

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 125**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08861423 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2240572**

54 Título: **Uso de ARN para reprogramar células somáticas**

30 Prioridad:

14.12.2007 EP 07024312

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2015

73 Titular/es:

**BIONTECH AG (50.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE y
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
POLEGANOV, MARCO y
BEISSERT, TIM**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 532 125 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

Uso de ARN para reprogramar células somáticas

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona los métodos para desdiferenciar células somáticas en células de tipo madre sin generar embriones o fetos. Más específicamente, la presente invención proporciona los métodos para efectuar la desdiferenciación de células somáticas a células que tienen características de célula madre, particularmente, pluripotencia, mediante la introducción de ARN que codifica factores que inducen la desdiferenciación de las células somáticas en células somáticas y cultivar la células somáticas permitiendo desdiferenciar las células. Después que se desdiferencian, las células se pueden inducir para re-diferenciar en la misma o un tipo de célula somática diferente, tal como neuronal, hematopoyética, muscular, epitelial, y otros tipos de células. Las células-madre derivadas por la presente invención tienen aplicaciones médicas para el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante "terapia celular" y se pueden usar en nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de trastornos cardíacos, neurológicos, endocrinológicos, vasculares, de la retina, dermatológicos, musculatura-esquelética, y otras enfermedades.

Antecedentes de la invención

15 Las células madre denominadas además células progenitoras son células con capacidades para auto renovarse, permanecer indiferenciadas, y para volverse diferenciadas en uno o más tipos de células especializadas con fenotipos maduros. Las células madre no son terminalmente diferenciadas y no están en el final de una vía de diferenciación.

20 Las células totipotentes contienen toda la información genética necesaria para crear todas las células del cuerpo, que incluyen las células de la placenta. Las células humanas tienen esta capacidad totipotente sólo durante las primeras divisiones de un óvulo fecundado. Después de tres a cuatro divisiones de células totipotentes, sigue una serie de etapas en las que las células se vuelven cada vez más especializadas. La siguiente etapa de división resulta en células pluripotentes, que son muy versátiles y pueden dar lugar a cualquier tipo de célula, excepto las células de la placenta u otros tejidos de soporte del útero. En la etapa siguiente, las células se vuelven multipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a varios otros tipos de células, pero esos tipos son limitados en número. Al final de la cadena larga de divisiones celulares que componen el embrión están las células "terminalmente diferenciadas" que se consideran estar comprometidas permanentemente a una función específica.

30 Existen tres grupos principales de células madre: (i) células madre somáticas o adultas (células post-natal), que existen en todos los organismos post-natales, (ii) células madre embrionarias, que se pueden derivar de una etapa de desarrollo pre-embriionario o embriionario y (iii) células madre fetales (pre-natal), que se pueden aislar del feto en desarrollo.

35 Las tecnologías de células madre que implican el aislamiento y uso de células madre embrionarias humanas se han vuelto en un tema importante de la investigación médica. Las células madre embrionarias humanas tienen un potencial para diferenciarse en cualquiera de los tipos de células en el cuerpo humano, que incluyen los tejidos complejos. Se espera que muchas enfermedades que resultan de la disfunción de las células pueden ser susceptibles al tratamiento mediante la administración de células madre embrionarias humanas o células derivadas de células madre embrionarias humanas. La capacidad de las células madre embrionarias pluripotentes para diferenciarse y dar lugar a una pluralidad de células maduras especializadas revela la aplicación potencial de estas células como un medio para sustituir, restaurar o complementar las células dañadas o enfermas, tejidos y órganos. Sin embargo, consideraciones científicas y éticas han frenado el progreso de la investigación que usa células madre embrionarias recuperadas de embriones abortados o embriones formados usando técnicas de fertilización in vitro.

45 Las células madre adultas están presentes sólo en frecuencias bajas y exhiben potencial de diferenciación restringido y un crecimiento pobre. Un problema adicional asociado con el uso de células madres adultas es que estas células no son inmunológicamente privilegiadas, o pueden perder su privilegio inmunológico después del trasplante, en donde el término "inmunológicamente privilegiada" se usa para denotar un estado donde el sistema inmunitario del receptor no reconoce las células como extrañas. Así, sólo los trasplantes autólogos son posibles en la mayoría de los casos cuando se usan células madre adultas. La mayoría de las formas de terapia de célula madre actualmente previstas son procedimientos médicos personalizados prácticamente y por lo tanto, factores económicos asociados con tales procedimientos limitan su potencial de amplio alcance.

55 La restauración de la expresión de al menos algunos genes embrionarios específicos medidos se ha observado en células somáticas a continuación de la fusión con células madre embrionarias. Sin embargo, las células resultantes son

híbridas, frecuentemente con un genotipo tetraploide, y por lo tanto no son adecuadas como células normales o histocompatibles para propósitos de trasplante.

5 El uso de la transferencia nuclear de la célula somática ha demostrado reprogramar adecuadamente el contenido nuclear de la célula somática para adoptar la pluripotencia, sin embargo, plantea un conjunto de preocupaciones además de la posición moral. Las tensiones colocadas tanto en el óvulo como el núcleo introducido son enormes, lo que conduce a una alta pérdida en las células resultantes. Además, el procedimiento se tiene que realizar manualmente bajo un microscopio, y por lo tanto, la transferencia nuclear de la célula somática es muy intensiva en recursos. Adicionalmente, no toda la información genética de las células donadoras se transfiere, se quedan atrás como la 10 mitocondria de la célula donadora que contienen su propio ADN mitocondrial. Las células híbridas resultantes conservan esas estructuras mitocondriales que originalmente pertenecieron al huevo. Como consecuencia, los clones no son copias perfectas del donador del núcleo.

15 Una etapa importante para las células pluripotentes derivadas del paciente se logró por Takahashi y otros en 2006. Se demostró que la sobreexpresión de factores de transcripción definidos (TFs) que son conocidos para regular y mantener la pluripotencia de células madre (Takahasi y otros, 2006, Cell 126, 663-676; Schulz & Hoffmann, 2007, Epigenetics 2, 37-42) pueden inducir un estado pluripotente de fibroblastos somáticos murinos, denominado células madre pluripotentes inducidas (iPS). En este estudio los autores identificaron OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC que se requieren para la generación de la célula iPS (Takahasi y otros, 2006). En un estudio posterior los autores demostraron que los 20 mismos TFs son capaces de reprogramar fibroblastos humanos adultos (Takahasi y otros, 2007, Cell 131, 861-872), mientras que otros atribuyen esta actividad a un cóctel TF modificado compuesto de OCT3/4, SOX2, NANOG y LIN28 respecto fibroblastos humanos (Yu y otros, 2007, Science 318, 1917) o murino (Wernig y otros, 2007, Nature 448, 318-324). Para los estudios iniciales, así como la mayoría de los estudios posteriores los TFs de reprogramación se sobreexpresaron usando vectores retrovirales o lentivirales. Debido al silenciamiento de los promotores virales estos estudios reproduciblemente muestran que la expresión de TFs exógenos se suspende durante el proceso de reprogramación (revisado por Hotta & Ellis, 2008, J. Cell Biochem. 105, 940-948). En consecuencia, el estado pluripotente se mantiene por los factores de transcripción endógenos activados. Además, el silenciamiento de TFs expresados viralmente es requisito previo para la posterior re-diferenciación de las células iPS a precursores específicos a tejido (Yu y otros, 2007). Una desventaja importante de la entrega viral es la reactivación estocástica de los retrovirus 25 integrados que codifican oncogenes potentes, que en el caso de c-MYC conduce a la inducción de tumores en ratones quiméricos (Okita y otros, 2007, Nature 448, 313-317). Mientras tanto se ha demostrado que la generación de células iPS es posible en ausencia de MYC (Nakagawa y otros, 2008, Nat. Biotechnol., 26(1), 101 - 106). En general, sólo OCT4 y SOX2 se reportaron ser esencial para la reprogramación, los oncogenes como MYC y KLF4 parecen actuar como potenciadores (McDevitt & Palecek, 2008, Curr. Opin. Biotechnol. 19, 527-33). En consecuencia se demostró que otros productos génicos transformantes como antígeno SV40 Large-T o hTERT puede mejorar la eficacia de la generación de iPS (Mali y otros, 2008, Stem Cells 26, 1998-2005). Como la reprogramación epigenética implica remodelación de cromatina la adición de la inhibidores de histona deacetilasa (HDAC) (como ácido valproico) o inhibidores ADN metiltransferasa (como 5'-azaC) mejoran en gran medida la eficiencia de la reprogramación (Huangfu y otros, 2008, Nat. Biotechnol. 26, 795-797) y reducen la necesidad de TFs para OCT4 y SOX2 (Huangfu y otros, 2008, 30 Nat. Biotechnol. 26, 1269-1275).

Otra estrategia para reducir el riesgo asociado con la integración retroviral en el genoma huésped es el uso de vectores adenovirales no-integradores, que median una expresión transgénica transitoria suficiente para la reprogramación (Stadtfeld y otros, 2008, 322, 945-949). La integración del transgén se evita además por el uso de plásmidos de expresión eucariota convencional que conduce a la expresión génica transitoria. Hasta ahora, con esta estrategia los MEFs han sido reprogramados con éxito a células iPS (Okita y otros, 2008, Science 322, 949-53). La integración genómica no se detectó en este estudio, sin embargo, no se puede completamente excluir la integración genómica estable en una pequeña fracción de las células de ADN de plásmido transfectado. 45

50 Los fibroblastos humanos adultos se derivan fácilmente de donadores sanos o - en futuras aplicaciones clínicas - de pacientes sin intervención quirúrgica riesgosa. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que los queratinocitos humanos son más fácilmente y más eficientemente reprogramados a células iPS, y que por ejemplo, los queratinocitos derivados de folículo piloso podrían ser la mejor fuente de elección para las células iPS derivadas de los pacientes (Aasen y otros, 2008, Nat. Biotechnol. 26(11), 1276-84). 55

Sigue siendo una necesidad de las tecnologías mejoradas para reprogramar las células somáticas diferenciadas producir en gran número y con buena calidad células reprogramadas adecuadas para la investigación, pruebas de control de calidad, y para el uso en terapia celular.

60 La presente invención proporciona tecnologías para producir células reprogramadas evitando el uso de ADN. Estas tecnologías usan células que se obtienen fácilmente y económicamente en cantidades ilimitadas y proporcionan células reprogramadas útiles en la terapia celular. El enfoque de acuerdo con la presente invención carece completamente el riesgo de integración genómica y abre la posibilidad de reprogramación sin modificación del genoma del huésped.

Breve descripción de la invención

- 5 La presente invención explota el hecho de que, cuando se proporciona con factores adecuados, un destino de las células terminalmente diferenciadas se puede redirigir a la pluripotencialidad. Específicamente, la presente invención proporciona la tecnología para reprogramar una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene propiedades de célula madre. Este método permite la desdiferenciación de un tipo de células somáticas en células tipo madre pluripotentes que usan un sistema definido *in vitro*. El método de la invención en una modalidad proporciona tipos de célula autóloga (isogénica) para el trasplante celular en el mismo individuo que donó la muestra inicial de célula somática.
- 10 De acuerdo con la presente invención, uno o más células somáticas se proporcionan con ARN capaz de expresar uno o más factores que inducen la reprogramación de células somáticas a células que tienen características de célula madre. La expresión de ARN capaz de expresar estos factores confiere características de una célula indiferenciada a una célula somática y facilita la reprogramación de la célula somática.
- 15 La introducción de los factores en forma de ARN tiene la ventaja, en relación con el uso de constructos de ADN, que, para la expresión, el ARN sólo tiene que entrar en el citoplasma de las células, no en el núcleo de la célula. Por lo tanto la transferencia de ARN no es dependiente de la actividad de división de las células que se transfectan. Además, las velocidades de transfección alcanzables con ARN son relativamente altas, para muchos tipos de células aun >90%, y por lo tanto, no existe necesidad de selección. Las cantidades de proteína lograda corresponden a las de expresión fisiológica.
- 20 Además, de acuerdo con la invención, es posible controlar la cantidad de ARN que se introduce en una célula, así como el nivel de estabilidad y traducción del ARN en la célula. Por lo tanto la cantidad y el tiempo de expresión de ciertos factores expresados por el ARN en la célula se pueden ajustar según sea necesario. De esta manera es posible simular los efectos de diferentes niveles de expresión en una célula e introducir ARN en una célula en cantidades suficientes para inducir la reprogramación y la desdiferenciación de células somáticas para producir células que tienen características de célula madre, preferentemente en cantidades suficientes para permitir el desarrollo de células somáticas en células pluripotentes.
- 25 Lo más importante, el ARN transfectado no resulta en integración significativa en el genoma huésped. En contraste, la transfección de ADN para uso médico se considera como terapia génica. La transferencia de ADN se asocia con un riesgo significativo de mutaciones en el genoma huésped con el aumento del riesgo de transformación maligna. Así, la transferencia de ARN tiene un perfil de seguridad mucho mejor y no se considera como terapia génica. Además, el ARN transfectado se degrada en la célula huésped en los siguientes días. Esto significa que una célula madre inducida por transfección de ARN es genéticamente idéntica a una célula madre natural autóloga. Así, los tipos de células y tejidos obtenidos a partir de tales células madre son genéticamente no distinguibles de sus contrapartes naturales autólogas. En contraste, una célula madre inducida por transfección de ADN porta genes foráneos adicionales. Todos los tejidos que se derivan de una célula madre recombinante de ese tipo portan los mismos marcadores genéticos y, así, exhiben un aumento del riesgo de transformación maligna.
- 30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir células que tienen características de célula madre que comprende las etapas de (i) proporcionar una población de células que comprende células somáticas, (ii) introducir ARN en al menos una porción de dichas células somáticas dicho ARN cuando se introduce en una célula somática es capaz de inducir el desarrollo de características de célula madre, y (iii) permitir el desarrollo de células que tienen características de célula madre. En una modalidad, el ARN se obtiene por transcripción *in vitro*.
- 35 Preferentemente, la etapa (iii) comprende cultivar las células somáticas bajo condiciones de cultivo de célula madre embrionaria, preferentemente condiciones adecuadas para mantener las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.
- 40 De acuerdo con la presente invención, el ARN se introduce preferentemente en dicha al menos una porción de células somáticas por electroporación.
- 45 En una modalidad del método de la invención, las características de la célula madre comprenden una morfología de la célula madre embrionaria, en donde dicha morfología de la célula madre embrionaria preferentemente comprende el criterio morfológico seleccionado del grupo que consiste de colonias compactas, alta relación de núcleo a citoplasma y nucleolos prominentes. En ciertas modalidades, las células que tienen características de célula madre tienen cariotipos normales, expresan actividad telomerasa, expresan marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias y/o expresan genes que son característicos de las células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias se pueden seleccionar del grupo que consiste de antígeno 3 embrionario de etapa específica (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con el tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E y los genes que son característicos de las células madre embrionarias se

pueden seleccionar del grupo que consiste de OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor 3 de diferenciación y crecimiento (GDF3), 1 de expresión reducida (REX1), factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF4), gen 1 específico de la célula embrionaria (ESOI), 2 asociado a pluripotencia del desarrollo de (DPPA2), DPPA4, y telomerasa transcriptasa inversa (TERT).

5

Preferentemente, las células que tienen características de célula madre son desdiferenciadas y/o las células somáticas reprogramadas. Preferentemente, las células que tienen características de célula madre exhiben las características esenciales de las células madre embrionarias tales como un estado pluripotente. Preferentemente, las células que tienen características de célula madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivadas avanzadas de las tres capas germinales primarias. En una modalidad, la capa germinal primaria es endodermo y la derivada avanzada es tejido epitelial tipo intestino. En una modalidad adicional, la capa germinal primaria es mesodermo y la derivada avanzada es músculo estriado y/o cartílago. En aun una modalidad adicional, la capa germinal primaria es ectodermo y la derivada avanzada es tejido neural y/o tejido epidérmico. En una modalidad preferida, las células que tienen características de célula madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células neuronales y/o células cardíacas.

10

15

En una modalidad preferida, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos fetales o fibroblastos postnatales o queratinocitos, preferentemente queratinocitos derivados de folículo piloso. En modalidades adicionales, los fibroblastos son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos. En modalidades particulares, los fibroblastos son fibroblastos que se depositaron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) bajo el Núm. de Catálogo CCL-186 o que se depositaron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) bajo el Núm. de Catálogo CRL-2097. En una modalidad, los fibroblastos son fibroblastos dérmicos adultos humanos. Preferentemente, las células somáticas son células humanas. De acuerdo con la presente invención, las células somáticas se pueden modificar genéticamente.

20

25

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir células que tienen características de célula madre que comprende las etapas de (i) proporcionar una población de células que comprende células somáticas, (ii) introducir ARN capaz de expresar OCT4 y ARN capaz de expresar SOX2 en al menos una porción de dichas células somáticas y (iii) permitir el desarrollo de células que tienen características de célula madre. En una modalidad, el método comprende además introducir ARN capaz de expresar NANOG y/o ARN capaz de expresar LIN28 y, alternativamente o adicionalmente, comprende además introducir ARN capaz de expresar KLF4 y/o ARN capaz de expresar c-MYC.

30

35

En una modalidad, la etapa (ii) comprende introducir ARN capaz de expresar OCT4, ARN capaz de expresar SOX2, ARN capaz de expresar NANOG y ARN capaz de expresar LIN28 en al menos una porción de dichas células somáticas.

En otra modalidad, la etapa (ii) comprende introducir ARN capaz de expresar OCT4, ARN capaz de expresar SOX2, ARN capaz de expresar KLF4 y ARN capaz de expresar c-MYC en al menos una porción de dichas células somáticas.

40

Preferentemente, la etapa (iii) comprende cultivar células somáticas bajo condiciones de cultivo de célula madre embrionaria, preferentemente condiciones adecuadas para mantener las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

45

De acuerdo con la presente invención, el ARN se introduce preferentemente en dicha al menos una porción de células somáticas por electroporación.

En una modalidad del método de la invención, las características de la célula madre comprenden una morfología de la célula madre embrionaria, en donde dicha morfología de la célula madre embrionaria preferentemente comprende el criterio morfológico seleccionado del grupo que consiste de colonias compactas, alta relación de núcleo a citoplasma y nucleolos prominentes. En ciertas modalidades, las células que tienen características de célula madre tienen cariotipos normales, expresan actividad telomerasa, expresan marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias y/o expresan genes que son característicos de las células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias se pueden seleccionar del grupo que consiste de antígeno-3 embrionario de etapa específica (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con el tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E y los genes que son característicos de las células madre embrionarias se pueden seleccionar del grupo que consiste de OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor 3 de diferenciación y crecimiento (GDF3), 1 de expresión reducida (REX1), factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF4), gen 1 específico de la célula embrionaria (ESG1), 2 asociado a pluripotencia del desarrollo (DPPA2), DPPA4, y telomerasa transcriptasa inversa (TERT).

50

55

60

Preferentemente, las células que tienen características de célula madre son desdiferenciadas y/o las células somáticas reprogramadas. Preferentemente, las células que tienen características de célula madre exhiben las características esenciales de las células madre embrionarias tales como un estado pluripotente. Preferentemente, las células que

5 tienen características de célula madre tiene el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivadas avanzadas de las tres capas germinales primarias. En una modalidad, la capa germinal primaria es endodermo y la derivada avanzada es tejido epitelial tipo intestino. En una modalidad adicional, la capa germinal primaria es mesodermo y la derivada avanzada es músculo estriado y/o cartílago. En aun una modalidad adicional, la capa germinal primaria es ectodermo y la derivada avanzada es tejido neural y/o tejido epidérmico. En una modalidad preferida, las células que tienen características de célula madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células neuronales y/o células cardíacas.

10 En una modalidad preferida, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos fetales o fibroblastos postnatales o queratinocitos, preferentemente queratinocitos derivados de folículo piloso. En modalidades adicionales, los fibroblastos son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos. En modalidades particulares, los fibroblastos son fibroblastos que se depositaron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) bajo el Núm. de Catálogo CCL-186 o que se depositaron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) bajo el Núm. de Catálogo CRL-2097. En una modalidad, los fibroblastos son fibroblastos dérmicos adultos humanos. Preferentemente, las células somáticas son células humanas. De acuerdo con la presente invención, las células somáticas se pueden modificar genéticamente.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para reprogramar una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene propiedades de célula madre, que comprende la etapa de introducir ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de dicha célula somática a una célula que tiene características de célula madre en dicha célula somática.

25 En una modalidad, el ARN se obtiene por transcripción *in vitro*. En diferentes modalidades, uno o más de dichos factores capaces de ser expresados por el ARN comprenden un conjunto de factores seleccionados del grupo que consiste de (i) OCT4 y SOX2, (ii) OCT4, SOX2, y uno o ambos NANOG y LIN28, (iii) OCT4, SOX2 y uno o ambos KLF4 y c-MYC. En una modalidad, uno o más de dichos factores capaces de ser expresados por el ARN comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 u OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC. Preferentemente, el ARN se introduce en dicha célula somática diferenciada de animal mediante electroporación o microinyección. Preferentemente, el método comprende además permitir el desarrollo de células que tienen características de célula madre, por ejemplo, mediante el cultivo de la célula somática bajo condiciones de cultivo de células madre embrionaria, preferentemente condiciones adecuadas para mantener las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

35 En una modalidad del método de la invención, las características de la célula madre comprende una morfología de célula madre embrionaria, en donde dicha morfología de la célula madre embrionaria comprende preferentemente el criterio morfológico seleccionado del grupo que consiste de colonias compactas, alta relación de núcleo a citoplasma y nucleolos prominentes. En ciertas modalidades, la célula que tiene características de célula madre tiene un cariotipo normal, expresa actividad telomerasa, expresa marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias y/o expresa genes que son característicos de las células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias se pueden seleccionar del grupo que consiste de antígeno-3 embrionario de etapa específica (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con el tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E y los genes que son característicos de las células madre embrionarias se pueden seleccionar del grupo que consiste de OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor 3 de diferenciación y crecimiento (GDF3), 1 de expresión reducida (REX1), factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF4), gen 1 específico de la célula embrionaria (ESG1), 2 asociado a pluripotencia del desarrollo de (DPPA2), DPPA4, y telomerasa transcriptasa inversa (TERT).

