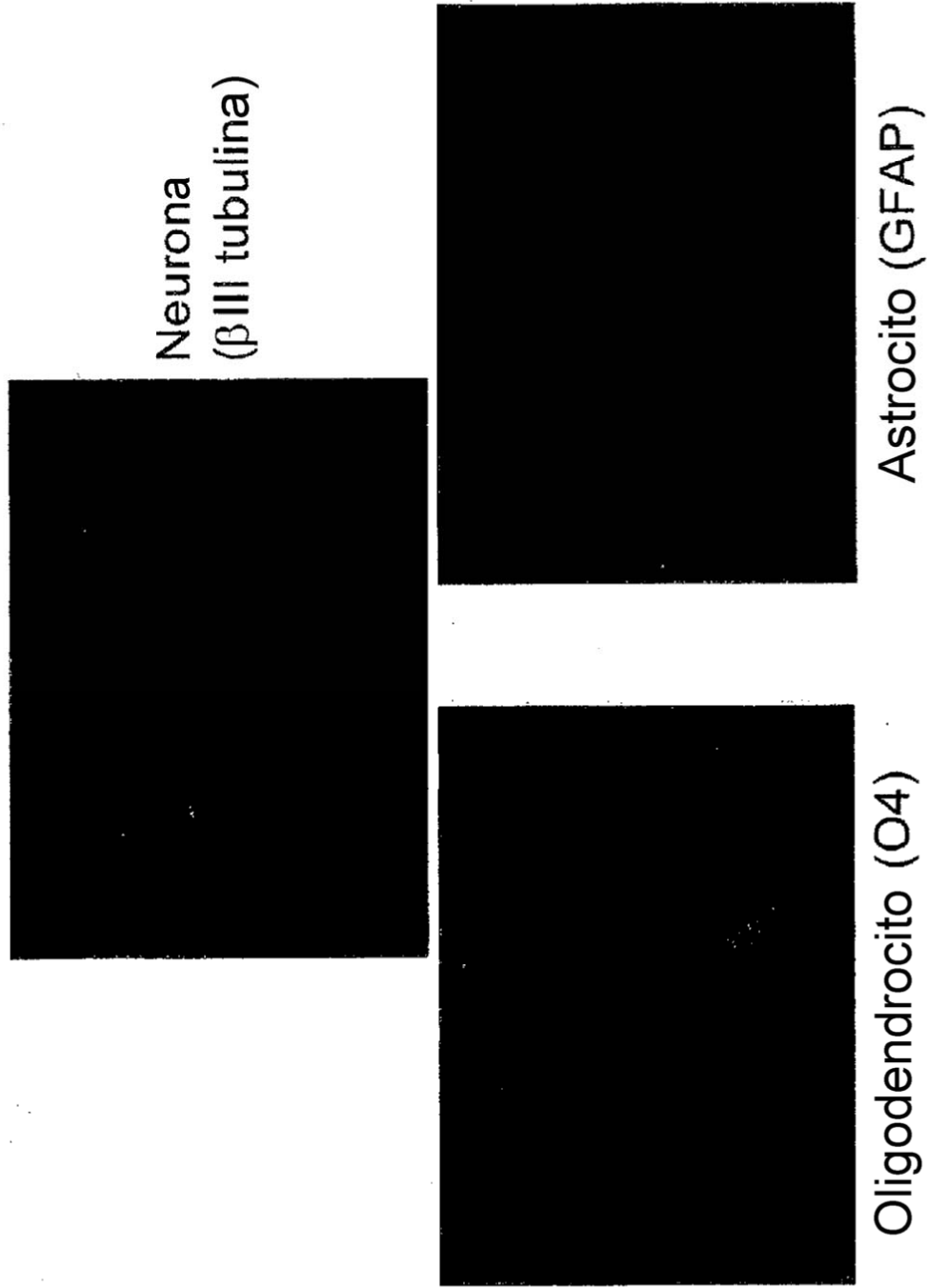
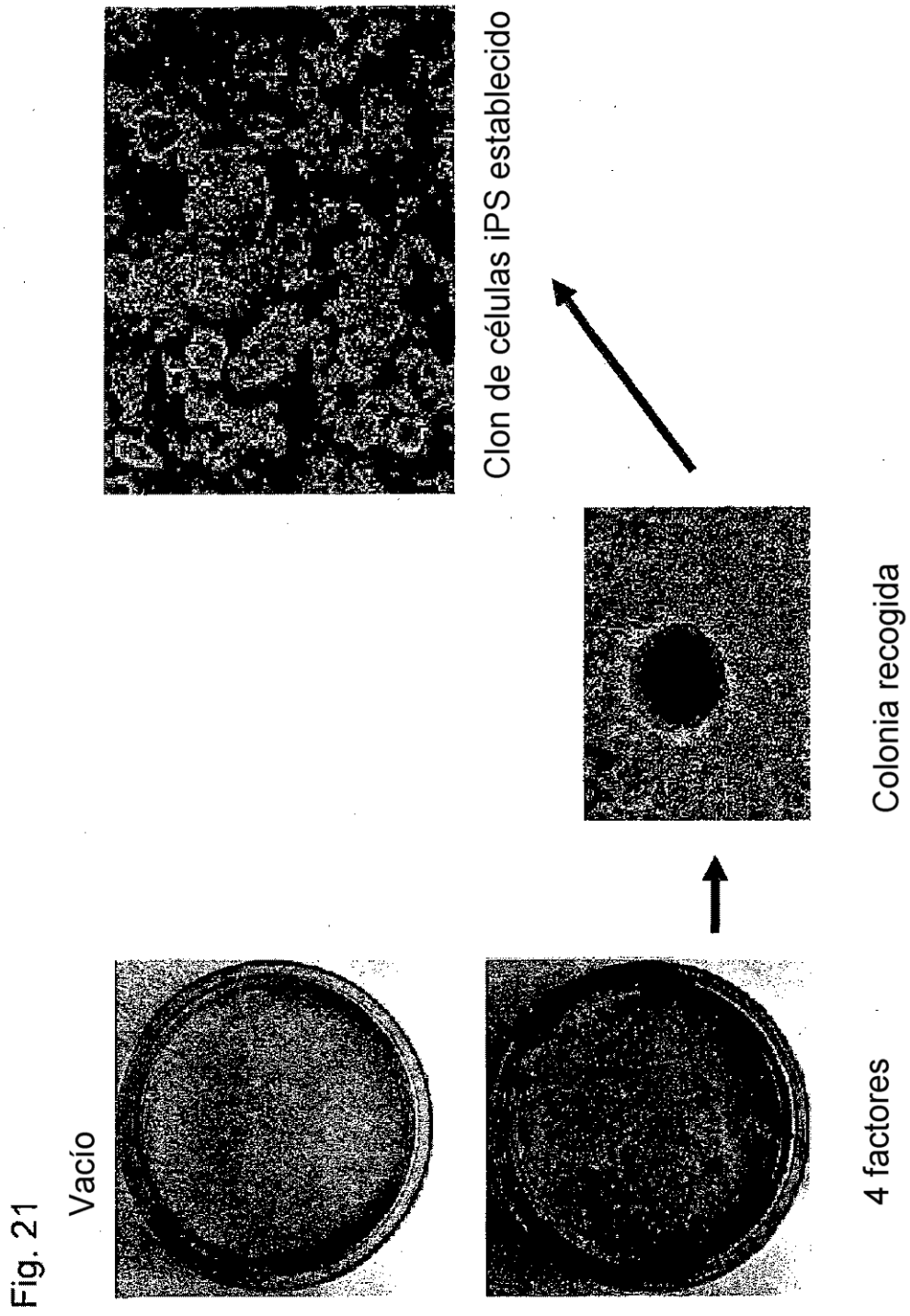


