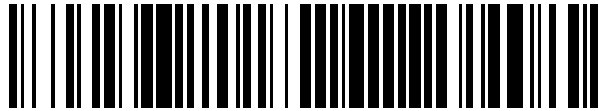


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 487**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/545** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2010 E 10829086 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2496689**

54 Título: **Reprogramación episódica con compuestos químicos**

30 Prioridad:

**04.11.2009 US 258120 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.07.2015**

73 Titular/es:

**CELLULAR DYNAMICS INTERNATIONAL, INC.  
(100.0%)  
University Research Park 525 Science Drive,  
Suite 200  
Madison, WI 53711, US**

72 Inventor/es:

**YU, JUNYING**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 539 487 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

Reprogramación episómica con compuestos químicos

### 1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo del desarrollo de células madre. Más en particular, se refiere a la generación de células madre pluripotentes.

### 2. Descripción de la técnica relacionada

10 La capacidad de proliferación ilimitada y la capacidad pluripotente de las células madre embrionarias (ES) humanas ha ofrecido un acceso sin precedentes a todos los tipos de células del cuerpo humano. Las células madre pluripotentes inducidas (iPS) humanas obtenidas directamente de células somáticas de pacientes con un trasfondo genético deseado comparten estas dos propiedades clave de las células ES humanas, lo que hace que estas células sean candidatos excelentes para modelos de enfermedades, cribado de fármacos, ensayos de toxicidad y terapias de trasplantes. La obtención inicial de células iPS humanas empleó vectores retrovirales o lentivirales con integración en el genoma para administrar transgenes de reprogramación (Lowry *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Tales vectores pueden producir mutaciones por inserción que interfieren con las funciones normales de las células iPS humanas y sus derivados, y la expresión de transgenes residuales que puede influir en la diferenciación hasta linajes específicos (Yu *et al.*, 2007), o incluso dar como resultado la tumorigénesis (Okita *et al.*, 2007).

20 Se han obtenido células iPS exentas de elementos genéticos exógenos a partir de fibroblastos embrionarios de ratón con transfecciones repetidas de plásmidos (Okita *et al.*, 2008), a partir de células hepáticas de ratón y fibroblastos humanos con vectores adenovirales sin integración (Stadtfeld *et al.*, 2008; Zhou y Freed, 2009), a partir de células somáticas con transposones PiggyBac (Woltjen *et al.*, 2009), a partir de fibroblastos humanos con vectores episómicos basados en oriP/EBNA-1 (Yu *et al.*, 2009), y la transducción de proteínas. A pesar de estos rápidos avances, ciertos obstáculos importantes siguen impidiendo el uso generalizado de una tecnología simple que produzca células iPS humanas de elevada calidad exentas de elementos genéticos exógenos. Por ejemplo, todas las tecnologías actuales (excepto la aproximación mediante el transposón PiggyBac) que permiten la generación de células iPS humanas exentas de elementos genéticos exógenos proporcionaron una eficacia de reprogramación muy baja. Esta baja eficacia hace difícil obtener células iPS de manera consistente a partir de una diversidad de tipos de células somáticas humanas fácilmente accesibles, y a partir de células con un trasfondo genético y edad del donante diferentes. La aproximación del transposón PiggyBac ofrece una eficacia de reprogramación razonable. Sin embargo, la eliminación de transposones de las células iPS puede ser bastante laboriosa cuando están implicadas muchas líneas celulares donantes.

35 Además, a pesar de la similitud elevada de las células iPS humanas con las células ES humanas, existen variaciones significativas clon a clon tanto en la expresión genética/modificaciones epigenéticas como en la capacidad de diferenciación específica del linaje de las células iPS humanas. En particular, en comparación con las células ES humanas, la mayoría de las células iPS humanas exhiben una capacidad de diferenciación neuronal significativamente inferior y ninguna respuesta a LIF (factor inhibidor de leucemia), que mantiene de manera rutinaria el cultivo de las células ES de ratón. Además, debido a la ausencia de buenos marcadores fácilmente ensayables para las células iPS humanas de calidad elevada, la selección del clon de células iPS humanas de calidad elevada puede ser laboriosa y requerir mucho tiempo.

40 La reprogramación genética de las células somáticas humanas hasta células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) podría ofrecer fuentes renovables de células para terapias de trasplantes. Para cumplir la promesa, las iPSCs humanas se obtendrán y se cultivarán de manera ideal en medios químicamente definidos exentos de células de soporte, y estarán exentas de ADN exógeno (sin huellas). Actualmente, no existe un método no viral exento de células de soporte simple y eficaz para la generación de iPSCs humanas sin huellas. Previamente, los esfuerzos para obtener iPSCs humanas sin huellas empleando vectores episómicos para la administración de transgenes fueron ineficaces y requirieron células de soporte.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de abordar la ineficacia u otros problemas en la preparación de células madre pluripotentes inducidas básicamente exentas de componentes genéticos exógenos.

### Compendio de la invención

50 Los aspectos de la presente invención superan una deficiencia importante de la técnica, proporcionando métodos nuevos para la preparación de células madre pluripotentes inducidas básicamente exentas de elementos de vectores exógenos, y así proporcionan ventajas particulares en cuanto a las aplicaciones de las células iPS.

55 Además, mediante el uso de moléculas pequeñas, ciertos aspectos ejemplares de la presente invención mejoraron enormemente la eficacia de la reprogramación episómica (>70 veces; >300 veces si se usa MYC deficiente de transformación, tal como LMYC), y establecieron una condición de reprogramación exenta de células de soporte mediante el uso de medios químicamente definidos para la obtención de iPSCs humanas sin huellas. Estas mejoras

posibilitaron la obtención rutinaria de iPSCs humanas sin huellas a partir de fibroblastos cutáneos y probablemente muchos otros tipos de células, haciendo así la tecnología fácilmente adaptable a la producción de grado clínico de iPSCs humanas.

- 5 Por lo tanto, en una primera realización, se proporciona una composición que comprende una población de células iPS básicamente exentas de elementos retrovirales exógenos y un medio que comprende inhibidores de la señalización añadidos externamente. En ciertos aspectos, estas células iPS pueden estar sustancialmente exentas, o preferiblemente básicamente exentas de, elementos genéticos o de vectores exógenos. Por ejemplo, estas células iPS se pueden obtener a partir de una o más células humanas. En un aspecto adicional, las células de la población pueden comprender el genoma de un individuo humano seleccionado, tal como un paciente humano.
- 10 En ciertos aspectos, las células humanas son células humanas primarias, que son células obtenidas directamente de un sujeto humano vivo, y pueden excluir el uso de una línea de células establecidas o inmortalizadas. Ciertas realizaciones pueden incluir el uso de células humanas diferenciadas de manera terminal. Los ejemplos no limitantes de la célula humana primaria incluyen un fibroblasto, un queratinocito, una célula hematopoyética, una célula mesenquimatosas, una célula adiposa, una célula endotelial, una célula neuronal, una célula muscular, una célula mamaria, una célula hepática, una célula renal, una célula cutánea, una célula del tracto digestivo, una célula del cúmulo, una célula glandular, o una célula de islote pancreático. De manera más específica, la célula humana primaria puede ser una célula progenitora hematopoyética, tal como una célula CD34<sup>+</sup>. La célula humana primaria se puede obtener de una muestra de sangre, una muestra de pelo, una muestra de piel, o de cualquier fuente conocida para una persona de experiencia habitual en la técnica.
- 15 Los inhibidores de la señalización pueden ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), un inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógeno (MEK), un inhibidor de receptores de factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor inhibidor de leucemia (LIF), y una combinación de los mismos. En particular, la composición comprende la población de células y una combinación de inhibidor de GSK-3, inhibidor de MEK, inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , y opcionalmente, LIF. El medio puede comprender además inhibidor de ROCK o inhibidor de Miosina II añadidos externamente. El inhibidor de ROCK puede ser HA-100. El medio puede comprender además FGF añadido externamente. En ciertos aspectos, la composición puede comprender además un medio químicamente definido. Los ejemplos no limitantes de un medio químicamente definido incluyen el medio TeSR, medio de cultivo de células embrionarias humanas, medio N2B27 y los derivados de los mismos.
- 20 La composición puede comprender además un componente de la matriz para sustituir las células de soporte para mantener el cultivo de la población de células. El componente de la matriz para la adhesión celular puede ser cualquier material destinado a la unión de células madre o células de soporte (si se usan). Los ejemplos no limitantes del componente de la matriz incluyen colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, vitronectina, laminina, y fibronectina y las mezclas de los mismos, por ejemplo, Matrigel™ y preparaciones de membranas de células lisadas.
- 25 En ciertas realizaciones, la invención implica un método para producir una población de células iPS, que comprende: a) obtener células somáticas que comprenden un elemento genético extracromosómico que expresa uno o más factores de reprogramación; y b) cultivar las células somáticas y/o las células de la progenie de las mismas en una condición de reprogramación que comprende añadir externamente uno o más inhibidores de la señalización, tal como un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, y/o un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , para producir de ese modo una población de células iPS. En ciertos aspectos, el medio de reprogramación puede comprender una combinación de un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , y opcionalmente, LIF.
- 30 En aspectos adicionales, la condición de reprogramación puede estar básicamente exenta de células de soporte, como células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) irradiados. La condición de reprogramación puede comprender un componente de la matriz, tal como Matrigel™.
- 35 La célula somática puede ser una célula humana o una célula primaria, tal como una célula humana primaria. Los ejemplos de la célula somática pueden incluir, pero sin limitación, un fibroblasto, un queratinocito, una célula hematopoyética, una célula mesenquimatosas, una célula adiposa, una célula endotelial, una célula neuronal, una célula muscular, una célula mamaria, una célula hepática, una célula renal, una célula cutánea, una célula del tracto digestivo, una célula del cúmulo, una célula glandular, una célula de islote pancreático. La célula hematopoyética puede incluir cualquier célula sanguínea, tal como una célula progenitora hematopoyética (p.ej., una célula CD34<sup>+</sup>), una célula T, una célula B, o una combinación de las mismas.
- 40 En ciertos aspectos, el elemento genético extracromosómico se puede definir además como un vector episómico. Por ejemplo, el vector episómico puede comprender un origen de replicación y uno o más casetes de expresión para la expresión de factores de reprogramación. Dicho o dichos casetes de expresión pueden comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica un factor que actúa en trans que se une al origen de replicación para replicar un molde extracromosómico. De manera alternativa, la célula somática puede expresar tal factor que actúa en trans. El elemento genético extracromosómico puede ser cualquier material genético o ácido nucleico, tal como ADN o ARN.
- 45
- 50
- 55

Tales vectores episómicos pueden estar básicamente exentos de elementos bacterianos. Los elementos bacterianos pueden ser componentes del esqueleto del vector que son necesarios para la propagación de plásmidos en bacterias, tales como el origen de replicación bacteriano, p.ej., el origen de replicación pUC, y un casete de selección bacteriano, p.ej., un casete de selección de Ampicilina.

5 En las realizaciones ejemplares, el origen de replicación puede ser un origen de replicación de un herpesvirus linfotrópico o un gamma herpesvirus, un adenovirus, SV40, un papiloma virus bovino, o una levadura, tal como un origen de replicación de un herpesvirus linfotrópico o un gamma herpesvirus que corresponde al oriP de EBV. En un aspecto adicional, el herpesvirus linfotrópico puede ser el virus de Epstein Barr (EBV), herpesvirus de sarcoma de Kaposi (KSHV), Herpesvirus saimiri (HS), o virus de la enfermedad de Marek (MDV).

10 Para la replicación y el mantenimiento transitorio de elementos genéticos extracromosómicos, el factor que actúa en trans puede ser un polipéptido que corresponde a, o un derivado de, una proteína de tipo natural de EBNA-1 (antígeno nuclear 1 de EBV) de EBV, preferiblemente en presencia de un origen de replicación que corresponde a OriP de EBV. El derivado puede tener una capacidad reducida de activar la transcripción de un molde integrado en comparación con el EBNA-1 de tipo natural, y así se reduce la posibilidad de activar de manera ectópica genes cromosómicos que provoquen una transformación oncogénica. A la vez, el derivado puede activar la transcripción al menos un 5% respecto de la proteína de tipo natural correspondiente a partir de un molde extracromosómico después de que el derivado se una al origen de replicación.

Para la reprogramación de células somáticas, ciertos aspectos de los presentes métodos pueden implicar el uso de factores de reprogramación que pueden comprender uno o más seleccionados del grupo que consiste en Sox, Oct, Nanog, Lin-28, Klf4, c-Myc, y SV40LT, por ejemplo, un grupo de Sox, Oct, Nanog, y opcionalmente Lin-28, un grupo de Sox, Oct, Klf4, y opcionalmente c-Myc, o una combinación de estos seis factores. En ciertos aspectos, para reducir el posible efecto tóxico de la expresión de c-Myc, se puede incluir el gen T grande de SV40 (SV40LT) con c-Myc. En ciertos aspectos, para mejorar adicionalmente la eficacia de reprogramación, se pueden usar mutantes, variantes u homólogos de Myc que son deficientes de transformación. Los ejemplos no limitantes incluyen un miembro de la familia de proto-oncogenes de Myc tal como LMYC (NM\_001033081), MYC con 41 aminoácidos delecionados en el extremo N-terminal (dN2MYC), o MYC con una mutación en el aminoácido 136 (W136E) (Nakagawa *et al.* 2010).

En ciertos aspectos, las células se pueden cultivar en una condición de reprogramación que tiene un medio de reprogramación que comprende inhibidores de la señalización como se describió anteriormente durante al menos o alrededor de 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días, o cualquier intervalo derivable de ello. La condición de reprogramación puede durar un periodo que incluye al menos de alrededor de un día a cinco días tras la introducción del elemento extracromosómico en las células somáticas. Los tiempos inicial y final se pueden seleccionar de 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días, o cualquier intervalo derivable de ello, tras la introducción, por ejemplo, de alrededor de un día a quince días tras la transfección de los elementos genéticos.

Tras la reprogramación, las células se pueden transferir a una condición de expansión que tiene un medio de expansión. El medio de expansión puede estar básicamente exento de inhibidor de GSK-3, inhibidor de MEK, e inhibidor de receptores de TGF- $\beta$  añadidos externamente. En ciertos aspectos, el medio de expansión puede tener uno o más de los inhibidores de la señalización y/o LIF. En ciertos aspectos, mediante el uso de esta condición de expansión, por ejemplo, un medio de cultivo de células ES o medio TeSR normal, se pueden obtener células iPS humanas similares a las células ES humanas.

En ciertos aspectos, los métodos pueden comprender además seleccionar las células iPS, por ejemplo, basándose en una o más características de las células embrionarias, tal como una morfología similar a las células ES. En un aspecto adicional, los métodos pueden comprender cultivar las células iPS seleccionadas en el medio de expansión.

45 Como ventaja adicional, las condiciones de cultivo descritas en la presente memoria, tal como la condición de reprogramación o la condición de expansión, pueden estar básicamente exentas de células de soporte. La condición exenta de células de soporte puede mejorar la aplicación industrial y terapéutica reduciendo la variabilidad y los efectos secundarios de las células de soporte. Por ejemplo, se puede usar un componente de la matriz en lugar de células de soporte. Para incrementar la reprogramación episómica en condiciones exentas de células de soporte, se pueden añadir inhibidores de la señalización y/o FGF al medio de reprogramación.

Para incrementar la eficacia de clonación de las células madre pluripotentes, el medio de reprogramación, el primer, o el segundo medio de expansión pueden comprender además un inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK) o inhibidor de miosina II, tal como HA-100 o blebistatina. Para sacar provecho adicional de la reprogramación episómica y/o aumentar la proliferación de las células reprogramadas, en ciertos aspectos, se puede añadir factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) al medio de reprogramación. El FGF o los inhibidores de la señalización añadidos externamente pueden estar en una cantidad de al menos, alrededor de o como máximo 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200 ng/ml, al menos, alrededor de, o como máximo 0,05, 0,1, 0,2, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  $\mu$ M, o cualquier intervalo derivable de ello, o cualquier concentración eficaz para mejorar la reprogramación episómica. En realizaciones específicas, se puede

usar una concentración elevada de FGF, por ejemplo, alrededor de 40 a 200 ng/ml, o más en particular, alrededor de 100 ng/ml.

5 En ciertos aspectos, el medio de reprogramación o el medio de expansión puede ser químicamente definido, tal como medio TeSR, medio de cultivo de células embrionarias humanas, o medio N2B27. En ciertos aspectos, el medio de reprogramación puede ser un medio básicamente exento de TGF $\beta$ , tal como el medio N2B27. El medio de expansión puede ser medio TeSR o medio mTeSR.

Por ejemplo, el inhibidor de GSK-3 puede ser CHIR99021; el inhibidor de MEK puede ser PD0325901; el inhibidor de receptores de TGF- $\beta$  puede ser A-83-01. También se puede proporcionar una población de células iPS producidas según los métodos anteriores.

10 En ciertos aspectos, las células de partida para los presentes métodos pueden comprender al menos o alrededor de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  células o cualquier intervalo derivable de ello. La población de células de partida puede tener una densidad de siembra de al menos o alrededor de  $10$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  células/ml, o cualquier intervalo derivable de ello.

15 Las realizaciones discutidas en el contexto de los métodos y/o composiciones de la invención se pueden emplear con respecto a cualquier otro método o composición descrita en la presente memoria. Así, una realización relacionada con un método o composición también se puede aplicar a otros métodos y composiciones de la invención.

20 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "codificar" o "que codifica", en referencia a un ácido nucleico, se usan para hacer la invención fácilmente entendible para el técnico experto; sin embargo, estas expresiones se pueden usar de manera intercambiable con "comprender" o "que comprende", respectivamente.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "un" o "uno" puede significar uno o más. Tal como se usa en la presente memoria en la(s) reivindicación(es), cuando se usa junto con las palabras "que comprende", las palabras "un" o "uno" pueden significar uno o más de uno.

25 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solamente a las alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción mantiene una definición que se refiere solamente a las alternativas y "y/o". Tal como se usa en la presente memoria, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

30 A lo largo de esta solicitud, la expresión "alrededor de" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

35 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debería entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración solamente, ya que serán evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

### Breve descripción de los dibujos

40 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva, y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

45 FIGs. 1A-1C. Mejora de la reprogramación episódica de fibroblastos de prepucio humanos con compuestos químicos pequeños. FIG. 1A. Vectores de reprogramación episódica. pEF: el promotor del factor 1 $\alpha$  de elongación eucariótico; pCMV: el promotor temprano inmediato de citomegalovirus. Los transgenes y otras características de los vectores se indican mediante los diferentes colores mostrados. FIG. 1B. Efecto de las diferentes combinaciones de compuestos químicos sobre la eficacia de la reprogramación episódica. Medio FF: medio de cultivo de fibroblastos de prepucio humanos; CM: medio de cultivo de células ES humanas previamente acondicionado con células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados. Se usó bFGF a una concentración final de 100 ng/ml. B: BIX01294 (1  $\mu$ M); P: PD0325901 (0,5  $\mu$ M); C: CHIR99021 (3  $\mu$ M); A: A-83-01 (0,5  $\mu$ M). Total: n $^\circ$  total de colonias de células iPS positivas a fosfatasa alcalina; Grandes: n $^\circ$  de buenas colonias de células iPS positivas a fosfatasa alcalina indiferenciadas de tamaño grande. FIG. 1C. Imágenes de una buena colonia de células iPS obtenida mediante reprogramación episódica en presencia de compuestos químicos. Izquierda: campo claro; derecha: tinción de fosfatasa alcalina.

55 FIGs. 2A-2B. Mejora de la reprogramación episódica de fibroblastos de prepucio humanos con compuestos químicos pequeños. FIG. 2A. Efecto de bFGF y las diferentes combinaciones de compuestos químicos sobre la eficacia de la reprogramación episódica. Medio FF: medio de cultivo de fibroblastos de prepucio humanos; CM:

medio de cultivo de células ES humanas previamente acondicionado con células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados. Se usó bFGF a una concentración final de 100 ng/ml. H: HA-100 (10  $\mu$ M); B: BIX01294 (1  $\mu$ M); P: PD0325901 (0,5  $\mu$ M); C: CHIR99021 (3  $\mu$ M); A: A-83-01 (0,5  $\mu$ M); L: hLIF (10 ng/ml). Total: n° total de colonias de células iPS positivas a fosfatasa alcalina; Grandes: n° de buenas colonias de células iPS positivas a fosfatasa alcalina indiferenciadas de tamaño grande. FIG. 2B. Tiempo de tratamiento con compuestos químicos sobre la eficacia de la reprogramación episómica. Se usó CM complementado con bFGF (100 ng/ml) y HA-100 (10  $\mu$ M) en el cultivo de reprogramación.

FIGs. 3A-3D. Se pueden obtener diferentes células iPS a partir del cultivo de reprogramación episómica tratado con compuestos químicos. FIG. 3A. Imágenes de células H1 ES humanas diferenciadas (p44) y células iPS similares a las células ES humanas normales (p20, obtenidas de fibroblastos de prepucio humanos mediante reprogramación episómica en ausencia de tratamiento químico) tras 5 días de cultivo en CM (medio de cultivo de células ES humanas previamente acondicionado con células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados) complementado con PD0325901 (0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (3  $\mu$ M), A-83-01 (0,5  $\mu$ M) y hLIF (10 ng/ml). FIG. 3B. Imagen de campo claro de células iPS similares a las células ES humanas normales obtenidas a partir de una biopsia cutánea de adulto de 42 años con reprogramación episómica en presencia de PD0325901 (0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (3  $\mu$ M) y A-83-01 (0,5  $\mu$ M). Los compuestos químicos se eliminaron 3 días antes de la recogida de las colonias (día 23 tras la nucleofección). Las colonias de células iPS se recogieron y se expandieron en células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) irradiados en medio de cultivo de células ES humanas complementado con bFGF (100 ng/ml) en ausencia de los compuestos químicos. FIG. 3C. Imagen de campo claro de una etapa intermedia de células iPS (piPSC para las iPSCs parcialmente reprogramadas) obtenidas a partir de fibroblastos de prepucio humanos con reprogramación episómica en presencia de PD0325901 (0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (3  $\mu$ M), A-83-01 (0,5  $\mu$ M) y hLIF (10 ng/ml). Los compuestos químicos estuvieron presentes a lo largo del cultivo de reprogramación. Las colonias de células piPSC se recogieron y se expandieron en células de soporte MEF en CM complementado con PD0325901 (0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (3  $\mu$ M), A-83-01 (0,5  $\mu$ M) y hLIF (10 ng/ml). FIG. 3D. Imagen de campo claro de un agrupamiento en forma de roseta (diferenciación neuronal) de células piPSC cultivadas en medio de cultivo de células ES humanas complementado con bFGF (100 ng/ml) tras la retirada de los compuestos químicos.