50 Preferentemente, la célula que tiene características de célula madre es una célula somática desdiferenciada y/o reprogramada. Preferentemente, la célula que tiene características de célula madre exhibe las características esenciales de las células madre embrionarias tales como un estado pluripotente. Preferentemente, la célula que tiene características de célula madre tiene el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivadas avanzadas de las tres capas germinales primarias. En una modalidad, la capa germinal primaria es endodermo y la derivada avanzada es el tejido epitelial tipo intestino. En una modalidad adicional, la capa germinal primaria es mesodermo y la derivada avanzada es músculo estriado y/o cartílago. En aun una modalidad adicional, la capa germinal primaria es ectodermo y la derivada avanzada es tejido neural y/o tejido epidérmico. En una modalidad preferida, la célula que tiene características de célula madre tiene el potencial de desarrollo para diferenciarse en células neuronales y/o células cardíacas.

60 En una modalidad preferida, la célula somática es un fibroblasto tales como fibroblasto fetal o fibroblasto postnatal o un queratinocito, preferentemente queratinocito derivado de folículo piloso. En modalidades adicionales, el fibroblasto es un fibroblasto de pulmón, fibroblasto de prepucio o fibroblasto dérmico. En modalidades particulares, el fibroblasto es un fibroblasto que se depositó en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) bajo el Núm. de Catálogo CCL-186 o que se depositó en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) bajo el Núm. de Catálogo CRL-2097. En una modalidad, el fibroblasto es un fibroblasto dérmico humano adulto. Preferentemente, la célula somática diferenciada de animal es

una célula humana. De acuerdo con la presente invención, la célula somática diferenciada de animal se puede modificar genéticamente

5 Las modalidades particulares de los métodos de la presente invención comprenden además la etapa de criopreservar las células que tienen características de célula madre.

10 En otros aspectos, la presente descripción se refiere a células que tienen las características de célula madre preparada por los métodos de la presente invención y una composición de células que tiene características de célula madre preparada por los métodos de la presente invención. En una modalidad preferida, la composición es una composición farmacéutica.

15 En aspectos adicionales, la presente descripción se refiere al uso de las células o la composición de la presente invención en la medicina, particularmente en la medicina de trasplantes, para producir un modelo de enfermedad o para el desarrollo del fármaco.

20 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para obtener tipos de células diferenciadas que comprende la etapa de cultivar las células que tienen características de célula madre de la presente invención o la composición de células que tienen características de célula madre de la presente invención bajo condiciones que inducen o dirigen la diferenciación parcial o completa a un tipo de célula particular. Las condiciones que inducen o dirigen la diferenciación parcial o completa a un tipo de célula particular comprenden la presencia de al menos un factor de diferenciación. Preferentemente, el tipo de célula somática de las células diferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente invención es diferente del tipo de célula somática de las células somáticas usadas para la desdiferenciación. Preferentemente, las células desdiferenciadas se derivan de células fibroblásticas y dichos tipos de células diferenciadas son diferentes de las células fibroblásticas. En otra modalidad, las células desdiferenciadas se derivan de los queratinocitos y dichos tipos de células re-diferenciadas son diferentes de los queratinocitos.

30 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un ensayo para identificar uno o más factores útiles para la reprogramación de una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene características de célula madre que comprende las etapas de introducir ARN capaz de expresar uno o más factores en dicha célula somática y determinar si dicha célula somática se ha convertido en una célula que tiene características de célula madre. Preferentemente, el método comprende además la etapa de permitir el desarrollo de células que tienen características de célula madre, por ejemplo, mediante el cultivo de la célula somática diferenciada de animal bajo condiciones de cultivo de célula madre embrionaria, preferentemente condiciones adecuadas para mantener las células madre pluripotentes en un estado indiferenciado. Preferentemente, el ARN se introduce en dicha célula somática diferenciada de animal mediante electroporación o microinyección.

40 La etapa de determinar si dicha célula somática se ha convertido en una célula que tiene características de célula madre comprende comparar la expresión génica de la célula obtenida por el método de la presente invención con la expresión génica encontrada en las células madre embrionarias, preferentemente del mismo tipo de célula, para determinar si uno o más de dichos factores juegan un papel en la reprogramación celular.

45 En una modalidad, la etapa de introducir el ARN capaz de expresar uno o más factores en dicha célula somática comprende introducir ARN capaz de expresar factores conocidos que se implican en la reprogramación de una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene características de célula madre. En una modalidad, dichos factores conocidos que se involucran en la reprogramación de una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene características de célula madre incluyen al menos un factor seleccionado del grupo que consiste de OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC. En una modalidad, dichos factores conocidos que se involucran en la reprogramación de una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene características de célula madre incluyen una combinación de OCT4 y SOX2, una combinación de OCT4, SOX2, NANOG y/o LIN28 y una combinación de OCT4, SOX2, KLF4 y/o c-MYC.

55 Varias modalidades de la célula somática, la célula que tiene características de célula madre y las condiciones de cultivo para permitir el desarrollo de células que tienen características de célula madre son como se describen anteriormente para los métodos de acuerdo con otros aspectos de la presente invención.

60 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un estuche para producir células que tienen características de célula madre que comprende ARN capaz de expresar uno o más factores conocidos que se involucran en la reprogramación de una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene características de célula madre. Preferentemente, dicho estuche comprende ARN capaz de expresar OCT4 y ARN capaz de expresar SOX2 y preferentemente comprende además (i) ARN capaz de expresar NANOG y/o ARN capaz de expresar Lin28 y/o (ii) ARN capaz de expresar y KLF4 y/o ARN capaz de expresar c-MYC. El estuche puede comprender además un medio de cultivo de célula madre embrionaria.

En aun un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende ARN que cuando se introduce en una célula somática es capaz de inducir el desarrollo de características de célula madre en dicha célula. Modalidades particulares de ARN, la célula somática y la célula que tiene características de célula madre son como se describen en la presente para otros aspectos de la invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona la tecnología para cambiar un tipo de células somáticas altamente especializadas, por ejemplo, fibroblastos o queratinocitos, en otro tipo, por ejemplo, células neuronales, a través de una célula pluripotente intermedia.

Específicamente, proporcionando una célula somática diferenciada con factores presentes en tipos de células pluripotentes, preferentemente células madre, con mayor preferencia células madre embrionarias, la invención restaura la memoria epigenética de la célula a un estado similar al de las células madre pluripotentes. Con la presente invención, los embriones no tienen que ser usados, creados o destruidos para generar células que tienen características de célula madre, particularmente, la pluripotencia, eliminando así las preocupaciones éticas. Además, la presente invención no requiere el uso de vectores que se integran en el genoma, tales como vectores virales que introducen potencialmente mutaciones en el sitio de inserción.

Las células somáticas usadas de acuerdo con la presente invención tienen una ventaja importante sobre los ovocitos como un medio para inducir la reprogramación en las que se pueden fácilmente expandir in vitro en número. Adicionalmente, la presente invención permite el uso de células somáticas específicas del paciente y así elimina gran parte de las preocupaciones del rechazo inmune y problemas asociados con la inmunosupresión del paciente. Usando las células generadas de acuerdo con la presente invención para el trasplante celular autólogo es poco probable inducir efectos secundarios adversos y/o resistencia. Si es necesario, es factible el trasplante celular repetido. Sin embargo, desde entonces la presente invención significativamente reducirá la necesidad de inmunosupresión del paciente que reduce el rechazo hiperagudo y agudo además se aliviará la necesidad de procedimientos de trasplante repetidos, reduciendo el costo del tratamiento de la enfermedad.

Términos tales como "célula que tiene características de célula madre", "célula que tiene propiedades de célula madre" o "célula tipo madre" se usan en la presente descripción para designar a las células que, aunque se derivan de las células no madre somáticas diferenciadas, exhiben una o más características típicas de las células madre, particularmente las células madre embrionarias. Tales características incluyen una morfología de célula madre embrionaria tales como colonias compactas, alta relación núcleo a citoplasma y nucleolos prominentes, cariotipos normales, expresión de actividad telomerasa, expresión de marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias, y/o expresión de genes que son característicos de las células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias son, por ejemplo, seleccionados del grupo que consiste de antígeno-3 embrionario de etapa específica (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con el tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E. Los genes que son característicos de las células madre embrionarias se seleccionan, por ejemplo, del grupo que consiste de OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor 3 de diferenciación y crecimiento (GDF3), 1 de expresión reducida (REX1), factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF4), gen 1 específico de célula embrionaria (ESG1), 2 asociado a pluripotencia del desarrollo (DPPA2), DPPA4, y telomerasa transcriptasa inversa (TERT). En una modalidad, una o más características típicas de células madre incluyen pluripotencia.

Una "célula madre" es una célula con la capacidad de autorrenovarse, permanecer indiferenciada, y volverse diferenciada. Una célula madre puede dividirse sin límite, durante al menos el tiempo de vida del animal en el que reside de forma natural. Una célula madre no es terminalmente diferenciada; no está en la etapa final de una vía de diferenciación. Cuando una célula madre se divide, cada célula hija pueden o bien seguir siendo una célula madre o embarcarse en un curso que conduce hacia la diferenciación terminal.

Las células madre totipotentes son células que tienen propiedades de diferenciación totipotenciales y que tienen la capacidad de transformarse en un organismo completo. Esta propiedad se posee por las células hasta el estadio celular 8 después de la fecundación del ovocito por el espermatozoide. Cuando estas células se aíslan y se trasplantan en el útero, pueden transformarse en un organismo completo.

Las células madre pluripotentes son células capaces de transformarse en varias células y tejidos derivados de las capas ectodérmica, mesodérmica y endodérmica. Las células madre pluripotentes que se derivan de la masa celular interna situada dentro de los blastocistos, generadas 4-5 días después de la fertilización se denominan "células madre embrionarias" y pueden diferenciarse en otras varias células de tejidos, pero no pueden formar nuevos organismos vivos.

5 Las células madre multipotentes son células madre que se diferencian normalmente sólo en tipos celulares específicos a su tejido y órgano de origen. Las células madre multipotentes se implican no sólo en el crecimiento y desarrollo de varios tejidos y órganos durante los periodos fetal, neonatal y adulto, sino además en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos y la función de inducir la regeneración tras el daño tisular. Las células multipotentes específicas a tejido se denominan colectivamente "células madre adultas".

10 Una "célula madre embrionaria" es una célula madre que está presente en o aislada a partir de un embrión. Puede ser pluripotentes, que tienen la capacidad de diferenciarse en todos y cada célula presente en el organismo, o multipotentes, con la capacidad de diferenciarse en más de un tipo de célula.

15 Como se usa en la presente, "embrión" se refiere a un animal en las primeras etapas de su desarrollo. Estas etapas se caracterizan por la implantación y la gastrulación, donde las tres capas germinales se definen y establecen y por la diferenciación de las capas germinales en los órganos respectivos y sistemas de órganos. Las tres capas germinales son el endodermo, ectodermo y mesodermo.

20 Un "blastocisto" es un embrión en una etapa temprana de desarrollo en el que el óvulo fertilizado se ha sometido a la escisión, y una capa esférica de células que rodean una cavidad llena de fluido se está formando, o se ha formado. Esta capa esférica de células es la trofotodermo. Dentro del trofotodermo está un agregado de células llamado la masa celular interna (ICM). El trofotodermo es el precursor de la placenta, y el ICM es el precursor del embrión.

25 Una célula madre adulta, además denominada una célula madre somática, es una célula madre que se encuentra en un adulto. Una célula madre adulta se encuentra en un tejido diferenciado, puede renovarse, y puede diferenciarse, con algunas limitaciones, para producir tipos de células especializadas de su tejido de origen. Los ejemplos incluyen células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y células de madre neurales.

30 Una "célula diferenciada" es una célula madura que ha sufrido cambios en el desarrollo progresivo a una forma o función más especializada. La diferenciación celular es el proceso que una célula sufre a medida que madura a un tipo de célula especializada abiertamente. Las células diferenciadas tienen características distintas, realizan funciones específicas, y son menos propensas a dividir que sus contrapartes menos diferenciadas.

35 Una célula "indiferenciada", por ejemplo, una célula inmadura, embrionaria, o primitiva, típicamente tiene un aspecto no específico, puede realizar actividades múltiples, no específicas, y puede funcionar deficientemente, si las funciones, en modo alguno, típicamente se realizan por células diferenciadas.

40 El término "autólogo" se usa para describir cualquier cosa que se deriva de los propios tejidos, células, o ADN de un organismo. Por ejemplo, "trasplante autólogo" se refiere a un trasplante de tejidos u órganos derivados del mismo organismo. Estos procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que de cualquier otra forma resulta en rechazo.

El término "heterólogo" se usa para describir algo consistente de múltiples elementos diferentes. Como un ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo en un individuo diferente constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del organismo.

45 "Célula somática" se refiere a cualquiera y todas las células diferenciadas y no incluye las células madre, células germinales o gametos. Preferentemente, "célula somática" como se usa en la presente descripción se refiere a una célula terminalmente diferenciada.

50 Como se usa en la presente descripción, "comprometido" se refiere a las células que se consideran estar comprometidas permanentemente con una función específica. Las células comprometidas además se les conoce como "células terminalmente diferenciadas".

55 Como se usa en la presente descripción, "diferenciación" se refiere a la adaptación de células a una forma o función particular. En las células, la diferenciación conduce a una célula más comprometida.

Como se usa en la presente descripción, "desdiferenciación" se refiere a la pérdida de especialización en forma o función. En las células, la desdiferenciación conduce a una célula menos comprometida.

60 Como se usa en la presente descripción "reprogramación" se refiere a reiniciar el programa genético de una célula. Una célula reprogramada presenta preferentemente pluripotencia.

Los términos "desdiferenciada" y "reprogramada" o términos similares se usan indistintamente en la presente descripción para denotar las células derivadas de célula somática que tienen características de célula madre. Sin

embargo, dichos términos no pretenden limitar el objeto descrito en la presente descripción por consideraciones mecanicistas o funcionales.

5 El término "ARN que induce el desarrollo de las características de célula madre" se refiere a ARN que cuando se introduce en una célula somática induce a la célula a desdiferenciar.

Como se usa en la presente descripción, "célula germinal" se refiere a una célula reproductiva tal como un espermatozoido o un ovocito, o una célula que se desarrollará en una célula reproductiva.

10 Como se usa en la presente descripción, "pluripotentes" se refiere a células que pueden dar lugar a cualquier tipo de célula, excepto las células de la placenta u otras células de sostén del útero.

De acuerdo con la invención, los métodos estándar se pueden usar para la producción de ácidos nucleicos, cultivo de células e introducción de ARN en las células.

15 De acuerdo con la invención, el término "ácido nucleico" comprende ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), combinaciones de estos, y formas modificadas de estos. El término comprende ADN genómico, ADNc, ARNm, producido de forma recombinante y moléculas sintetizadas químicamente. De acuerdo con la invención, un ácido nucleico puede estar presente como una molécula monocatenaria o de cadena doble y lineal o covalentemente de forma circular cerrada.

20 Un ácido nucleico se puede aislar, de acuerdo con la invención. El término "ácido nucleico aislado" significa, de acuerdo con la invención, que el ácido nucleico (i) se amplificó *in vitro*, por ejemplo, por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se produjo de forma recombinante mediante clonación, (iii) se purificó, por ejemplo, mediante escisión y separación mediante electroforesis en gel o (iv) se sintetizó, por ejemplo mediante síntesis química.

25 En una modalidad preferida, un ácido nucleico clonado está, de acuerdo con la invención, presente en un vector, con el vector que comprende opcionalmente un promotor que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se usa en su significado más general y comprende cualquier vehículos intermedios de un ácido nucleico que hacen que sea posible, por ejemplo, insertar el ácido nucleico en células procariotas y/o eucariotas y, opcionalmente, integrarlos en un genoma. Tales vectores se replican preferentemente y/o expresan en la célula. Un vehículo intermedio se puede adaptar por ejemplo, para el uso en la electroporación, en el bombardeo con microproyectiles, en la administración liposomal, en la transferencia por medio de agrobacterias o en la inserción a través de virus de ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos o genomas virales.

30 El término "gen" se refiere de acuerdo con la invención a una secuencia de ácido nucleico particular, que es responsable de la producción de uno o más productos celulares y/o para la obtención de uno o más funciones intercelulares o intracelulares. Particularmente, el término se refiere a un segmento de ADN que codifica para una proteína específica o una molécula de ARN funcional o estructural.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "ARN" significa una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" se denota un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una porción beta-D-ribo-furanosa. El término incluye ARN de cadena doble, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN prácticamente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN alterado que difiere del ARN de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como el (los) extremo (s) de un ARN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos de ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN pueden además comprender nucleótidos no estándar, tales como los nucleótidos de origen no natural o nucleótidos sintetizados químicamente o desoxinucleótidos. Estos ARN alterados se pueden conocer como análogos o análogos de ARN de origen natural.

40 De acuerdo con la presente invención, el término "ARN" incluye y preferentemente se refiere a "ARNm", que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcrito" que se puede producir usando el ADN como molde y codifica un péptido o proteína. El ARNm comprende típicamente una 'región no traducida 5', una proteína o región codificante del péptido y una región no traducida 3'. El ARNm tiene una vida media limitada en las células e *in vitro*. Preferentemente, el ARNm se produce por transcripción *in vitro* usando un molde de ADN.

45 El término "expresión" se usa de acuerdo con la invención en su sentido más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteínas/péptidos, por ejemplo, por transcripción y/o traducción. Comprende, además, la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. Con referencia a ARN, el término "expresión" se refiere particularmente a la producción de proteínas/péptidos.

Las secuencias de control de la expresión o secuencias reguladoras, que de acuerdo con la invención se pueden

enlazar funcionalmente con un ácido nucleico, pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificante y una secuencia reguladora se enlazan entre sí "funcionalmente" si están unidas covalentemente, de manera que la transcripción o traducción de la secuencia codificante está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia reguladora. Si la secuencia codificante debe ser traducida a una proteína funcional, con enlace funcional de una secuencia reguladora con la secuencia codificante, la inducción de la secuencia reguladora conduce a una transcripción de la secuencia codificante, sin causar un cambio de marco de lectura en la secuencia codificante o incapacidad de la secuencia codificante que se traduce a la proteína o péptido deseado.

El término "secuencia de control de la expresión" o "secuencia reguladora" comprende, de acuerdo con la invención, promotores, secuencias de unión al ribosoma y otros elementos de control, que controlan la transcripción del gen o la traducción del ARN derivado. En ciertas modalidades de la invención, se pueden controlar las secuencias de control de la expresión. La estructura exacta de secuencias reguladoras se pueden variar dependiendo de la especie o dependiendo del tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcrita y 5'-y 3'-no traducidas, que se implican en la iniciación de la transcripción o de traducción, tales como la caja TATA, la secuencia de caperuza, secuencia CAAT-y similares. Particularmente, las secuencias reguladoras 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido funcionalmente. Las secuencias reguladoras pueden comprender además secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba.

El término "transcripción" de acuerdo con la invención se refiere al proceso por el cual el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. El ARN se puede posteriormente traducir a proteína. De acuerdo con la invención, el término "transcripción" comprende " transcripción *in vitro*-" (IVT) que se refiere a un proceso en donde el ARN, particularmente, ARNm, se sintetiza en un sistema *in vitro* libre de células preferentemente usando extractos celulares preparados adecuadamente. Preferentemente se usan vectores de clonación para la producción de transcritos que generalmente se designan vectores de transcripción.

El término "traducción" de acuerdo con la invención se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para hacer una proteína o péptido.

En modalidades particulares, el ARN que se va a introducir en una célula de acuerdo con la invención comprende una población de diferentes moléculas de ARN, por ejemplo, ARN de célula completa, una genoteca de ARN, o una porción de esta, por ejemplo una genoteca de moléculas de ARN expresadas en un tipo de célula particular, tales como células indiferenciadas, particularmente, células madre tales como células madre embrionarias, o una fracción de la genoteca de moléculas de ARN tal como ARN con la expresión enriquecida en células indiferenciadas, particularmente células madre tales como las células madre embrionarias en relación con las células diferenciadas.

Así, de acuerdo con la invención, el término "ARN" puede incluir ARN de célula completa o de una fracción de esta, que se puede obtener por un proceso que comprende el aislamiento de ARN de las células y/o por medios recombinantes, particularmente, por transcripción *in vitro*.

En una modalidad de los métodos de acuerdo con la invención, el ARN que se va a introducir en una célula se obtiene por transcripción *in vitro* de un molde de ADN adecuado. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor de una ARN polimerasa. Los ejemplos particulares de ARN polimerasas son las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. Preferentemente la transcripción *in vitro* de acuerdo con la invención se controla mediante un promotor de T7 o SP6.

Un molde ADN para la transcripción *in vitro* se puede obtener mediante clonación de un ácido nucleico, particularmente ADNc, e introduciendo en un vector adecuado para la transcripción *in vitro*. El ADNc se puede obtener por transcripción inversa del ARN. El ADNc que contiene el molde de vector puede comprender vectores que portan diferentes insertos de ADNc que a continuación de la transcripción resultan en una población de diferentes moléculas de ARN opcionalmente capaces de expresar diferentes factores o pueden comprender vectores que portan sólo una especie de inserto de ADNc que a continuación de la transcripción solo resultan en una población de una especie de ARN capaz de expresar sólo un factor. Así, es posible producir ARN capaz de expresar solo un único factor o producir composiciones de diferentes ARNs tales como genotecas de ARN y ARN de células completas capaces de expresar más de un factor, por ejemplo, una composición de factores específicos de las células madre embrionarias. La presente invención prevé la introducción de todos tales ARN en células somáticas.

Particularmente, para obtener ARN de células completas o de una fracción de esta por transcripción *in vitro* se puede proceder como sigue: 1. El ARN se aísla de las células y el ARN se fracciona opcionalmente para seleccionar una subespecie específica de ARN para el procesamiento adicional. 2. El ARN así obtenido se transforma en ADNc, particularmente, mediante transcripción inversa. 3. El ADNc a continuación de una etapa de separación opcional para seleccionar una subespecie específica de ADNc para su procesamiento adicional se inserta en un vector adecuado para

la transcripción *in vitro*. 4. El vector que contiene el ADNc (opcionalmente a continuación de la linealización del vector) se somete a transcripción *in vitro*. La etapa opcional de fraccionamiento de ARN puede servir para separar ARN que contiene una secuencia poli-A a partir de ARN que no contiene dicha secuencia. Además, puede servir para separar el ARN de acuerdo con, por ejemplo, tamaño, patrones particulares de expresión etc. Por ejemplo, si las células indiferenciadas, particularmente las células madre tales como las células madre embrionarias se usan para aislar el ARN es posible seleccionar ARN para el procesamiento adicional que se expresa específicamente en dichas células, pero no, por ejemplo, en células diferenciadas. Un fraccionamiento similar de ADNc es posible en la etapa 3.