Fig. 20





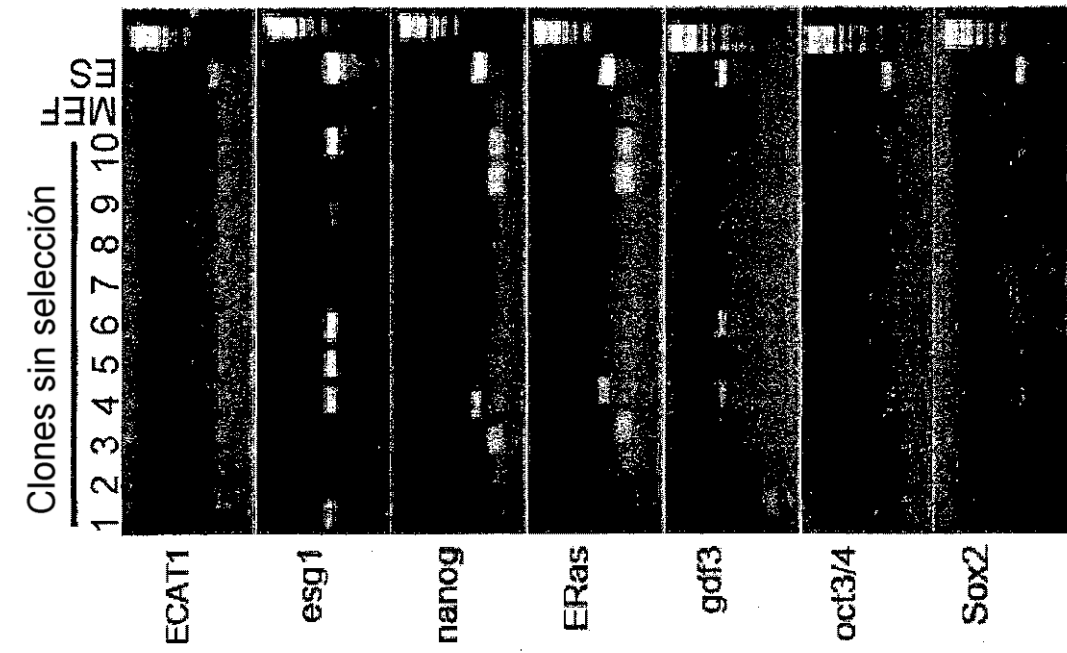
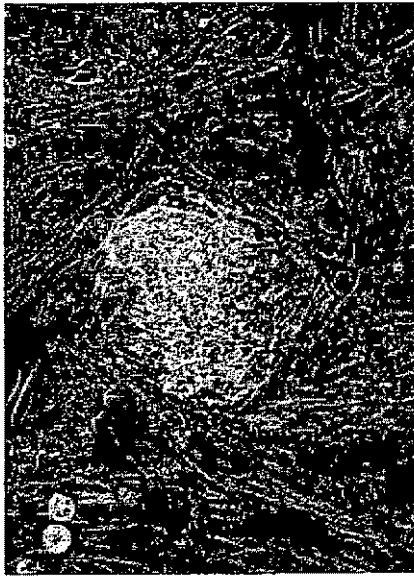


Fig. 22

Fig. 23



Colonia



Después de pases (pase 2)

Fig. 24