FIGs. 4A-4B. Reprogramación episómica en medio definido complementado con compuestos químicos. FIG. 4A. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la reprogramación episómica en presencia de PD0325901 (0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (3  $\mu$ M), A-83-01 (0,5  $\mu$ M) y hLIF (10 ng/ml). Medio FF: medio de cultivo de fibroblastos de prepucio humanos; CM: medio de cultivo de células ES humanas previamente acondicionado con células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados. Se usó bFGF a una concentración final de 100 ng/ml. H: HA-100 (10  $\mu$ M); B: BIX01294 (1  $\mu$ M); P: PD0325901 (0,5  $\mu$ M); C: CHIR99021 (3  $\mu$ M); A: A-83-01 (0,5  $\mu$ M); L: hLIF (10 ng/ml). Total: n° total de colonias de células iPS positivas a fosfatasa alcalina; Grandes: n° de buenas colonias de células iPS positivas a fosfatasa alcalina indiferenciadas de tamaño grande. FIG. 4B. Esquema del proceso de reprogramación de tres etapas para la obtención de células piPSC y células iPS similares a las células ES humanas.

FIGs. 5A-5C. Mejora de la eficacia de reprogramación episómica con moléculas pequeñas. FIG. 5A. Efecto de PD0325901 (P, 0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (C, 3  $\mu$ M), A-83-01 (A, 0,5  $\mu$ M), hLIF (L, 1000 U/ml) y HA-100 (H, 10  $\mu$ M) sobre la reprogramación episómica. FIG. 5B. Necesidad temporal del tratamiento con moléculas pequeñas para una reprogramación episómica mejorada. Se colocaron en placas fibroblastos de prepucio humanos transfectados en células de soporte MEF. Se usó un medio de ESCs humanas acondicionado con MEF complementado con 100 ng/ml de bFGF (CM100) y moléculas pequeñas para mantener la reprogramación. Las colonias de iPSCs positivas a fosfatasa alcalina se contaron en el día 22-23 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar (e.e.m.) (n=3). FIG. 5C. Diferenciación de las iPSCs (p3) recién obtenidas en presencia de moléculas pequeñas. Cuando se recogieron y se expandieron en medio de ESCs humanas o medio de ESCs humanas acondicionado con MEF complementado con moléculas pequeñas en células de soporte MEF, las iPSCs obtenidas con la presencia continua de las moléculas pequeñas exhibieron una diferenciación considerable. La adición de bFGF al medio de cultivo no tuvo efecto. Flecha negra: colonias de iPSCs indiferenciadas; flechas blancas: colonias diferenciadas. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

FIGs. 6A-6D. Desarrollo de condiciones exentas de células de soporte para la reprogramación episómica. FIG. 6A. Efecto de las células de soporte MEF, Matrigel™ y los medios de cultivo sobre la reprogramación episómica. Se colocaron fibroblastos de prepucio humanos transfectados (p6) en placas de 10 cm sembradas con células de soporte MEF o revestidas con Matrigel™, y se sometieron a diferentes condiciones de cultivo de reprogramación. Las colonias positivas a fosfatasa alcalina (AP<sup>+</sup>) se contaron en el día 18 - 21 tras la transfección. El número de colonias AP<sup>+</sup> fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. (n=3). N2B27: medio DMEM/F12 complementado con N-2 y B-27; N2B27-100: Medio N2B27 complementado con 100 ng/ml de bFGF. \* marca las piPSCs. FIG. 6B. Imágenes de campo claro de una colonia de piPSCs del ensayo 2 y una colonia de iPSCs similares a ESCs humanas de los ensayos 1, 3 y 4. Barras de escala: 100  $\mu$ m. FIG. 6C. Análisis de RT-PCR cuantitativa de la expresión de OCT4 y NANOG en los clones de piPSCs 1 a 4 (p3). Total: expresión endógena y de transgenes. Se usaron H1 ESCs humanas (H1ESC, p32) como control. Los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. (n=3). FIG. 6D. Necesidad temporal del tratamiento con moléculas pequeñas para la reprogramación episómica exenta de células de soporte mediante el uso de medios de cultivo definidos. Se colocaron fibroblastos de prepucio

humanos transfectados (p7) en placas de 10 cm revestidas con Matrigel™. Se usó el medio N2B27-100 complementado con PCALH para mantener la reprogramación durante diferentes ventanas de tiempo (etapa 2), seguido de mTeSR1 para la expansión. Las colonias de iPSCs positivas a fosfatasa alcalina se contaron en el día 22 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. (n=3).

FIGs. 7A-7F. Caracterización de iPSCs obtenidas en condiciones exentas de células de soporte con medios definidos. FIG. 7A. Imagen de campo claro de iPSCs obtenidas de fibroblastos cutáneos de adulto humano (clon 2 de iPS(SK46)). Barra de escala: 100  $\mu$ m. FIG. 7B. Análisis de cromosomas de bandas G del clon 2 de iPS(SK46) (p17). FIG. 7C. Análisis mediante PCR de vectores de reprogramación en iPSCs. E: ADN episómico; G: ADN genómico; NF: fibroblastos de prepucio neonatales (p5); clon 1 a 3 de iPSF7: iPSCs obtenidas de fibroblastos de prepucio neonatales (p26); AF: fibroblastos cutáneos de adulto (p6); clon 1 a 3 de iPS(SK46): iPSCs obtenidas de fibroblastos cutáneos de adulto (p22). Se usaron piPSCs obtenidas de fibroblastos de prepucio humanos (p4) como controles. *T-OCT4*: transgén *OCT4*; *T-SOX2*: transgén *SOX2*; *T-NANOG*: transgén *NANOG*; *T-LIN28*: transgén *LIN28*; *T-c-MYC*: transgén *c-MYC*; *T1-KLF4*: transgén *KLF4* (1); *T2-KLF4*: transgén *KLF4* (2); *T-SV40LT*: transgén *SV40LT*; *OCT4*: *OCT4* endógeno. Se usaron 32 ciclos de PCR para todos los grupos de cebadores. FIG. 7D. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión de *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *LIN28* endógenos en los clones de iPSCs. Los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. (n=3). FIG. 7E. Análisis mediante secuenciación con bisulfito del estado de metilación de los promotores *OCT4* y *NANOG* en los clones de iPSCs. Los círculos claros indican dinucleótidos CpG sin metilar, y los círculos oscuros indican dinucleótidos CpG metilados. FIG. 7F. Tinción de hematoxilina y eosina de cortes de teratomas del clon 2 de iPSC(SK46). Los teratomas se obtuvieron a partir de todos los clones de iPSCs. Panel izquierdo: tejido neuronal (ectodermo); panel medio: cartílago (mesodermo); panel derecho: epitelio intestinal (endodermo). Barras de escala: 100  $\mu$ m.

FIGs. 8A-8C. Efecto de las diferentes combinaciones de vectores de reprogramación episómica sobre la obtención de iPSCs a partir de diferentes tipos de células somáticas en presencia de moléculas pequeñas. FIG. 8A. Reprogramación de fibroblastos de prepucio humanos con vectores episómicos. Se colocaron fibroblastos de prepucio humanos transfectados (HFFs, p6) en placas de 10 cm revestidas con Matrigel™ en medio de cultivo de fibroblastos de prepucio. Se usó medio N2B27-100 complementado con PD0325901 (P, 0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (C, 3  $\mu$ M), A-83-01 (A, 0,5  $\mu$ M), hLIF (L, 1000 U/ml) y HA-100 (H, 10  $\mu$ M) (PCALH) para mantener la reprogramación entre los días 1 y 13 tras la transfección, seguido de mTeSR1 entre los días 14 y 21 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar (e.e.m.) (n=3). 7F-1 (pEP4EO2SCK2MEN2L y pEP4EO2SET2K); 7F-2 (pEP4EO2SEN2K, pCEP4-M2L y pEP4EO2SET2K); 5F (pEP4EO2SEN2L y pEP4EO2SET2N). Se muestran todas las cartografías de los vectores en la FIG. 12. FIG. 8B. Reprogramación de células madre obtenidas de tejido adiposo (AdSCs) con vectores episómicos. Se cultivaron AdSCs (Zenbio, Research Triangle Park, NC) en medio de cultivo MesenCult®-XF (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, V5Z 1B3, Canadá) complementado con Glutamax 1 x (Invitrogen) en placas de 10 cm revestidas con colágeno I humano (60  $\mu$ g por placa de 10 cm, STEMCELL Technologies Inc.) y fibronectina (18  $\mu$ g por placa de 10 cm, Invitrogen). Las AdSCs transfectadas (p9, Amaxa VPE-1001 con el programa A-33) se colocaron en placas de 10 cm revestidas con Matrigel™ en medio de cultivo de AdSC. Se usó el medio N2B27-100 complementado con PCALH para mantener la reprogramación entre los días 2 y 13 tras la transfección, seguido de mTeSR1 entre los días 13 y 21 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,35 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar (e.e.m.) (n=2). FIG. 8C. Reprogramación de células CD34<sup>+</sup> obtenidas de sangre de cordón (CB) con vectores episómicos. Antes de la transfección, se cultivaron células CD34<sup>+</sup> obtenidas de CB (STEMCELL Technologies Inc.) durante 4 días en una placa de 6 pocillos revestidos con fibronectina en medio de expansión de células CD34<sup>+</sup> de CB: StemSpan SFEM (STEMCELL Technologies Inc.) complementado con complemento de medio ExCyte 1 x (Millipore, Billerica, MA), Glutamax 1 x, 250 ng/ml de SCF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 250 ng/ml de FLT3L (Peprotech), 100 ng/ml de TPO (Peprotech), 20 ng/ml de IL-3 (Peprotech), 50 ng/ml de IL-6 (Peprotech) y 10 ng/ml de sIL6-R (Peprotech). Las células de CB transfectadas (Amaxa VPA-1003 con el programa T-16) se colocaron en placas de 6 pocillos revestidas con fibronectina/Matrigel™ en medio de expansión de células CD34<sup>+</sup> de CB. Se usó el medio N2B27-100 complementado con PCALH para mantener la reprogramación entre los días 2 y 11 tras la transfección, seguido de mTeSR1 entre los días 11 y 17 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales (después de 4 días de cultivo). Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar (e.e.m.) (n=3).

FIG. 9. Reprogramación episómica mejorada con MYC deficiente de transformación en presencia de moléculas pequeñas. Se usó una combinación del vector episómico 7F-2 para la obtención de iPSCs. Se sustituyó c-Myc en el vector pCEP4-M2L con MYC deficiente de transformación: LMYC (NM\_001033081), MYC con 41 aminoácidos deletionados en el extremo N-terminal (dN2MYC), o MYC con una mutación en el aminoácido 136 (W136E) (Nakagawa *et al.*, 2010). Se colocaron fibroblastos de prepucio humanos transfectados (HFFs, p9) en placas de 10 cm revestidas con Matrigel™ en medio de cultivo de fibroblastos de prepucio. Se usó medio N2B27-100 complementado con PD0325901 (P, 0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (C, 3  $\mu$ M), A-83-01 (A, 0,5  $\mu$ M), hLIF (L, 1000 U/ml) y HA-100 (H, 10  $\mu$ M) (PCALH) para mantener la reprogramación entre los días 2 y 13 tras la transfección, seguido de mTeSR1 entre los días 14 y 20 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  error estándar (e.e.m.) (n=3).

- FIGS. 10A-10C. Desarrollo de condiciones exentas de células de soporte para la reprogramación episómica. FIG. 10A. Análisis de la expresión mediante citometría de flujo de marcadores de la superficie celular específicos de ESCs humanas (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81) y un marcador de fibroblastos CD44 en piPSCs (p6). Claro: control de isotipo; oscuro: tinción del antígeno. FIG. 10B. Análisis mediante PCR de los vectores de reprogramación en el ADN episómico aislado de piPSCs (p7). Carril 1: transgén *OCT4* (*T-OCT4*); Carril 2: transgén *NANOG* (*T-NANOG*); Carril 3: transgén *KLF4* (1) (*T1-KLF4*); Carril 4: transgén *KLF4* (2) (*T2-KLF4*); Carril 5: transgén *SV40LT* (*T-SV40LT*); Carril 6: transgén *SOX2* (*T-SOX2*); Carril 7: transgén *LIN28* (*T-LIN28*); Carril 8: transgén *c-MYC* (*T-c-MYC*); Carril 9: *OCT4* endógeno (*OCT4*). FIG. 10C. Necesidad temporal del tratamiento con moléculas pequeñas para la reprogramación episómica exenta de células de soporte mediante el uso de mTeSR1. Se colocaron fibroblastos de prepucio humanos transfectados (p7) en placas de 10 cm revestidas con Matrigel™. Se usó mTeSR1 complementado con moléculas pequeñas (PCALH) para mantener la reprogramación durante diferentes ventanas de tiempo (etapa 2) seguido de mTeSR1 sin moléculas pequeñas para la expansión. Las colonias de iPSCs positivas a fosfatasa alcalina se contaron en el día 22 tras la transfección. El número de colonias de iPSCs fue de  $\sim 0,33 \times 10^6$  células iniciales. Los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. (n=3).
- FIGS. 11A-11E. Caracterización de iPSCs obtenidas en condiciones exentas de células de soporte con medios definidos. FIG. 11A. Imagen de campo claro de iPSCs obtenidas de fibroblastos de prepucio humanos (clon 1 de iPSF7). Barra de escala: 100  $\mu$ m. FIG. 11B. Análisis de cromosomas de bandas G del clon 1 de iPSF7 (p18). FIG. 11C. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de transgenes en clones de iPSCs. NF: fibroblastos de prepucio neonatales (p5); clon 1 a 3 de iPSF7: iPSCs obtenidas de fibroblastos de prepucio neonatales (p26); AF: fibroblastos cutáneos de adulto (p6); clon 1 a 3 de iPS(SK46): iPSCs obtenidas de fibroblastos cutáneos de adulto (p22). Se usaron H1ESC (p32) y piPSC (p4) obtenidas de fibroblastos de prepucio humanos como controles. T-OCT4: transgén *OCT4*; T-SOX2: transgén *SOX2*; T-NANOG: transgén *NANOG*; T-LIN28: transgén *LIN28*; T-c-MYC: transgén *c-MYC*; T1-KLF4: transgén *KLF4* (1); T2-KLF4: transgén *KLF4* (2); T-SV40LT: transgén *SV40LT*; OCT4: *OCT4* endógeno; GAPDH: control endógeno. Se usaron 32 ciclos de PCR para todos los grupos de cebadores excepto para T-OCT4 (30 ciclos). FIG. 11D. Análisis de la expresión mediante citometría de flujo de marcadores de la superficie celular específicos de ESCs humanas (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81) y el marcador enriquecido en fibroblastos CD44. Claro: control de isotipo; oscuro: tinción del antígeno. FIG. 11E. Tinción de hematoxilina y eosina de cortes de teratomas del clon 1 de iPSF7. Panel superior: tejido neuronal (ectodermo); panel medio: cartílago (mesodermo); panel inferior: epitelio intestinal (endodermo). Barras de escala: 100  $\mu$ m.
- FIG. 12. Vectores de reprogramación episómica. Un detalle de los componentes genéticos de los vectores de reprogramación episómica. pEF: el promotor del factor 1 $\alpha$  de elongación eucariótico; pCMV: el promotor temprano inmediato de citomegalovirus; IRES2: sitio interno de entrada al ribosoma; SV40 pA: señal de poliadenilación del virus vacuolar de simio 40; oriP: origen de replicación de EBV; EBNA-1: antígeno nuclear 1 de EBV; Amp: casete de selección de resistencia bacteriana a ampicilina; origen pUC: origen de replicación bacteriano; Oct4: factor de transcripción Octámero 4; Sox2: factor de transcripción Sox2; c-Myc: factor de transcripción c-Myc; Klf4: modulador transcripcional del factor similar a Kreuppel; SV40LT: gen T grande de SV40; Nanog: factor de transcripción *NANOG*; Lin28: proteína de unión al mRNA Lin28.

## Descripción de las realizaciones ilustrativas

### I. Introducción

- La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que se pueden usar inhibidores de la señalización intracelular para mejorar la eficacia y la cinética de reprogramación episómica cultivando las células reprogramadas en presencia de un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, y un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ . Aunque se ha informado que la reprogramación retroviral de fibroblastos humanos se mejoró mediante el uso de un cóctel químico que incluía un inhibidor de MEK y un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$  (Lin *et al.*, 2009), la reprogramación retroviral (que incluye la lentiviral) es fundamentalmente diferente de la reprogramación episómica por la integración en el genoma de los elementos de los vectores retrovirales y la expresión persistente de transgenes de los elementos integrados de los vectores. Por ejemplo, como se demuestra en los Ejemplos, la reprogramación episómica en presencia de una combinación de estos tres inhibidores dio como resultado una eficacia de reprogramación inesperadamente elevada en comparación con aquella en presencia de un inhibidor de MEK y un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , que solamente tiene un aumento mínimo sobre el valor inicial.

- El uso de un vector episómico en la práctica de ciertos aspectos de la presente invención tiene varias ventajas sobre los vectores que se integran en el genoma. En primer lugar, reduce el trasfondo de alteraciones fenotípicas irrelevantes que se dan como resultado de integraciones aleatorias en el ADN. En segundo lugar, los episomas reducen la posibilidad de mutagénesis por inserción, que podría conducir a la formación de tumores. En tercer lugar, la replicación de los vectores episómicos puede dar como resultado la pérdida gradual de los elementos de vectores exógenos, lo que deja a las células con una modificación genética exógena mínima. Sin embargo, la baja eficacia de reprogramación ha obstaculizado el uso de los vectores episómicos en la reprogramación de células somáticas, lo que se podría abordar mediante ciertos aspectos de la presente invención.

- En aspectos adicionales, se han desarrollado métodos para producir células iPS con aplicaciones industriales y clínicas mejoradas. El método puede implicar el uso de una condición exenta de células de soporte para producir



células iPS básicamente exentas de elementos genéticos exógenos y, por lo tanto, evitar los problemas provocados por la persistencia o los efectos mutagénicos de los elementos genéticos exógenos y la variabilidad o los efectos indeseados de las células de soporte.

5 También se describen más adelante los avances adicionales en la composición y los métodos para la producción de poblaciones de células iPS.

## II. Definiciones

Una "célula primaria", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una célula obtenida directamente a partir de un organismo vivo o a la progenie de la misma sin establecerla o inmovilizarla en una línea celular. Una "célula primaria humana" se refiere a una célula primaria obtenida a partir de un sujeto humano vivo.

10 Las "células madre embrionarias (ES)" son células madre pluripotentes obtenidas de embriones tempranos. Se estableció una célula ES por primera vez en 1981, lo que también se ha aplicado a la producción de ratones con genes inactivados desde 1989. En 1998 se estableció una célula ES humana, lo cual ya está disponible en la actualidad para la medicina regenerativa.

15 Las "células madre pluripotentes inducidas", habitualmente abreviadas como células iPS o iPSCs, se refieren a un tipo de célula madre pluripotente preparada de manera artificial a partir de una célula que no es pluripotente, en general una célula somática de adulto, o célula diferenciada de manera terminal, tal como fibroblasto, una célula hematopoyética, un miocito, una neurona, una célula epidérmica, o similares, mediante reprogramación.

20 La "pluripotencia" se refiere a una célula madre que tiene la capacidad de diferenciarse hasta todas las células que constituyen uno o más tejidos u órganos, o, preferiblemente, cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (recubrimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital), o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las "células madre pluripotentes" usadas en la presente memoria se refieren a células que se pueden diferenciar hasta células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales, por ejemplo, descendientes directos de células totipotentes, células madre embrionarias, o células pluripotentes inducidas.

25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula somática" se refiere a cualquier célula distinta de las células germinales, tal como un óvulo, un espermatozoide, o similares, que no transfieren directamente su ADN a la siguiente generación. En general, las células somáticas tienen una pluripotencia limitada o nula. Las células somáticas usadas en la presente memoria pueden ser naturales o genéticamente modificadas.

30 La "reprogramación" es un proceso que confiere a una célula una capacidad incrementada medible de formar una progenie de al menos un tipo celular nuevo, en cultivo o *in vivo*, respecto de la que tendría en las mismas condiciones sin la reprogramación. De manera más específica, la reprogramación es un proceso que confiere a una célula somática un potencial pluripotente. Esto significa que, tras una proliferación suficiente, una proporción medible de la progenie tiene las características fenotípicas del tipo celular nuevo si básicamente no se pudiera formar tal progenie antes de la reprogramación; de otra forma, la proporción que tiene las características del tipo celular nuevo es mayor de manera medible que antes de la reprogramación. En ciertas condiciones, la proporción de progenie con características del tipo celular nuevo puede ser al menos alrededor del 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 25% o más en orden de preferencia creciente.

35 Las células están "sustancialmente exentas" de elementos de vectores o elementos genéticos exógenos, tal como se usa en la presente memoria, cuando tienen menos del 10% de el/los elemento(s), y están "básicamente exentas" de elementos de vectores o elementos genéticos exógenos cuando tienen menos del 1% de el/los elemento(s). Sin embargo, son aún más deseables las poblaciones de células en las que menos del 0,5% o menos del 0,1% de la población total de células comprende elementos de vectores o elementos genéticos exógenos. Los medios están "básicamente exentos" de ciertos reactivos, tales como inhibidores de MEK, inhibidores de GSK, inhibidores de receptores de TGF- $\beta$ , LIF, cuando el medio tiene un nivel de estos reactivos menor de un nivel detectable mediante el uso de los métodos de detección convencionales conocidos para una persona de experiencia habitual en la técnica.