El ARN usado de acuerdo con la presente invención puede tener una composición conocida (en esta modalidad se conoce preferentemente que factores se expresan por el ARN) o la composición de la ARN puede ser parcialmente o totalmente desconocido. Alternativamente, el ARN usado de acuerdo con la presente invención puede tener una función conocida o la función del ARN pueden ser parcial o totalmente desconocida.

La presente descripción se refiere además a un método para tamizar los factores que, en la introducción en una célula somática, ya sea solo o en combinación con otros factores, son capaces de inducir, potenciar o inhibir la reprogramación de una célula somática diferenciada de animal a una célula que tiene características de célula madre tales como la pluripotencia. Este método puede comprender además la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARN que causa el efecto observado en la célula somática diferenciada de animal.

De acuerdo con la invención, el término "ARN capaz de expresar" con respecto a un factor particular significa que el ARN, si está presente en el medio ambiente adecuado, preferentemente dentro de una célula, se puede expresar para producir dicho factor. Preferentemente, el ARN de acuerdo con la invención es capaz de interactuar con la maquinaria de traducción celular para proporcionar el factor que es capaz de expresar.

El ARN capaz de expresar un factor particular de acuerdo con la presente invención incluye ARN de origen natural capaz de expresar dicho factor y cualquier ARN de origen no natural capaz de expresar dicho factor, por ejemplo, formas modificadas o variantes de ARN de origen natural capaz de expresar dicho factor. Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, la secuencia de ARN se puede modificar sin alterar la secuencia del factor expresado. Además, el ARN se puede modificar para alterar su nivel de estabilidad y expresión.

El término "ARN capaz de expresar" con respecto a un factor particular incluye las composiciones que contienen sólo ARN que codifica el factor y las composiciones que comprenden ARN que codifica el factor pero además otros ARN, particularmente ARN que codifica diferentes proteínas/péptidos. Así, el término "ARN capaz de expresar" con respecto a un factor particular puede incluir además ARN de célula completa o de una fracción de esta.

Si de acuerdo con la invención se hace referencia al ARN que expresa más de un factor, el ARN puede comprender diferentes moléculas de ARN que expresan más de uno de estos factores diferentes. Sin embargo, la presente invención incluye además situaciones en donde una molécula de ARN expresa diferentes factores, opcionalmente enlazados a través de uno al otro.

De acuerdo con la invención, la estabilidad y la eficiencia de la traducción del ARN introducido en una célula se puede modificar según se requiera. Por ejemplo, el ARN se puede estabilizar y su traducción aumentar por una o más modificaciones que tienen unos efectos estabilizantes y/o que aumentan la eficiencia traducción del ARN. Tales modificaciones se describen, por ejemplo, en PCT/EP2006/009448 incorporada en la presente como referencia.

Por ejemplo, el ARN que tiene una secuencia poli-A desenmascarada se traduce de manera más eficiente que el ARN que tiene una secuencia poli-A enmascarada. El término "secuencia poli-A" se refiere a una secuencia de residuos adenil (A) que típicamente se encuentran en el extremo 3' de una molécula de ARN y "secuencia poli-A desenmascarada" significa que la secuencia poli A en el extremo 3' de una molécula de ARN termina con una A de la secuencia poli A y no es seguida por nucleótidos distintos de A situado en el extremo 3', es decir, corriente abajo, de la secuencia poli-A. Además, una larga secuencia poli-A de aproximadamente 120 pares de bases resulta en una estabilidad de transcrito y eficiencia de la traducción óptima de ARN.

Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o expresión del ARN usado de acuerdo con la presente invención, se puede modificar para estar presente junto con una secuencia poli A, que tiene preferentemente una longitud de 10 a 500, con mayor preferencia 30 a 300, aún con mayor preferencia 65 a 200 y especialmente 100 a 150 residuos de adenosina. En una modalidad especialmente preferida, la secuencia poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Para aumentar además la estabilidad y/o expresión del ARN usado de acuerdo con la invención, se puede desenmascarar la secuencia poli A.

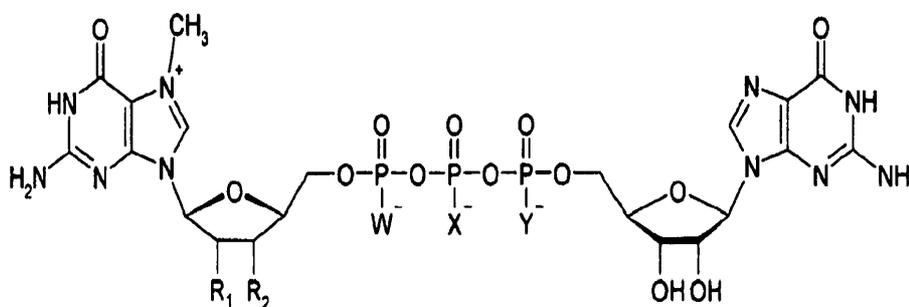
Adicionalmente, la incorporación de una región 3' no-traducida (UTR) en la región 3' no traducida de una molécula de ARN puede resultar en una mejora en la eficiencia de la traducción. Un efecto sinérgico se puede lograr mediante la incorporación de dos o más de tales regiones 3' no traducidas. Las regiones 3' no traducidas pueden ser autólogas o

heterólogas al ARN en el que se introducen. En una modalidad particular, la región 3' no traducida se deriva del gen de la β -globina humana.

Una combinación de las modificaciones descritas anteriormente, es decir, la incorporación de una secuencia poli-A, desenmascaramiento de una secuencia poli A e incorporación de una o más regiones 3' no traducidas, tiene una influencia sinérgica en la estabilidad del ARN y aumento en la eficiencia de la traducción.

Para aumentar la expresión del ARN usado de acuerdo con la presente invención, se puede modificar dentro de la región codificante, es decir, la secuencia que codifica el factor expresado, preferentemente sin alterar la secuencia del factor expresado, de manera que aumente el contenido de GC para aumentar la estabilidad del ARNm y realizar una optimización de codón dependiente de la especie a partir de las que se derivan así las células, lo que mejora la traducción en las células.

En modalidades adicionales de la invención, el ARN que se introduce en una célula tiene, en su extremo 5', una estructura Cap o una secuencia reguladora, que promueve la traducción en la célula huésped. Preferentemente, el ARN se encapucha en su extremo 5' mediante una 7-metilguanósina opcionalmente modificada unida por un puente 5'-5' al primer nucleótido transcrito de la cadena de ARNm. Preferentemente, el extremo 5' del ARN incluye una estructura Cap que tiene la siguiente fórmula general:



en donde R_1 y R_2 son independientemente hidroxilo o metoxi y W , X y Y son independientemente oxígeno o azufre. En una modalidad preferida, R_1 y R_2 son hidroxilo y W , X y Y son oxígeno. En una modalidad preferida adicional, uno de R_1 y R_2 , preferentemente R_1 es hidroxilo y el otro es metoxi y W , X y Y son oxígeno. En una modalidad preferida adicional, R_1 y R_2 son hidroxilo y uno de W , X y Y , preferentemente X es azufre mientras que los otros son oxígeno. En una modalidad preferida adicional, uno de R_1 y R_2 , preferentemente R_2 es hidroxilo y el otro es metoxi y uno de W , X y Y , preferentemente X es azufre mientras que los otros son oxígeno.

En la fórmula anterior, el nucleótido en el lado derecho se conecta a la cadena de ARN a través de su grupo 3'. Las modalidades preferidas de la estructura Cap 5' se muestran además en la Figura 4A.

Esas estructuras Cap en donde al menos uno de W , X e Y es azufre, es decir, que tienen una porción de fosforotioato, existen en diferentes formas diastereoisómeras todas las que se abarcan en la presente descripción. Además, la presente invención abarca todos los tautómeros y estereoisómeros de la fórmula anterior.

Por ejemplo, la estructura Cap que tiene la estructura anterior en donde R_1 es metoxi, R_2 es hidroxilo, X es azufre y W e Y son oxígeno existe en dos formas diastereoisómeras (R_p y S_p). Éstas se pueden resolver mediante HPLC de fase inversa y se denominan D1 y D2 de acuerdo con su orden de elución de la columna de HPLC de fase inversa. De acuerdo con la invención, se prefiere particularmente el isómero D1 de $m_2^{7,2'-O}Gpp_s pG$.

Por supuesto, si de acuerdo con la presente invención se desea disminuir la estabilidad y/o eficiencia de traducción del ARN, es posible modificar el ARN para interferir con la función de elementos como se describió anteriormente aumentando la estabilidad y/o la eficiencia de traducción de ARN.

De acuerdo con la presente invención, cualquier técnica útil para transferir ARN en células se pueden usar para introducir ARN en las células. Preferentemente, el ARN se transfecta en las células mediante técnicas estándar. Tales técnicas incluyen la electroporación, lipofección y microinyección. En una modalidad particularmente preferida de la presente invención, el ARN se introduce en las células por electroporación.

La electroporación o electropermeabilización se refiere a un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la

permeabilidad de la membrana plasmática de la célula causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Se usa por lo general en la biología molecular como una forma de introducir una sustancia en una célula.

5 La electroporación se hace por lo general con electroporadores, aparatos que crean un campo electromagnético en la solución celular. La suspensión celular se pipetea en una cubeta de vidrio o plástico que tiene dos electrodos de aluminio en sus lados.

10 Para la electroporación, se usa típicamente una suspensión celular de alrededor de 250 microlitros. Antes de la electroporación se mezcla con el ácido nucleico que se transforma. La mezcla se pipetea en la cubeta, el voltaje y la capacitancia se establece y la cubeta se inserta en el electroporador. Preferentemente, se añade medio líquido inmediatamente después de la electroporación (en la cubeta o en un tubo eppendorf), y el tubo se incubaba a la temperatura óptima de las células durante una hora o más para permitir la recuperación de la células y opcionalmente la expresión de resistencia a los antibióticos.

15 Preferentemente de acuerdo con la invención se usa para la electroporación un voltaje de 200 a 300 V, preferentemente 230 a 270 V, con mayor preferencia alrededor de 250 V y una capacitancia de 200 a 600 μF , preferentemente 250 a 500 μF , con mayor preferencia 300 a 500 μF .

20 De acuerdo con la invención se prefiere que la introducción de ARN capaz de expresar ciertos factores como se describe en la presente en células somáticas resulta en la expresión de dichos factores durante un período de tiempo para completar el proceso de reprogramación y en el desarrollo de las células que tienen características de célula madre. Preferentemente, la introducción de ARN capaz de la expresión de ciertos factores como se describe en la presente en células somáticas resulta en la expresión de dichos factores durante un período de tiempo extendido, preferentemente durante al menos 10 días, preferentemente durante al menos 11 días y con mayor preferencia durante al menos 12 días. Para lograr tal expresión a largo plazo, el ARN se introduce preferentemente periódicamente en las células más de una vez, preferentemente usando electroporación. Preferentemente, el ARN se introduce en las células al menos dos veces, con mayor preferencia al menos 3 veces, con mayor preferencia al menos 4 veces, aún con mayor preferencia al menos 5 veces hasta preferentemente 6 veces, con mayor preferencia hasta 7 veces o aun hasta 8, 9 o 10 veces, preferentemente durante un período de tiempo de al menos 10 días, preferentemente durante al menos 11 días y con mayor preferencia durante al menos 12 días para asegurar la expresión de uno o más factores durante un período de tiempo extendido. Preferentemente, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN son de 24 horas a 120 horas, preferentemente 48 horas a 96 horas En una modalidad, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN no son más de 72 horas, preferentemente no más de 48 horas o 36 horas. En una modalidad, antes de la siguiente electroporación, las células se les permite recuperar de la electroporación anterior. En esta modalidad, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN son al menos 72 horas, preferentemente al menos 96 horas, con mayor preferencia al menos 120 horas. En cualquier caso, las condiciones se deben seleccionar de manera que los factores se expresan en las células en cantidades y durante períodos de tiempo que apoyan el proceso de reprogramación.

40 Preferentemente se usa al menos 1 μg , preferentemente al menos 1.25 μg , con mayor preferencia al menos 1.5 μg y preferentemente hasta 20 μg , con mayor preferencia hasta 15 μg , con mayor preferencia hasta 10 μg , con mayor preferencia hasta 5 μg , preferentemente 1 a 10 μg , aún con mayor preferencia 1 a 5 μg , o 1 a 2.5 μg de ARN para cada factor por electroporación.

45 Preferentemente, para permitir el desarrollo de las células que tienen características de célula madre, las células se cultivan en presencia de uno o más inhibidores de ADN metiltransferasa y/o uno o más inhibidores de histona desacetilasa. Los compuestos preferidos se seleccionan del grupo que consiste de 5'-azacitidina (5'-azaC), ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), dexametasona, tricostatina A (TSA) y ácido valproico (VPA). Preferentemente, las células se cultivan en presencia de ácido valproico (VPA), preferentemente en una concentración de entre 0.5 y 10 mM, con mayor preferencia entre 1 y 5 mM, con la máxima preferencia en una concentración de aproximadamente 2 mM.

50 En una modalidad preferida de la presente invención, el ARN se introduce en las células somáticas por electroporaciones repetidas. Preferentemente, si ocurre una pérdida de viabilidad de las células, se añaden células previamente no electroporadas como células portadoras. Preferentemente, las células previamente no electroporadas se añaden antes de, durante o después de una o más de la 4^{ta} y posteriores, preferentemente, la 5^{ta} y posteriores electroporaciones, tales como antes de, durante o después de la 4^{ta} y 6^{ta} electroporación. Preferentemente, se añaden células previamente no electroporadas antes, durante o después de la 4^{ta} o 5^{ta} y cada electroporación posterior. Preferentemente, las células previamente no electroporadas son las mismas células que aquellas en las que se introduce el ARN.

60 Preferentemente, la introducción de ARN capaz de expresar uno o más factores en una célula causa la expresión de uno o más factores en la célula.

El término "transfección de ARN" se refiere de acuerdo con la invención a la introducción de uno o más ácidos nucleicos en una célula. De acuerdo con la presente invención, la célula puede ser una célula aislada o puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo.

5

El término "factor" de acuerdo con la invención cuando se usa junto con la expresión de este por el ARN incluye proteínas y péptidos, así como derivados y variantes de estos. Por ejemplo, el término "factor" comprende OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC.

10

Los factores pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitarse a primates humanos y no humanos. Los primates incluyen, pero sin limitarse a humanos, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus, y cualquier otros monos del Nuevo o Antiguo Mundo. Los roedores incluyen, pero sin limitarse a ratón, rata, conejillo de indias, hámster y gerbo.

15

OCT4 es un factor de transcripción de los factores de transcripción POU eucariótico y un indicador de la pluripotencia de las células madre embrionarias. Es una proteína de unión al octámero sustancialmente expresada. Se ha observado que está presente en ovocitos, la masa celular interna de blastocitos y además en la célula germinal primordial. El gen *POU5F1* codifica la proteína OCT4. Los sinónimos al nombre del gen incluyen *OCT3*, *OCT4*, *OTF3* y *MGC22487*. La presencia de OCT4 en concentraciones específicas es necesario para permanecer indiferenciadas las células madre embrionarias.

20

Preferentemente, la "proteína OCT4" o simplemente "OCT4" se refiere a OCT4 humana y preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de OCT4 como se describió anteriormente sería equivalente a ARNm de OCT4, y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar OCT4.

25

Sox2 es un miembro de la familia de genes Sox (caja HMG relacionada con SRY) que codifica factores de transcripción con un único dominio de unión al ADN HMG. Se ha encontrado que SOX2 controla las células progenitoras neurales mediante la inhibición de su capacidad para diferenciarse. La represión del factor resulta en la delaminación de la zona ventricular, que es seguido por una salida del ciclo celular. Estas células comienzan además a perder su carácter progenitor a través de la pérdida de los marcadores de diferenciación neuronal temprano y del progenitor.

30

Preferentemente, la "proteína SOX2" o simplemente "SOX2" se refiere a SOX2 humana y preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 4. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de SOX2 como se describió anteriormente sería equivalente a ARNm de SOX2, y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar SOX2.

35

NANOG es un gen homeodominio de tipo NK-2, y se ha propuesto que juega un papel clave al mantener la pluripotencia de la célula madre, presumiblemente, mediante la regulación de la expresión de genes críticos para la renovación y diferenciación de la célula madre embrionarias. NANOG se comporta como un activador de la transcripción con dos dominios de activación inusualmente fuertes incrustados en su C terminal. La reducción de la expresión de NANOG induce la diferenciación de las células madre embrionarias. Preferentemente, la "proteína NANOG" o simplemente "NANOG" se refiere a NANOG humana y preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 5 preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 6. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de NANOG como se describió anteriormente sería equivalente a ARNm de NANOG, y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar NANOG.

45

50

Lin28 es una proteína citoplasmática conservada con una pareja inusual de motivos de unión al ARN: un dominio de choque frío y un par de dedos de zinc de tipo CCHC retroviral. En los mamíferos, es abundante en diversos tipos de células indiferenciadas. En las células de mamíferos pluripotentes, LIN28 se observa en los complejos sensibles a Ribonucleasa con proteína de unión a Poli (A), y en las fracciones polisomal de gradientes de sacarosa, lo que sugiere que se asocia con ARNm de traducción.

55

Preferentemente, la "proteína LIN28" o simplemente "LIN28" se refiere a LIN28 humana y preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 7 preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 8. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de LIN28 como se describió anteriormente sería equivalente a ARNm de LIN28, y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar LIN28.

60

El factor de tipo Krueppel (KLF4) es un factor de transcripción con dedo de zinc, que se expresa fuertemente en las

células epiteliales postmitóticas de diferentes tejidos, por ejemplo, el colon, el estómago y la piel. KLF4 es esencial para la diferenciación terminal de estas células y se implica en la regulación del ciclo celular.

5 Preferentemente, la "proteína KLF4" o simplemente "KLF4" se refiere a KLF4 humana y preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 9 preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 10. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de KLF4 como se describió anteriormente sería equivalente a ARNm de KLF4, y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar KLF4.

10 MYC (cMYC) es un protooncogén, que se sobreexpresa en una amplia variedad de cánceres humanos. Cuando se muta específicamente, o sobreexpresa, aumenta la proliferación celular y funciona como un oncogén. El gen MYC codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de 15% de todos los genes a través de la unión de secuencias Caja Potenciadoras (E-cajas) y que reclutan histonas acetiltransferasas (HAT). MYC pertenece a la familia MYC de factores de transcripción, que incluye además los genes N-MYC y L-MYC. Los factores de transcripción de la familia MYC contienen el dominio bHLH/LZ (cremallera de leucina básica de Hélice-bucle-hélice)

15 Preferentemente, "proteína cMYC" o simplemente "cMYC" se refiere a cMYC humana y preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 11, preferentemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 12. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de cMYC como se describió anteriormente sería equivalente a ARNm de cMYC y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar cMYC.

20 Una referencia en la presente descripción a factores específicos, tales como OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 o c-MYC o a secuencias específicas de estas debe entenderse de manera que incluya además todas las variantes de estos factores específicos o las secuencias específicas de estas como se describe en la presente. Particularmente, debe ser entendido de manera que incluya además todas las variantes de empalme, variantes modificadas después de la traducción, conformaciones, isoformas y homólogos de especies de estos factores/secuencias específicas que se expresan de forma natural por las células.

25 De acuerdo con la presente invención, el término "péptido" comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a las sustancias que comprenden dos o más, preferentemente 3 o más, preferentemente 4 o más, preferentemente 6 o más, preferentemente 8 o más, preferentemente 10 o más, preferentemente 13 o más, preferentemente 16 o más, preferentemente 21 o más y hasta preferentemente 8, 10, 20, 30, 40 o 50, particularmente 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferentemente a los péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero generalmente los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y pueden usarse indistintamente en la presente descripción.

30 Las proteínas y péptidos descritos de acuerdo con la invención se pueden aislar a partir de muestras biológicas tales como homogenatos de tejido y célula y se pueden expresar por vía recombinante en una multiplicidad de sistemas de expresión pro- o eucariótico.

35 Para los propósitos de la presente invención, "variantes" de una proteína o péptido o de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

40 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxi-terminal y además inserciones del único o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácido en particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio en particular de una secuencia de aminoácido, aunque es posible también la inserción aleatoria con tamizaje adecuado del producto resultante.

45 Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia.

50 Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por al menos un residuo en la secuencia que se elimina y otro residuo que se inserta en su lugar. La preferencia está dada en las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o en el reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares.

55 "Las sustituciones conservativas" pueden realizarse, por ejemplo, sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo: (a) los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; (b) los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y

5 glutamina; (c) los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y (d) los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones típicamente pueden realizarse dentro de los grupos (a)-(d). Adicionalmente, glicina y prolina se pueden sustituir una por otra basado en su capacidad de alterar α -hélices. Algunas sustituciones preferidas se pueden realizar entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L y I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto puede construir fácilmente los ADN que codifican las variantes de aminoácidos conservadoras.

10 Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente de identidad entre una secuencia de aminoácidos específica descrita en la presente descripción y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos específica será al menos 70%, preferentemente al menos 80%, preferentemente al menos 85%, aún con mayor preferencia al menos 90% o con la máxima preferencia al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o de identidad se da preferentemente para una región de al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 200 o 250 aminoácidos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia.

20 Las variantes de aminoácidos descritas anteriormente pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas tales como, por ejemplo, por síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964) y métodos similares o por manipulación de ADN recombinante. La manipulación de las secuencias de ADN para la preparación de proteínas y péptidos que tienen sustituciones, inserciones o deleciones, se describe en detalle en Sambrook y otros (1989), por ejemplo.

25 De acuerdo con la invención, las "variantes" de proteínas y péptidos comprenden además sustituciones únicas o múltiples, deleciones y/o adiciones de cualquiera de las moléculas asociadas con la proteína o péptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. El término "variantes" se extiende además a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos.