40 El término "exógeno", cuando se usa con relación a una proteína, gen, ácido nucleico, polinucleótido, elementos genéticos, o elementos de vectores en una célula u organismo, se refiere a una proteína, gen, ácido nucleico, polinucleótido, elemento genético o elemento de vector que se ha introducido en la célula u organismo mediante medios artificiales o naturales, o con relación a una célula, se refiere a una célula que se aisló y posteriormente se introdujo en otras células o en un organismo mediante medios artificiales o naturales. Un ácido nucleico exógeno puede ser de un organismo o célula diferente, o puede ser una o más copias adicionales de un ácido nucleico que se da de manera natural dentro del organismo o célula. Una célula exógena puede ser de un organismo diferente, o puede ser del mismo organismo. A modo de ejemplo no limitante, un ácido nucleico exógeno está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o está flanqueado de otra manera por una secuencia de ácido nucleico diferente de la que se halla en la naturaleza.

55 Un "origen de replicación" ("ori") es una secuencia de ADN, p.ej., en un herpesvirus linfotrópico, que cuando está

5 presente en un plásmido en una célula es capaz de mantener las secuencias unidas en el plásmido, y/o un sitio en o cerca de donde se inicia la síntesis del ADN. Un ori para EBV incluye secuencias FR (20 copias imperfectas de una repetición de 30 pb), y preferiblemente secuencias DS, sin embargo, otros sitios del EBV se unen a EBNA-1, p.ej., las secuencias Rep\* pueden sustituir a DS como origen de replicación (Kirchmaier y Sugden, 1998). Así, un origen de replicación de EBV incluye secuencias FR, DS o Rep\* o cualquier secuencia funcionalmente equivalente por medio de modificaciones del ácido nucleico o la combinación sintética derivada de ello. Por ejemplo, la presente invención puede usar también un origen de replicación genéticamente modificado de EBV, tal como mediante la inserción o mutación de elementos individuales, como se describió específicamente en Lindner *et al.* (2008).

10 Un herpesvirus "linfotrópico" es un herpesvirus que se replica en un linfoblasto (p.ej., un linfoblasto B humano) u otros tipos de células, y se replica de manera extracromosómica durante al menos una parte de su ciclo vital natural. Después de infectar a un hospedador, estos virus infectan de manera latente al hospedador manteniendo el genoma viral en forma de un plásmido. El virus herpes simplex (HSV) no es un herpesvirus "linfotrópico". Los herpesvirus linfotrópicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, EBV, herpesvirus de sarcoma de Kaposi (KSHV), Herpesvirus saimiri (HS) y virus de la enfermedad de Marek (MDV).

15 Un "vector" o "construcción" (a veces denominado "vehículo" de administración génica o de transferencia génica) se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprende un polinucleótido a administrar a una célula hospedadora, *in vitro* o *in vivo*.

20 Un "plásmido", un tipo habitual de vector, es una molécula de ADN extracromosómica diferente del ADN cromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. En ciertos casos, es circular y bicatenario.

Un "molde", tal como se usa en la presente memoria, es una molécula de ADN o ARN que contiene un origen de replicación. Un "molde integrado" es uno que se mantiene de manera estable en el genoma de la célula, p.ej., integrado en un cromosoma de esa célula. Un "molde extracromosómico" es uno que se mantiene de manera estable en una célula, pero que no está integrado en el cromosoma.

25 "Construcción de expresión" o "casete de expresión" significa una molécula de ácido nucleico que es capaz de dirigir la transcripción. Una construcción de expresión incluye, como mínimo, un promotor o una estructura funcionalmente equivalente a un promotor. También se pueden incluir elementos adicionales, tales como un potenciador, y/o una señal de terminación de la transcripción. Una molécula de ácido nucleico puede ser ADN o ARN.

30 La expresión "corresponde a" se usa en la presente memoria para significar que una secuencia polinucleotídica es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a la totalidad o una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. En contraposición, la expresión "complementario a" se usa en la presente memoria para significar que la secuencia complementaria es homóloga a la totalidad o una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia. Como ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC", y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

### III. Células iPS

40 Las células madre pluripotentes inducidas, habitualmente abreviadas como células iPS o iPSCs, son un tipo de células madre pluripotentes obtenidas de manera artificial de una célula que no es pluripotente, en general una célula somática de adulto. Se cree que las células madre pluripotentes inducidas son similares, si no idénticas, a las células madre pluripotentes naturales, tales como las células madre embrionarias, en muchos aspectos, tal como en cuanto a la expresión de ciertos genes y proteínas de las células madre, patrones de metilación de la cromatina, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, formación de teratomas, formación de quimeras viables, y potencia y diferenciabilidad, pero todavía se está estudiando el grado completo de su relación con las células madre pluripotentes naturales.

45 Se desea la generación de células pluripotentes inducidas obtenidas de tejido humano que no sea de origen embrionario para reducir las preocupaciones éticas relacionadas con el uso experimental de embriones y de tejido embrionario. Se ha promocionado la promesa de las aplicaciones terapéuticas de las células pluripotentes inducidas. Las aplicaciones médicas incluyen los tratamientos para la enfermedad de Alzheimer, la diabetes y las lesiones de la médula espinal, por nombrar algunas. Otras aplicaciones incluyen la modelización de enfermedades y el cribado farmacológico.

50 Las células iPS se produjeron por primera vez en 2006 (Takahashi *et al.*, 2006) a partir de células de ratón, y en 2007 a partir de células humanas (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Esto se ha citado como un avance importante en la investigación de las células madre, ya que puede permitir a los investigadores obtener células madre pluripotentes, que son importantes en investigación y tienen potencialmente uso terapéutico, sin el uso controvertido de embriones. La primera demostración con éxito de generar células pluripotentes inducidas (células iPS) a partir de tejido de ratón o humano implicó el uso de vectores retrovirales que expresaban un grupo específico de factores de transcripción. La investigación en los laboratorios de James Thomson y Shinya Yamanaka ha demostrado que la introducción de factores de transcripción específicos mediante vectores retrovirales en

fibroblastos de ratón o humanos es suficiente para reprogramar esas células hasta células madre pluripotentes indiferenciadas. Los factores usados por Thomson incluyen Oct4, Sox2, Nanog y Lin28. Los factores usados por Yamanaka incluyen Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. La reprogramación por medio de cualquiera de los dos grupos de genes se lleva a cabo mediante la integración en el genoma de la célula hospedadora y la expresión de los factores de transcripción. Oct4 y Sox2 parecen ser factores de transcripción esenciales necesarios para la reprogramación. La eficacia de la reprogramación es baja, con frecuencias en el intervalo de 0,01 - 0,02% de la población de células de partida.

Para mejorar los métodos de reprogramación actuales, en ciertas realizaciones de la invención, se describen métodos de reprogramación de células somáticas introduciendo factores de reprogramación en las células somáticas con elementos genéticos extracromosómicos, seguido del cultivo en un medio de reprogramación que comprende uno o más inhibidores de la señalización como se describió anteriormente. La progenie de estas células podría ser idéntica a las células madre embrionarias en diversos aspectos, como se describe más adelante, pero podrían estar básicamente exentas de elementos genéticos exógenos.

Las células madre embrionarias originales (células ES) son células madre pluripotentes derivadas de la masa de células internas del blastocisto, un embrión en una etapa temprana. Las células ES se distinguen por dos propiedades distintivas: su pluripotencia y su capacidad de auto-renovarse indefinidamente. Las células ES son pluripotentes, es decir, son capaces de diferenciarse hasta todos los derivados de las tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo, y mesodermo. Además, en condiciones definidas, las células madre embrionarias son capaces de propagarse indefinidamente. Esto permite que las células madre embrionarias se empleen como herramientas útiles para la investigación y la medicina regenerativa, debido a que se puede producir un número ilimitado de ellas para la investigación continua o el uso clínico.

Sin embargo, existen diferencias notables entre las células ES de ratón y humanas. Se halló que las células ES humanas, cuando fueron descubiertas por James Thomson, eran diferentes de las células ES de ratón en su potencia y en sus condiciones de cultivo, notables por ser completamente insensibles a LIF (un elemento necesario en el cultivo de células ES de ratón), lo que es el resultado de una ruta inactiva del factor inhibidor de leucemia en las células ES humanas. Las células iPS humanas existentes son similares a las células ES humanas a este respecto, y por lo tanto se podrían denominar células iPS similares a las células ES humanas.

#### IV. Elementos genéticos extracromosómicos para la reprogramación

La inducción de células madre pluripotentes a partir de células somáticas humanas se ha alcanzado mediante el uso de retrovirus o vectores lentivirales para la expresión ectópica de los genes de reprogramación. Los retrovirus recombinantes, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, tienen la capacidad de integrarse en el genoma del hospedador de una manera estable. Contienen una transcriptasa inversa que permite la integración en el genoma del hospedador. Los lentivirus son una subclase de retrovirus. Se adaptan de manera generalizada como vectores gracias a su capacidad de integrarse en el genoma de las células que no están en división, así como en las células en división. El genoma viral en forma de ARN se transcribe inversamente cuando el virus entra en la célula para producir ADN, que se inserta después en el genoma en una posición aleatoria mediante la enzima integrasa viral. Por lo tanto, la tecnología actual de reprogramación eficaz depende de las aproximaciones virales basadas en la integración.

Sin embargo, con la presente tecnología, la integración deseada todavía no es rutinaria (Bode *et al.*, 2000), y la alternativa convencional, la integración aleatoria, puede conducir a mutagénesis por inserción con consecuencias impredecibles en las células madre pluripotentes inducidas. Por las mismas razones, no se puede controlar la expresión del transgén, ya que depende del contexto de la cromatina del sitio de integración (Baer *et al.*, 2000). Solamente se puede alcanzar un nivel elevado de expresión en loci genómicos favorables, pero existe el peligro de que la integración en sitios de expresión elevada interfiera con las funciones celulares vitales de las células madre pluripotentes inducidas.

Además, hay pruebas crecientes de la existencia de mecanismos de defensa celular contra el ADN exógeno que funcionan inhibiendo transgenes en un proceso que va acompañado por la metilación del ADN (Bingham, 1997, Garrick *et al.*, 1998). Además, los componentes virales pueden actuar junto con otros factores para transformar las células. Acompañada por la expresión continua de varios genes virales, la persistencia de al menos parte del genoma viral dentro de la célula puede provocar la transformación de la célula. Estos genes pueden interferir con una ruta de señalización de la célula, lo que provoca los cambios fenotípicos observados de la célula, lo que conduce a que una célula transformada muestre una división celular incrementada, que es favorable para el virus.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención desarrolla métodos nuevos para generar células madre pluripotentes inducidas básicamente exentas de elementos genéticos exógenos, tales como los elementos de vectores retrovirales o lentivirales usados en los métodos previos. Estos métodos de la presente invención hacen uso de vectores que se replican de manera extracromosómica, o vectores capaces de replicarse de manera episómica (véase la Solicitud de EE.UU. N° 12/478.154, incorporada en la presente memoria como referencia), en combinación con el cultivo de las células reprogramadas en presencia de inhibidores de la señalización celular para conseguir una eficacia y cinética de reprogramación óptimas.

Varios virus de ADN, tales como adenovirus, virus vacuolar de simio 40 (SV40), papiloma virus bovino (BPV), o plásmidos que contienen ARS (secuencias de replicación autónoma) en levaduras en gemación se replican de manera extracromosómica en las células de mamífero. Estos plásmidos episómicos están intrínsecamente exentos de todas estas desventajas (Bode *et al.*, 2001) asociadas a los vectores de integración. Un sistema basado en herpesvirus linfotrópico, que incluye el virus de Epstein Barr (EBV), se puede replicar también de manera extracromosómica y ayudar a administrar los genes de reprogramación a las células somáticas.

Por ejemplo, la aproximación basada en un vector episómico usada en la invención extrae elementos robustos necesarios para la replicación y el mantenimiento eficaz de un sistema basado en elementos de EBV sin comprometer la facilidad de manejo del sistema en un entorno clínico, como se describe con detalle más adelante. Los elementos de EBV útiles son OriP y EBNA-1, o sus variantes o equivalentes funcionales. Una ventaja adicional de este sistema es que estos elementos exógenos se perderán con el tiempo tras haberlos introducido en las células, lo que conduce a células iPS automantenidas básicamente exentas de estos elementos.

#### A. Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr (EBV), también denominado herpesvirus humano 4 (HHV-4), es un virus de la familia herpes (que incluye el virus Herpes simplex y Citomegalovirus), y es uno de los virus más habituales en humanos. El EBV mantiene su genoma de manera extracromosómica y funciona en colaboración con la maquinaria de la célula hospedadora para su replicación y mantenimiento eficaz (Lindner y Sugden, 2007), y depende únicamente de dos características esenciales para su replicación y su retención dentro de las células durante la división celular (Yates *et al.* 1985; Yates *et al.* 1984). Un elemento, denominado habitualmente *oriP*, existe en *cis* y sirve como origen de replicación. El otro factor, EBNA-1, funciona en *trans* mediante la unión a secuencias de *oriP* para favorecer la replicación y el mantenimiento del ADN del plásmido. Como ejemplo no limitante, ciertos aspectos de la invención extraen estas dos características y las usan en el contexto de un vector para trasladar los genes necesarios para reprogramar las células somáticas, para facilitar la replicación y la expresión mantenida de estos genes respecto de los plásmidos convencionales.

#### B. Origen de replicación

En ciertos aspectos, se puede usar un origen de replicación de EBV, *OriP*. *OriP* es el sitio en el que o cerca del cual se inicia la replicación del ADN, y está compuesto de dos secuencias que actúan en *cis* a una distancia de aproximadamente 1 kilobase, conocidas como la familia de repeticiones (FR) y la simetría binaria (DS).

FR está compuesta de 21 copias imperfectas de una repetición de 30 pb y contiene 20 sitios de unión de EBNA-1 de afinidad elevada. Cuando FR se une a EBNA-1, sirve como potenciador transcripcional de promotores en *cis* hasta una distancia de 10 kb (Reisman y Sugden, 1986; Yates, 1988; Sugden y Warren, 1989; Wysokenski y Yates, 1989; Gahn y Sugden, 1995; Kennedy y Sugden, 2003; Altmann *et al.*, 2006), y contribuye a la retención nuclear y al mantenimiento fiel de los plásmidos que contienen FR (Langle-Rouault *et al.*, 1998; Kirchmaier y Sugden, 1995; Wang *et al.*, 2006; Nanbo y Sugden, 2007). La repartición eficaz de los plásmidos de *oriP* probablemente también es atribuible a FR. Aunque el virus ha evolucionado para mantener 20 sitios de unión de EBNA-1 en FR, el mantenimiento eficaz del plásmido requiere solamente siete de estos sitios, y se pueden reconstituir mediante un polímero de tres copias de DS, que tiene un total de 12 sitios de unión de EBNA-1 (Wysokenski y Yates, 1989).

El elemento de simetría binaria (DS) es suficiente para el inicio de la síntesis de ADN en presencia de EBNA-1 (Aiyar *et al.*, 1998; Yates *et al.*, 2000), y el inicio se da en o cerca de DS (Gahn y Schildkraut, 1989; Niller *et al.*, 1995). Se cree que la terminación de la síntesis de ADN viral se da en FR, porque cuando FR se une a EBNA-1 funciona como una barrera para la horquilla de replicación, como se observa mediante electroforesis en gel bidimensional (Gahn y Schildkraut, 1989; Ermakova *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2006). El inicio de la síntesis de ADN a partir de DS está limitado a una vez por ciclo celular (Adams, 1987; Yates y Guan, 1991), y se regula mediante los componentes del sistema de replicación celular (Chaudhuri *et al.*, 2001; Ritzi *et al.*, 2003; Dhar *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005; Julien *et al.*, 2004). DS contiene cuatro sitios de unión de EBNA-1, aunque con una afinidad inferior a la hallada en FR (Reisman *et al.*, 1985). La topología de DS es tal que los cuatro sitios de unión están dispuestos en forma de dos pares de sitios, con un espaciado de 21 pb entre los centros de cada par, y un espaciado de 33 pb entre los centros de los dos sitios de unión internos no emparejados (Baer *et al.*, 1984; Rawlins *et al.*, 1985).

Los papeles funcionales de los elementos de DS se han confirmado mediante estudios de otra región del genoma de EBV, denominada Rep\*, que se identificó como un elemento que puede sustituir a DS de manera ineficaz (Kirchmaier y Sugden, 1998). La polimerización de Rep\* ocho veces produjo un elemento tan eficaz como DS en su mantenimiento de la replicación (Wang *et al.*, 2006). La disección bioquímica de Rep\* identificó un par de sitios de unión de EBNA-1 con un espaciado de 21 pb entre centros crucial para su función replicativa (ibídem). Se descubrió que el replicador mínimo de Rep\* fue el par de sitios de unión de EBNA-1, ya que la función replicativa se conservó incluso después de sustituir todas las secuencias flanqueantes del polímero con secuencias derivadas del fago lambda. Las comparaciones de DS y Rep\* han revelado un mecanismo común: estos replicadores mantienen el inicio de la síntesis de ADN incorporando la maquinaria replicativa celular por medio de un par de sitios espaciados de manera adecuada, pegados y unidos por EBNA-1.

Existen otros plásmidos extracromosómicos autorizados que se replican en las células de mamífero que no están relacionados con EBV, y en cierto modo parecen similares a la zona de inicio en la cepa Raji de EBV. Hans Lipps y sus colegas han desarrollado y estudiado plásmidos que contienen "regiones de unión a la estructura/matriz nuclear" (S/MARs) y una unidad transcripcional robusta (Piechaczek *et al.*, 1999; Jenke *et al.*, 2004). Su S/MAR procede del gen de interferón-beta humano, es rica en A/T, y está definida operacionalmente por su asociación a la matriz nuclear y su desenrollamiento preferente a fuerza iónica baja o cuando se inserta en ADN superenrollado (Bode *et al.*, 1992). Estos plásmidos se replican de manera semiconservativa, se unen a proteínas ORC, y mantienen el inicio de la síntesis de ADN de manera eficaz aleatoriamente a lo largo de su ADN (Schaarschmidt *et al.*, 2004). Se mantienen de manera eficaz en las células de hámster y humanas en proliferación sin selección con fármacos, y cuando se introducen en embriones de cerdo pueden mantener la expresión de GFP en la mayoría de tejidos de animales fetales (Manzini *et al.*, 2006).

### C. Factor de actuación en trans

Un ejemplo particular del factor que actúa en trans podría ser el antígeno nuclear 1 de Epstein Barr (EBNA-1), que es una proteína de unión al ADN que se une a FR y DS de *oriP* o Rep\* para facilitar la replicación y la repartición fiel del vector basado en EBV en las células hijas de manera independiente de, pero de acuerdo con, los cromosomas celulares durante cada división celular.

Los 641 aminoácidos (AA) de EBNA-1 se han clasificado en dominios asociados a sus diversas funciones mediante análisis de mutaciones y deleciones. Dos regiones, entre los AA 40-89 y AA 329-378, son capaces de unir dos elementos de ADN en *cis* o en *trans* cuando se unen a EBNA-1, y así se han denominado Región de Unión 1 y 2 (LR1, LR2) (Middleton y Sugden, 1992; Frappier y O'Donnell, 1991; Su *et al.*, 1991; Mackey *et al.*, 1995). La fusión de estos dominios de EBNA-1 a GFP dirige a GFP hacia los cromosomas mitóticos (Marechal *et al.*, 1999; Kanda *et al.*, 2001). LR1 y LR2 son redundantes funcionalmente para la replicación; una deleción de cualquiera de ellos produce un derivado de EBNA-1 capaz de mantener la replicación del ADN (Mackey y Sugden, 1999; Sears *et al.*, 2004). LR1 y LR2 son ricos en residuos de arginina y glicina, y se parecen a los motivos de unión a AT que se unen al ADN rico en A/T (Aravind y Landsman, 1998), (Sears *et al.*, 2004). Un análisis *in vitro* de LR1 y LR2 de EBNA-1 ha demostrado su capacidad de unirse al ADN rico en A/T (Sears *et al.*, 2004). Cuando LR1, que contiene tal unión a AT, se fusionó con el dominio de unión al ADN y dimerización de EBNA-1, se descubrió que era suficiente para la replicación del ADN de los plásmidos de *oriP*, aunque de manera menos eficaz que el EBNA-1 de tipo natural (ibídem).

LR1 y LR2, no obstante, difieren. La mitad C-terminal de LR1 está compuesta de aminoácidos distintos de las Arg-Gly repetidas de la mitad N-terminal, y se denomina región única 1 (UR1). UR1 es necesaria para que EBNA-1 active la transcripción de manera eficaz a partir de ADNs indicadores transfectados e integrados que contienen FR (Wu *et al.*, 2002; Kennedy y Sugden, 2003; Altmann *et al.*, 2006). UR1 es esencial también para la transformación eficaz de las células B infectadas por EBV. Cuando un derivado de EBNA-1 que carece de este dominio sustituye a la proteína de tipo natural en el contexto del virus completo, estos virus derivados tienen un 0,1% de la capacidad transformante del virus de tipo natural (Altmann *et al.*, 2006).

LR2 no es necesario para el mantenimiento de EBNA-1 de la replicación de *oriP* (Shire *et al.*, 1999; Mackey y Sugden, 1999; Sears *et al.*, 2004). Además, la mitad N-terminal de EBNA-1 se puede sustituir por proteínas celulares que contienen motivos de unión a AT, tales como HMGA1a, y todavía conserva la función replicativa (Hung *et al.*, 2001; Sears *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2006). Estos hallazgos indican que probablemente es la actividad de unión a AT de LR1 y LR2 la que es necesaria para el mantenimiento de *oriP* en las células humanas.

Un tercio de los residuos de EBNA-1 (AA 91-328) consisten en repeticiones glicina-glicina-alanina (GGA), implicadas en la capacidad de EBNA-1 de evitar la respuesta inmunitaria del hospedador inhibiendo la degradación y presentación proteosómica (Levitskaya *et al.*, 1995; Levitskaya *et al.*, 1997). También se ha descubierto que estas repeticiones inhiben la traducción de EBNA-1 *in vitro* e *in vivo* (Yin *et al.*, 2003). Sin embargo, la deleción de gran parte de este dominio no tiene un efecto evidente sobre las funciones de EBNA-1 en cultivo celular, lo que hace que sea difícil de dilucidar el papel que desempeña este dominio.

Una señal de localización nuclear (NLS) está codificada por los AA 379-386, lo que también está asociado a la maquinaria de importación nuclear celular (Kim *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1997). Las secuencias en las regiones ricas en Arg-Gly de LR1 y LR2 también pueden funcionar como NLSs debido a su contenido sumamente básico.

En último lugar, el extremo C-terminal (AA 458-607) codifica los dominios solapantes de unión al ADN y de dimerización de EBNA-1. La estructura de estos dominios unidos al ADN se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X, y se descubrió que era similar al dominio de unión al ADN de la proteína E2 de papilomavirus (Hegde *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2000; Bochkarev *et al.*, 1996).

En las realizaciones específicas de la invención, un vector de reprogramación contendrá *oriP* y una secuencia abreviada que codifica una versión de EBNA-1 competente para mantener la replicación del plásmido y su mantenimiento adecuado durante la división celular. La secuencia sumamente repetitiva del tercio amino-terminal de EBNA-1 de tipo natural y la eliminación de una región de 25 aminoácidos que ha mostrado toxicidad en diversas

células son prescindibles para la función de actuación en trans de EBNA-1 asociada a *oriP* (Yates *et al.* 1985; Kennedy *et al.* 2003). Por lo tanto, en una realización se podría usar la forma abreviada de EBNA-1, conocida como deltaUR1, al lado de *oriP* dentro de este sistema basado en vector episómico.

5 En ciertos aspectos, un derivado de EBNA-1 que se puede usar en la invención es un polipéptido que, respecto de un polipéptido de tipo natural correspondiente, tiene una secuencia de aminoácidos modificada. Las modificaciones incluyen la delección, inserción o sustitución de al menos un residuo de aminoácido en una región correspondiente a la región única (los residuos alrededor de 65 a alrededor de 89) de LR1 (los residuos alrededor de 40 a alrededor de 89) en EBNA-1, y pueden incluir una delección, inserción y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácido en las regiones correspondientes a otros residuos de EBNA-1, p.ej., alrededor del residuo 1 a alrededor del residuo 40, los  
10 residuos alrededor de 90 a alrededor de 328 (la región de repetición "Gly-Gly-Ala"), los residuos alrededor de 329 a alrededor de 377 (LR2), los residuos alrededor de 379 a alrededor de 386 (NLS), los residuos alrededor de 451 a alrededor de 608 (unión y dimerización de ADN), o los residuos alrededor de 609 a alrededor de 641, con tal de que el derivado resultante tenga las propiedades deseadas, p.ej., que dimerice y se una a ADN que contenga un *ori* correspondiente a *oriP*, se localice en el núcleo, no sea citotóxico, y active la transcripción de un vector extracromosómico pero no active sustancialmente la transcripción de un molde integrado.  
15

#### D. Característica exenta de residuos

De manera importante, la replicación y el mantenimiento de un vector episómico basado en *oriP* es imperfecta, y se pierde rápidamente (25% por división celular) de las células en las dos primeras semanas tras haberlo introducido en las células; sin embargo, las células que conservan el plásmido lo pierden con menos frecuencia (3% por división celular) (Leight y Sugden, 2001; Nanbo y Sugden, 2007). Una vez que se elimina la selección de células que albergan el plásmido, los plásmidos se perderán durante cada división celular hasta que todos se hayan eliminado con el tiempo sin dejar huellas de su existencia anterior dentro de las células hijas resultantes. Ciertos aspectos de la invención hacen uso de esta característica sin huellas del sistema basado en *oriP* como alternativa a la aproximación asociada viral actual para administrar genes para generar células iPS. Otros vectores extracromosómicos también se perderán durante la replicación y la propagación de las células hospedadoras, y se podrían emplear también en la presente invención.  
20  
25

#### E. Factores de reprogramación

La generación de células iPS es crucial en los genes usados para la inducción. Se podrían usar los siguientes factores, o una combinación de los mismos, en el sistema de vector descrito en la presente invención. En ciertos aspectos, se incluirán ácidos nucleicos que codifican Sox y Oct (preferiblemente Oct3/4) en el vector de reprogramación. Por ejemplo, un vector de reprogramación puede comprender casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Nanog y opcionalmente Lin-28, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Klf4 y opcionalmente c-myc. Los ácidos nucleicos que codifican estos factores de reprogramación pueden estar comprendidos en el mismo casete de expresión, en casetes de expresión diferentes, en el mismo vector de reprogramación, o en vectores de reprogramación diferentes.  
30  
35

Oct-3/4 y ciertos miembros de la familia de genes Sox (Sox1, Sox2, Sox3, y Sox15) se han identificado como reguladores transcripcionales cruciales implicados en el proceso de inducción, cuya ausencia hace imposible la inducción. Se ha identificado que genes adicionales, no obstante, que incluyen ciertos miembros de la familia Klf (Klf1, Klf2, Klf4, y Klf5), la familia Myc (C-myc, L-myc, y N-myc), Nanog, y LIN28, incrementan la eficacia de inducción.  
40

Oct-3/4 (Pou5f1) es un miembro de la familia de factores de transcripción de unión a octámero ("Oct"), y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia. La ausencia de Oct-3/4 en las células Oct-3/4+, tales como blastómeros y células madre embrionarias, conduce a la diferenciación espontánea de trofoblastos, y la presencia de Oct-3/4 da lugar así a la pluripotencia y la diferenciación potencial de las células madre embrionarias. Otros diversos genes de la familia "Oct", que incluyen genes relacionados estrechamente con Oct-3/4, Oct1 y Oct6, no son capaces de generar la inducción.  
45

La familia de genes Sox está asociada al mantenimiento de una pluripotencia similar a Oct-3/4, aunque está asociada a células madre multipotentes y unipotentes en contraste con Oct-3/4, que se expresa exclusivamente en las células madre pluripotentes. Aunque Sox2 fue el primer gen usado para la inducción por Takahashi *et al.* (2006), Wernig *et al.* (2007), y Yu *et al.* (2007), se ha descubierto que otros genes de la familia Sox también funcionan en el proceso de inducción. Sox1 produce células iPS con una eficacia similar a Sox2, y los genes Sox3, Sox15, y Sox18 también generan células iPS, aunque con una eficacia disminuida.  
50

Nanog es un factor de transcripción implicado de manera crucial en la auto-renovación de las células madre embrionarias indiferenciadas. En seres humanos, esta proteína está codificada por el gen *NANOG*. Nanog es un gen expresado en las células madre embrionarias (ESCs), y se cree que es un factor clave en el mantenimiento de la pluripotencia. Se cree que *NANOG* funciona de acuerdo con otros factores tales como Oct4 (POU5F1) y Sox2 para establecer la identidad de ESC.  
55

LIN28 es una proteína de unión al mRNA expresada en las células madre embrionarias y en las células de

carcinoma embrionario asociadas a la diferenciación y proliferación. Yu *et al.* (2007) demostró que es un factor en la generación de iPS, aunque no es esencial.

5 Klf4 de la familia de genes Klf fue identificado inicialmente por Takahashi *et al.* (2006) y fue confirmado por Wernig *et al.* (2007) como un factor para la generación de células iPS de ratón, y Takahashi *et al.* (2007) demostró que era un factor para la generación de células iPS humanas. Sin embargo, Yu *et al.* (2007) informó que Klf4 no era esencial para la generación de células iPS humanas. Se descubrió que Klf2 y Klf4 eran factores capaces de generar células iPS, y los genes relacionados Klf1 y Klf5 también, aunque con una eficacia reducida.

10 La familia de genes Myc son proto-oncogenes implicados en el cáncer. Takahashi *et al.* (2006) y Wernig *et al.* (2007) demostraron que c-myc es un factor implicado en la generación de células iPS de ratón, y Yamanaka *et al.* demostró que era un factor implicado en la generación de células iPS humanas. Sin embargo, Yu *et al.* (2007) y Takahashi *et al.* (2007) informaron que c-myc era innecesario para la generación de células iPS humanas. El uso de la familia de genes "myc" en la inducción de células iPS es problemático para la eventualidad de células iPS como terapia clínica, ya que un 25% de los ratones transplantados con células iPS inducidas con c-myc desarrollaron teratomas letales. Se ha identificado que N-myc y L-myc inducen la pluripotencia en vez de c-myc con una eficacia similar. En ciertos aspectos, se pueden usar mutantes, variantes, homólogos, o derivados de Myc, tales como mutantes que tienen una transformación reducida de las células. Los ejemplos incluyen LMYC (NM\_001033081), MYC con 41 aminoácidos deletados en el extremo N-terminal (dN2MYC), o MYC con una mutación en la posición del aminoácido 136 (p.ej., W136E).

#### V. Inhibidores de la señalización celular

20 En ciertos aspectos de la invención, durante al menos parte del proceso de reprogramación, la célula se puede mantener en presencia de uno o más inhibidores de la señalización que inhiben un transductor de señales implicado en una cascada de señalización, p.ej., en presencia de un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3, un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , tanto un inhibidor de MEK como un inhibidor de GSK3, tanto un inhibidor de GSK3 como un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , tanto un inhibidor de MEK como un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , una combinación de los tres inhibidores, o un inhibidor de otros transductores de señales en estas mismas rutas. En ciertos aspectos, se pueden usar inhibidores de ROCK, tales como HA-100, o un inhibidor de Miosina II, tal como blebistatina, para facilitar la expansión clonal de las células reprogramadas y las células iPS resultantes. También se puede usar una concentración elevada de FGF, en combinación con un medio de reprogramación específica, tal como un medio de cultivo acondicionado de células ES humanas o un medio químicamente definido, tal como medio N2B27 definido exento de suero, para incrementar la eficacia de la reprogramación.

35 En ciertas realizaciones, además de introducir en las células uno o más factores de reprogramación (p.ej. dos, tres o más, como se describe en la presente memoria) mediante elementos genéticos extracromosómicos, las células se tratan con un medio de reprogramación que comprende: un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , un inhibidor de GSK3, y opcionalmente LIF, con ventajas tales como la mejora de la eficacia y cinética de reprogramación y la facilitación de la identificación de las células iPS en el cultivo de reprogramación primario, por lo que se preserva la clonalidad de las células iPS.

40 Se entenderá que en estos aspectos y realizaciones, se puede sustituir con otros inhibidores de la señalización que inhiban un componente de la señalización de la misma ruta de señalización (p.ej. la cascada de ERK1 o ERK2) donde se desee por el inhibidor de MEK. Esto puede incluir la inhibición de un estímulo anterior de la ruta MAPK, en particular a través del receptor de FGF (Ying, 2008). De forma similar, el inhibidor de GSK3 se puede sustituir donde se desee por otros inhibidores de rutas de señalización relacionadas con GSK3, tales como la síntesis de insulina y la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina; el LIF se puede sustituir donde se desee por otros activadores de la señalización de Stat3 o gp130.

45 Tal inhibidor de la señalización, p.ej., un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3, un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , se puede usar a una concentración eficaz de al menos o alrededor de 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 500 a alrededor de 1000  $\mu$ M, o cualquier intervalo derivable de ello.

Los expertos en la técnica pueden proporcionar u obtener inhibidores mediante medios convencionales o a partir de fuentes convencionales (véase también el documento WO2007113505).

#### A. Inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3

50 La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) es una proteína quinasa específica de serina/reonina que media en la adición de moléculas de fosfato en ciertos aminoácidos de serina y reonina en sustratos celulares particulares. La fosforilación de estas otras proteínas mediante GSK-3 normalmente inhibe la proteína objetivo (también denominada el "sustrato"). Como se mencionó, GSK-3 es conocida por fosforilar y así inactivar la glucógeno sintasa. También se ha implicado en el control de la respuesta celular al ADN dañado y en la señalización de Wnt. GSK-3 también fosforila Ci en la ruta Hedgehog (Hh), y lo selecciona para la proteólisis hasta una forma inactiva. Además de la glucógeno sintasa, GSK-3 tiene muchos otros sustratos. Sin embargo, GSK-3 es poco habitual entre las quinasas, ya que normalmente requiere que una "quinasa cebadora" fosforelle primero un sustrato.

La consecuencia de la fosforilación de GSK-3 normalmente es la inhibición del sustrato. Por ejemplo, cuando GSK-3 fosforila otro de sus sustratos, la familia NFAT de factores de transcripción, estos factores de transcripción no se pueden translocar al núcleo, y por lo tanto se inhiben. Además de su importante papel en la ruta de señalización de Wnt, que es necesaria para establecer el diseño del tejido durante el desarrollo, GSK-3 también es crítica para la síntesis de proteínas que se induce en situaciones tales como la hipertrofia del músculo esquelético. Su papel como quinasa de NFAT también la coloca como regulador clave de la diferenciación y la proliferación celular.

La inhibición de GSK3 se puede referir a la inhibición de una o más enzimas de GSK3. La familia de enzimas de GSK3 es muy conocida, y se han descrito varias variantes (véase p.ej. Schaffer *et al.*, 2003). En realizaciones específicas, se inhibe GSK3- $\beta$ . Los inhibidores de GSK3- $\alpha$  también son adecuados, y en ciertos aspectos los inhibidores para el uso en la invención inhiben tanto GSK3- $\alpha$  como GSK3- $\beta$ .

Los inhibidores de GSK3 pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de, y siARN y ácidos nucleicos inversos que seleccionan como objetivo GSK3. Los ejemplos de inhibidores de GSK3 se describen en Bennett *et al.* (2002) y en Ring *et al.* (2003).

Los ejemplos específicos de inhibidores de GSK3 incluyen, pero sin limitación, Kenpaulona, 1-Azakenpaulona, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418 (véase, p.ej., Gould *et al.*, 2004), CT 99021 (véase, p.ej., Wagman, 2004), CT 20026 (véase, Wagman, anteriormente mencionado), SB415286, SB216763 (véase, p.ej., Martin *et al.*, 2005), AR-A014418 (véase, p.ej., Noble *et al.*, 2005), litio (véase, p.ej., Gould *et al.*, 2003), SB 415286 (véase, p.ej., Frame *et al.*, 2001) y TDZD-8 (véase, p.ej., Chin *et al.*, 2005). Los inhibidores de GSK3 ejemplares adicionales disponibles de Calbiochem (véase, p.ej., Dalton *et al.*, documento WO2008/094597, incorporado en la presente memoria como referencia), incluyen, pero sin limitación, BIO (2'Z,3'E)-6-Bromoindirrubin-3'-oxima (Inhibidor de GSK3 IX); BIO-Acetoxima (2'Z,3'E)-6-Bromoindirrubin-3'-acetoxima (Inhibidor de GSK3 X); (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina (Inhibidor de GSK3 XIII); Complejo piridocarbazol-ciclopentadienilrutenio (Inhibidor de GSK3 XV); TDZD-8 4-Bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (Inhibidor de GSK3beta I); 2-Tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol (Inhibidor de GSK3beta II); OTDZT 2,4-Dibencil-5-oxotiadiazolidin-3-tiona (Inhibidor de GSK3beta III); alfa-4-Dibromoacetofenona (Inhibidor de GSK3beta VII); AR-AO 14418 N-(4-Metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea (Inhibidor de GSK-3beta VIII); 3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrololo[2,3-b]piridin-3-il)-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona (Inhibidor de GSK-3beta XI); TWS1 19 compuesto de pirrolopirimidina (Inhibidor de GSK3beta XII); L803 H-KEAPP APPQSpP-NH2 o su forma miristoilada (Inhibidor de GSK3beta XIII); 2-Cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-il)-etanona (Inhibidor de GSK3beta VI); AR-AO144-18; SB216763; y SB415286.

Los inhibidores de GSK3 pueden activar, por ejemplo, la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina. Muchos de los genes posteriores de  $\beta$ -catenina co-regulan redes de genes de pluripotencia. Por ejemplo, un inhibidor de GSK activa la expresión de cMyc, y también aumenta su estabilidad proteica y la actividad transcripcional. Así, en ciertas realizaciones, se pueden usar los inhibidores de GSK3 para estimular la expresión del polipéptido de Myc endógena en una célula, y de ese modo eliminar la necesidad de expresión de Myc para inducir la pluripotencia.

Además, se ha caracterizado la estructura del sitio activo de GSK3- $\beta$ , y se han identificado los residuos clave que interaccionan con inhibidores específicos e inespecíficos (Bertrand *et al.*, 2003). Esta caracterización estructural permite que los inhibidores de GSK adicionales se identifiquen fácilmente.

Los inhibidores usados en la presente memoria son preferiblemente específicos para seleccionar como objetivo la quinasa. Los inhibidores de ciertas realizaciones son específicos de GSK3- $\beta$  y GSK3- $\alpha$ , no inhiben sustancialmente erk2 y no inhiben sustancialmente cdc2. Preferiblemente, los inhibidores tienen una selectividad de al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 200 veces, muy preferiblemente al menos 400 veces hacia GSK3 humano respecto de erk2 de ratón y/o cdc2 humano, medido como la proporción de los valores de  $CI_{50}$ ; en la presente memoria, la referencia a los valores de  $CI_{50}$  de GSK3 se refiere a los valores medios para GSK3- $\beta$  y GSK3- $\alpha$  humano. Se han obtenido buenos resultados con CHIR99021, que es específico de GSK3. Las concentraciones adecuadas para el uso de CHIR99021 están en el intervalo de 0,01 a 100, preferiblemente 0,1 a 20, más preferiblemente 0,3 a 10 micromolar.

#### B. Inhibidor de MEK

Los inhibidores de MEK, que incluyen los inhibidores de la proteína quinasa quinasa activada por mitógenos (MAPK/ERK quinasa o MEK) o sus rutas de señalización relacionadas como la cascada de MAPK, se pueden usar en ciertos aspectos de la invención. La proteína quinasa quinasa activada por mitógenos (sic) es una enzima quinasa que fosforila la proteína quinasa activada por mitógenos. También se conoce como MAP2K. Los estímulos extracelulares conducen a la activación de una MAP quinasa por medio de una cascada de señalización ("cascada de MAPK") compuesta de MAP quinasa, MAP quinasa quinasa (MEK, MKK, MEKK, o MAP2K), y MAP quinasa quinasa quinasa (MKKK o MAP3K).

Un inhibidor de MEK en la presente memoria se refiere a los inhibidores de MEK en general. Así, un inhibidor de MEK se refiere a cualquier inhibidor de un miembro de la familia de MEK de proteína quinasas, que incluye MEK1, MEK2 y MEK5. También se hace referencia a los inhibidores de MEK1, MEK2 y MEK5. Los ejemplos de inhibidores de MEK adecuados, ya conocidos en la técnica, incluyen los inhibidores de MEK1 PD184352 y PD98059, los



inhibidores de MEK1 y MEK2 U0126 y SL327, y los discutidos en Davies *et al.* (2000).

En particular, se ha descubierto que PD184352 y PD0325901 tienen un grado elevado de especificidad y potencia en comparación con otros inhibidores de MEK conocidos (Bain *et al.*, 2007). Otros inhibidores de MEK y clases de inhibidores de MEK se describen en Zhang *et al.* (2000).

5 Los inhibidores de MEK pueden incluir anticuerpos hacia, variantes negativas dominantes de, y siARN y ácidos nucleicos inversos que inhiben la expresión de MEK. Los ejemplos específicos de inhibidores de MEK incluyen, pero sin limitación, PD0325901 (véase, p.ej., Rinehart *et al.*, 2004), PD98059 (disponible, p.ej., de Cell Signaling Technology), U0126 (disponible, por ejemplo, de Cell Signaling Technology), SL327 (disponible, p.ej., de Sigma-Aldrich), ARRY-162 (disponible, p.ej., de Array Biopharma), PD184161 (véase, p.ej., Klein *et al.*, 2006), PD184352  
10 (CI-1040) (véase, p.ej., Mattingly *et al.*, 2006), sunitinib (véase, p.ej., Voss, *et al.*, documento US2008004287 incorporado en la presente memoria como referencia), sorafenib (véase Voss, anteriormente mencionado), Vandetanib (véase Voss, anteriormente mencionado), pazopanib (véase, p.ej., Voss, anteriormente mencionado), Axitinib (véase Voss, anteriormente mencionado) y PTK787 (véase Voss, anteriormente mencionado).

15 Actualmente se están sometiéndolos varios inhibidores de MEK a evaluaciones en ensayos clínicos. CI-1040 se ha evaluado en ensayos clínicos de fase I y II para el cáncer (véase, p.ej., Rinehart *et al.*, 2004). Otros inhibidores de MEK que se están evaluando en ensayos clínicos incluyen PD 184352 (véase, p.ej., English *et al.*, 2002), BAY 43-9006 (véase, p.ej., Chow *et al.*, 2001), PD-325901 (también PD0325901), GSK1 120212, ARRY-438162, RDEA1 19, AZD6244 (también ARRY-142886 o ARRY-886), RO5126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704).

20 La inhibición de MEKs también se puede conseguir de manera conveniente mediante el uso de interferencia mediada por ARN (ARNi). En general, se introduce una molécula de ARN bicatenaria complementaria a todo o parte de un gen de MEK en células pluripotentes, por lo que se estimula la degradación específica de moléculas de mRNA que codifican MEK. Este mecanismo postranscripcional da como resultado una expresión reducida o suprimida del gen de MEK seleccionado como objetivo. Se conocen técnicas y protocolos adecuados para conseguir la inhibición de MEK mediante el uso de ARNi.

25 Se conocen varios ensayos para identificar inhibidores de quinasas, que incluyen los inhibidores de GSK3 y los inhibidores de MEK. Por ejemplo, Davies *et al.* (2000) describe ensayos de quinasas en los que se incubaba una quinasa en presencia de un sustrato peptídico y ATP radiomarcado. La fosforilación del sustrato por la quinasa da como resultado la incorporación del marcador en el sustrato. Se inmovilizan alícuotas de cada reacción en papel de fosfocelulosa y se lavan en ácido fosfórico para eliminar el ATP libre. Después se mide la actividad del sustrato tras  
30 la incubación, y esto proporciona una indicación de la actividad quinasa. La actividad quinasa relativa en presencia y ausencia de inhibidores de quinasa candidatos se puede determinar fácilmente mediante el uso de tal ensayo. Downey *et al.* (1996) también describe ensayos de actividad quinasa que se pueden usar para identificar inhibidores de quinasas.