30 De acuerdo con la invención, una variante de una proteína o péptido tiene preferentemente una propiedad funcional de la proteína o péptido a partir del cual se derivó. Tales propiedades funcionales se describen anteriormente para OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC, respectivamente. Preferentemente, una variante de una proteína o péptido tiene la misma propiedad en la reprogramación de una célula diferenciada de los animales como la proteína o péptido a partir del cual se derivó. Preferentemente, la variante induce o mejora la reprogramación de una célula animal diferenciada.

35 Los métodos de la presente invención se pueden usar para efectuar la desdiferenciación de cualquier tipo de célula somática. Las células que pueden usarse incluyen células que pueden ser desdiferenciadas o reprogramadas por los métodos de la presente invención, particularmente células que están total o parcialmente diferenciadas, con mayor preferencia completamente diferenciadas. Preferentemente, la célula somática es una célula diploide derivada de organismos multi-celulares pre-embrionarios, embrionarios, fetales y postnatales. Los ejemplos de células, que se pueden usar incluyen pero no se limitan a fibroblastos, tales como fibroblastos fetales y neonatales o fibroblastos adultos, queratinocitos, particularmente queratinocitos primarios, con mayor preferencia queratinocitos derivados de pelo, células B, células T, células dendríticas, células adiposas, células epiteliales, células epidérmicas, condrocitos, células del cúmulo, células neuronales, células gliales, astrocitos, células cardíacas, células esofágicas, células musculares, células hematopoyéticas, melanocitos, osteocitos, macrófagos, monocitos y células mononucleares.

40 Las células con las que los métodos de la invención se pueden usar pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Los ejemplos de células de mamífero que pueden ser desdiferenciadas y re-diferenciadas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a células de primates humanos y no humanos. Las células de primates con la que la invención se puede realizar incluyen pero no se limitan a las células de seres humanos, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus, y cualquiera de los otros monos del nuevo o viejo mundo. Las células de roedores con la que la invención se puede realizar incluyen, pero no se limitan a células de ratón, rata, conejillo de indias, hámster y jerbo.

55 El término "organismo" de acuerdo con la invención se refiere a cualquier unidad biológica que es capaz de multiplicar o transmitir el material genético y comprende las plantas y animales, y microorganismos tales como bacteria, levaduras, hongos y virus. El término "organismo" incluye pero no se limita a un ser humano, un primate no humano u otro animal, particularmente un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor tal como un ratón y rata. En una modalidad particularmente preferida, el organismo es un ser humano.

60 Las células desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente invención se espera que muestre muchos de los mismos requisitos que las células madre pluripotentes y se puede ampliar y mantener bajo condiciones usadas para las células madre embrionarias, por ejemplo, el medio celular ES o cualquier medio que apoye el crecimiento de las células

embrionarias. Las células madre embrionarias conservan su pluripotencia in vitro cuando se mantienen en fibroblastos fetales inactivados tales como fibroblastos embrionarios de ratón irradiados o fibroblastos humanos (por ejemplo, fibroblastos de prepucio humano, fibroblastos de piel humana, fibroblastos endometrial humano, fibroblastos oviductal humano) en cultivo. En una modalidad, las células alimentadoras humanas pueden ser células alimentadoras autólogas derivadas del mismo cultivo de células reprogramadas por diferenciación directa.

Además, las células madre embrionarias humanas pueden propagarse con éxito sobre Matrigel en un medio condicionado con fibroblastos de ratón fetal. Las células madre humanas pueden crecer en cultivo durante un período de tiempo prolongado y permanecer indiferenciadas en condiciones de cultivo específicas.

En ciertas modalidades, las condiciones de cultivo celular pueden incluir poner en contacto las células con factores que pueden inhibir la diferenciación o de cualquier otra forma potenciar la desdiferenciación de las células, por ejemplo, prevenir la diferenciación de células en células no-ES, trofoectodermo u otros tipos de células. Las células desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente invención se pueden evaluar por métodos que incluyen supervisar los cambios en el fenotipo de células y caracterizar su expresión génica y proteica. La expresión génica se puede determinar mediante RT-PCR, y los productos de traducción se pueden determinar por inmunocitoquímica e inmunoelectrotransferencia. Particularmente, las células desdiferenciadas pueden caracterizarse para determinar el patrón de expresión génica y de este modo usando técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo transcriptómica las células reprogramadas muestran un patrón de expresión génica esperado similar al patrón de expresión de las células de control pluripotentes indiferenciadas, tales como células madre embrionarias.

La expresión de los siguientes genes de células desdiferenciadas se puede evaluar a este respecto: OCT4, NANOG, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen específico de la célula embrionaria 1 (ESG1), asociado al desarrollo pluripotencial 2 (DPPA2), DPPA4, telomerasa transcriptasa inversa (TERT), antígeno embrionario 3 (SSEA-3), SSEA-4, antígeno asociado a tumor-1-60 (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E

Las células madre embrionarias o indiferenciadas con las que pueden compararse las células reprogramadas pueden ser de la misma especie que las células somáticas diferenciadas. Alternativamente, las células madre indiferenciadas o embrionarias con las que pueden compararse las células reprogramadas pueden ser de una especie diferente como las células somáticas diferenciadas.

En algunas modalidades, existe una similitud en el patrón de expresión génica entre una célula reprogramada y una célula indiferenciada, por ejemplo, célula madre embrionaria, si ciertos genes expresados específicamente en una célula indiferenciada se expresan además en la célula reprogramada. Por ejemplo, ciertos genes, por ejemplo, telomerasa, que son típicamente indetectables en las células somáticas diferenciadas se pueden usar para controlar la extensión de la reprogramación. Del mismo modo, para ciertos genes, la ausencia de expresión se puede usar para evaluar la extensión de la reprogramación.

La capacidad de auto-renovación, marcada por la inducción de la actividad de la telomerasa, es otra de las características de las células madre que pueden supervisarse en las células desdiferenciadas.

El análisis del cariotipo se puede realizar por medio de las extensiones del cromosoma a partir de las células mitóticas, cariotipado espectral, ensayos de la longitud del telómero, hibridación genómica total, u otras técnicas bien conocidas en la técnica.

Usando la presente invención, el ARN que codifica los factores apropiados se incorpora en una o mas células somáticas, por ejemplo, por electroporación. Después de la incorporación, las células se cultivan preferentemente usando condiciones que apoyan el mantenimiento de las células desdiferenciadas (es decir, condiciones de cultivo de la célula madre). Las células desdiferenciadas pueden expandirse después e inducir que se re-diferencien en diferentes tipos de células somáticas que se necesitan para la terapia celular. Las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden inducir a diferenciarse in vitro o in vivo en uno o más tipos de células somáticas deseadas.

Preferentemente, las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente invención pueden dar lugar a células de cualquiera de las tres capas germinales embrionarias, es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo. Por ejemplo, las células desdiferenciadas pueden diferenciarse en músculo esquelético, esqueleto, dermis de la piel, tejido conectivo, sistema urogenital, corazón, sangre (células linfáticas), y bazo (mesodermo); estómago, colon, hígado, páncreas, vejiga urinaria; revestimiento de la uretra, partes epiteliales de la tráquea, pulmones, faringe, tiroides, paratiroidea, intestino (endodermo); o del sistema nervioso central, retina y cristalino, cráneo y sensorial, ganglios y nervios, células de pigmento, tejido conectivo de la cabeza, epidermis, pelo, glándulas mamarias (ectodermo). Las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente invención pueden ser re-diferenciadas in vitro o in vivo usando procedimientos conocidos en la técnica.

5 Las células reprogramadas resultantes de los métodos de la invención se usan para producir la progenie diferenciada. Así, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir células diferenciadas, que comprende (i) obtener células reprogramadas usando los métodos de esta invención; e (ii) inducir la diferenciación de las células reprogramadas para producir células diferenciadas. La etapa (ii) se puede realizar in vivo o in vitro. Además, la diferenciación se puede inducir a través de la presencia de factores de diferenciación apropiados, que pueden o bien añadirse o están presentes in situ, por ejemplo, en un cuerpo, un órgano o tejido en el que se introdujeron las células reprogramadas. Las células diferenciadas se pueden usar para derivar las células, tejidos y/u órganos que se usan ventajosamente en el área de célula, tejido y/o trasplante de órgano. Si se desea, las modificaciones genéticas se pueden introducir, por ejemplo, en células somáticas antes de la reprogramación. Las células diferenciadas de la presente invención preferentemente no poseen la pluripotencia de una célula madre embrionaria, o una célula germinal embrionaria, y son, en esencia, células específicas de tejido parcial o totalmente diferenciadas.

15 Una ventaja de los métodos de la presente invención es que las células reprogramadas obtenidas en la presente invención se pueden diferenciar sin previa selección o purificación o establecimiento de una línea celular. Como consecuencia, una población heterogénea de células que comprenden células reprogramadas se diferencian en un tipo celular deseado. En una modalidad, una mezcla de células obtenidas a partir de los métodos de la presente invención se expone a uno o más factores de diferenciación y se cultiva in vitro.

20 Los métodos de diferenciación de las células reprogramadas obtenidas por los métodos descritos en la presente puede comprender una etapa de permeabilización de la célula reprogramada. Por ejemplo, las células generadas por las técnicas de reprogramación descritas en la presente, o alternativamente una mezcla heterogénea de células que comprenden células reprogramadas, pueden permeabilizarse antes de la exposición a uno o más factores de diferenciación o extracto celular u otra preparación que comprende factores de diferenciación.

25 Por ejemplo, las células diferenciadas pueden obtenerse mediante el cultivo de las células reprogramadas indiferenciadas en presencia de al menos un factor de diferenciación y seleccionarse de células diferenciadas a partir del cultivo. La selección de células diferenciadas puede basarse en el fenotipo, tal como la expresión de ciertos marcadores celulares presentes en las células diferenciadas, o mediante ensayos funcionales (por ejemplo, la capacidad de realizar uno o mas funciones de un tipo de célula diferenciada en particular).

30 Como se describe en el presente documento, las células reprogramadas de acuerdo con la presente invención se modifican genéticamente mediante la adición, eliminación o modificación de su(s) secuencia(s) de ADN.

35 Las células reprogramadas o desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente invención o células derivadas de las células reprogramadas o desdiferenciadas son útiles en la investigación y en terapia. Células pluripotentes reprogramadas se pueden diferenciar en cualquiera de las células en el cuerpo, que incluyen, sin limitarse a, células de la piel, cartílago, músculo esquelético óseo, músculo cardíaco, renales, hepáticas, sangre y formadoras de la sangre, precursoras vasculares y endotelial vascular, beta pancreáticas, neuronas, gliales, retinales, neuronales, intestinales, pulmonares, y hepáticas.

40 Las células reprogramadas son útiles para la terapia regenerativa/reparadora y se pueden trasplantar a un paciente que lo necesite. En una modalidad, las células son autólogas con el paciente.

45 Las células reprogramadas proporcionadas de acuerdo con la presente invención se pueden usar, por ejemplo, en las estrategias terapéuticas en el tratamiento de trastornos cardíacos, neurológicos, endocrinológicos, vasculares, retinales, dermatológicos, muscular-esqueléticos, y otras enfermedades.

50 Por ejemplo, y sin pretender ser una limitación, las células reprogramadas de la presente invención se pueden usar para reponer las células en animales cuyas células naturales se han agotado debido a la edad o la terapia de ablación tales como radioterapia y quimioterapia del cáncer. En otro ejemplo no-limitante las células reprogramadas de la presente invención son útiles en la regeneración de órganos y reparación tisular. Las células reprogramadas se pueden usar para revitalizar el tejido muscular dañado incluyendo los músculos distróficos y músculos dañados por eventos isquémicos, tales como infartos de miocardio. Las células reprogramadas descritas en la presente pueden usarse para mejorar la cicatrización en los animales, incluyendo los seres humanos, después de una lesión traumática o de la cirugía. Las células reprogramadas de la presente invención se administran sistémicamente, tal como por vía intravenosa, y migran al sitio del tejido recién traumatizado reclutadas por las citoquinas circulantes que se secretan por las células dañadas. En otra modalidad de la presente invención, las células reprogramadas se pueden administrar localmente a un sitio de tratamiento que lo necesita o en reparación o regeneración.

60 El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, particularmente un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor tal como un ratón y rata. En una modalidad particularmente preferida, el paciente es un ser humano.

Los términos " un" y " una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra forma en la presente descripción o claramente sea contradicho por el contexto. La mención de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir meramente como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique de cualquier otra forma en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si se mencionara individualmente en la presente descripción. A menos que se indique de cualquier otra forma en la presente o se contradiga claramente por el contexto, todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado. El uso de alguno y todos los ejemplos, o del lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente pretenden meramente ilustrar mejor la invención y de cualquier otra forma no constituyen una limitación en el alcance de la invención reivindicada. De ninguna manera el lenguaje en la descripción se debería interpretar como indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para llevar a la práctica la invención.

La presente invención se describe en detalle más abajo mediante las figuras y ejemplos, que se usan solamente para fines de ilustración y no pretenden ser limitantes.

Figuras

Fig. 1: Determinación de la influencia del tiempo en la cantidad de transcrito y proteína después de la transfección de las células 786-0 con 20 µg de ARN IVT eGFP (transcrito *in vitro*) y ARN IVT 2dGFP, respectivamente. Determinación de la intensidad de fluorescencia promedio de eGFP mediante FACS-Kalibur.

Fig. 2: Transferencia de dispersión de todos los genes para determinar la similitud de los duplicados. Comparación de los duplicados de las células transfectadas con SYT-SSX2 o eGFP. Representación de las réplicas después de 24h.

Fig. 3: Representación de los genes regulados por SYT-SSX2.

a. Transferencia de dispersión de todos los genes analizados. Comparación de las células transfectadas con SYT-SSX2 con las células transfectadas con eGFP seguido la transfección de cada 15 µg de ARN IVT. Representación de las réplicas después de 24h. El amarillo-naranja muestra la expresión diferencial en la región no significativa, es decir, por debajo de un factor de dos, rojo y verde muestran regulación positiva y negativa, respectivamente, en un factor mayor que dos.

b. Representación del número de genes que se regulan significativamente después de 8 h y 24 h, respectivamente, mediante la transfección de 15µg de ARN IVT del gen respectivo.

Fig. 4: Presentación general de las diferentes estructuras 5'-CAP

(A) En la imagen están la estructura 5'-CAP natural del ARNm y versiones químicas modificadas de este 5'-CAP (ARCA, D1 y D2 - D1 y D2 se refieren a los dos diastereoisómeros producidos por la porción de fosforotioato), que se muestran para estabilizar el ARNm.

(B) Esquema general de la síntesis *in vitro* del ARNm (ARN-IVT) traducido.

Fig. 5: Electroporación de fibroblastos humanos (CCD1079Sk) y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Fibroblastos CCD1079Sk y MEFs se electroporaron una vez con 10 µg de ARN-IVT que codifica eGFP. El voltaje y capacidad se escogieron como indicado. 24 h después de la electroporación las eficiencias de transfección [%] se midieron mediante FACS, dándose en paréntesis los niveles de fluorescencia medio.

Fig. 6: Optimización de la estructura cap del ARN IVT

Los fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron (250V, 300µF) ya sea con el ARN-IVT de ARCA-luc (que codifica la luciferasa (luc) con ARCA-5'-CAP), D1-luc o D2-luc (10 µg cada). Después de 2h, 4h, 8h, 24h, 48h, y 72h los ensayos de luciferasa se realizaron por duplicado. Los datos se expresan como actividad luciferasa media ±SD.

Fig. 7: Persistencia del ARN-IVT electroporado en fibroblastos humanos

Los fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron una vez con 15 µg de ARN-IVT de cada factor de transcripción. Los niveles intracelulares de ARN-IVT de los constructos se cuantificaron 7 días después de la electroporación por qRT-PCR.

Fig. 8: Expresión de los factores de transcripción humano y murino después de la electroporación de constructos ARN-IVT.

(A) MEFs y (B) fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron una vez con 10 µg o 2,5 µg respectivamente del ARN-IVT que codifica los cuatro factores de la transcripción (TFs) OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC (OSKM). Las células se lisaron post electroporación en los intervalos de tiempo indicados. La expresión de la proteína se supervisó por inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos específicos. Células 293T electroporadas con 15 µg de ARN-IVT que codifica OSKM se usaron como control positivo.

Fig. 9: Tinción de fosfatasa alcalina de fibroblastos CCD1079Sk humanos electroporados

(A) Fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron una vez ya sea con ARN-IVT que codifica los cuatro TFs OSKM o con tampón (simulador) y cultivaron en medio celular ES humano.
(B) Después de 10 días las células se tiñeron para fosfatasa alcalina (AP) y la fluorescencia roja resultante se supervisó mediante FACS.

Fig. 10: Tinción de fosfatasa alcalina de fibroblastos CCD1079Sk humanos electroporados

(A) Células CCD1079Sk se electroporaron tres veces consecutivas en intervalos de 48h con el ARN-IVT que codifica ya sea GFP (simulador) o los cuatro TFs OSKM (2.5 o 1.25µg cada). Las células transfectadas con OSKM o el simulador se cultivaron en medio iPS.
(B) Después de 168h las células se tiñeron para fosfatasa alcalina (AP) y se supervisaron por microscopía de fluorescencia.

Fig. 11: Tinción fosfatasa alcalina de MEFs electroporadas

(A) MEFs cultivadas hasta el pasaje 3 se electroporaron en intervalos de 48h con ARN-IVT ya sea GFP (simulador) o los cuatro TFs OSKM murino (5µg cada). OSKM o simuladores de MEFs transfectados se cultivaron en medio celular ES de ratón en la presencia o ausencia de ácido valproico 2 mM (VPA) como indicado.
(B) Después de 96h las células se tiñeron para fosfatasa alcalina (AP) y supervisaron por microscopía de fluorescencia.

Fig. 12: Expresión de genes marcadores-ES humano de células CCD1079Sk electroporadas.

(A) Fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron dos veces, ya sea con tampón (simulador) o con 15 µg de ARN-IVT que codifica los factores de transcripción OSKM y se cultivaron en medio celular ES humano en presencia o ausencia de VPA (0.5 o 1 mM) como indicado.
(B) Después de los intervalos de tiempo indicados, 10% de las células se eliminaron a partir de los cultivos antes de la posterior electroporación, el ARN total se aisló y la expresión del ARNm de los genes marcadores-ES humano OCT4 (endógeno), TERT y GDF3 se evaluó por PCR en tiempo real.

Fig. 13: Expresión genes marcadores-ES humano de células CCD1079Sk electroporadas

(A) Fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron dos veces, ya sea con 15µg o 5µg de ARN-IVT que codifica que codifica los factores de transcripción OSKM o con tampón (simulador) y cultivaron en un medio celular ES humano en presencia o ausencia de VPA 1 mM como indicado.
(B) Después de los intervalos de tiempo indicados, 10% de las células se eliminaron a partir de los cultivos antes de la posterior electroporación, el ARN total se aisló y la expresión del ARNm de los genes marcadores-ES humano OCT4 (endógeno), TERT, GDF3 y DPPA4 se cuantificó por qRT-PCR.

Fig. 14: Expresión de genes marcadores-ES murinos de MEFs electroporados

(A) MEFs se electroporaron seis veces consecutivas con 5 o 2.5µg de ARN-IVT que codifica ya sea GFP (simulador) o los cuatro factores de transcripción murino OSKM y se cultivaron en medio celular ES de ratón en presencia o ausencia de VPA 2 mM como indicado.
(B) Después de los intervalos de tiempo indicados, 10% de las células se eliminaron a partir de los cultivos antes de la posterior electroporación, el ARN total se aisló y la expresión del ARNm del gen marcador-ES murino mTert se evaluó mediante qRT-PCR.

Ejemplo 1: Producción del ARN IVT

La primera etapa en la producción del ARN IVT comprende la linealización de un plásmido que contiene la secuencia codificante de un factor particular y que tiene un promotor SP6 o el promotor T7 antes del codón de inicio, a partir de la cual es posible una transcripción *in vitro*. Para este fin, se usan enzimas de restricción, por ejemplo. Después de la linealización, la enzima se inactiva por precipitación con fenol-cloroformo y se elimina. Para esto, se añadió un isovolumen de una mezcla de fenol y cloroformo y mezcló bien.

Breve centrifugación a 10 000 xg proporciona una separación en una fase orgánica inferior y una fase acuosa superior, que contiene el ADN. Este último se transfiere a un nuevo recipiente de reacción. A continuación, la fase acuosa se mezcla con un isovolumen de cloroformo puro, para eliminar cualquiera de los residuos de fenol. Después de la centrifugación, la fase acuosa se elimina y precipita durante 2 horas adicionando dos isovolumenes de etanol y 10% de acetato de sodio 3M v/v pH 4.5 a -20°C.

El ADN se sedimenta por centrifugación durante 45 min a 10 000 xg a 4 ° C, lava con etanol al 70% para la eliminación de sales, y se obtiene en un volumen adecuado de agua libre de RNasa. La electroforesis en gel se usa para verificar que linealización fue exitosa y completa. La concentración del ADN se determina fotométricamente a 260nm. Para la determinación de la pureza del ADN, se mide adicionalmente la densidad óptica a 280 nm para obtener las relaciones de OD260/280.

10 µg de ADN linealizado se usa para la transcripción *in vitro*. Para esto, 40 µl de dNTPs, con 4/5 del dGTP proporcionado adicionalmente con una estructura Cap, 10 µl de tampón 10x, 20 µl de dTT y 10 µl de polimerasa T7 o SP6 se incubaron durante 2h a 37°C. Las polimerasas se unen a sus secuencias de reconocimiento T7 o SP6, que se ubican 5' de la ORF que se transcribe, y sintetizan la cadena de ARN complementaria.

El ARN IVT se purifica con el *MegaClear Kit*. Para esto, se obtiene en un concentrado de tampón de unión, que contiene las sales necesarias para la unión óptima del ARN a la membrana de sílice. La adición de etanol elimina el agua de la capa de hidratación del ARN. La mezcla se carga en una columna de sílice y centrifuga a 10 000 x g durante 2min. El ARN se une a la columna, mientras que las impurezas, por ejemplo, residuos de enzimas, se elimina lavando. Después de varias etapas de lavado, se eluye el ARN purificado. El tampón de elución se precalienta a 95°C para hacer la elución más eficiente

El control de calidad y cuantificación se realizan mediante electroforesis en gel y mediante fotometría.

Ejemplo 2: Electroporación de las células

El principio de la electroporación se basa en alterar el potencial transmembrana de las células con un breve pulso de corriente. La alteración del potencial transmembrana por un estímulo externo se describe por la siguiente ecuación:

$$\Delta V_m = fE_{ext}r \cos \phi$$

V_m es el potencial transmembrana y f es un factor de forma, que describe la influencia de la célula en la distribución del campo extracelular. fE_{ext} describe el campo eléctrico aplicado, r el radio de la célula y ϕ el ángulo en el campo eléctrico externamente aplicado. El factor f se da frecuentemente como 1.5, aunque depende de muchos otros factores. La electroporación de las células es exitosa si el campo eléctrico aplicado excede la capacidad de la membrana celular, es decir, ΔV_m es mayor que un valor umbral ΔV_s , dado como 1V (Kinosita, K., Jr. y Tsong, T.Y. (1977) *Nature* 268, 438-441). Ya que la construcción de la membrana celular como una bicapa es una característica que es común en las células eucariotas, este valor muestra poca variación para diferentes líneas celulares.

A través de la ruptura dieléctrica del potencial transmembrana, se forman poros hidrófilos transitoriamente, a través de los cuales el agua penetra dentro de la célula, por ejemplo, transportando moléculas por ejemplo ácidos nucleicos en las células (Weaver, J.C. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55, 3-28; Neumann, E. y otros (1999) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48, 3-16).

Antes de la electroporación, las células adherentes usadas se cultivan hasta semi-confluencia, se lavan con PBS y se desprenden de los frascos de cultivo de células con tripsina. Las células se transfirieren a un medio con 10% de FCS (suero de ternera fetal) y centrifugan durante 8min a 500 x g. El sedimento se resuspende en el medio libre de suero X-Vivo y centrifuga de nuevo durante 8 min a 500 x g. Esta operación de lavado se lleva a cabo dos veces más para eliminar los residuos de FCS, que pueden interferir con la electroporación subsiguiente.

Después del lavado, las células se ajustan en 250 µl a la densidad celular deseada, transfieren a las cubetas de electroporación y se colocan en hielo. Después de añadir la cantidad apropiada de ARN transcrito *in vitro* y agitando cuidadosamente, la electroporación se lleva a cabo a 200 V y 250µF. Después, las células se transfieren inmediatamente al medio nutriente adecuado para la incubación.

De acuerdo con la invención, fue posible transfectar líneas celulares con una eficiencia de hasta 90% o incluso más.

Además, se puede excluir la influencia del conteo de células en la eficiencia de transfección en un intervalo de células entre 2×10^6 y 2×10^7 . Las condiciones de electroporación no tienen además una influencia decisiva en la eficacia de transfección en el intervalo ensayado

Estabilidad del ARN se demostró en un período de 24 horas, mientras que la proteína se puede detectar en las células durante un período de 48-72 horas, dependiendo de su media vida.

Se puede demostrar que existe una dependencia directa entre la cantidad de ARN transfectada y la cantidad de proteína disponible.

Ejemplo 3: Estabilidad de las proteínas expresadas por ARN transfectado.

Se examina a continuación cómo las proteínas largas con diferentes tiempos de media vida pueden ser detectadas de forma estable en las células después de la transferencia del ARN IVT. Células 786-0 se transfectaron con 20 µg de ARN IVT eGFP y ARN IVT 2dGFP, respectivamente, y se midió la intensidad de fluorescencia en el transcurso de tiempo de 3 h a 120 h. La proteína eGFP tiene un tiempo de media vida de 16 horas, mientras que el tiempo de media vida de la variante desestabilizada de 2dGFP debido a la integración de una secuencia de aminoácidos de PEST que efectúa la degradación de proteínas se reduce a 2 h (Clontech, 1998). El experimento mostró que ya después de 4 h fue detectable una cantidad sustancial de proteína traducida que aumentó más aun hasta 24 h después de la transfección. La cantidad de proteína eGFP permanece relativamente constante durante más de 120 h. Aun el 2dGFP desestabilizado muestra la expresión de proteína estable durante 48 h (Fig. 1). Para inducir la expresión de la proteína de 2dGFP que es estable durante un largo período de tiempo el ARN puede transfectarse cada 48 h.

Ejemplo 4: Examen de los efectos debido a la metodología después de la electroporación del ARN

A continuación se examinan los efectos inespecíficos que se inducen mediante la electroporación e introducción del ARN de cadena simple dentro de las células. Estos efectos pueden superponer la diferenciación celular inducida por un producto génico específico transferido como ARN IVT. 2×10^7 de las células 786-0 se transfectaron con 20 µg de ARN IVT eGFP y se cultivaron durante otras 8 h, 24 h y 72 h. Una comparación con las células sin transfectar no mostró un cambio en el comportamiento del crecimiento ni mostró una apoptosis intensa. La porción de células vivas después de la transfección en cada caso fue aproximadamente 95%.

En una etapa adicional, el ARN se extrajo de las células y se usó para la preparación de sondas. Las sondas se hibridaron en un chip de matriz de microarreglo de ADNc con varios cientos de genes. Esto se siguió por una evaluación básica usando el programa ImaGene del software versión 4.1 (BioDiscovery, Los Angeles, California). Las impurezas de la matriz que eran visibles a simple vista se enmascararon manualmente. Después de la normalización con los genes de control que también se puntearon en la matriz, se obtuvieron los niveles relativos de expresión en comparación con la referencia. Se muestra en la Tabla 1 el número de genes significativamente regulados.

Tabla 1: Número de genes significativamente regulados en 2×10^7 células 786-0 que se transfectaron con 20 µg de ARN IVT eGFP en comparación con las células de control sin transfectar. Sólo una regulación de >2 y $<0,5$, respectivamente, se consideró un cambio significativo.

Factor de regulación	Número de genes regulados después de 8 h	Número de genes regulados después de 24 h	Número de genes regulados después de 72 h
>2	10 (0,87%)	0	0
$< 0,5$	48 (4,16%)	15 (1,3%)	0

El número de genes significativamente regulados fue moderado y disminuyó con el tiempo. 24 h después de la electroporación e introducción del ARN de simple cadena en las células, sólo 15 genes (1,3%) se expresan

diferencialmente aun. La regulación específica a eGFP de los genes se excluyó por medio de un análisis adicional de las células que se transfectaron usando ARN IVT irrelevante.. Como consecuencia, es baja la disfunción del transcriptoma de las células en términos de una regulación de genes inespecífica que es causada inherentemente por la metodología. La reprogramación de las células mediante la transfección con el ARN IVT se espera por lo tanto, que no se afecte con las dificultades inherentes a la metodología o sólo en una parte muy pequeña.

Ejemplo 5: Reprogramación de las células por medio de la introducción del ARN que codifica para factores de transcripción

Para examinar si la introducción de genes puede usarse para cambiar el programa celular, se analiza el efecto de la transfección de los factores de transcripción oncogénicos SYT-SSX1 y SYT-SSX2 que resulta de la translocación t(X; 18) (p11.2; q11.2) (Clark y otros, 1994; Crew y otros, 1995) y se detectan en más del 90% de los sarcomas sinoviales (Sreekantiah y otros, 1994). Los cambios moleculares causados por la transfección del ARN IVT SYT-SSX1 y SYT-SSX2 se analizaron mediante la matriz de microarreglos de oligonucleótidos *Affymetrix*. Los diferentes constructos se transfectaron cada uno por triplicado. La transfección con eGFP se realizó para examinar la eficacia de transfección en el microscopio de fluorescencia. Se determinó después de 8 h una eficacia de transfección de más de 95% (datos no mostrados). Las células se recogieron después de 8 h, 24 h y 72 h, respectivamente, y se extrajo el ARN. Para analizar los cambios moleculares en las células de los genes enumerados después de la transferencia de ARN usamos la matriz de microarreglos de oligonucleótidos *Affymetrix* que permite el examen simultáneo de los cambios en la expresión de 22,000 genes.

Para analizar las células transfectadas con SYT-SSX2 y eGFP, dos matrices de *genoma humano U133A* se hibridaron a las 8 h y 24 h en cada caso. SSX2 y SYT-SSX1 se examinaron en las determinaciones individuales a las 8 h y 24 h. La evaluación de los datos se realizó usando el software *Microarray Suite 5.0* así como el *ArrayAssist* (Fig. 2). El número de genes significativamente regulados en la comparación entre los duplicados fue cero. Esto resultó en una confianza suficiente con respecto a la reproducibilidad de los resultados de manera que también los resultados de los microarreglos de los transfectantes que sólo estuvieron representados por determinaciones individuales (SYT-SSX1 y SSX2) se podrían incluir en el análisis.

Para la determinación de los genes que son significativamente regulados por SYT-SSX2, se tomaron como base los valores de expresión de las células transfectadas con eGFP y el patrón de expresión de las células transfectadas con el ARN IVT SSX2, SYT-SSX1 y SYT-SSX2 se compararon a ellos (Fig. 3). La evaluación de los datos se realizó usando los programas *Microarray Suite 5.0* y *ArrayAssist*. La Fig. 3a demuestra ilustrativamente la expresión diferencial de genes por SYT-SSX2.

Para la evaluación, una regulación con al menos un factor de dos se tomó como una base que se corresponde con el intervalo de sensibilidad del sistema. Un valor de $p=5\%$ se consideró como criterio de significación. Bajo estas condiciones, 185 genes se pueden detectar en las células transfectadas SYT-SSX2 después de 8 h y 218 genes pueden detectarse después de 24 h. La porción de genes que se regulan después de 8h así como después de 24h es 41,3% (Fig. 3b).

Los genes regulados pueden ser asignados a diferentes grupos sobre la base de su función. Estos son, por ejemplo, factores de crecimiento, genes neuronales, genes asociados a tumores, colágenos, así como los que están implicados en los procesos de transducción de señales, adhesión celular, desarrollo celular y diferenciación celular, así como en la regulación del ciclo celular.

En este sentido, es notable que la porción de genes sobreexpresados es significativamente mayor que la porción de genes suprimidos. Los genes que están regulados por SYT-SSX1 son >95% idénticos a los que también se regulan por SYT-SSX2.

La expresión diferencial *in vivo* de los genes analizados se puede confirmar claramente en los sarcomas sinoviales. El aumento de la expresión de BMP-7 y EphA4 ya se describió en otros estudios (Nagayama y otros, 2002). La sobreexpresión en los sarcomas sinoviales fue detectable también para FGFR4, p57, BMP5 y PGF.

Los estudios muestran que la transferencia de factores de transcripción del RNA puede usarse con éxito para cambiar la diferenciación de las células.

Ejemplo 6: Reprogramación de las células por medio de la introducción del ARN que codifica para cócteles de factores de transcripción

El ARNm traducido in-vitro (ARN-IVT) que codifica el cóctel de TFs OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC (OSKM) o OCT4, SOX2, LIN28 y NANOG (OSLN) se electrotransfirió en el citoplasma de los fibroblastos humanos o murinos.

En un primer conjunto de experimentos, se optimizan los parámetros de electroporación usando ARN-IVT que codifica eGFP para fibroblastos de prepucio de recién nacido humano (CCD1079Sk) y fibroblastos embrionarios de ratón (MEF).

5 Como medida general para aumentar la estabilidad de los constructos de ARN-IVT y la traducción de la proteína, la secuencia de nucleótidos de los TFs se optimizó en codones para aumentar el contenido de GC y para mejorar la traducción en las células humanas o murinas. Dado que la eficacia de la expresión y la estabilidad del ARN-IVT depende principalmente de la estructura 5'-CAP, se evaluó el efecto de tres estructuras 5'-Cap diferentes (Fig. 4) que están bien establecidas en nuestro laboratorio sobre la expresión de la luciferasa en las células CCD1079Sk.

10 Se encontró que la eficiencia de la electroporación es consistentemente mayor 90%, que es superior que las eficiencias de transducción retroviral publicadas por otros (Takahasi y otros, 2006; Takahasi y otros, 2007). Especialmente, se ha de considerar que una eficiencia de infección de 80% para un vector retroviral significa que las eficiencias de cotransducción de los 4 vectores requeridos serán inferiores ($0,8^4=0,4$). Nuestro enfoque, la co-electroporación de los 4 TFs asegurará la transferencia de los 4 factores en más de 90% de las células.

15 Se observó que se alcanza la eficiencia más alta cuando las células CCD1079SK o MEFs se electroporan con 300 μ F/250V o 500 μ F/250V respectivamente con respecto a la fluorescencia media de eGFP (que se corresponde con el nivel de expresión más alto)(Fig. 5).

20 Además se encontró que el ARNm-IVT con estructura de cap D1 mostró la expresión más alta y más estable de la luciferasa en células CCD1079Sk (Fig. 6) y por lo tanto se eligió para los experimentos posteriores. El ARNm-IVT con estructura cap D2 mostró mayor y más estable expresión de la luciferasa que el ARNm-IVT con estructura cap ARCA.

25 A continuación se examinó la cantidad intracelular del ARN electroporado y los niveles de expresión de los constructos de ARNm exógenos que codifican los seis TFs SOX2, OCT4, KLF4, cMYC, NANOG, y LIN28. Los oligonucleótidos específicos para los constructos de codones optimizados se usaron en estudios de qRT-PCR. En el mismo conjunto de experimentos se determinó la media vida del ARN-IVT y las proteínas codificadas en el transcurso de los experimentos.

30 Se encontró que:

- (i) pueden detectarse altos niveles de ARN-IVT por qRT-PCR después de 24 horas en las células CCD1079Sk electroporadas (Fig. 7),
- 35 (ii) el ARN-IVT de los seis factores de transcripción se detecta bien aun 168h después de la electroporación (Fig. 7),
- (iii) el ARN-IVT que codifica los cuatro TFs SOX2, OCT4, KLF4, y cMYC (OSKM) se traducen en altos niveles de proteína 24 h después de la electroporación como según se supervisó mediante análisis de inmunoelectrotransferencia (Fig. 8),
- 40 (iv) OCT4 - junto con SOX2 la TF más importante para la reprogramación (Huangfu y otros, 2008) - se expresó durante 72 h (en células CCD1079Sk) en 96 h (en MEFs) a niveles similares a o niveles más altos que en las células NTERA, una línea celular de carcinoma embrionario- la expresión de SOX2 fue detectable durante 48 horas (en células CCD1079Sk) en 72 h (en MEFs) (Fig. 8) y
- 45 (v) MYC y KLF4 se expresaron al menos 24 h (en células CCD1079Sk) y 48 h (en MEFs). Para ambas TF se publican las media-vidas cortas (Chen y otros, 2005 Cancer Res. 15;65(22), 10394-10400; Sears y otros, 2000, Genes & Dev. 14: 2501-2514) (Fig. 8).

50 Dado que está bien establecido que todas las células madre pluripotentes de mamíferos expresan actividad de fosfatasa alcalina (AP) y que AP es un marcador temprano del proceso de reprogramación (Pera y otros, 2000, Journal of Cell Science 113, 5-10; Brambrink y otros, 2008, Cell Stem Cell. 7, 151-159; O'Connor y otros, 2008, Stem Cells, 26, 1109-1116), se determinó la inducción de la expresión AP en una única electroporación del ARN-IVT que codifica los cuatro TFs OSKM (15 μ g cada TF).

55 Se encontró que 10 días después de la electroporación aproximadamente 6% de las células se tiñeron positivo para AP según lo revelado por análisis FACS (Fig. 9). Estos datos coinciden con los datos publicados recientemente que muestran que la expresión de 3 días de los cuatro TFs OSKM en un sistema inducible a la doxiciclina conduce a aproximadamente 5% de células positivas a AP (Brambrink y otros, 2008). Como se mencionó anteriormente, una única electroporación conduce también a una expresión de 3 - 4 días.

60 Sin embargo una única electroporación no fue suficiente para inducir el crecimiento de colonias iPS. Esto está de acuerdo con los datos recientemente publicados que muestran que la inducción de AP es reversible y los TFs necesitan ser expresados al menos 12 días para completar el proceso de reprogramación (Brambrink y otros, 2008). Sobre la base de los experimentos de cinética (Fig. 8) células CCD1079Sk y MEFs se electroporaron por tanto repetidamente cada 48 horas, lo que significa que se requieren 6 electroporaciones para garantizar al menos 12 días de la expresión de TF.

Después de diferentes intervalos de tiempo se tiñeron las células para el marcador temprano de reprogramación AP y analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Además se aisló el ARN total a partir de células justo antes de cada electroporación y evaluó la expresión del ARNm de marcadores celulares endógenos ES humano y murino mediante PCR en tiempo real cuantitativo. En nuestro estudio se incluyó el inhibidor de HDAC VPA, ya que se demostró que el VPA mejora la eficacia de la reprogramación (Huangfu y otros, 2008).

Se encontró que:

- 10 (i) las células se tiñeron reproducibles positivas para AP. AP se indujo aun en intervalos de tiempo tempranos como se analizó en el primer experimento (4 a 7 días). La cantidad de ARN-IVT resultante en la positividad de AP se alcanzó desde tan poco como 1.25µg por TF hasta 5µg por TF (Fig. 10 y 11),
- 15 (ii) la adición de VPA aumenta en gran medida el porcentaje de MEFs AP-positivas electroporadas con ARN-IVT que codifica los cuatro TFs OSKM (Fig. 11),
- 20 (iii) los marcadores celulares ES humano y murino que subrayan más aun el proceso de reprogramación se indujeron: OCT4 endógeno humano (Fig. 12), TERT humano y murino (TERT) (telomerasa transcriptasa inversa) (Fig. 12-14), GDF3 humano (factor de diferenciación del crecimiento 3) (Fig. 12 y 13) y DPPA4 humano (asociado al desarrollo de la pluripotencia 4) (Fig. 13). Sin embargo la adición de VPA a AP aumentó la inducción de marcador celular ES humano y murino (Fig. 12-14) y
- (iv) la electroporación repetitiva se asocia con una pérdida de la viabilidad celular que se volvió evidente sólo después de la segunda electroporación. La viabilidad disminuyó más aun con cada siguiente electroporación.

La adición de células previamente no electroporadas (que sirven como células "vehículo") durante la 4ta y 6ta electroporación resultó rescatar las células electroporadas (Fig. 14A).

Se encontró que un gran número de células permanecieron viables después de última electroporación. Esto nos permitió cultivar en placa estas células sobre las células alimentadoras MEF irradiadas. La consecuencia de las colonias pluripotentes a partir de estas células está todavía bajo investigación.

En conjunto nuestros datos muestran que la electro-transferencia del ARN-IVT que codifica TFs que regulan la pluripotencia de células madre en las células somáticas inicia con éxito el proceso de reprogramación. Se espera que el problema de la viabilidad limitada de las células puede mejorarse mediante la reducción del tiempo de expresión de TF necesario para reprogramar las células o el aumento de la supervivencia de las células durante la electroporación.

Se espera que las siguientes medidas reduzcan la duración de la reprogramación:

- 40 (i) Se publicó recientemente que los queratinocitos son más rápidamente y más eficazmente reprogramados en las células pluripotentes que en los fibroblastos (Aasen y otros, 2008, Nat. Biotechnol. 26, 1276-84). Por lo tanto, se espera que usando queratinocitos tales como queratinocitos primarios (queratinocitos epidérmicos normales humanos; Promocell, Heidelberg, Alemania) un número reducido de electroporaciones será suficiente para cubrir el período de expresión requerido.
- 45 (ii) Se publicó recientemente que la expresión de las proteínas que se saben que immortalizan las células, hTERT y gran antígeno T-SV40, mejoran la eficacia y el ritmo de la reprogramación (Park y otros, 2008, Nature Protocols 3, 1180-1186; Mali y otros, 2008). Por lo tanto, la adición del ARN-IVT que codifica tales proteínas tal como ARN-IVT que codifica el gran antígeno T de codón optimizado del cóctel-TF se espera proporcione un efecto beneficioso.

Se espera que las siguientes medidas aumenten la supervivencia de las células:

- 50 (i) los parámetros de voltaje y capacidad de las electroporaciones usadas en la presente se optimizaron para los niveles de expresión máxima después de una electroporación. Sin embargo, incluso las condiciones más suaves resultaron en porcentajes similares de células transfectadas con los niveles de expresión ligeramente reducidos como supervisado mediante la fluorescencia media de GFP (Fig. 4). Por lo tanto, los parámetros se deben optimizar más aun con respecto a la supervivencia después electroporaciones repetidas sin aceptar la eficacia de transfección inferior al 75%.
- 55 (ii) Los resultados mostraron que los fibroblastos humanos se convierten y permanecen AP positivos durante al menos 10 días después de una única electroporación que es dos o tres veces más extensa que la expresión de los TFs exógenos. En nuestros experimentos de cinética se indica que el fibroblasto humano comienza a recuperarse del daño inducido por la electroporación después de aproximadamente 96 horas. Por lo tanto, se entiende que la frecuencia de electroporaciones puede elevarse a 96 o 120 horas para permitir una mejor recuperación de las células sin perjudicar el proceso de reprogramación.
- 60 (iii) Además de las modificaciones en las condiciones y frecuencias de electroporación, una supervivencia aumentada puede también obtenerse mediante la inhibición de la apoptosis previniendo la sobre-regulación de la proteína pro-apoptótica p53. Para este objetivo se añadirá la E6 proteína transformante del virus del papiloma humano 16 (VPH-16 E6) a nuestro cóctel-TF. E6 inhibe la apoptosis mediante la inducción de la poli-ubiquitinilación y la degradación

proteasomal de p53 y al interferir con otras proteínas pro-apoptóticas (Bak, FADD, procaspase-8). Además, induce la expresión de hTERT y coopera positivamente con c-MYC (Ristriani y otros, 2008, Oncogene [en imprenta]; Narisawa-Saito & Kiyono 2007, Cancer Sci., 98(10),1505-11).

5 (iv) Además aumentará la media vida de la proteína MYC mediante la introducción de una mutación puntual de estabilización (Thr-58 en Ala-58) que se encuentra en el linfoma de Burkitt y se ha descrito anteriormente (Sears y otros, 2000; Gregory & Hann 2000 Mol. Cell. Biol., 20(7) 2423-2435).