### C. Inhibidor de receptores de TGF- $\beta$

35 Los inhibidores de receptores de TGF- $\beta$  pueden incluir cualquier inhibidor de la señalización de TGF en general o inhibidores específicos para receptores de TGF- $\beta$  (p.ej., ALK5), que pueden incluir anticuerpos hacia, variantes negativas dominantes de, y siARN y ácidos nucleicos inversos que inhiben la expresión de, los receptores de TGF beta (p.ej., ALK5). Los inhibidores ejemplares de receptores de TGF $\beta$ /ALK5 incluyen, pero sin limitación, SB431542 (véase, p.ej., Inman *et al.*, 2002), A-83-01, también conocido como 3-(6-Metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (véase, p.ej., Tojo *et al.*, 2005, y disponible comercialmente, p.ej., de Toicris Bioscience); 2-  
40 (3-(6-Metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, p.ej., Dalton, *et al.*, documento WO2008/094597, incorporado en la presente memoria como referencia), BMP4 (véase Dalton, anteriormente mencionado), GW788388 ((4-[3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]piridin-2-il)-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)benzamida) (véase, p.ej., Gellibert *et al.*, 2006), SM16 (véase, p.ej., Suzuki *et al.*, 2007), IN-1130 (3-((5-(6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1H-imidazol-2-il)metil)benzamida) (véase, p.ej., Kim *et al.*, 2008), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)piridin) (véase, p.ej., de Gouville *et al.*, 2006), SB-505124 (hidrocloruro de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina) (véase, p.ej., DaCosta *et al.*, 2004) y derivados de pirimidina (véase, p.ej., los enumerados en Stiefl *et al.*, documento WO2008/006583, incorporado en la presente memoria como referencia).

45 Además, aunque un "inhibidor de ALK5" no pretende abarcar inhibidores de quinasas inespecíficos, se debería entender que un "inhibidor de ALK5" abarca los inhibidores que inhiben ALK4 y/o ALK7 además de ALK5, tal como, por ejemplo, SB-431542 (véase, p.ej., Inman *et al.*, 2002). Sin pretender limitar el alcance de la invención, se cree que los inhibidores de ALK5 afectan al proceso de conversión/transición de mesenquimatoso a epitelial (MET). La ruta de TGF $\beta$ /activina es un controlador de la transición de epitelial a mesenquimatoso (EMT). Los inventores consideran que inhibir la ruta de TGF $\beta$ /activina puede facilitar el proceso MET (es decir, la reprogramación).

55 Se cree que la inhibición de la ruta de TGF $\beta$ /activina tendrá efectos similares. Así, se puede usar cualquier inhibidor (p.ej., anterior o posterior) de la ruta de TGF $\beta$ /activina en combinación con, o en vez de, los inhibidores de TGF- $\beta$ /ALK5 como se describe en la presente memoria. Los inhibidores de la ruta de TGF $\beta$ /activina ejemplares incluyen, pero sin limitación: los inhibidores de receptores de TGF beta, inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3,

inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD 4, y activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7. Además, las categorizaciones descritas en la presente memoria tienen simplemente fines organizativos, y un experto en la técnica conocería que los compuestos pueden afectar a uno o más puntos dentro de una ruta, y así los compuestos pueden funcionar en más de una de las categorías definidas.

- 5 Los inhibidores de receptores de TGF beta pueden incluir anticuerpos hacia, variantes negativas dominantes de, y siARN o ácidos nucleicos inversos que seleccionan como objetivo los receptores de TGF beta. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero sin limitación, SU5416; hidrocloreuro de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124); lerdelimumb (CAT-152); metelimumab (CAT-192); GC-1008; ID1  
10 1; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; Gleevec; 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin); activina-M108A; P144; TBR2-Fc soluble; y células tumorales transfectadas con moléculas inversas que seleccionan como objetivo los receptores de TGF beta (véase, p.ej., Wrzesinski *et al.*, 2007; Kaminska *et al.*, 2005; y Chang *et al.*, 2007.)

#### D. Inhibidores de ROCK e inhibidores de Miosina II ATPasa

- 15 Las células madre pluripotentes, especialmente las células ES humanas y las células iPS, son vulnerables a la apoptosis tras el desprendimiento y la disociación celular, que es importante para el aislamiento o la expansión clonal y para la inducción de la diferenciación. Recientemente, se ha descubierto que una pequeña clase de moléculas incrementa la eficacia y supervivencia clonal de las células madre pluripotentes disociadas, tales como los inhibidores de la quinasa asociada a Rho (ROCK), que son inhibidores de las rutas de señalización relacionadas con  
20 ROCK, por ejemplo, inhibidores específicos de Rho, inhibidores específicos de ROCK o inhibidores específicos de miosina II. En ciertos aspectos de la invención, los inhibidores de ROCK se pueden usar para cultivar y hacer pases de células madre pluripotentes y/o para la diferenciación de las células madre. Por lo tanto, los inhibidores de ROCK podrían estar presentes en cualquier medio de cultivo de células en el que crezcan células madre pluripotentes, se disocian, formen agregados, o experimenten diferenciación, tal como un cultivo adherente o un cultivo en suspensión. A menos que se indique de otra manera en la presente memoria, los inhibidores de miosina II, tales  
25 como blebistatina, se pueden sustituir por el uso experimental de los inhibidores de ROCK.

- Las rutas de señalización de ROCK pueden incluir la familia de GTPasas Rho; ROCK, una quinasa efectora importante posterior a Rho; Miosina II, el efector predominante posterior a ROCK (Harb *et al.*, 2008); y cualquier procesador de señales intermedio, anterior o posterior. ROCK puede fosforilar e inactivar la subunidad 1 selectiva de la miosina fosfatasa (MYPT1), uno de los objetivos posteriores importantes de ROCK que regulan negativamente la  
30 función de la miosina por medio de la desfosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina (MRLC).

- Las ROCKs son quinasas específicas de serina/treonina que sirven como proteínas objetivo para Rho (de la que existen tres isoformas, RhoA, RhoB y RhoC). Estas quinasas se caracterizaron inicialmente como mediadores de la formación de fibras de estrés y adhesiones focales inducidas por RhoA. Las dos isoformas de ROCK, ROCK1 (p160ROCK, también denominada ROK $\beta$ ) y ROCK2 (ROK $\alpha$ ), consisten en un dominio de quinasa N-terminal,  
35 seguido de un dominio de hélices superenrolladas que contiene un dominio de unión a Rho y un dominio de homología con pleckstrina (PH). Ambas ROCKs son reguladores citoesqueléticos, que actúan como mediadores en los efectos de RhoA sobre la formación de fibras de estrés, la contracción del músculo liso, la adhesión celular, la ondulación de la membrana y la motilidad celular. Las ROCKs pueden ejercer su actividad biológica seleccionando como objetivo moléculas posteriores, tales como miosina II, la cadena ligera de miosina (MLC), MLC fosfatasa  
40 (MLCP) y el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN).

- Los ejemplos no limitantes de los inhibidores de ROCK incluyen HA-100, Y-27632, H-1152, Fasudil (también denominado HA1077), Y-30141 (descrito en la patente de EE.UU. 5.478.838), Wf-536, HA-1077, hidroxil-HA-1077, GSK269962A, SB-772077-B, y los derivados de los mismos, y ácido nucleico inverso para ROCK, ácido nucleico  
45 que induce la interferencia del ARN (por ejemplo, siARN), péptidos competitivos, péptidos antagonistas, anticuerpos inhibitorios, fragmentos de anticuerpos-ScFV, variantes negativas dominantes y vectores de expresión de los mismos. Además, debido a que se conocen otros compuestos de bajo peso molecular como inhibidores de ROCK, también se pueden usar tales compuestos o derivados de los mismos en las realizaciones (por ejemplo, véanse las Publicaciones de Patentes de EE.UU. N $^{\circ}$ s 20050209261, 20050192304, 20040014755, 20040002508, 20040002507, 20030125344 y 20030087919, y las Publicaciones de Patentes Internacionales N $^{\circ}$ s 2003/062227,  
50 2003/059913, 2003/062225, 2002/076976 y 2004/039796, que se incorporan en la presente memoria como referencia). En ciertos aspectos de la presente invención, también se puede usar una combinación de uno o dos o más de los inhibidores de ROCK.

También se pueden usar inhibidores específicos de Rho, tales como exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, y/o inhibidores específicos de Miosina II como inhibidores de ROCK en ciertos aspectos de la invención.

#### 55 VI. Cultivo de células reprogramadas

La célula inicial y la célula reprogramada final, en general, tienen diferentes necesidades para el medio y las condiciones de cultivo. Para tener en cuenta esto a la vez que también se permite que tenga lugar la reprogramación de la célula, normalmente se lleva a cabo al menos una etapa inicial de cultivo, tras la introducción de los factores de

reprogramación, en presencia de medio y en condiciones de cultivo que se sabe que son adecuadas para la proliferación de la célula inicial. Esto va seguido de un periodo posterior de cultivo en presencia de un medio de reprogramación y en condiciones que se sabe que son adecuadas para las células pluripotentes, con células de soporte con suero o el uso de un medio químicamente definido o en condiciones exentas de células de soporte. Las células de soporte adecuadas incluyen líneas de fibroblastos primarias o inmortalizadas, en general inactivadas de forma que su crecimiento no supere el crecimiento de las células que se están reprogramando. Tras un tiempo suficiente para la reprogramación, las células reprogramadas se pueden cultivar adicionalmente para la expansión de las células iPS antes o después de la selección de las células iPS en un medio de expansión. Tal medio de expansión puede comprender uno o más inhibidores de la señalización como se describió anteriormente, o comprender un medio de cultivo básicamente exento de estos inhibidores.

La etapa inicial de cultivo es preferiblemente durante un periodo de hasta 6 días, más preferiblemente hasta 4 días y, en realizaciones particulares descritas más adelante, durante no más de 3 días, y más en particular hasta o alrededor de un día. La etapa posterior de cultivo en el medio de reprogramación que comprende uno o más inhibidores de la señalización es de manera adecuada durante un periodo de al menos o alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 días, o cualquier intervalo derivable de ello, y puede ser durante un periodo de hasta 70 días, preferiblemente hasta 56 días, o hasta la detección de las células iPS. En una realización específica descrita más adelante usada para generar células humanas reprogramadas, la etapa inicial de cultivo fue durante un periodo de alrededor de 1 día, y la etapa posterior fue durante alrededor de 9 a 28 días mediante cultivo en una condición de reprogramación en presencia de un medio de reprogramación que comprendía un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , y un inhibidor de GSK3. La condición de reprogramación puede estar básicamente exenta de células de soporte. En aspectos adicionales, el medio de reprogramación puede ser químicamente definido. Para mejorar la reprogramación, el medio de reprogramación puede comprender adicionalmente una concentración elevada de FGF, y puede estar básicamente exento de TGF $\beta$ .

La combinación de un inhibidor de MEK, un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , y un inhibidor de GSK3 puede facilitar el proceso de reprogramación, lo que incluye incrementar la eficacia de reprogramación y acortar el tiempo de reprogramación. LIF es un ejemplo de un activador de la señalización de gp130, y otro es IL-6 en combinación con el receptor soluble de IL-6, y favorece el crecimiento y la supervivencia de la célula que está en el proceso de ser reprogramada. Durante la reprogramación, las células se pueden cultivar en presencia de LIF; mediante el uso de LIF se puede ayudar a las células reprogramadas en ciertos aspectos de la presente invención para mejorar la supervivencia de las células y la clonogenicidad.

#### A. Condiciones de cultivo de células madre en general

Las condiciones de cultivo según la presente invención se definirán de manera adecuada dependiendo del medio y de las células madre usadas. El medio, según ciertos aspectos de la presente invención, se puede preparar mediante el uso de un medio usado para cultivar células animales como su medio basal, tal como cualquiera de los medios TeSR, BME, BGJb, CMRL 1066, Glasgow MEM, MEM con zinc opcional mejorado, IMDM, Medio 199, MEM de Eagle,  $\alpha$ MEM, DMEM, Ham, RPMI 1640, y Fischer, así como cualquier combinación de los mismos, pero el medio no se limita en particular a ellos, con tal de que se pueda usar para el cultivo de células animales.

El medio según la presente invención puede ser un medio que contiene suero o exento de suero. El medio exento de suero se refiere a los medios con suero procesado o purificado, y por lo tanto puede incluir medios con componentes derivados de sangre purificados o componentes derivados de tejidos animales purificados (tales como factores de crecimiento). Desde el punto de vista de prevenir la contaminación con componentes heterogéneos procedentes de animales, el suero puede proceder del mismo animal del que procede(n) la(s) célula(s) madre.

El medio según la presente invención puede contener o no cualquier alternativa al suero. Las alternativas al suero pueden incluir materiales que contienen de manera adecuada albúmina (tales como albúmina rica en lípidos, sustitutos de la albúmina tales como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteínas), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, 3'-tioglicerol, o sus equivalentes. Las alternativas al suero se pueden preparar, por ejemplo, mediante el método descrito en la Publicación Internacional N° 98/30679. De manera alternativa, se puede usar cualquier material disponible comercialmente para más comodidad. Los materiales disponibles comercialmente incluyen el sustituto de suero Knockout (KSR), concentrado de lípidos químicamente definido (Gibco), y Glutamax (Gibco).

El medio de la presente invención también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), vitamina(s), factores de crecimiento, citocinas, sustancias antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes tamponadores, y sales inorgánicas. La concentración de 2-mercaptoetanol puede ser, por ejemplo, alrededor de 0,05 a 1,0 mM, y en particular alrededor de 0,1 a 0,5 mM, pero la concentración no se limita en particular a ello, con tal de que sea adecuada para cultivar la(s) célula(s) madre.

Un recipiente de cultivo usado para cultivar la(s) célula(s) madre puede incluir, pero sin limitación particular: matraz, matraz para cultivo de tejidos, placa, placa petri, placa para cultivo de tejidos, multiplaca, microplaca, placa de

micropocillos, multiplaca, placa de multipocillos, microportaobjetos, portaobjetos de cámara, tubo, bandeja, cámaras CellSTACK®, bolsa de cultivo, y botella para agitador de rodillos, con tal de que se puedan cultivar las células madre en ellos. Las células madre se pueden cultivar en un volumen de al menos o alrededor de 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 1500 ml, o cualquier intervalo derivable de ello, dependiendo de las necesidades del cultivo. En cierta realización, el recipiente de cultivo puede ser un biorreactor, que puede hacer referencia a cualquier dispositivo o sistema que mantenga un medio biológicamente activo. El biorreactor puede tener un volumen de al menos o alrededor de 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 litros, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 metros cúbicos, o cualquier intervalo derivable de ello.

El recipiente de cultivo puede ser adhesivo celular o no adhesivo, y se selecciona dependiendo del propósito. El recipiente de cultivo adhesivo celular se puede revestir con cualquier sustrato para proporcionar la adhesión celular, tal como matriz extracelular (ECM) para mejorar la adhesividad de la superficie del recipiente hacia las células. El sustrato para la adhesión celular puede ser cualquier material destinado a la unión de células madre o células de soporte (si se usan). El sustrato para la adhesión celular incluye colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, vitronectina, laminina, y fibronectina y las mezclas de los mismos, por ejemplo Matrigel™, y preparaciones de membranas de células lisadas (Klimanskaya *et al.*, 2005).

Se pueden definir de manera adecuada otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de alrededor de 30 a 40 °C, por ejemplo, al menos o alrededor de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 °C, pero sin limitación particular a ellas. La concentración de CO<sub>2</sub> puede ser de alrededor del 1 al 10%, por ejemplo, alrededor del 2 al 5%, o cualquier intervalo derivable de ello. La tensión de oxígeno puede ser al menos o alrededor del 1, 5, 8, 10, 20%, o cualquier intervalo derivable de ello.

Los métodos de la presente invención se pueden usar en ciertos aspectos para el cultivo de adhesión de células madre, por ejemplo. En este caso, las células se pueden cultivar en presencia de células de soporte. En el caso en el que se usan las células de soporte en los métodos de la presente invención, se pueden usar células estromales tales como fibroblastos fetales como células de soporte (por ejemplo, véase; Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994); Gene Targeting, A Practical Approach (1993); Martin (1981); Evans y Kaufman (1981); Jainchill *et al.*, (1969); Nakano *et al.* (1996); Kodama *et al.* (1982); y los N°s de Publicación Internacional 01/088100 y 2005/080554).

Los métodos de la presente invención en ciertos aspectos se pueden usar también para un cultivo en suspensión de células madre, que incluye el cultivo en suspensión en portadores (Fernandes *et al.*, 2004) o encapsulación en gel/biopolímero (Publicación de Estados Unidos 2007/0116680). La expresión cultivo en suspensión de las células madre significa que las células madre se cultivan en una condición no adherente con respecto al recipiente de cultivo o las células de soporte (si se usan) en un medio. El cultivo en suspensión de células madre incluye un cultivo de disociación de células madre y un cultivo en suspensión de agregados de células madre. La expresión cultivo de disociación de células madre significa que se cultivan las células madre suspendidas, y el cultivo de disociación de células madre incluye las células madre individuales o los pequeños agregados celulares compuestos de una diversidad de células madre (por ejemplo, de alrededor de 2 a 400 células). Cuando el cultivo de disociación anteriormente mencionado continúa, las células cultivadas, disociadas forman un agregado mayor de células madre, y después se puede llevar a cabo un cultivo en suspensión de agregados. El cultivo en suspensión de agregados incluye un método de cultivo embrionario (véase Keller *et al.*, 1995), y un método SFEB (Watanabe *et al.*, 2005; Publicación Internacional N° 2005/123902).

#### B. Cultivo de células madre pluripotentes

Dependiendo de las condiciones de cultivo, las células madre pluripotentes pueden producir colonias de células diferenciadas o de células indiferenciadas. La expresión "diferenciado" significa la progresión de una célula por una ruta del desarrollo. La expresión "diferenciado" es una expresión relativa que describe la progresión de una célula por una ruta del desarrollo en comparación con otra célula. Por ejemplo, una célula pluripotente puede dar lugar a cualquier célula del cuerpo, mientras una célula más diferenciada, tal como una célula hematopoyética, dará lugar a menos tipos de células.

Los cultivos de células madre pluripotentes se describen como "indiferenciados" cuando una proporción sustancial de células madre y sus derivados de la población exhiben características morfológicas de las células indiferenciadas, que las distinguen claramente de las células diferenciadas de origen embrionario o de adulto. Los expertos en la técnica reconocen las células iPS o ES indiferenciadas, y en general aparecen en las dos dimensiones de una vista microscópica en colonias de células con proporciones nucleares/citoplasmáticas elevadas y nucléolos prominentes. Se entiende que las colonias de células indiferenciadas pueden tener células cercanas que están diferenciadas.

Las células ES se pueden mantener en un estado indiferenciado cultivando las células en presencia de suero y una capa de células de soporte, en general fibroblastos embrionarios de ratón. También se conocen otros métodos para mantener las células madre en un estado indiferenciado. Por ejemplo, las células ES de ratón se pueden mantener en un estado indiferenciado cultivándolas en presencia de LIF sin una capa de células de soporte. Sin embargo, a diferencia de las células ES de ratón, las células ES humanas preexistentes no responden a LIF. Las células ES

humanas se pueden mantener en un estado indiferenciado cultivando las células ES sobre una capa de soporte de fibroblastos en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Amit *et al.*, 2000), o cultivando sobre una matriz de proteínas, tal como Matrigel™ o laminina, sin una capa de soporte y en presencia de medio acondicionado de fibroblastos más factor de crecimiento de fibroblastos básico (Xu *et al.*, 2001; Patente de EE.UU. N° 6.833.269).

5 Los métodos para preparar y cultivar células ES se pueden hallar en libros de texto y revistas habituales en biología celular, cultivo de tejidos y embriología, que incluyen Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (1987); Guide to Techniques in Mouse Development (1993); Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro* (1993); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (1998), todos incorporados en la presente memoria como referencia. Los métodos habituales usados en el cultivo de tejidos se describen en general en Animal Cell Culture (1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (1987); y Current Protocols in Molecular Biology y Short Protocols in Molecular Biology (1987 y 1995).

10 Después de haber introducido o puesto en contacto las células somáticas con los factores de reprogramación, estas células se pueden cultivar en un medio suficiente para mantener la pluripotencia y el estado indiferenciado. El cultivo de las células madre pluripotentes inducidas (iPS) generadas en esta invención puede usar diversos medios y técnicas desarrolladas para cultivar células madre pluripotentes de primates, más en especial, células madre embrionarias, como se describió en la Publicación de Pat. de EE.UU. 20070238170 y en la Publicación de Pat. de EE.UU. 20030211603, y Publicación de Pat. de EE.UU. 20080171385, que se incorporan en la presente memoria como referencia. Se aprecia que se pueden usar métodos adicionales para el cultivo y el mantenimiento de las células madre pluripotentes, como conocería un experto, con la presente invención.

15 En ciertas realizaciones, se pueden usar condiciones indefinidas; por ejemplo, las células pluripotentes se pueden cultivar en células de soporte de fibroblastos o un medio que se ha expuesto a células de soporte de fibroblastos para mantener las células madre en un estado indiferenciado.

20 De manera alternativa, las células pluripotentes se pueden cultivar y mantener en un estado básicamente indiferenciado mediante el uso de un sistema de cultivo definido, independiente de células de soporte, tal como un medio TeSR (Ludwig *et al.*, 2006a; Ludwig *et al.*, 2006b). Se pueden usar sistemas de cultivo y medios independientes de células de soporte para cultivar y mantener las células pluripotentes. Estas aproximaciones permiten que las células iPS humanas obtenidas, así como las células madre embrionarias humanas, permanezcan en un estado básicamente indiferenciado sin la necesidad de "capas de soporte" de fibroblastos de ratón. Como se describe en la presente memoria, se pueden hacer diversas modificaciones en estos métodos para reducir los costes como se desee.

25 Se pueden usar diversos componentes de la matriz en el cultivo y el mantenimiento de las células madre pluripotentes humanas. Por ejemplo, se puede usar Matrigel™, colágeno IV, fibronectina, laminina, y vitronectina en combinación para revestir una superficie de cultivo como medio para proporcionar un soporte sólido para el crecimiento de células pluripotentes, como se describe en Ludwig *et al.* (2006a; 2006b), que se incorpora como referencia en su totalidad. En particular, se puede usar Matrigel™ para proporcionar un sustrato para el cultivo celular y el mantenimiento de células madre pluripotentes humanas. Matrigel™ es una mezcla gelatinosa de proteínas secretadas por células tumorales de ratón, y está disponible comercialmente de BD Biosciences (Nueva Jersey, EE.UU.). Esta mezcla se parece al medio extracelular complejo hallado en muchos tejidos, y lo usan los biólogos celulares como sustrato para el cultivo de células.