(v) Se eliminará funcionalmente un dominio PEST desestabilizador en c-MYC para aumentar aún más la media vida. Las supresiones del dominio PEST demostraron aumentar la estabilidad de c-MYC (Gregory & Hann 2000).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Johannes Gutenberg-Universität Mainz
 <120> Uso de ARN para reprogramar células somáticas
 <130> 410-8PCT
 15 <150> EP 07 024 312.6
 <151> 2007-12-14
 <160> 12
 20 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 1411
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 532 125 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

```

ccttcgcaag ccctcatttc accagggccc cggtctgggg cgccttcctt ccccatggcg      60
ggacacctgg cttcggattt cgccttctcg ccccctccag gtggtggagg tgatgggcca      120
ggggggcccg agccgggctg ggttgatcct cggacctggc taagcttcca aggcctcct      180
ggagggccag gaatcgggcc gggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattccccca      240
tgccccccgc cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgtact gtgggccccca ggttggagtg      300
gggctagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtccgg      360
gtggagagca actccgatgg ggcctccccg gagccctgca ccgtcacccc tggtgccctg      420
aagctggaga aggagaagct ggagcaaaac ccggaggagt cccaggacat caaagctctg      480
cagaaagaac tcgagcaatt tgccaagctc ctgaagcaga agaggatcac cctgggatat      540
acacaggccc atgtggggct caccctgggg gttctatttg ggaaggtatt cagccaaacg      600
accatctgcc gctttgaggc tctgcagctt agcttcaaga acatgtgtaa gctgeggccc      660
ttgctgcaga agtgggtgga ggaagctgac aacaatgaaa atcttcagga gatatgcaaa      720
gcagaaacc tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga      780
ggcaacctgg agaatttgtt cctgcagtgc ccgaaaccca cactgcagca gatcagccac      840
atcgccccagc agcttgggct cgagaaggat gtggtccgag tgtggttctg taaccggcgc      900
cagaagggca agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggattttga ggctgctggg      960
tctcctttct cagggggacc agtgtccttt cctctggccc cagggccccca ttttggtagc     1020
ccaggctatg ggagccctca cttcactgca ctgtactcct cggtcctttt ccctgagggg     1080
gaagcctttc cccctgtctc cgtcaccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt     1140
gcctgccctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg     1200
agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt cttcattcac taaggaagga attgggaaca     1260
caaagggctg gggcagggga gtttggggca actggttggga ggggaaggtga agttcaatga     1320

tgctcttgat tttaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga     1380
cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a                                     1411
  
```

50
 55
 60

```

<210> 2
<211> 360
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
  
```

ES 2 532 125 T3

5 Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
1 1 5 10

10 Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
20 20 25 30

15 Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
35 40 45

20 Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
50 55 60

25 Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
65 70 75 80

30 Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
85 90 95

35 Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
100 105 110

40 Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
115 120 125

45 Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
130 135 140

50 Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
145 150 155 160

55 Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
165 170 175

60 Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
180 185 190

65 Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
195 200 205

ES 2 532 125 T3

5 Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
1 5 10 15

10 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
20 25 30

15 Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
35 40 45

20 Met Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
50 55 60

25 Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
65 70 75 80

30 Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
85 90 95

35 Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro
100 105 110

40 Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
115 120 125

45 Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
130 135 140

50

55

60

5 Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
 145 150 155 160

10 Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
 165 170 175

15 Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
 180 185 190

20 Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn
 195 200 205

25 Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
 210 215 220

30 Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
 225 230 235 240

35 Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr
 245 250 255

40 Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
 260 265 270

45 Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
 275 280 285

50 Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
 290 295 300

55 Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
 305 310 315

45 <210> 5
 <211> 2098
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 5

55

60

ES 2 532 125 T3

attataaatc tagagactcc aggattttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60
 gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggaggctc 120
 5 tatttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtccac 180
 ctcttaaat ttttctect ettectetat actaacatga gtgtggatcc agcttgctcc 240
 caaagcttgc cttgcttga agcatccgac tgtaaagaat cttcacctat gcctgtgatt 300
 10 tgtgggctg aagaaaacta tccatccttg caaatgtctt ctgctgagat gcctcacacg 360
 gagactgtct ctctcttcc ttcctccatg gatctgctta ttcaggacag ccctgattct 420
 tccaccagtc ccaaaggcaa acaaccact tctgcagaga agagtgtcgc aaaaaggaa 480
 gacaaggctc cggtaagaa acagaagacc agaactgtgt tctctccac ccagctgtgt 540
 gtactcaatg atagatttca gagacagaaa tacctcagcc tccagcagat gcaagaactc 600
 20 tccaacatcc tgaacctcag ctacaaacag gtgaagacct ggttcagaa ccagagaaatg 660
 aatctaaga ggtggcagaa aaacaactgg ccgaagaata gcaatggtgt gacgcagaag 720
 gcctcagcac ctacctacc cagccttac tcttctacc accagggatg cctggtgaac 780
 25 ccgactggga accttccaat gtggagcaac cagacctgga acaattcaac ctggagcaac 840
 cagaccaga acatccagtc ctggagcaac cactcctgga aactcagac ctggtgcacc 900
 caatcctgga acaatcaggc ctggaacagt ccctctata actgtggaga ggaatctctg 960
 30 cagtcctgca tgcagttcca gccaaattct cctgccagtg acttgaggc tgccttgaa 1020
 gctgctgggg aaggccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtattttag tactccacia 1080
 accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga 1140
 35 gtgaaactga tattactcaa tttcagtctg gacactggct gaatecttcc tctcccctcc 1200
 tcccatcct cataggattt ttcttgttg gaaaccacgt gttctggttt ccatgatgcc 1260
 catccagtc atctcatgga ggggtggagta tgggtggagc ctaatcagcg aggtttcttt 1320
 40 ttttttttt ttctatttg atcttctgg agaaaatact ttttttttt ttttttttga 1380
 aacggagtct tgctctgctg ccaggtctg agtgacgtgg cgcggtcttg gctcactgca 1440
 agctcctct cccgggttca cgcattctc ctgcctcagc ctcccagca gctgggacta 1500
 45 caggcgcctg ccacctgcc cgctaatat tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac 1560
 tgtgttagcc aggatggtct cgatctctg acctgtgat ccaccgcct cggcctcct 1620
 aacagctggg atttacaggc gtgagccacc gcgcctgcc tagaaaagac attttaataa 1680
 50 ccttggctgc cgtctctggc tatagataag tagatctaact actagtttg atatctttag 1740
 ggtttagaat ctaacctcaa gaataagaaa tacaagtaca aattggtgat gaagatgat 1800
 tcgtattgtt tgggattggg aggctttgct tttttttta aactattga ggtaaagggt 1860
 55 taagctgtaa catacttaat tgatttctta cegtttttgg ctctgttttg ctatatcccc 1920
 taatttgttg gttgtgctaa tcttttaga aagaggctc gtatttgctg catcgtaatg 1980
 acatgagtac tgctttagtt ggtttaagtt caaatgaatg aaacaactat ttttcttta 2040
 60 gttgatttta ccctgatttc accgagtgtt tcaatgagta aatatacagc ttaaacad 2098

ES 2 532 125 T3

<210> 6
 <211> 305
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 6

10	Met	Ser	Val	Asp	Pro	Ala	Cys	Pro	Gln	Ser	Leu	Pro	Cys	Phe	Glu	Ala
	1				5				10						15	
15	Ser	Asp	Cys	Lys	Glu	Ser	Ser	Pro	Met	Pro	Val	Ile	Cys	Gly	Pro	Glu
			20						25					30		
20	Glu	Asn	Tyr	Pro	Ser	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Ala	Glu	Met	Pro	His	Thr
			35					40					45			
25	Glu	Thr	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Ser	Met	Asp	Leu	Leu	Ile	Gln	Asp
		50					55					60				
30	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Gly	Lys	Gln	Pro	Thr	Ser	Ala
	65					70					75					80
35	Glu	Lys	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Pro	Val	Lys	Lys	Gln
					85					90					95	
40	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Phe	Ser	Ser	Thr	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	Asn	Asp
				100					105					110		
45	Arg	Phe	Gln	Arg	Gln	Lys	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Met	Gln	Glu	Leu
			115					120					125			
50	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Thr	Trp	Phe	Gln
		130					135					140				
55	Asn	Gln	Arg	Met	Lys	Ser	Lys	Arg	Trp	Gln	Lys	Asn	Asn	Trp	Pro	Lys
	145					150					155					160
60	Asn	Ser	Asn	Gly	Val	Thr	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser
					165					170					175	
65	Leu	Tyr	Ser	Ser	Tyr	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Gly	Asn
				180					185					190		
70	Leu	Pro	Met	Trp	Ser	Asn	Gln	Thr	Trp	Asn	Asn	Ser	Thr	Trp	Ser	Asn
			195					200					205			
75	Gln	Thr	Gln	Asn	Ile	Gln	Ser	Trp	Ser	Asn	His	Ser	Trp	Asn	Thr	Gln
		210					215					220				
80	Thr	Trp	Cys	Thr	Gln	Ser	Trp	Asn	Asn	Gln	Ala	Trp	Asn	Ser	Pro	Phe
	225					230					235					240
85	Tyr	Asn	Cys	Gly	Glu	Glu	Ser	Leu	Gln	Ser	Cys	Met	Gln	Phe	Gln	Pro
					245					250					255	

ES 2 532 125 T3

Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu
 260 265 270

5 Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln
 275 280 285

10 Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp
 290 295 300

15 Val
 305

20 <210> 7
 <211> 780
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 7

gtgCGgggga agatgtagca gcttcttctc cgaaccaacc ctttgccttc ggacttctcc 60

ggggccagca gccgcccgac caggggcccg gggccacggg ctccagccgac gaccatgggc 120

30 tccgtgtcca accagcagtt tgcaggtggc tgcgccaagg cggcagaaga ggcgcccgag 180

gaggcgccgg aggacgcggc ccggggggcg gacgagcctc agctgctgca cggtgcgggc 240

35 atctgtaagt ggttcaacgt gcgcatgggg ttcggettcc tgtccatgac cgcccgcgcc 300

ggggtcgcgc tcgaccccc agtggatgtc tttgtgcacc agagtaagct gcacatggaa 360

gggttccgga gcttgaagga gggtaggca gtggagtca cctttaagaa gtcagccaag 420

40 ggtctggaat ccatccgtgt caccggacct ggtggagtat tctgtattgg gaggtagagg 480

cggccaaaag gaaagagcat gcagaagcgc agatcaaaaag gagacaggtg ctacaactgt 540

45 ggaggcttag atcatcatgc caaggaatgc aagctgccac cccagcccaa gaagtgccac 600

ttctgccaga gcatcagcca tatggtagcc tcatgtccgc tgaaggccca gcagggcctt 660

agtgcacagg gaaagccaac ctactttcga gaggaagaag aagaaatcca cagccctacc 720

50 ctgctcccgg aggcacagaa ttgagccaca atgggtgggg gctattcttt tgctatcagg 780

55 <210> 8
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <400> 8

1 Met Gly Ser Val Ser Asn Gln Gln Phe Ala Gly Gly Cys Ala Lys Ala
 5 5 10 15
 20 Ala Glu Glu Ala Pro Glu Glu Ala Pro Glu Asp Ala Ala Arg Ala Ala
 25 20 25 30
 10 Asp Glu Pro Gln Leu Leu His Gly Ala Gly Ile Cys Lys Trp Phe Asn
 35 40 45
 15 Val Arg Met Gly Phe Gly Phe Leu Ser Met Thr Ala Arg Ala Gly Val
 50 55 60
 20 Ala Leu Asp Pro Pro Val Asp Val Phe Val His Gln Ser Lys Leu His
 65 70 75 80
 25 Met Glu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu Gly Glu Ala Val Glu Phe Thr
 85 90 95
 30 Phe Lys Lys Ser Ala Lys Gly Leu Glu Ser Ile Arg Val Thr Gly Pro
 100 105 110
 35 Gly Gly Val Phe Cys Ile Gly Ser Glu Arg Arg Pro Lys Gly Lys Ser
 115 120 125
 40 Met Gln Lys Arg Arg Ser Lys Gly Asp Arg Cys Tyr Asn Cys Gly Gly
 130 135 140
 45 Leu Asp His His Ala Lys Glu Cys Lys Leu Pro Pro Gln Pro Lys Lys
 145 150 155 160
 50 Cys His Phe Cys Gln Ser Ile Ser His Met Val Ala Ser Cys Pro Leu
 165 170 175
 55 Lys Ala Gln Gln Gly Pro Ser Ala Gln Gly Lys Pro Thr Tyr Phe Arg
 180 185 190
 60 Glu Glu Glu Glu Glu Ile His Ser Pro Thr Leu Leu Pro Glu Ala Gln
 195 200 205
 65 Asn

<210> 9
 <211> 2639
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 9

	tcgaggcgac cgcgacagtg gtgggggacg ctgctgagtg gaagagagcg cagcccggcc	60
5	accggaccta cttactcgcc ttgctgattg tctatTTTTg cgTTTacaac ttttctaaga	120
	acttttGtat acaaaggaac tttttaaaaa agacgcttcc aagttatatt taatccaaag	180
10	aagaaggatc tcggccaatt tggggTTTTg ggTTTTggct tcgTTTcttc tcttcgTTga	240
15	ctttggggtt caggtgcccc agctgcttcg ggctgccgag gacTTTctgg gccccacat	300
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		

ES 2 532 125 T3

	taatgaggca gccacctggc gagtctgaca tggctgtcag cgacgcgctg ctcccatctt	360
5	tctccacggt cgcgctctggc ccggcgggaa gggagaagac actgcgtcaa gcaggtgccc	420
	cgaataaccg ctggcgggag gagctctccc acatgaagcg acttccccca gtgcttcccg	480
	gccgccccta tgacctggcg gcggcgaccg tggccacaga cctggagagc ggcggagccg	540
10	gtgcggttg cggcggtagc aacctggcgc ccctacctcg gagagagacc gaggagtca	600
	acgatctcct ggacctggac tttattctct ccaattcgcct gacctcctt cgggagtcag	660
	tggccgccac cgtgtcctcg tcagcgtcag cctcctcttc gtcgtcgccg tcgagcagcg	720
15	gccctgccag cgcgccctcc acctgcagct tcacctatcc gatccgggccc gggaaacgacc	780
	cgggcgtggc gccggggcggc acgggcggag gcctcctcta tggcagggag tccgctcccc	840
20	ctccgacggc tcccttcaac ctggcggaca tcaacgacgt gagcccctcg ggcggcttcg	900
	tggccgagct cctgcggccca gaattggacc cgggtgtacat tccgccgag cagccgcagc	960
	cgccaggtgg cgggctgatg ggcaagtctg tgctgaaggc gtcgctgagc gccctggca	1020
25	gcgagtacgg cagcccgtcg gtcctcagcg tcagcaaagg cagccctgac ggcagccacc	1080
	cgggtggtggt ggcgccctac aacggcgggc cgccgcgcac gtgcccgaag atcaagcagg	1140
	aggcggctct ttcgtgcacc cacttgggcg ctggaccccc tctcagcaat ggccaccggc	1200
30	cggctgcaca cgacttcccc ctggggcggc agctccccag caggactacc ccgacctgg	1260
	gtcttgagga agtgctgagc agcagggact gtcacctgac cctgcccgtt cctcccggct	1320
35	tccatccccca cccggggccc aattacccat ccttctgccc cgatcagatg cagccgcaag	1380
	tcccgcgct ccattaccaa gagctcatgc caccgggttc ctgcatgcca gaggagccca	1440
	agccaaagag gggaaagacga tcgtggcccc ggaaaaggac cgccaccac acttgtgatt	1500
40	acgcgggctg cggcaaaacc tacacaaaga gttcccatct caaggcacac ctgcgaacct	1560
	acacaggtga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttcgcccgt	1620
	cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca ccgcccgttc cagtgccaaa	1680
45	aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctcgcctt acacatgaag aggcattttt	1740
	aaatcccaga cagtggatat gaccacact gccagaagag aattcagtat tttttacttt	1800
50	tcacactgtc ttcccgatga gggaggagc ccagccagaa agcactaaa tcatgggtcaa	1860
	gttcccact gagtcatctt gtgagtggat aatcaggaaa aatgaggaat ccaaaagaca	1920
	aaaatcaaag aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcattccaat tctaaatccg	1980
55	acttgaatat tcctggactt acaaaatgcc aagggggtga ctggaagttg tggatatcag	2040
	ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattcccttg aattgtgtat	2100
	tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtattctctt taccttctaa aagccattat	2160
60	tatgatgtta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttaa atagcctaaa	2220

5 tgatggtgct tggtgagtct tggttctaaa ggtaccaaac aaggaagcca aagttttcaa 2280
 actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttgtctt ccgatcaaca tttatgacct 2340
 aagtcaggta atatacctgg tttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc 2400
 10 actgtggttt cagatgtgca ataatttgta caatggttta ttcccaagta tgccttaagc 2460
 agaacaaatg tgtttttcta tatagttcct tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa 2520
 15 gcaaacgtct attttgtata tttgtaaact acaaagtaaa atgaacattt tgtggagttt 2580
 gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaaataa acctataata ttttatctg 2639

20

<210> 10
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 10

30

Met Ala Val Ser Asp Ala Leu Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser
1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Arg Glu Lys Thr Leu Arg Gln Ala Gly Ala Pro Asn
 20 25 30

35

Asn Arg Trp Arg Glu Glu Leu Ser His Met Lys Arg Leu Pro Pro Val
 35 40 45

40

Leu Pro Gly Arg Pro Tyr Asp Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Thr Asp
 50 55 60

Leu Glu Ser Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Gly Gly Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

45

Pro Leu Pro Arg Arg Glu Thr Glu Glu Phe Asn Asp Leu Leu Asp Leu
 85 90 95

50

Asp Phe Ile Leu Ser Asn Ser Leu Thr His Pro Pro Glu Ser Val Ala
 100 105 110

Ala Thr Val Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser
 115 120 125

55

Ser Ser Gly Pro Ala Ser Ala Pro Ser Thr Cys Ser Phe Thr Tyr Pro
130 135 140

Ile Arg Ala Gly Asn Asp Pro Gly Val Ala Pro Gly Gly Thr Gly Gly
145 150 155 160

60

Gly Leu Leu Tyr Gly Arg Glu Ser Ala Pro Pro Pro Thr Ala Pro Phe

ES 2 532 125 T3

					165					170					175	
5	Asn	Leu	Ala	Asp 180	Ile	Asn	Asp	Val	Ser 185	Pro	Ser	Gly	Gly	Phe 190	Val	Ala
	Glu	Leu	Leu 195	Arg	Pro	Glu	Leu	Asp 200	Pro	Val	Tyr	Ile	Pro 205	Pro	Gln	Gln
10	Pro	Gln 210	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly 215	Leu	Met	Gly	Lys	Phe 220	Val	Leu	Lys	Ala
	Ser 225	Leu	Ser	Ala	Pro	Gly 230	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ser 235	Pro	Ser	Val	Ile	Ser 240
15	Val	Ser	Lys	Gly	Ser 245	Pro	Asp	Gly	Ser	His 250	Pro	Val	Val	Val	Ala 255	Pro
20	Tyr	Asn	Gly	Gly 260	Pro	Pro	Arg	Thr	Cys 265	Pro	Lys	Ile	Lys	Gln 270	Glu	Ala
	Val	Ser	Ser 275	Cys	Thr	His	Leu	Gly 280	Ala	Gly	Pro	Pro	Leu 285	Ser	Asn	Gly
25	His	Arg 290	Pro	Ala	Ala	His	Asp 295	Phe	Pro	Leu	Gly	Arg 300	Gln	Leu	Pro	Ser
30	Arg 305	Thr	Thr	Pro	Thr	Leu 310	Gly	Leu	Glu	Glu	Val 315	Leu	Ser	Ser	Arg	Asp 320
	Cys	His	Pro	Ala	Leu 325	Pro	Leu	Pro	Pro	Gly 330	Phe	His	Pro	His	Pro	Gly 335
35	Pro	Asn	Tyr	Pro 340	Ser	Phe	Leu	Pro	Asp 345	Gln	Met	Gln	Pro	Gln 350	Val	Pro
40	Pro	Leu	His 355	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met 360	Pro	Pro	Gly	Ser	Cys 365	Met	Pro	Glu
45	Glu 370	Pro	Lys	Pro	Lys	Arg	Gly 375	Arg	Arg	Ser	Trp	Pro 380	Arg	Lys	Arg	Thr
	Ala 385	Thr	His	Thr	Cys	Asp 390	Tyr	Ala	Gly	Cys	Gly 395	Lys	Thr	Tyr	Thr	Lys 400
50	Ser	Ser	His	Leu	Lys 405	Ala	His	Leu	Arg	Thr 410	His	Thr	Gly	Glu	Lys 415	Pro
	Tyr	His	Cys	Asp	Trp	Asp	Gly	Cys	Gly	Trp	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Asp
				420				425								430
55	Glu	Leu	Thr	Arg	His	Tyr	Arg	Lys	His	Thr	Gly	His	Arg	Pro	Phe	Gln
			435					440						445		
60	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	His	Leu	Ala	Leu
		450					455					460				
	His	Met	Lys	Arg	His	Phe										
	465				470											

ES 2 532 125 T3

<210> 11
 <211> 2377
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

```

    acccccgagc tgtgctgctc gcggccgcca ccgccgggcc ccggccgtcc ctggctcccc    60
    tcctgcctcg agaagggcag ggcttctcag aggcttggcg ggaaaaagaa cggagggagg    120
    gatcgcgctg agtataaaag ccggtttctg gggtttatc taactcgtg tagtaattcc    180
    agcgagaggc agagggagcg agcggggcggc cggctagggg ggaagagccg ggcgagcaga    240
    gctgcgctgc gggcgctcctg ggaagggaga tccggagcga atagggggct tcgcctctgg    300
    cccagccctc ccgctgatcc cccagccagc ggtccgcaac ccttgccgca tccacgaaac    360
    tttgcccata gcagcgggcg ggcaacttgc actggaactt acaacacccg agcaaggacg    420
    cgactctccc gacgcgggga ggctattctg cccatttggg gacacttccc cgccgctgcc    480
    aggaccgct tctctgaaag gctctccttg cagctgctta gacgctggat ttttttcggg    540
    tagtggaaaa ccagcagcct cccgcgacga tgcccctcaa cgtagcttc accaacagga    600
    actatgacct cgactacgac tcggtgcagc cgtatttcta ctgcgacgag gaggagaact    660
    tctaccagca gcagcagcag agcgagctgc agccccggc gccagcagag gatatctgga    720
    agaaattcga gctgctgccc accccgcccc tgtcccctag ccgccgtcc gggctctgct    780
    cgccctccta cgttgcggtc acaccottct cccttcgggg agacaacgac ggcgggtggcg    840
    ggagcttctc cacggccgac cagctggaga tggtagccga gctgctggga ggagacatgg    900
    tgaaccagag tttcatctgc gaccgggacg acgagacctt catcaaaaac atcatcatcc    960
    aggactgtat gtggagcggc ttctcggccg ccgccaagct cgtctcagag aagctggcct   1020
    cctaccaggc tgcgcgcaa gacagcggca gcccgaacct cgcccgcggc cacagcgtct   1080
    gctccacctc cagcttgtac ctgcaggatc tgagcggcgc cgcctcagag tgcacgacc   1140
    cctcggtggt cttcccctac cctctcaacg acagcagctc gcccaagtcc tgcgcctcgc   1200
    aagactccag cgccctctct ccgtcctcgg attctctgct ctctcagac gagtctctcc   1260
    cgcagggcag ccccgagccc ctggtgctcc atgaggagac accgcccacc accagcagcg   1320
  