#### 30 C. Pase de células

Ciertos aspectos de la presente invención pueden implicar además una etapa de disociación de las células madre. La disociación de las células madre se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier procedimiento conocido. Estos procedimientos incluyen tratamientos con un agente quelante (tal como EDTA), una enzima (tal como tripsina, colagenasa), o similares, y operaciones tales como la disociación mecánica (tal como el pipeteo). La(s) célula(s) madre se puede(n) tratar con el inhibidor de ROCK antes y/o después de la disociación. Por ejemplo, la(s) célula(s) madre se puede(n) tratar solamente después de la disociación.

45 En ciertas realizaciones adicionales del cultivo de células madre pluripotentes, una vez que un recipiente de cultivo está lleno, la colonia se puede fraccionar en células agregadas o incluso en células individuales mediante cualquier método adecuado para la disociación, cuyas células se colocan después en recipientes de cultivo nuevos para realizar el pase. El pase de células es una técnica que permite mantener vivas las células y cultivarlas en condiciones de cultivo durante periodos de tiempo prolongados. Las células se someterían al pase normalmente cuando alcanzasen una confluencia de alrededor del 70%-100%.

50 Se puede usar la disociación en células individuales de las células madre pluripotentes, seguido del pase de las células individuales, en los presentes métodos con varias ventajas, como facilitar la expansión de las células, la clasificación de las células, y la siembra definida para la diferenciación, y permitir la automatización de los procedimientos de cultivo y de expansión clonal. Por ejemplo, las células de la progenie obtenibles de manera clonal a partir de una célula individual pueden ser homogéneas en su estructura genética y/o estar sincronizadas en el ciclo celular, lo que puede incrementar la diferenciación deseada. Los métodos ejemplares para realizar pases de células

individuales pueden ser como se describió en la Sol. de Pat. de EE.UU. 20080171385, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

5 En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes se pueden disociar en células individuales independientes, o una combinación de células individuales independientes y agrupamientos pequeños de células que comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 células o más. La disociación se puede realizar mediante fuerza mecánica, o mediante un agente de disociación de células, tal como Citrato Na, o una enzima, por ejemplo, tripsina, tripsina-EDTA, TrypLE Select, o similares.

10 Basándose en la fuente de células madre pluripotentes y en la necesidad de expansión, las células disociadas se pueden transferir de manera individual o en agrupamientos pequeños a recipientes de cultivo nuevos en una proporción de fraccionamiento tal como al menos o alrededor de 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, o cualquier intervalo derivable de ello. Las proporciones de fraccionamiento de las líneas celulares en suspensión se pueden realizar en un volumen de suspensión celular de cultivo. El intervalo de los pases puede ser de al menos o alrededor de cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días o cualquier intervalo derivable de ello. Por ejemplo, las proporciones de fraccionamiento alcanzables para los diferentes protocolos de pase enzimático pueden ser 1:2 cada 3-7 días, 1:3 cada 4-7 días, y 1:5 a 1:10 aproximadamente cada 7 días, 1:50 a 1:100 cada 7 días. Cuando se usan proporciones elevadas de fraccionamiento, el intervalo de los pases se puede prolongar hasta al menos 12-14 días o cualquier periodo de tiempo sin pérdida de células debida a una excesiva diferenciación espontánea o muerte celular.

20 En ciertos aspectos, el pase de células individuales se puede hacer en presencia de una molécula pequeña eficaz para incrementar la eficacia de clonación y la supervivencia celular, tal como un inhibidor de ROCK como se describió anteriormente. Tal inhibidor de ROCK, p.ej., Y-27632, HA-1077, H-1152, o blebistatina, se puede usar a una concentración eficaz, por ejemplo, al menos o alrededor de 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 a alrededor de 100  $\mu$ M, o cualquier intervalo derivable de ello.

#### VII. Selección de células iPS

25 En ciertos aspectos de la invención, después de introducir uno o más elementos genéticos extracromosómicos en células somáticas, las células se pueden cultivar para su expansión (opcionalmente seleccionadas por la presencia de elementos de vectores como marcadores de selección positiva o marcadores cribables para concentrar las células transfectadas), y estos elementos genéticos expresarán factores de reprogramación en estas células y se replicarán y repartirán en la división celular. Estos factores de reprogramación expresados reprogramarán el genoma celular somático para establecer un estado pluripotente automantenido, y a la vez o después de la eliminación de la selección positiva de la presencia de los vectores, los elementos genéticos exógenos se perderán gradualmente. Estas células madre pluripotentes inducidas se podrían seleccionar de la progenie derivada de estas células somáticas basándose en las características de las células madre embrionarias, ya que se espera que sean sustancialmente idénticas a las células madre embrionarias pluripotentes. También se podría emplear una etapa de selección negativa adicional para acelerar o ayudar en la selección de las células iPS básicamente exentas de elementos genéticos exógenos ensayando la ausencia de ADN del vector de reprogramación o mediante el uso de marcadores de selección.

#### A. Selección de las características de las células madre embrionarias

40 Las iPSCs generadas con éxito a partir de los estudios previos fueron notablemente similares a las células madre pluripotentes aisladas naturales (tales como las células madre embrionarias de ratón y humanas, mESCs y hESCs, respectivamente) en los siguientes aspectos, lo que confirmó la identidad, autenticidad, y pluripotencia de las iPSCs respecto de las células madre pluripotentes aisladas naturales. Así, las células madre pluripotentes inducidas generadas a partir de los métodos descritos en esta invención se podrían seleccionar basándose en una o más de las siguientes características de las células madre embrionarias.

#### 45 i. Propiedades biológicas celulares

Morfología: Las iPSCs son morfológicamente similares a las ESCs. Cada célula puede tener una forma redonda, un nucléolo grande y un citoplasma escaso. Las colonias de iPSCs también podrían ser similares a las de ESCs. Las iPSCs humanas forman colonias de bordes agudos, planas, densamente empaquetadas, similares a las hESCs, y las iPSCs de ratón forman colonias similares a las mESCs, colonias menos planas y más agregadas que las de las hESCs. En ciertas realizaciones, el presente método puede generar células iPS humanas grandes, que pueden tener un diámetro de al menos o alrededor de 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 mm, o cualquier intervalo derivable de ello, y pueden ser fácilmente distinguibles de las células que no son iPS.

Propiedades de crecimiento: El tiempo de duplicación y la actividad mitótica son la piedra angular de las ESCs, ya que las células madre deben auto-renovarse como parte de su definición. Las iPSCs podrían ser activas mitóticamente, auto-renovarse de manera activa, proliferar y dividirse a una velocidad igual que las ESCs.

Marcadores de células madre: Las iPSCs pueden expresar marcadores antigénicos de la superficie celular expresados en las ESCs. Las iPSCs humanas expresaron los marcadores específicos de hESC, que incluyen, pero

sin limitación, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, y Nanog. Las iPSCs de ratón expresaron SSEA-1 pero no SSEA-3 ni SSEA-4, de forma similar a las mESCs.

Genes de células madre: Las iPSCs pueden expresar los genes expresados en las ESCs indiferenciadas, que incluyen Oct-3/4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, y hTERT.

5 Actividad de telomerasa: Las telomerasas son necesarias para mantener la división celular ilimitada en el límite de Hayflick de ~50 divisiones celulares. Las ESCs humanas expresan una elevada actividad de telomerasa para mantener la auto-renovación y la proliferación, y las iPSCs también muestran una elevada actividad de telomerasa y expresan hTERT (telomerasa transcriptasa inversa humana), un componente necesario en el complejo proteico de la telomerasa.

10 Pluripotencia: Las iPSCs serán capaces de diferenciarse de una manera similar a las ESCs hasta tejidos completamente diferenciados.

Diferenciación neuronal: Las iPSCs se podrían diferenciar en neuronas, expresar  $\beta$ III-tubulina, tirosina hidroxilasa, AADC, DAT, ChAT, LMX1B, y MAP2. La presencia de enzimas asociadas a catecolamina puede indicar que las iPSCs, como las hESCs, pueden ser diferenciables hasta neuronas dopaminérgicas. Los genes asociados a las células madre estarán inhibidos tras la diferenciación.

15 Diferenciación cardíaca: Las iPSCs se podrían diferenciar hasta cardiomiocitos que comenzasen a latir espontáneamente. Los cardiomiocitos expresaron TnTc, MEF2C, MYL2A, MYHC $\beta$ , y NKX2.5. Los genes asociados a las células madre estarán inhibidos tras la diferenciación.

20 Formación de teratomas: Las iPSCs inyectadas en ratones inmunodeficientes pueden formar espontáneamente teratomas tras cierto tiempo, tal como nueve semanas. Los teratomas son tumores de múltiples linajes que contienen tejido derivado de las tres capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo; es diferente de otros tumores, que generalmente son de solamente un tipo celular. La formación de teratomas es un ensayo de referencia de la pluripotencia.

25 Cuerpo embriode: Las ESCs humanas en cultivo forman espontáneamente estructuras esféricas similares a embriones denominadas "cuerpos embrioides", que consisten en un núcleo de hESCs activas mitóticamente y en diferenciación, y una periferia de células completamente diferenciadas de las tres capas germinales. Las iPSCs también pueden formar cuerpos embrioides, y tienen células periféricas diferenciadas.

30 Inyección de blastocistos: Las ESCs humanas residen de manera natural dentro de la masa celular interna (embrioblasto) de blastocistos, y en el embrioblasto se diferencian hasta el embrión mientras la cubierta del blastocisto (troboblasto) se diferencia hasta los tejidos extraembrionarios. El trofoblasto hueco es incapaz de formar un embrión vivo, y así es necesario que las células madre embrionarias del embrioblasto se diferencien y formen el embrión. Las iPSCs inyectadas mediante micropipeta en un trofoblasto para generar un blastocisto, transferidas a hembras receptoras, pueden dar como resultado crías de ratón vivas quiméricas: los ratones con derivados de iPSCs los incorporaron en todo su cuerpo con un 10%-90% de quimerismo.

35 ii. Reprogramación epigenética

Desmetilación de promotores: La metilación es la transferencia de un grupo metilo a una base del ADN, en general la transferencia de un grupo metilo a una molécula de citosina en un sitio CpG (secuencia de citosina/guanina adyacente). La metilación generalizada de un gen interfiere con la expresión previniendo la actividad de las proteínas de expresión o reuniendo enzimas que interfieren con la expresión. Así, la metilación de un gen lo silencia de manera eficaz previniendo la transcripción. Los promotores de los genes asociados a la pluripotencia, que incluyen Oct-3/4, Rex1, y Nanog, pueden estar desmetilados en las iPSCs, mostrando su actividad promotora y la promoción y expresión activa de los genes asociados a la pluripotencia en las iPSCs.

45 Desmetilación de histonas: Las histonas son proteínas compactadoras que están localizadas estructuralmente en secuencias de ADN que pueden llevar a cabo su actividad por medio de diversas modificaciones relacionadas con la cromatina. Las histonas H3 asociadas a Oct-3/4, Sox2, y Nanog se pueden desmetilar para activar la expresión de Oct-3/4, Sox2, y Nanog.

B. Selección de la característica exenta de residuos

50 Un vector de reprogramación tal como el vector basado en oriP de esta invención se podría replicar de manera extracromosómica, y perder su presencia en las células hospedadoras tras generaciones. Sin embargo, una etapa de selección adicional de las células de la progenie básicamente exentas de elementos de vectores exógenos puede facilitar este proceso. Por ejemplo, se puede extraer una muestra de células de la progenie para ensayar la presencia o pérdida de elementos de vectores exógenos, como se conoce en la técnica (Leight y Sugden, 2001).

Un vector de reprogramación puede comprender además un marcador de selección, de manera más específica, un marcador de selección negativa, tal como un gen que codifica una timidina quinasa para seleccionar las células de la

progenie básicamente exentas de tal marcador de selección. El gen humano de timidina quinasa de tipo 1 del virus herpes simplex (HSVtk) actúa como un marcador letal condicional en las células de mamífero. La enzima codificada por HSVtk es capaz de fosforilar ciertos análogos de nucleósidos (p.ej., ganciclovir, un fármaco antiherpético), por los que los convierte en inhibidores tóxicos de la replicación del ADN. Una alternativa o una aproximación complementaria es ensayar la ausencia de elementos genéticos exógenos en las células de la progenie, mediante el uso de métodos convencionales, tales como RT-PCR, PCR, FISH (hibridación fluorescente in situ), matriz de genes, o hibridación (p.ej., transferencia de Southern).

#### VIII. Construcción y administración de vectores

En ciertas realizaciones, los vectores de reprogramación se podrían construir para que comprendieran elementos adicionales además de las secuencias de ácido nucleico que codifican los factores de reprogramación, como se describió anteriormente, para expresar estos factores de reprogramación en las células. Una característica de estos métodos es el uso de vectores que se replican de manera extracromosómica, que no se integrarán en el genoma de la célula hospedadora y que se pueden perder durante las generaciones de replicación. Los detalles de los componentes de estos vectores y métodos de administración se describen más adelante.

##### A. Vector

El uso de vectores extracromosómicos basados en plásmidos o liposomas, p.ej., vectores basados en oriP, y/o vectores que codifican un derivado de EBNA-1 permite que se introduzcan grandes fragmentos de ADN en una célula y que se mantengan de manera extracromosómica, que se repliquen una vez por ciclo celular, que se repartan en las células hijas de manera eficaz, y que no generen sustancialmente una respuesta inmunitaria. En particular, EBNA-1, la proteína viral responsable de la replicación del vector de expresión basado en oriP, no genera una respuesta inmunitaria celular porque ha desarrollado un mecanismo eficaz para evitar el procesamiento necesario para la presentación de sus antígenos a las moléculas del MHC de clase I (Levitskaya *et al.*, 1997). Además, EBNA-1 puede actuar en *trans* para aumentar la expresión del gen clonado, induciendo la expresión de un gen clonado hasta 100 veces en ciertas líneas celulares (Langle-Rouault *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1997). Finalmente, la fabricación de tales vectores de expresión basados en oriP es económica.

Otros vectores extracromosómicos incluyen otros vectores basados en herpesvirus linfotrópicos. El herpesvirus linfotrópico es un herpesvirus que se replica en un linfoblasto (p.ej., un linfoblasto B humano) y se convierte en un plásmido durante una parte de su ciclo vital natural. El virus herpes simplex (HSV) no es un herpesvirus "linfotrópico". Los herpesvirus linfotrópicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, EBV, herpesvirus de sarcoma de Kaposi (KSHV); Herpesvirus saimiri (HS) y virus de la enfermedad de Marek (MDV). Además, se contemplan otras fuentes de vectores basados en episomas, tales como ARS de levadura, adenovirus, SV40, o BPV.

Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector por medio de técnicas recombinantes habituales (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados en la presente memoria como referencia).

Los vectores pueden comprender además otros componentes o funcionalidades que modulan adicionalmente la administración de genes y/o la expresión génica, o que proporcionan de otra manera propiedades beneficiosas para las células seleccionadas como objetivo. Dichos otros componentes incluyen, por ejemplo, los componentes que influyen en la unión o la selección de las células (que incluyen componentes que actúan como mediadores en la unión específica del tipo celular o del tejido); los componentes que influyen en la absorción del ácido nucleico del vector por parte de la célula; los componentes que influyen en la localización del polinucleótido dentro de la célula tras la absorción (tales como los agentes que actúan como mediadores en la localización nuclear); y los componentes que influyen en la expresión del polinucleótido.

Tales componentes podrían además incluir marcadores, tales como marcadores detectables y/o de selección que se pueden usar para detectar o seleccionar las células que han absorbido y que expresan el ácido nucleico administrado mediante el vector. Tales componentes se pueden proporcionar como una característica natural del vector (tal como el uso de ciertos vectores virales que tienen componentes o funcionalidades que actúan como mediadores en la unión y la absorción), o se pueden modificar los vectores para proporcionar tales funcionalidades. Se conoce una gran diversidad de tales vectores en la técnica, y en general están disponibles. Cuando se mantiene un vector en una célula hospedadora, las células pueden replicar de manera estable el vector durante la mitosis como una estructura autónoma, incorporarlo dentro del genoma de la célula hospedadora, o mantenerlo en el núcleo o el citoplasma de la célula hospedadora.

##### B. Elementos reguladores

Los casetes de expresión eucariótica incluidos en los vectores contienen preferiblemente (en una dirección 5' a 3') un promotor transcripcional eucariótico unido de forma operable a una secuencia codificante de proteína, señales de corte y empalme que incluyen secuencias intermedias, y una secuencia de terminación transcripcional/poliadenilación.



## i. Promotor/potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controla el inicio y la velocidad de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las frases "colocado de forma operable", "unido de forma operable", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcional correcta con respecto a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio transcripcional y/o la expresión de esa secuencia.

Los promotores adecuados para el uso en el vector que codifica EBNA-1 de la invención son aquellos que dirigen la expresión de los casetes de expresión que codifican la proteína EBNA-1 para dar como resultado unos niveles constantes suficientes de proteína EBNA-1 para mantener de manera estable los vectores que contienen oriP de EBV. Los promotores se pueden usar también para la expresión eficaz de factores de reprogramación que codifican casetes de expresión.

Un promotor comprende en general una secuencia que funciona para colocar el sitio de inicio para la síntesis del ARN. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en ciertos promotores que carecen de una caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor del gen de desoxinucleotidil transferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que cubre el propio sitio de inicio para ayudar a reparar el lugar de inicio. Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio transcripcional. En general, estos se localizan en la región de 30-110 pb en dirección 5' respecto del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales posteriores al sitio de inicio. Para poner una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se coloca el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional "en dirección 3'" (es decir, en posición 3') del promotor elegido. El promotor "en dirección 5'" estimula la transcripción del ADN y favorece la expresión del ARN codificado.

El espaciado entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de forma que se conserva la función del promotor cuando se invierten o se mueven los elementos unos respecto de otros. En el promotor *tk*, el espaciado entre los elementos promotores se puede incrementar hasta 50 pb antes de que la actividad comience a decaer. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción. Un promotor se puede usar o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado de manera natural a una secuencia de ácido nucleico, tal como se puede obtener aislando las secuencias no codificantes de 5' localizadas en dirección 5' del segmento codificante y/o exón. Tal promotor se puede denominar "endógeno". De forma similar, un potenciador puede ser uno asociado de manera natural a una secuencia de ácido nucleico, localizado en dirección 3' o 5' de esa secuencia. De manera alternativa, se obtendrán ciertas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, lo que se refiere a un promotor que no está asociado normalmente a una secuencia de ácido nucleico en su medio natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que normalmente no está asociado a una secuencia de ácido nucleico en su medio natural. Tales promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariótica o eucariótica, y promotores o potenciadores que no "se dan de manera natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras transcripcionales, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan de manera más habitual en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas de promotores de  $\beta$ -lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (*trp*). Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de manera sintética, se pueden producir secuencias mediante el uso de clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácido nucleico, que incluye PCR™, en relación a las composiciones descritas en la presente memoria (véanse las Patentes de EE.UU. N°s 4.683.202 y 5.928.906, cada una incorporada en la presente memoria como referencia). Además, se contempla que se puedan usar también secuencias de control que dirigen la transcripción y/o la expresión de secuencias dentro de orgánulos que no son nucleares, tales como las mitocondrias, cloroplastos, y similares.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija de manera eficaz la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, tipo de célula, tejido, órgano, u organismo elegido para la expresión. Los expertos en la técnica de biología molecular conocen en general el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* 1989, incorporado en la presente memoria como referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles, y/o útiles en las condiciones adecuadas para dirigir la expresión a nivel elevado del segmento de ADN introducido, como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Además, también se podría usar cualquier combinación promotor/potenciador (por ejemplo, la base de datos de promotores eucarióticos EPDB, en internet en [epd.isb-sib.ch/](http://epd.isb-sib.ch/)) para controlar la expresión. Otra realización posible es

el uso de un sistema de expresión citoplasmática de T3, T7 o SP6. Las células eucarióticas pueden mantener la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana adecuada, como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.

5 Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen los promotores virales tempranos o tardíos, tales como los promotores tempranos o tardíos de SV40, promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus (CMV), promotores tempranos del virus del sarcoma de Rous (RSV); promotores de células eucarióticas, tales como, p.ej., el promotor de beta actina (Ng, 1989, Quitsche *et al.*, 1989), promotor de GADPH (Alexander *et al.*, 1988, Ercolani *et al.*, 1988), promotor de metalotioneína (Karin *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1984); y promotores de elementos de respuesta concatenados, tales como los promotores de elementos de respuesta al AMP cíclico (cre), el promotor de elementos de respuesta al suero (sre), promotor de éster de forbol (TPA) y promotores de elementos de respuesta (tre) cercanos a una caja TATA mínima. También es posible usar secuencias promotoras de hormonas del crecimiento humanas (p.ej., el promotor mínimo de la hormona del crecimiento humana descrita en Genbank, nº de acceso X05244, nucleótidos 283-341) o un promotor de tumor mamario de ratón (disponible de la ATCC, nº de cat. de la ATCC 45007). Un ejemplo específico podría ser un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK).

15 ii. Señales de inicio y sitios internos de unión al ribosoma

También puede ser necesaria una señal de inicio específica para la traducción eficaz de las secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o las secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control traduccional exógenas, que incluyen el codón de inicio ATG. Alguien de experiencia habitual en la técnica sería capaz de determinarlo fácilmente, y proporcionar las señales necesarias. Se sabe que el codón de inicio debe estar "en el mismo marco" que el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control traduccional exógenas y los codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión se puede incrementar mediante la inclusión de elementos potenciadores adecuados de la transcripción.

25 En ciertas realizaciones de la invención, se usan elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear mensajes multigénicos, o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de evitar el modelo de exploración de los ribosomas de la traducción dependiente de la caperuzas metilada de 5', y comienzan la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito los elementos IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como IRES de un mensaje de mamíferos (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES se pueden unir a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, por lo que se crean mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para su traducción eficaz. Se pueden expresar de manera eficaz múltiples genes mediante el uso de un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véanse las Patentes de EE.UU. N°s 5.925.565 y 5.935.819, cada una incorporada en la presente memoria como referencia).

35 iii. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios para enzimas de restricción, cualquiera de los cuales se puede usar junto con la tecnología recombinante habitual para digerir el vector (véase, por ejemplo, Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, y Cocea, 1997, incorporados en la presente memoria como referencia). La "digestión con enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solamente en localizaciones específicas de una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. Los expertos en la técnica entienden en general el uso de tales enzimas. Con frecuencia, un vector se linealiza o se fragmenta mediante el uso de una enzima de restricción que corta en el MCS para permitir que se ligen las secuencias exógenas al vector. La "ligadura" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser o no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican las enzimas de restricción y las reacciones de ligadura son muy conocidas para los expertos en la técnica de la tecnología recombinante.

iv. Sitios de corte y empalme

50 La mayoría de las moléculas de ARN eucarióticas transcritas experimentará corte y empalme del ARN para eliminar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucarióticas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme donantes y/o aceptores para asegurar el procesamiento adecuado del transcrito para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Chandler *et al.*, 1997, incorporado en la presente memoria como referencia).

v. Señales de terminación

55 Los vectores o construcciones de la presente invención comprenderán en general al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" consiste en las secuencias de ADN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Así, en ciertas realizaciones, se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. Puede ser necesario un terminador *in*

vivo para alcanzar niveles deseables de mensaje.

5 En los sistemas eucarióticos, la región del terminador puede comprender además secuencias de ADN específicas que permitan la escisión específica de sitio del transcrito nuevo para exponer un sitio de poliadenilación. Esto actúa como señalización para que una polimerasa endógena especializada añada un tramo de alrededor de 200 residuos de A (poliA) en el extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen más estables y se traducen de manera más eficaz. Así, en otras realizaciones que implican a los eucariotas, se prefiere que ese terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y se prefiere más que la señal del terminador favorezca la poliadenilación del mensaje. El terminador y/o los elementos del sitio de poliadenilación pueden servir para aumentar los niveles del mensaje y para minimizar la lectura del casete hacia otras secuencias.

10 Los terminadores contemplados para el uso en la invención incluyen cualquier terminador conocido de la transcripción descrito en la presente memoria o conocido para alguien de experiencia habitual en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tales como, por ejemplo, el terminador de la hormona del crecimiento bovina o las secuencias de terminación virales, tales como, por ejemplo, el terminador de SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser la ausencia de una secuencia transcribible o traducible, tal como la debida a un truncamiento de secuencia.

vi. Señales de poliadenilación

15 En la expresión, en particular en la expresión eucariótica, en general se incluirá una señal de poliadenilación para llevar a cabo la poliadenilación adecuada del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica eficaz de la invención, y se puede emplear cualquiera de tales secuencias. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, que se sabe que funcionan de manera adecuada y conocida en las diversas células objetivo. La poliadenilación puede incrementar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

vii. Orígenes de replicación

20 Para propagar un vector en una célula hospedadora, el vector puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo denominados "ori"), por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que corresponde a oriP de EBV como se describió anteriormente, que es una secuencia de ácido nucleico específica en la que se inicia la replicación. De manera alternativa, se puede emplear un origen de replicación de otro virus de replicación extracromosómica como se describió anteriormente o una secuencia de replicación autónoma (ARS).

viii. Marcadores de selección y cribables

25 En ciertas realizaciones de la invención, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención se pueden identificar *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permitiese la identificación sencilla de las células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positiva es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras un marcador de selección negativa es uno en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a fármacos.

30 Normalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación y la identificación de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, blastidina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes basándose en la aplicación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores cribables, tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. De manera alternativa, se pueden utilizar enzimas cribables como marcadores de selección negativa, tales como timidina quinasa del virus herpes simplex (*tk*) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la técnica también sabría emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis mediante FACS. No se cree que el marcador usado sea importante, con tal de que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Los ejemplos adicionales de marcadores de selección y cribables son muy conocidos para un experto en la técnica.

C. Administración de vectores

35 La introducción de un vector de reprogramación en las células somáticas con la presente invención puede usar cualquier método adecuado para la administración de ácidos nucleicos para la transformación de una célula, como se describe en la presente memoria o como conocería alguien de experiencia habitual en la técnica. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, la administración directa de ADN, tal como mediante transfección *ex vivo* (Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989); mediante inyección (Patentes de EE.UU. N°s 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859, todas incorporadas en la presente memoria como referencia), que incluye la microinyección (Harland y Weintraub, 1985; Patente de EE.UU. N° 5.789.215, incorporada en la presente memoria como referencia); mediante electroporación (Patente de EE.UU. N° 5.384.253, incorporada en la presente memoria como referencia; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); mediante precipitación con

fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); mediante el uso de DEAE-dextrano seguido de polietilén glicol (Gopal, 1985); mediante carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); mediante bombardeo con microproyectiles (Solicitudes PCT N°s WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE.UU. N°s 5.610.042; 5.322.783 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880, todas incorporadas en la presente memoria como referencia); mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler *et al.*, 1990; Patente de EE.UU. N°s 5.302.523 y 5.464.765, incorporadas en la presente memoria como referencia); mediante absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985), y cualquier combinación de tales métodos. Por medio de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar de manera estable o transitoria orgánulo(s), célula(s), tejido(s) u organismo(s).

#### i. Transfección mediada por liposomas

En una cierta realización de la invención, se puede atrapar un ácido nucleico en un lípido complejo tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio interno acuoso. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de disolución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan un auto-reordenamiento antes de la formación de las estructuras cerradas, y atrapan agua y los solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contempla un ácido nucleico complejado con Lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen). La cantidad de liposomas usada puede variar con la naturaleza del liposoma, así como la célula usada, por ejemplo, se puede considerar alrededor de 5 a alrededor de 20 µg de ADN de vector por 1 a 10 millones de células.

La administración de ácidos nucleicos mediada por liposomas y la expresión de ADN exógeno *in vitro* ha sido muy eficaz (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). También se ha demostrado la viabilidad de la administración mediada por liposomas y la expresión del ADN exógeno en células cultivadas de embrión de pollo, HeLa y hepatoma (Wong *et al.*, 1980).

En ciertas realizaciones de la invención, se puede complejar un liposoma con un virus que provoca hemaglutinación (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y favorece la entrada a la célula del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda *et al.*, 1989). En otras realizaciones, se puede complejar o emplear un liposoma junto con proteínas cromosómicas que no son histonas nucleares (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). En otras realizaciones adicionales, se puede complejar o emplear un liposoma junto con HVJ y HMG-1. En otras realizaciones, un vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma.

#### ii. Electroporación

En ciertas realizaciones de la presente invención, se introduce un ácido nucleico en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo por medio de electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alta tensión. Las células receptoras se pueden hacer más susceptibles a la transformación mediante daño mecánico. Además, la cantidad de los vectores usados puede variar con la naturaleza de las células usadas, por ejemplo, se puede contemplar alrededor de 5 a alrededor de 20 µg de ADN de vector por 1 a 10 millones de células.

La transfección de células eucarióticas mediante el uso de la electroporación ha sido bastante eficaz. Se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con genes de inmunoglobulina kappa humana (Potter *et al.*, 1984), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa *et al.*, 1986) de esta manera.

#### iii. Fosfato cálcico

En otras realizaciones de la presente invención, se introduce un ácido nucleico en las células mediante el uso de la precipitación con fosfato cálcico. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham y Van Der Eb, 1973) mediante el uso de esta técnica. También de esta manera, se transfectaron células L(A9) de ratón, C127 de ratón, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, 1987), y se transfectaron hepatocitos de rata con una diversidad de genes marcadores (Rippe *et al.*, 1990).

#### iv. DEAE-dextrano

En otra realización, se administra un ácido nucleico a una célula mediante el uso de DEAE-dextrano seguido de polietilén glicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos indicadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, 1985).

#### v. Carga por sonicación

Las realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción de un ácido nucleico mediante carga sónica directa. Se han transfectado fibroblastos LTK<sup>+</sup> con el gen de timidina quinasa mediante carga por sonicación

(Fechheimer *et al.*, 1987).

vi. Transfección mediada por receptores

Además, se puede administrar un ácido nucleico a una célula objetivo por medio de vehículos de administración mediada por receptores. Estos aprovechan la absorción selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por receptores que se dará en una célula objetivo. En vista de la distribución específica del tipo celular de diversos receptores, este método de administración añade otro grado de especificidad a la presente invención.

Ciertos vehículos de selección génica mediada por receptores comprenden un ligando específico del receptor celular y un agente de unión al ácido nucleico. Otros comprenden un ligando específico del receptor celular al que se ha unido de forma operable el ácido nucleico a administrar. Se han usado varios ligandos para la transferencia génica mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, documento EPO 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otro tipo de células de mamífero (Wu y Wu, 1993; incorporado en la presente memoria como referencia). En ciertos aspectos de la presente invención, se elegirá un ligando para que corresponda a un receptor expresado de manera específica en la población de células objetivo.

En otras realizaciones, un componente del vehículo de administración de ácidos nucleicos de un vehículo que dirige el ácido nucleico específico de células puede comprender un ligando de unión específica en combinación con un liposoma. El/los ácido(s) nucleico(s) a administrar se albergan dentro del liposoma, y el ligando de unión específica se incorpora de manera funcional en la membrana del liposoma. El liposoma se unirá así de manera específica a el/los receptor(es) de una célula objetivo y administrará el contenido a una célula. Se ha demostrado que tales sistemas son funcionales mediante el uso de sistemas en los que, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por receptores de un ácido nucleico a células que exhiben un aumento del receptor de EGF.

En las realizaciones adicionales, el componente del vehículo de administración de ácidos nucleicos de un vehículo de administración dirigida puede ser un liposoma propiamente dicho, que comprenderá preferiblemente uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, se ha incorporado lactosil-ceramida, un asialgangliósido con galactosa terminal, en liposomas y se ha observado un incremento de la absorción del gen de insulina por los hepatocitos (Nicolau *et al.*, 1987). Se considera que las construcciones transformantes específicas de tejido de la presente invención se pueden administrar específicamente a una célula objetivo de una manera similar.

vii. Bombardeo con microproyectiles

Las técnicas de bombardeo con microproyectiles se pueden usar para introducir un ácido nucleico en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (Patente de EE.UU. N° 5.550.318; Patente de EE.UU. N° 5.538.880; Patente de EE.UU. N° 5.610.042; y Solicitud PCT WO 94/09699; cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia). Este método depende de la capacidad de acelerar microproyectiles revestidos de ADN a una velocidad elevada que les permita perforar las membranas celulares y entrar en las células sin destruirlas (Klein *et al.*, 1987). Hay una amplia diversidad de técnicas de bombardeo con microproyectiles conocidas en la técnica, muchas de las cuales son aplicables a la invención.

En este bombardeo con microproyectiles, se puede revestir una o más partículas con al menos un ácido nucleico y administrarlas a las células mediante una fuerza propulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de tales dispositivos se basa en una descarga de alta tensión para generar una corriente eléctrica, lo que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang *et al.*, 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como partículas o microesferas de oro o tungsteno. Las partículas ejemplares incluyen las que consisten en tungsteno, platino, y, preferiblemente, oro. Se considera que en ciertos casos no sería necesaria la precipitación del ADN sobre las partículas metálicas para la administración del ADN a una célula receptora mediante el uso del bombardeo con microproyectiles. Sin embargo, se considera que las partículas pueden contener ADN en vez de revestirlas con ADN. Las partículas revestidas con ADN pueden incrementar el nivel de administración de ADN por medio del bombardeo con partículas, pero no son, en sí mismas, necesarias.

Para el bombardeo, se concentran las células en suspensión en filtros o medio de cultivo sólido. De manera alternativa, las células de embriones inmaduros u otras células objetivo se pueden disponer en un medio de cultivo sólido. Las células a bombardear se colocan a una distancia adecuada por debajo de la placa de parada de macroproyectiles.

**IX. Ejemplos**

Los ejemplos siguientes se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan las técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y así se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían apreciar, en vista de la

presente descripción, que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen, y obtener todavía un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

#### Ejemplo 1 - Reprogramación episómica de fibroblastos de prepucio humanos con compuestos químicos pequeños

5 Por medio del cribado de compuestos químicos conocidos que influyen en la obtención de células iPS, los inventores han identificado varios compuestos que mejoraron significativamente la eficacia de la reprogramación episómica de fibroblastos de prepucio humanos. BIX01294 (B) es un inhibidor selectivo de G9a histona metiltransferasa. En combinación con BayK8644, se identificó inicialmente como moléculas pequeñas que podrían permitir la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón transducidos con Oct4 y Klf4 solo (Shi *et al.*, 2008). PD0325901 (P) es un inhibidor de la proteína quinasa quinasa activada por mitógenos (MAPK/ER quinasa o MEK). CHIR99021 (C) es el inhibidor más selectivo de GSK3P, mientras A-83-01 (A) es un inhibidor potente del receptor de TGF- $\beta$  de tipo I ALK5, el receptor de Activina/Nodal ALK4, y el receptor de Nodal ALK7. La combinación de PD0325901 y CHIR99021 (2i) ha permitido la obtención eficaz de células ES de ratón de cepas recalcitrantes (Ying *et al.*, 2008). En la condición 2i, el factor inhibidor de leucemia (LIF), que se usó de manera rutinaria para el cultivo de células ES de ratón, aunque prescindible, estimuló la clonogenicidad y la obtención de células ES de ratón (Ying *et al.*, 2008). Se demostró que esta condición 2i/LIF favoreció la reprogramación de las células madre neuronales de ratón hasta una pluripotencia auténtica (Silva *et al.*, 2008). De manera interesante, aunque las células ES de rata auténticas se podrían obtener fácilmente de embriones tempranos en esta condición 2i/LIF (Buehr *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008), se demostró que la adición de A-83-01 era necesaria para mantener el cultivo a largo plazo de células iPS de rata (Li *et al.*, 2009). Se demostró también que la combinación de PD0325901, CHIR99021, A-83-01 y LIF era capaz de seleccionar y estabilizar las células iPS humanas similares a las células ES de ratón atípicas a partir del cultivo de reprogramación mediada por lentivirus (Li *et al.*, 2009); sin embargo, no se han documentado efectos de la combinación de estos inhibidores sobre la reprogramación, especialmente sobre la reprogramación episómica.

Para el cultivo celular, se mantuvieron células ES y células iPS humanas en fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEFs) en medio de cultivo DMEM/F12 complementado con un 20% de sustituto de suero KnockOut, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, Glutamax 1 mM (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM y 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico de pez cebra (zbFGF) (Amit *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2006a; Thomson *et al.*, 1998). El cultivo exento de células de soporte en Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA) con medio acondicionado se llevó a cabo como se describió previamente (Xu *et al.*, 2001), excepto con 100 ng/ml de zbFGF. Se cultivaron fibroblastos de prepucio de recién nacido humano (Cat nº CRL-2097™, ATCC, Manassas, VA) y fibroblastos de adulto de una biopsia cutánea de una persona de 42 años en DMEM (Invitrogen) complementado con un 10% de suero bovino fetal definido (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, Glutamax 2 mM (todos de Invitrogen),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM y 4 ng/ml de zbFGF. Se obtuvo mTeSR™1 de Stem Cell Technologies Inc. (Vancouver, Canadá). Se preparó medio N2B27 como sigue: Medio de cultivo DMEM/F12 complementado con suplemento N2 1 x, suplemento B-27 1 x, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, Glutamax 1 mM (todos de Invitrogen),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM.

Para la reprogramación episómica de las células somáticas humanas, se cotransfectaron fibroblastos de prepucio humanos, vectores episómicos (FIG. 1A, 7,3  $\mu$ g de pEP4EO2SCK2MEN2L y 3,2  $\mu$ g de pEP4EO2SET2K) (Yu *et al.*, 2009) en  $1 \times 10^6$  células a través de nucleofección (NHDF-VPD-1001 con el programa U-20, Amaxa, Walkersville, MD). Los fibroblastos de prepucio transfectados de cada nucleofección se colocaron directamente en 3 x placas de 10 cm sembradas con MEF en medio de cultivo de fibroblastos. Para los fibroblastos cutáneos de adulto, se cotransfectaron 7,3  $\mu$ g de pEP4EO2SCK2MEN2L y 6,4  $\mu$ g de pEP4EO2SET2K en  $1 \times 10^6$  células a través de nucleofección (NHDF-VPD-1001 con el programa U-20, Amaxa). Los fibroblastos cutáneos de adulto transfectados de cada nucleofección se colocaron directamente en 1 x placas de 10 cm sembradas con MEF en medio de cultivo de fibroblastos debido a la supervivencia celular inferior. Al día siguiente, el medio de cultivo de fibroblastos se sustituyó por medio de cultivo de fibroblastos reciente o diversos medios de reprogramación (p.ej., medio de cultivo de células ES humanas previamente acondicionado con MEFs -CM, medio de cultivo de células ES humanas, mTeSR™1, N2B27) complementado con o sin zbFGF (100 ng/ml), con o sin los compuestos siguientes: H - HA-100 (10  $\mu$ M); B - BIX01294 (1  $\mu$ M); P - PD0325901 (0,5  $\mu$ M); C - CHIR99021 (3  $\mu$ M); A - A-83-01 (0,5  $\mu$ M) y L - hLIF (10 ng/ml). Para obtener células iPS similares a las células ES humanas, se sustituyó el medio de reprogramación por CM complementado con 100 ng/ml de zbFGF o mTeSR™1 en el día 13 - 20 tras la transfección. Para obtener un tipo diferente de células iPS (piPSC para iPSCs parcialmente reprogramadas), el medio de reprogramación se sustituyó por medio CM o N2B27 complementado con PCAL. La tinción de fosfatasa alcalina (Cat nº SCR004, Millipore, Billerica, MA) se llevó a cabo entre el día 18 y el día 24 tras la transfección para comprobar la eficacia de la reprogramación.

55 BIX01294, aunque por sí solo pudo mejorar la reprogramación mediante los vectores episómicos (FIG. 1A), no mostró ningún beneficio o solamente un ligero beneficio en combinación con PD0325901, CHIR99021 y A-83-01 (FIGs. 1B y 2A). A diferencia de la reprogramación de células madre neuronales de ratón (Silva *et al.*, 2008), en la que fueron suficientes PD0325901 y CHIR99021 solos, fueron necesarios los tres compuestos químicos (PD0325901, CHIR99021 y A-83-01) para conseguir la mejor eficacia de reprogramación (FIG. 1B). Las colonias de células iPS obtenidas pudieron ser fácilmente distinguibles de las colonias que no fueron células iPS en presencia de los tres compuestos químicos (FIG. 1C). Esto permitiría el mantenimiento de la clonalidad de las células iPS durante la recogida y la expansión, una gran mejora del protocolo previo (Yu *et al.*, 2009) en el que era necesario el pase del

cultivo de reprogramación primario para identificar las células iPS de las que no eran células iPS. Se demostró que HA-100 mejoraba la eficacia de clonación de las células ES humanas. Se incluyó en los subgrupos de experimentos. La adición de LIF humano (hLIF, o L) facilitó adicionalmente la reprogramación episómica con PD0325901, CHIR99021 y A-83-01 (FIG. 2A). Además, con la adición de LIF, la primera aparición de las células iPS fue aproximadamente 3-4 días antes (~ día 14 tras la transfección), y hubo colonias más grandes de células iPS (FIG. 2A).

Debido a que PD0325901 inhibe de manera eficaz la actividad de MEK, un objetivo posterior de la señalización de bFGF, también se examinó el efecto de bFGF sobre la reprogramación. Tal como se muestra en la FIG. 2A, una concentración elevada de bFGF (100 ng/ml) fue beneficiosa en esta condición de reprogramación particular. Este efecto fue el resultado muy probablemente de los efectos no mediados por MEK del nivel elevado de bFGF. El efecto del nivel elevado de bFGF pareció depender del medio de cultivo de reprogramación específico. Por ejemplo, bFGF mostró efectos beneficiosos cuando se usó medio de cultivo de células ES humanas acondicionado (CM) y medio N2B27 definido exento de suero (FIGs. 2A y 4A), mientras se observó el efecto opuesto cuando se ensayó un medio de cultivo de células ES humanas sin acondicionar (FIG. 4A). Tal como se muestra en la FIG. 2B, la adición temprana de los compuestos químicos incrementó la eficacia de la reprogramación, y fue necesario un tratamiento químico más largo para conseguir la mejor eficacia de reprogramación.

La proliferación de las células ES humanas y células iPS similares a las células ES humanas requiere la activación de las rutas de señalización de FGF y TGF $\beta$ /Activina, de forma similar a las EpiSCs de ratón derivadas de epiblastos de ratón post-implantación. PD0325901 inhibe MEK, un objetivo posterior de la señalización de FGF, y A-83-01 inhibe la señalización de TGF $\beta$ /Activina. La observación de que ambos fármacos incrementaron la reprogramación fue bastante sorprendente. Tal como se muestra en la FIG. 3A, las células ES humanas y las células iPS similares a las células ES humanas experimentaron una diferenciación eficaz en presencia del cóctel químico de reprogramación (PD0325901, CHIR99021, A-83-01 y hLIF). Para confirmar la identidad de las células iPS obtenidas en presencia del cóctel químico, las células iPS se recogieron para su expansión en condiciones de cultivo de células ES humanas normales. Los ensayos iniciales produjeron muchas colonias diferenciadas con agrupamientos pequeños de células indiferenciadas, que fueron muy diferentes de las células iPS obtenidas en ausencia del cóctel químico, en las que la mayoría de colonias permanecieron indiferenciadas. Este resultado sugiere que la mayoría de las células iPS obtenidas en presencia del cóctel químico fueron diferentes de las células iPS similares a las células ES humanas normales.

En presencia del cóctel químico, las células iPS se pudieron recoger y expandir en células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón (FIG. 3C), aunque con mucha diferenciación, lo que sugiere la necesidad de optimización del cultivo. La eliminación del cóctel químico cultivando estas células iPS en una condición de cultivo de células ES humanas normales dio como resultado una diferenciación significativa, muchas de las cuales formaron estructuras de roseta (FIG. 3D), lo que sugiere que estas células tienen una capacidad de diferenciación neuronal *in vitro* eficaz en contraste con la mayoría de las células iPS humanas previamente obtenidas. Estos datos y la observación de que hLIF mejoró la reprogramación sugieren que este tipo de células iPS humanas son diferentes de las células iPS similares a las células ES humanas normales, y más tarde se descubrió que eran una etapa intermedia de las células reprogramadas.