```

ES 2 532 125 T3

5 actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag aaatcgatgt tgtttctgtg gaaaagaggc 1380
 aggctcctgg caaaaggcca gagtctggat caccttctgc tggaggccac agcaaacctc 1440
 ctcacagccc actggtcctc aagaggtgcc acgtctccac acatcagcac aactacgcag 1500
 10 cgctccctc cactcggaag gactatcctg ctgccaagag ggtcaagttg gacagtgtca 1560
 gagtcttgag acagatcagc aacaaccgaa aatgcaccag ccccagggtcc tcggacaccg 1620
 aggagaatgt caagaggcga acacacaacg tcttggagcg ccagaggagg aacgagctaa 1680
 15 aacggagctt ttttgcctg cgtgaccaga tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc 1740
 ccaaggtagt tatccttaa aaagccacag catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc 1800
 20 aaaagctcat ttctgaagag gacttggtgc ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac 1860
 ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaag gaaaagtaag gaaaacgatt ccttctaaca 1920
 25 gaaatgtcct gagcaatcac ctatgaactt gtttcaaatg catgatcaaa tgcaacctca 1980
 caaccttggc tgagtcttga gactgaaaga ttagccata atgtaaactg cctcaaattg 2040
 30 gactttgggc ataaaagaac ttttttatgc ttaccatctt tttttttct ttaacagatt 2100
 tgtatttaag aattgtttt aaaaaattht aagatttaca caatgtttct ctgtaaatat 2160
 tgccattaaa tgtaataaac ttaataaaa cgtttatagc agttacacag aatttcaatc 2220
 35 ctagtatata gtacctagta ttataggtac tataaacctt aatttttttt atttaagtac 2280
 attttgcttt ttaaagttga tttttttcta ttgttttttag aaaaaataaa ataactggca 2340
 40 aatatatcat tgagccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2377

45 <210> 12
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 12

55

60

ES 2 532 125 T3

5	Met	Asp	Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Asn	Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Met
	1				5					10					15	
10	Pro	Leu	Asn	Val	Ser	Phe	Thr	Asn	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asp	Tyr	Asp
				20					25					30		
15	Ser	Val	Gln	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Cys	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gln
			35					40					45			
20	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Ile
		50					55					60				
25	Trp	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg
	65					70					75					80
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																

5 Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser
 85 90 95
 10 Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp
 100 105 110
 15 Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln
 115 120 125
 20 Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile
 130 135 140
 25 Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val
 145 150 155 160
 30 Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser
 165 170 175
 35 Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr
 180 185 190
 40 Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val
 195 200 205
 45 Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala
 210 215 220
 50 Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser
 225 230 235 240
 55 Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His
 245 250 255
 60 Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu
 260 265 270
 65 Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 70 Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys
 290 295 300
 75 Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His
 305 310 315 320
 80 Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 325 330 335

5 Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
340 345 350

10 Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
355 360 365

15 Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
370 375 380

20 Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
385 390 395 400

25 Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
405 410 415

30 Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
420 425 430

35 Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
435 440 445

40 Leu Arg Asn Ser Cys Ala
450

45

50

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células que tienen características de célula madre que comprende las etapas de
- 5 (i) proporcionar una población de células que comprende células somáticas, (ii) introducir ARN en al menos una porción de dichas células somáticas, dicho ARN que codifica los factores que inducen el desarrollo de las características de la célula madre en dichas células somáticas, y (iii) permitir el desarrollo de las células que tienen características de célula madre,
- 10 en donde el ARN se obtiene por transcripción in vitro o síntesis química.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ARN es el ARN capaz de expresar OCT4 y el ARN capaz de expresar SOX2.
- 15 3. El método de la reivindicación 2 en donde el método comprende además introducir el ARN capaz de expresar NANOG y/o ARN capaz de expresar LIN28.
4. El método de la reivindicación 2 o 3 en donde el método comprende además introducir el ARN capaz de expresar KLF4 y/o el ARN capaz de expresar c-MYC.
- 20 5. El método de cualquier una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células que tienen características de célula madre presentan un estado pluripotente.
6. El método de cualquier una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células somáticas son fibroblastos, preferentemente fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos.
- 25 7. El método de cualquier una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho ARN se introduce en dicha al menos una porción de células somáticas por electroporación.

30

35

40

45

50

Figura 1

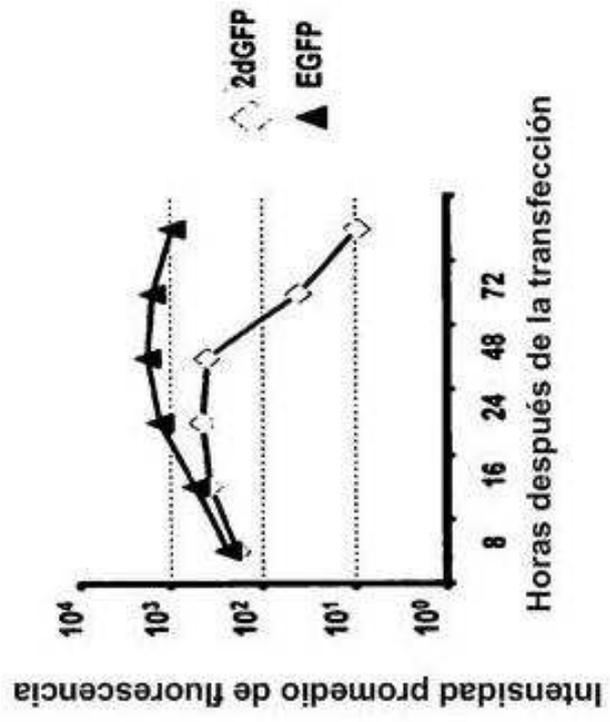


Figura 2

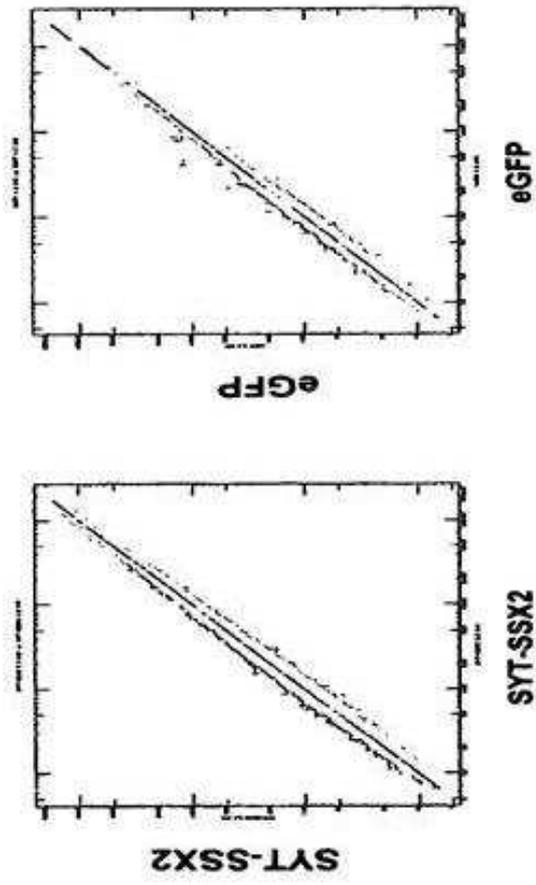


Figura 3

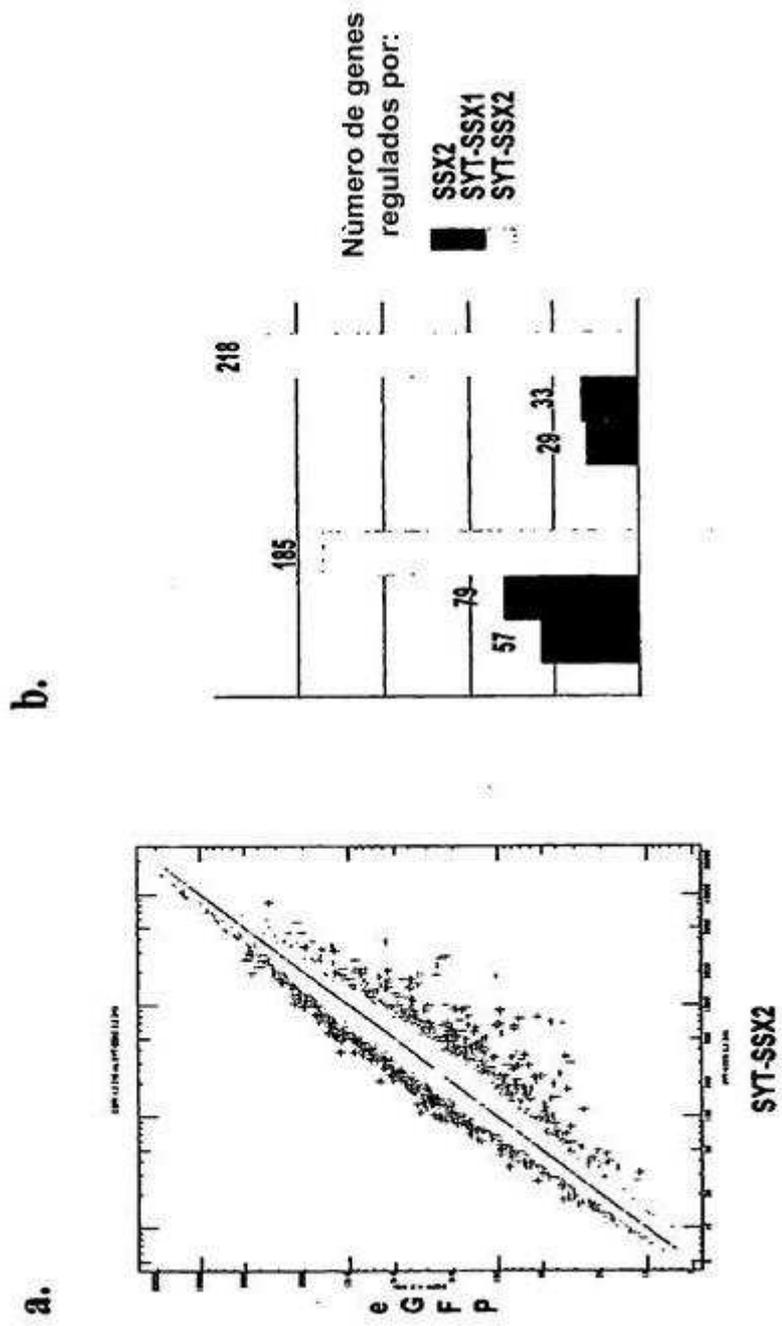
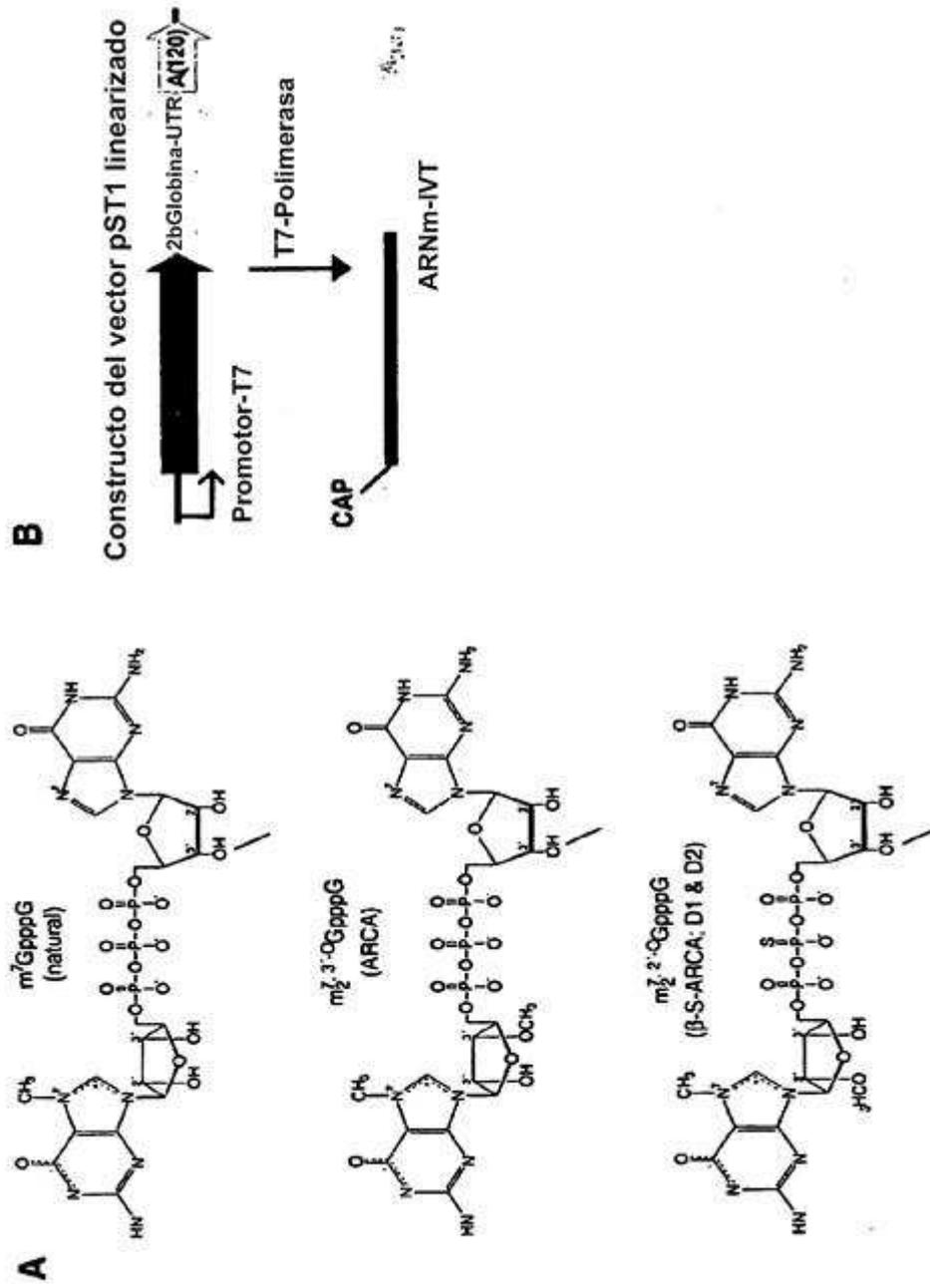
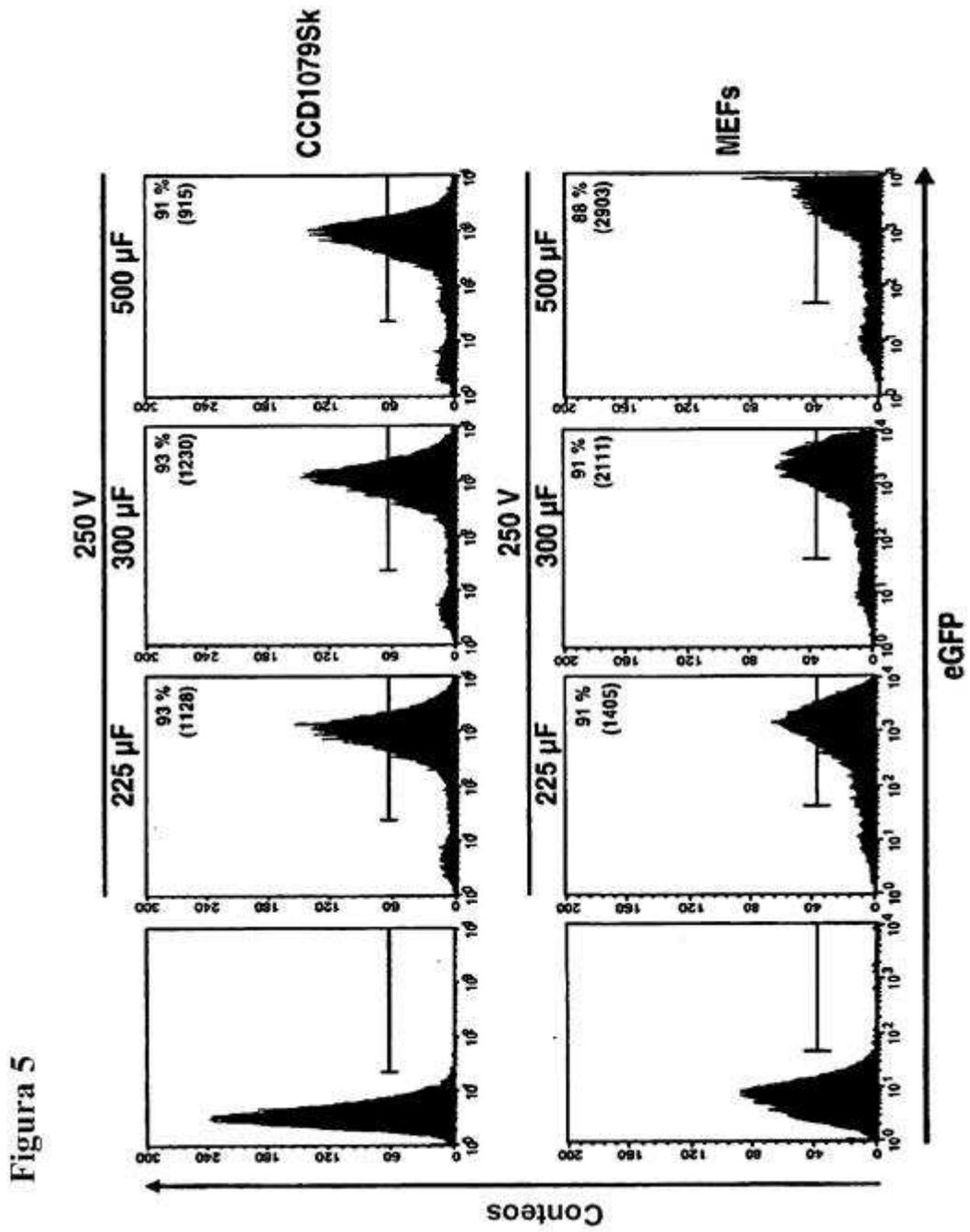


Figura 4





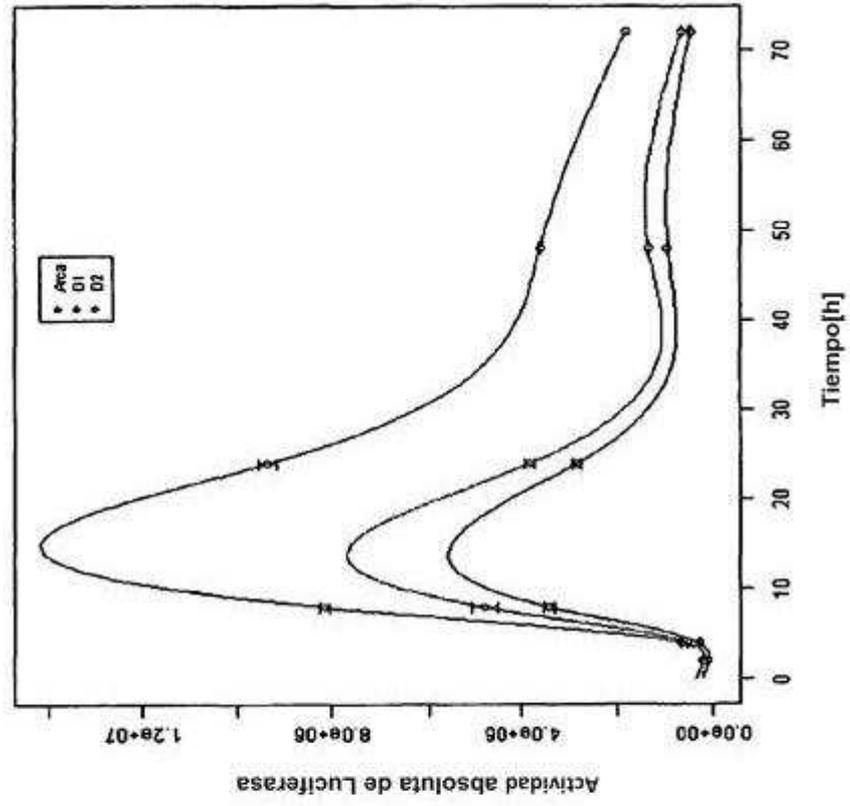


Figura 6

Figura 7

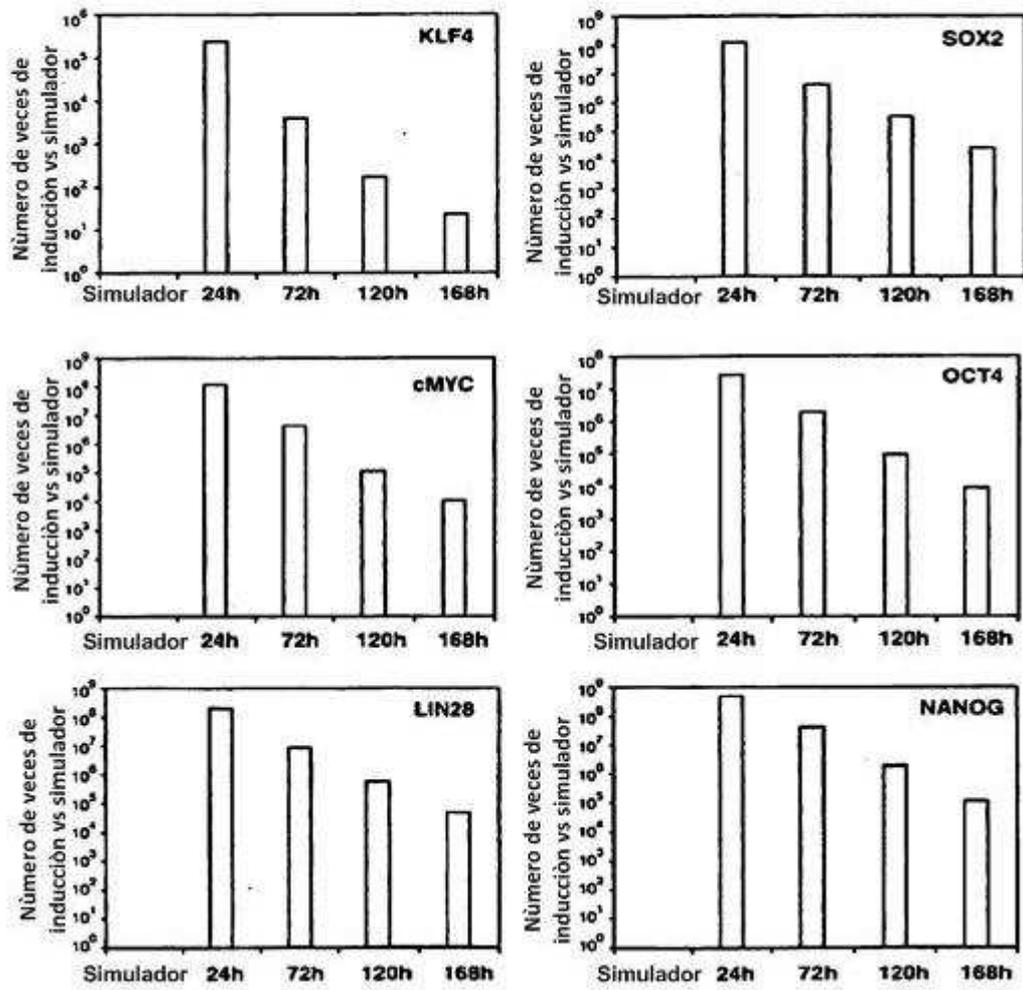


Figura 8

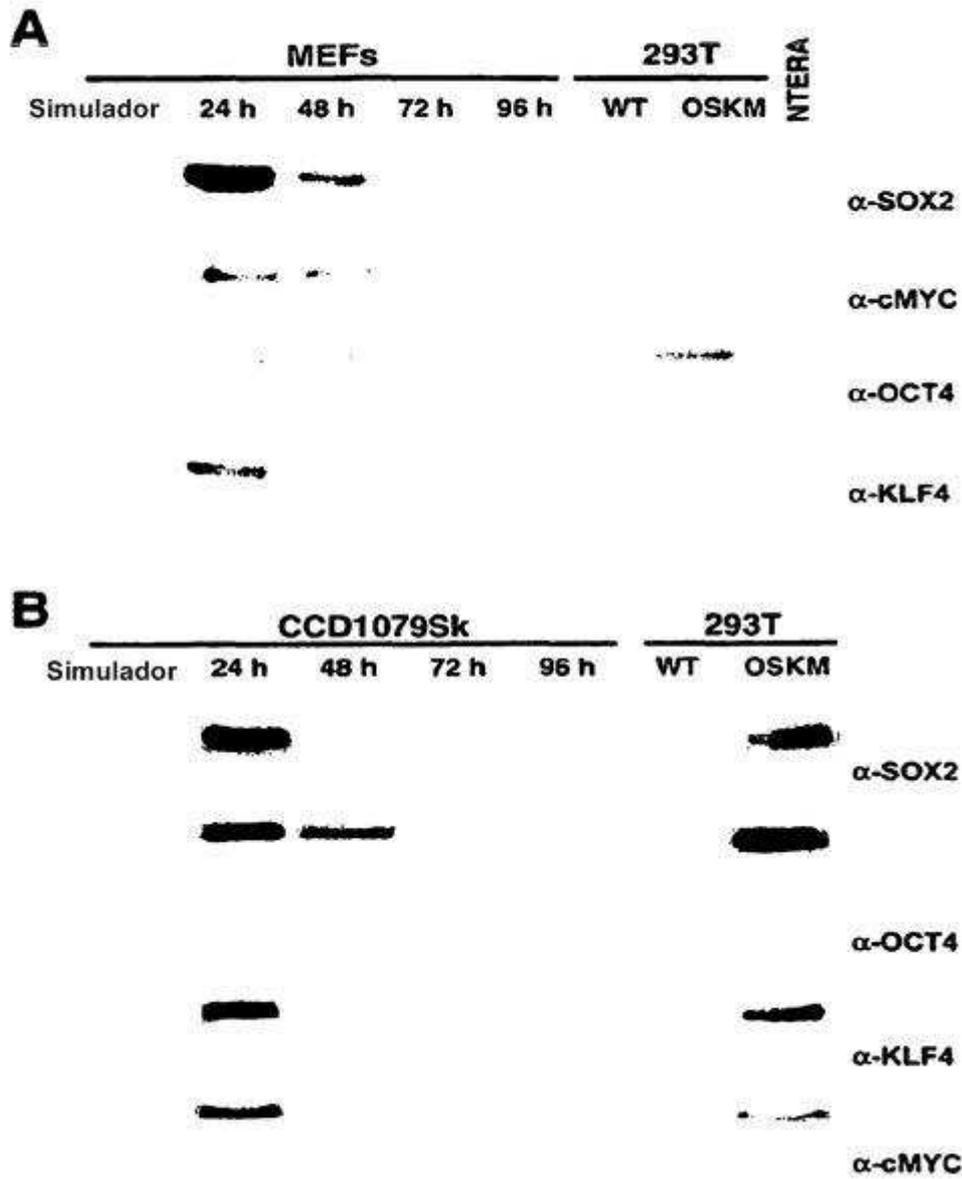


Figura 9

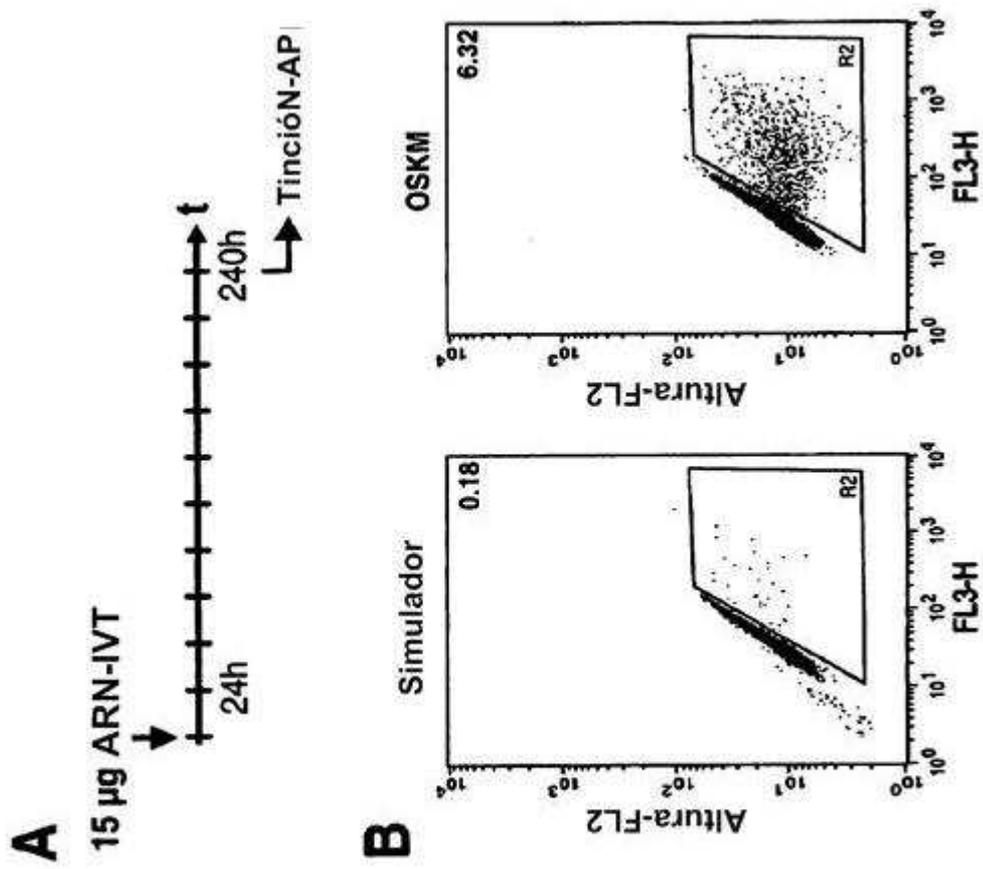
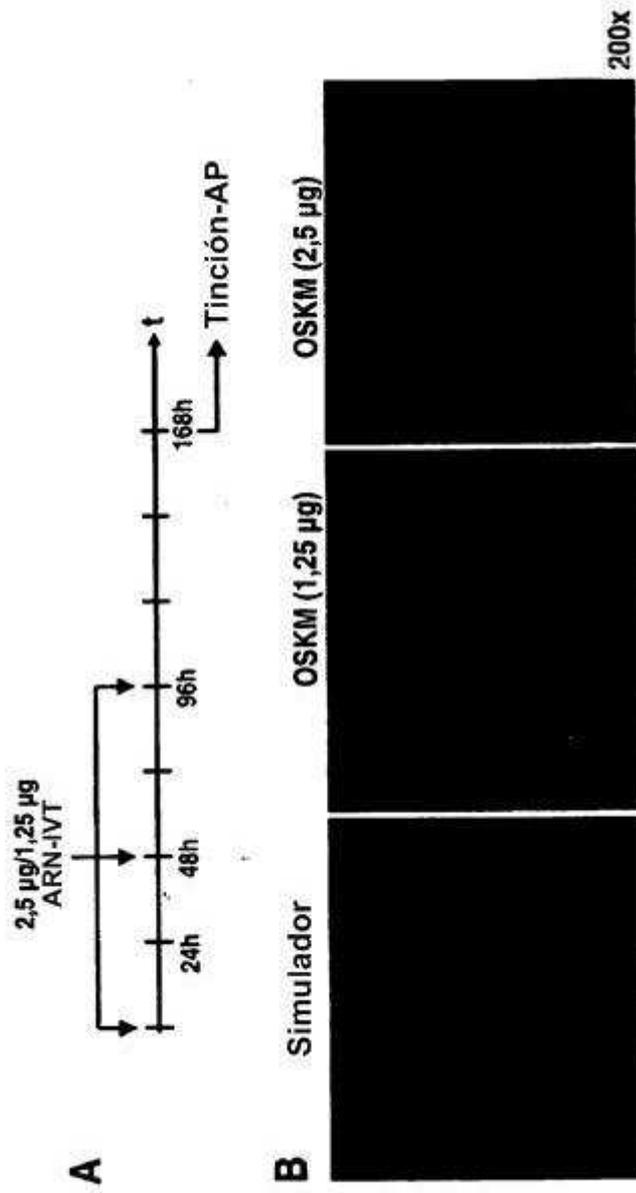


Figura 10



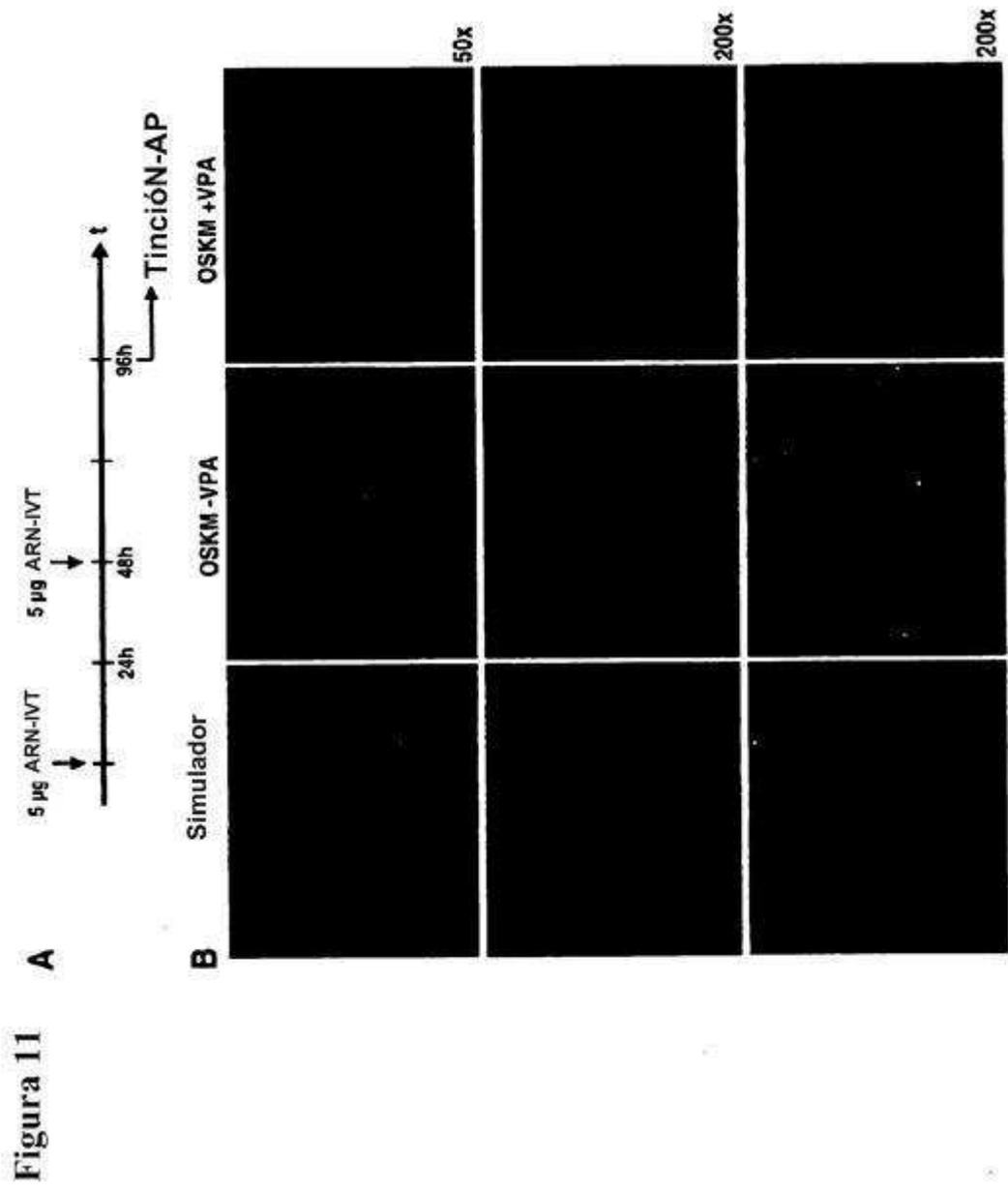


Figura 12

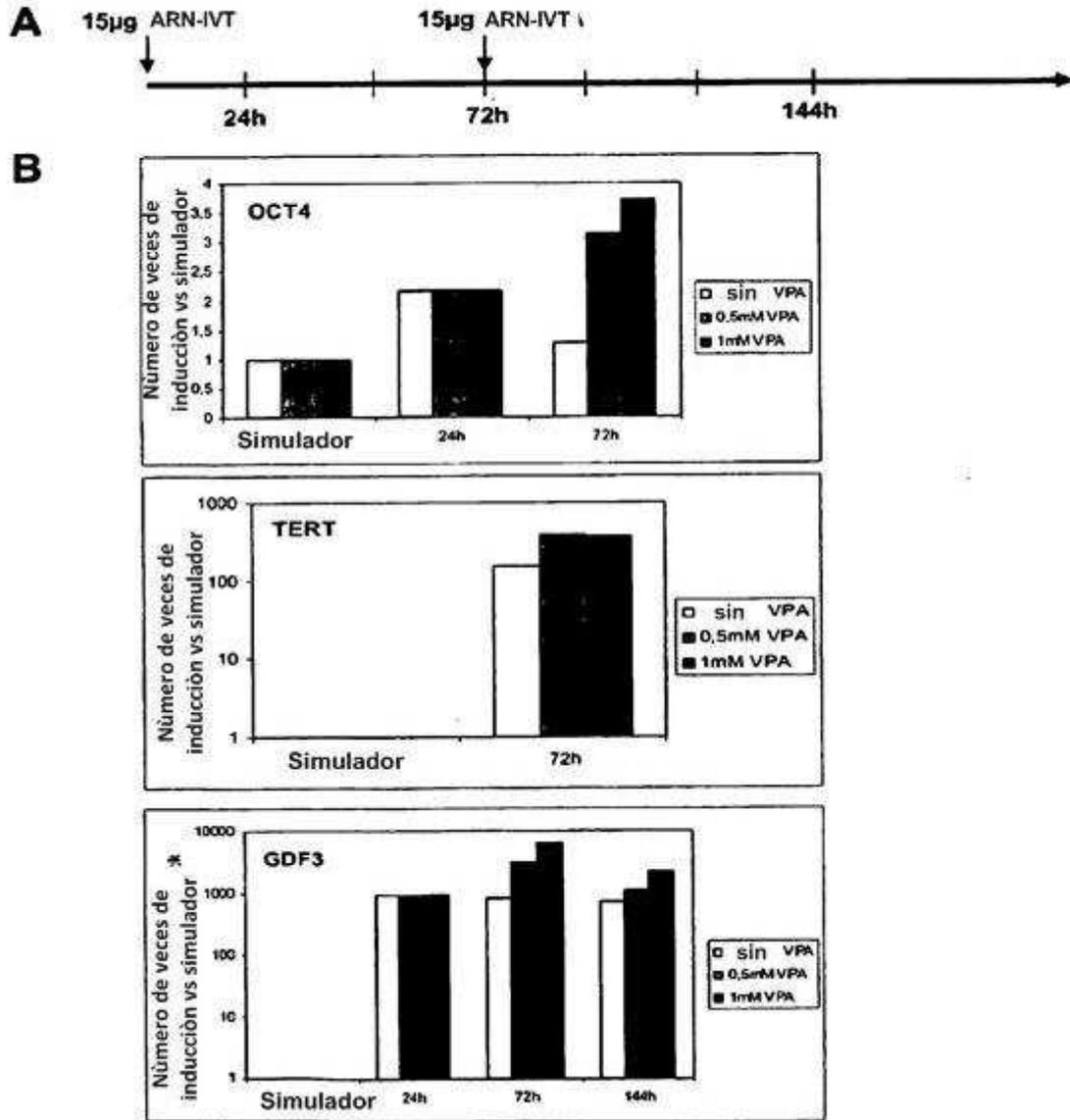


Figura 13

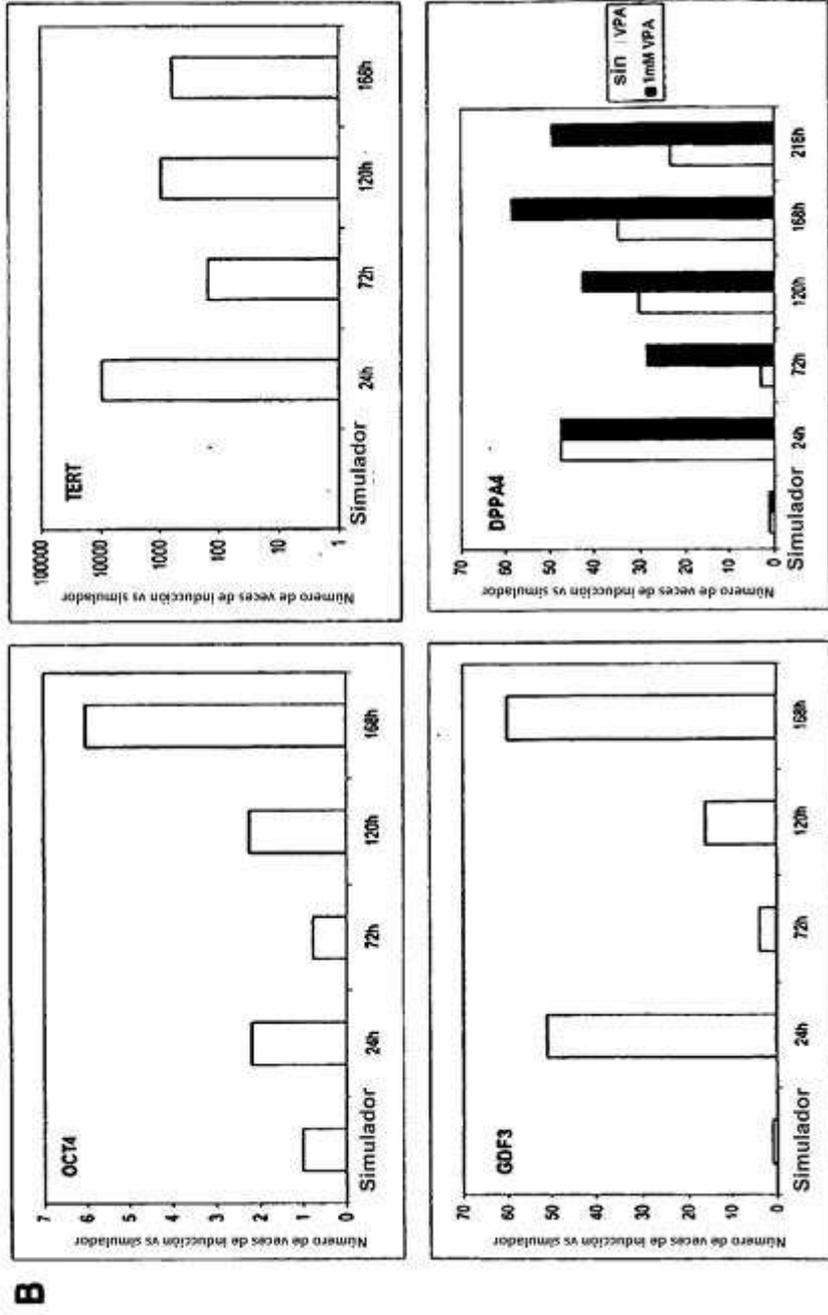


Figura 14