La presencia de agrupamientos pequeños de células indiferenciadas cuando se recogieron y se expandieron las células iPS obtenidas químicamente en una condición de cultivo de células ES humanas normales generó la posibilidad de que las células iPS similares a las células ES humanas normales se pudieran obtener también del cultivo de reprogramación tratado con productos químicos. De hecho, cuando el cóctel químico se eliminó del cultivo de reprogramación tras un tratamiento de un mínimo de diez días, las células iPS similares a las células ES humanas normales se expandieron fácilmente en condiciones de cultivo de células ES humanas normales (FIG. 3B). El origen de estas células iPS sigue siendo una cuestión interesante. Se pueden expandir a partir de células iPS similares a las células ES humanas normales preexistentes, o se pueden obtener a partir de células piPS, ya que las células piPS podrían dar lugar fácilmente a células iPS similares a las células ES humanas normales en las condiciones de cultivo de las células ES humanas normales.

La reprogramación de las células somáticas humanas se llevó a cabo en general en células de soporte de MEF con un medio de cultivo de células ES humanas previamente acondicionado con MEFs (CM). La calidad de los MEFs varía significativamente entre los diferentes lotes, lo que tiene un gran impacto sobre la consistencia de la eficacia de reprogramación. Y la preparación de MEF y CM puede ser bastante laboriosa. Además, las células de soporte de MEF y de CM mantienen el crecimiento de una amplia diversidad de tipos de células, lo que podría plantear limitaciones significativas sobre la eficacia de la reprogramación, ya que la proliferación de células que no son iPS durante la reprogramación puede afectar negativamente a la reprogramación. Para superar este problema, se ensayaron diferentes medios de cultivo. Tal como se muestra en la FIG. 4A, TeSR, un medio de cultivo de células ES humanas sin acondicionar sin complemento de bFGF y el medio N2B27 mantuvieron una reprogramación episómica robusta, mayor que la de CM complementado con bFGF.

Además, diferentes medios de reprogramación (etapa 2, FIG. 4B) dieron lugar a dos tipos de células iPS con diferentes eficacias. Dependiendo de qué medio de reprogramación se usó, la eficacia de obtención de dos tipos de células iPS difirió como se muestra en la FIG. 4A. Por ejemplo, cuando se usó medio hESC (+PCALH) en la

reprogramación, se pueden obtener fácilmente células iPS similares a las células ES humanas del cultivo de reprogramación mediante el uso de medio de expansión CM+bFGF o TeSR, y células piPS cuando se usa medio de expansión N2B27+PCAL. Sin embargo, no se pudieron obtener o se obtuvieron pocas células iPS similares a las células ES humanas cuando se usó medio N2B27 (+PCALH) como medio de reprogramación.

- 5 Esto sugiere que la combinación del medio de reprogramación (etapa 2, FIG. 4B) y el medio de expansión (etapa 3, FIG. 4B) afectará probablemente al nivel de heterogeneidad de las células iPS en el cultivo de reprogramación. Las combinaciones óptimas de medios para la obtención de cada tipo de célula iPS se pueden seleccionar para minimizar la variación de clon a clon de células iPS.

#### Ejemplo 2 - Reprogramación episómica exenta de células de soporte con moléculas pequeñas

- 10 Las iPSCs humanas, similares a las células madre embrionarias humanas (ESCs), tienen una capacidad de proliferación ilimitada y tienen la capacidad de diferenciarse hasta todos los tipos de células del cuerpo. Estas células, así, tienen aplicaciones en biología básica, modelización de enfermedades, desarrollo de fármacos, y terapias de trasplantes. Al expresar un grupo definido de factores de reprogramación, se han generado iPSCs a partir de muchos tipos de células de especies diferentes (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Takahashi y Yamanaka, 2006; Liu *et al.*, 2008; Esteban *et al.*, 2009; Loh *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Shimada *et al.*, 2010). Los métodos iniciales para la generación de iPSCs emplearon vectores retrovirales o lentivirales de integración en el genoma (Yu *et al.*, 2007; Takahashi y Yamanaka, 2006). Estas aproximaciones pudieron producir mutaciones tumorigénicas por inserción, y la cantidad residual o la reactivación de la expresión de transgenes durante la diferenciación de iPSCs podría afectar a la elección del linaje y a la funcionalidad de los derivados de iPSCs (Yu *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007). Para superar estos problemas, se desarrollaron diversos métodos para obtener iPSCs sin huellas, que incluyeron los tratamientos repetidos con factores de reprogramación (plásmidos, ADN minicircular, vectores adenovirales sin integración y proteínas), transposones y vectores virales de ARN (Okita *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008; Fusaki *et al.*, 2009; Kaji *et al.*, 2009; Woltjen *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2010). Sin embargo, estos métodos se ven afectados por una o más de las siguientes limitaciones: la inaceptable baja eficacia de reprogramación; la laboriosa eliminación de los factores de reprogramación de las iPSCs; la necesidad de células de empaquetamiento viral o de soporte. Así, existe la necesidad de desarrollar un método simple y exento de células de soporte eficaz para permitir la obtención rutinaria de iPSCs sin huellas a partir de muchas muestras de donantes humanos y finalmente la obtención de iPSCs humanas de grado clínico.

- 30 Previamente se generaron iPSCs humanas sin huellas mediante el uso de vectores episómicos de oriP/EBNA-1 (antígeno nuclear 1 de Epstein-Barr) para administrar los genes de reprogramación (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-MYC, KLF4 y SV40LT) (Yu *et al.*, 2009). En comparación con otros métodos, esta aproximación tiene varias ventajas. En primer lugar, los vectores de oriP/EBNA-1 tienen un amplio intervalo de células hospedadoras, lo que permite la aplicación de este método a muchos tipos de células humanas. En segundo lugar, no requiere el empaquetamiento viral. En tercer lugar, no son necesarios tratamientos repetidos con los factores de reprogramación. Una única transfección de vectores episómicos es suficiente para la obtención de iPSCs humanas. Además, se puede alcanzar una eficacia de transfección más elevada con estos vectores debido a la importación nuclear mediada por oriP/EBNA-1 y a la retención del ADN del vector (Middleton y Sugden, 1994). En cuarto lugar, los vectores de oriP/EBNA-1 se replican una vez por ciclo celular, y en general están presentes en un número bajo de copias por célula, por lo que se minimiza el reordenamiento del ADN y la integración en el genoma (Yates y Guan, 1991). Por último, la eliminación de los vectores episómicos de las iPSCs humanas se puede llevar a cabo mediante cultivo celular simple sin ninguna manipulación adicional, debido al silenciamiento del promotor viral que controla la expresión de EBNA-1 en las iPSCs, y a la inestabilidad inherente del estado episómico de oriP/EBNA-1 - los episomas establecidos de manera estable se pierden de las células a una velocidad del ~ 5% por generación celular debido a defectos en la síntesis y el reparto del vector (Nanbo *et al.*, 2007). A pesar de estas ventajas, la aproximación episómica original de oriP/EBNA-1 proporcionó una eficacia de reprogramación baja (~ 3 colonias de iPSCs a partir de ~  $1 \times 10^5$  fibroblastos de prepucio humanos iniciales), y usó células de soporte de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), lo que limita seriamente las aplicaciones industriales y terapéuticas de este método.

- 50 Para superar estas limitaciones, primero se cribaron moléculas pequeñas en busca de una eficacia de reprogramación episómica mejorada. Los vectores de oriP/EBNA-1 pueden establecer episomas estables solamente en un 1-10% de las células transfectadas (Leight y Sugden, 2001). Durante las primeras dos semanas tras la transfección, las células transfectadas pierden los vectores oriP/EBNA-1 a >25% por generación celular, lo que va acompañado por el silenciamiento de transgenes probablemente mediado por medio de la metilación del ADN (Kameda *et al.*, 2006). La pérdida de la expresión de transgenes durante las primeras dos semanas tras la transfección, debida a la pérdida del vector o al silenciamiento de transgenes, es responsable principalmente de la baja eficacia de la reprogramación episómica. Así, se espera que las moléculas pequeñas, que podrían acelerar el proceso de reprogramación, o reducir el silenciamiento de transgenes, o incrementar la eficacia del establecimiento de episomas estables, mejoren la reprogramación. Ensayando las moléculas pequeñas que previamente se demostró que favorecían la reprogramación, se descubrió que se podría incrementar enormemente la eficacia de la reprogramación episómica con la adición de un inhibidor de MEK PD0325901, un inhibidor de GSK3 $\beta$  CHIR99021, y un inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ /Activina/Nodal A-83-01 (FIG. 5A). Los estudios previos demostraron que los inhibidores de la señalización de TGF- $\beta$  junto con el inhibidor de MEK PD0325901 dieron como resultado un incremento >100 veces de la eficacia de reprogramación viral (Lin *et al.*, 2009). Como se muestra en la FIG. 1a, el



inhibidor de la señalización de TGF- $\beta$  A-83-01, solo o junto con el inhibidor de MEK PD0325901, tuvo un efecto mínimo sobre la reprogramación episómica. Los tres inhibidores PD0325901, CHIR99021, y A-83-01 fueron necesarios para conseguir el incremento máximo de la eficacia de reprogramación. El factor inhibidor de leucemia humano (hLIF), aunque no mejoró significativamente la eficacia de la reprogramación episómica, incrementó la proliferación de intermedios de reprogramación. El inhibidor de ROCK HA-100, aunque tuvo un efecto mínimo por sí solo, incrementó adicionalmente la eficacia de la reprogramación episómica en presencia de PD0325901, CHIR99021, A-83-01 y hLIF. El efecto de HA-100 podría no estar mediado a través de su función en la estimulación de la supervivencia celular de iPSCs humanas individualizadas, ya que no se pudo sustituir por otros inhibidores que tienen funciones similares, p.ej. H-1152 y blebistatina (Watanabe *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). El incremento en la eficacia de la reprogramación episómica se correlacionó con la duración del tratamiento con moléculas pequeñas (FIG. 5B). El tratamiento entre el día 1 y 5 tras la transfección, en particular, pareció ser importante para su efecto máximo.

Las ESCs humanas muestran una expresión génica y necesidades de cultivo similares a las células madre derivadas de epiblastos de ratón (EpiSCs), y difieren de las ESCs de ratón derivadas de etapas más tempranas de blastocistos. Los estudios previos demostraron la capacidad de PD0325901, CHIR99021, A-83-01 y hLIF de expandir iPSCs humanas similares a ESCs de ratón de cultivos de reprogramación que no se expusieron previamente a estos inhibidores (Li *et al.*, 2009). Estas iPSCs humanas similares a ESCs de ratón se diferenciaron fácilmente tras la retirada de estas moléculas pequeñas. Las ESCs humanas, al contrario, se diferenciaron rápidamente en presencia de estas moléculas pequeñas. Sorprendentemente, las iPSCs episómicas humanas obtenidas en presencia continua de las moléculas pequeñas exhibieron una buena proliferación con una diferenciación mínima en condiciones de ESCs humanas (sin moléculas pequeñas), pero experimentaron una diferenciación considerable cuando se recogieron y se expandieron en la misma condición usada para su obtención, es decir, en presencia de las moléculas pequeñas (FIG. 5C), lo que sugiere que estas iPSCs estaban probablemente en un estado pluripotente similar a las ESCs humanas, no a las ESCs de ratón. Los resultados aparentemente contradictorios se podrían explicar por la presencia de actividades que mitigaron la eficacia de las moléculas pequeñas en el medio de ESCs humanas acondicionado con MEF usado para la reprogramación (p.ej., bFGF y ligandos para la señalización de TGF- $\beta$ ), que podría posibilitar la generación de un estado pluripotente similar a las ESCs humanas en presencia de las moléculas pequeñas.

Debido a que el sustituto de suero KnockOut™ usado en el medio de ESCs humanas contiene factores desconocidos que podrían interferir con la reprogramación, para averiguar si se pueden generar de manera eficaz iPSCs similares a ESCs de ratón mediante el uso de medios de cultivo que carecen de actividades que mitigan las moléculas pequeñas, y para identificar las condiciones de reprogramación definidas, se realizaron experimentos para hallar los medios definidos que podrían mantener la reprogramación episómica. De manera específica, se ensayó el medio N2B27 definido, que tiene una formulación simple y fue capaz de mantener la proliferación de ESCs humanas cuando se complementó con citocinas (Liu *et al.*, 2006). Tal como se muestra en la FIG. 6A, el medio N2B27 complementado con moléculas pequeñas dio lugar a un número prácticamente 6 veces mayor de colonias teñidas de manera positiva para fosfatasa alcalina (un marcador de células madre pluripotentes humanas) (ensayo 2 frente al ensayo 1). Estas colonias (piPSC para las iPSCs parcialmente reprogramadas) tuvieron una morfología ovalada similar a las ESCs de ratón, que difiere de la morfología aplanada típica de las colonias de iPSCs similares a ESCs humanas (FIG. 6B). Se pudieron recoger y expandir durante más de 7 pases en el medio N2B27 complementado con moléculas pequeñas. El análisis mediante citometría de flujo de estas células, sin embargo, no pudo detectar la expresión de antígenos específicos de células madre pluripotentes humanas (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81), aunque hubo expresión de un marcador de fibroblastos CD44 (FIG. 10A). El análisis mediante RT-PCR cuantitativa tampoco pudo detectar la expresión de OCT4 y NANOG endógenos, dos marcadores esenciales de las células madre pluripotentes humanas (FIG. 6C). Estos resultados indicaron que las colonias fueron iPSCs parcialmente reprogramadas, no iPSCs similares a ESCs humanas como las obtenidas con el medio de ESCs humanas acondicionado con MEF (ensayo 1) o iPSCs similares a ESCs de ratón como las obtenidas viralmente en presencia de PD0325901, CHIR99021 y LIF, lo que ilustra la importante influencia de las condiciones de cultivo de reprogramación sobre el estado pluripotente de las iPSCs (Hanna *et al.*, 2010; Buecker *et al.*, 2010). De manera interesante, las piPSCs contuvieron abundantes vectores episómicos y mantuvieron una expresión de transgenes a nivel elevado incluso después de múltiples pases en el medio N2B27 complementado con las moléculas pequeñas (FIG. 6C y FIG. 10B), lo que sugiere la implicación probable de las moléculas pequeñas en la retención de los vectores episómicos y la expresión de transgenes. La eliminación de las moléculas pequeñas condujo a la aparición ocasional de iPSCs similares a ESCs humanas entre una diferenciación considerable después de un cultivo de dos semanas de piPSCs en el medio definido de ESCs humanas mTeSR1. Así, aunque las condiciones de reprogramación actuales no pudieron producir iPSCs episómicas humanas similares a ESCs de ratón, se pudieron hacer modificaciones en el protocolo de reprogramación para posibilitar la obtención de iPSCs similares a ESCs humanas en el medio N2B27.

Con este propósito, los inventores dividieron el proceso de reprogramación en tres etapas: transfección (etapa 1), reprogramación (etapa 2), y expansión (etapa 3), en la que se usó mTeSR1 (FIG. 6A). Cuando se usó el medio N2B27 complementado con moléculas pequeñas en la etapa 2 para mantener la reprogramación, se pudo observar solamente una conversión escasa de piPSCs a iPSCs similares a ESCs humanas, lo que sugiere que la expresión de transgenes durante la expansión en mTeSR1 fue insuficiente para reactivar la expresión de los genes

pluripotentes endógenos en la mayoría de iPSCs. Así, los inventores examinaron si fue posible mejorar la reprogramación episómica añadiendo citocinas adicionales en el medio N2B27 complementado con moléculas pequeñas (etapa 2). De los factores que están implicados en la proliferación de las ESCs humanas, la señalización de bFGF y TGF- $\beta$ /Activina/Nodal es de especial importancia. Debido a que la inhibición de la señalización de TGF- $\beta$ /Activina/Nodal mediante A-83-01 facilitó la reprogramación (FIG. 5A), los inventores ensayaron el efecto de bFGF sobre la reprogramación episómica. De hecho, la adición de bFGF a una concentración elevada al medio N2B27 produjo un número razonable de colonias de iPSCs similares a ESCs humanas (ensayo 3) (FIG. 6A). Este resultado fue coherente con las observaciones previas de que bFGF a concentración elevada mantuvo el crecimiento de ESCs humanas por medio de múltiples rutas además de MEK. De manera importante, Matrigel™ fue capaz de sustituir a las células de soporte de MEF con una eficacia de reprogramación incluso más elevada (ensayo 4) (FIG. 6A). Los experimentos temporales mostraron la necesidad de una ventana temporal óptima de tratamiento con las moléculas pequeñas (FIG. 6D). Como era de esperar, la sustitución del medio N2B27 por el mTeSR1 que contenía TGF- $\beta$  en la etapa 2 disminuyó significativamente la eficacia de la reprogramación episómica (FIG. 10C). Así, mediante el uso de células de soporte con una eficacia significativamente mejorada ( $> 220$  colonias de iPSCs a partir de  $1 \times 10^6$  fibroblastos de prepucio humanos iniciales, incremento  $> 70$  veces) (FIG. 6D).

Con la condición de reprogramación exenta de células de soporte recientemente desarrollada, se han obtenido de manera eficaz iPSCs similares a ESCs humanas a partir de fibroblastos cutáneos de adulto. Cuando se recogieron y expandieron en mTeSR1, estas iPSCs mostraron una morfología de ESC humana típica (p.ej. colonias compactas, proporciones elevadas núcleo-citoplasma y nucléolos prominentes), y tuvieron cariotipos normales (FIGs. 7A-7F y FIGs. 11A-11E). La mayoría de las colonias de iPSCs no mostraron expresión de transgenes o integración genómica, y perdieron completamente los vectores episómicos después de pases múltiples ( $>14$ ), tal como se demostró mediante análisis de PCR y RT-PCR (FIG. 7C y FIG. 11C). Expresaron antígenos típicos específicos de ESCs humanas (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81), inhibieron la expresión del marcador de fibroblastos CD44 (FIG. 11D), y reactivaron la expresión de los genes pluripotentes endógenos (OCT4, NANOG, SOX2 y LIN28) (FIG. 7D). Los promotores de OCT4 y NANOG estuvieron desmetilados en estas iPSCs, de forma similar a las ESCs humanas y en contraste con los fibroblastos y piPSCs originales (FIG. 7E). Cuando se inyectaron en ratones inmunodeprimidos, formaron teratomas que consistieron en derivados de las tres capas germinales, lo que demuestra la pluripotencia de estas iPSCs (FIG. 7F y FIG. 11E).

El efecto de las moléculas pequeñas sobre la reprogramación episómica exenta de células de soporte no es específico del tipo de célula, y en cambio es aplicable a diferentes tipos de células somáticas (FIGs. 8A-8C). Además, estos datos ilustran la importancia de identificar la combinación correcta de vectores episómicos (diferente combinación de transgenes de reprogramación y diferente nivel de expresión de transgenes) para conseguir la eficacia de reprogramación óptima para cada tipo de célula.

Se consiguió una eficacia de reprogramación episómica mejorada significativa con MYC deficiente de transformación (FIG. 9), p.ej., LMYC proporcionó  $\sim 1000$  colonias de iPSCs por  $1 \times 10^6$  fibroblastos de prepucio humanos iniciales.

Para resumir, mediante el uso de una aproximación genética y química combinada, se ha establecido con éxito un método de reprogramación episómica exenta de células de soporte no viral con una eficacia muy mejorada. Aunque se desarrolló con fibroblastos, este método es aplicable a tipos de células de tejidos que se pueden obtener fácilmente de donantes humanos vivos, tales como tejido adiposo y sangre periférica. Debido a que los diferentes tipos de células parecen tener preferencia por combinaciones y niveles de expresión específicos de los factores de reprogramación, podría ser necesario ensayar diferentes vectores de reprogramación episómica en busca de una eficacia óptima. Se pueden introducir características adicionales en los vectores episómicos para mejorar adicionalmente la eficacia de reprogramación. Por ejemplo, los vectores episómicos actuales tienen los elementos necesarios para la propagación bacteriana, que contienen muchas islas CpG que se sabe que contribuyen al silenciamiento de transgenes (Chen *et al.*, 2004). Es posible minimizar el silenciamiento de transgenes eliminando el componente de vector bacteriano mediante el uso de recombinación específica de sitio para producir vectores episómicos de oriP/EBNA-1 minicirculares. Sin embargo, el nuevo método es suficientemente simple y eficaz para la obtención rutinaria de iPSCs sin huellas a partir de un gran número de muestras de donantes humanos, y con una matriz definida que mantiene la unión de las células donantes y el crecimiento de iPSCs, y este método se puede adaptar fácilmente a la producción de iPSCs humanas de grado clínico.

Cultivo celular. Las ESCs e iPSCs humanas se mantuvieron en MEFs irradiados en medio de cultivo DMEM/F12 complementado con un 20% de sustituto de suero KnockOut™, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, GlutaMAX 1 mM (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma, St. Louis, MO) y 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico de pez cebra (zbFGF) (Yu *et al.*, 2009). Se preparó medio de ESCs humanas acondicionado con MEF como se describió previamente (Xu *et al.*, 2001). Se cultivaron fibroblastos de prepucio de recién nacido humano (nº de cat. CRL-2097™, ATCC, Manassas, MA) y fibroblastos cutáneos de adulto (nº de cat. CRL-2106™, ATCC) en DMEM (Invitrogen) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado térmicamente (FBS, HyClone Laboratories, Loan, UT), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, GlutaMAX 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM y 4 ng/ml de zbFGF.

El cultivo exento de células de soporte de ESCs e iPSCs humanas en Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA) en

mTeSR™1 (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canadá) se llevó a cabo como se describió previamente con modificaciones en el procedimiento de pases (Ludwig *et al.*, 2006c). Brevemente, se empleó el método de fraccionamiento con EDTA. Cuando las ESCs e iPSCs humanas alcanzaron la confluencia, las células se lavaron una vez con PBS exento de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , y se incubaron con EDTA 0,5 mM durante 8 minutos a 37 °C (2 ml/pocillo de una placa de 6 pocillos). Tras la incubación, se eliminó la disolución de EDTA y se añadió mTeSR1 fresco (2 ml/pocillo de una placa de 6 pocillos) gota a gota a cada pocillo para el desprendimiento de las células. La mayoría de las células se desprendieron de la placa con agitación suave. Las células disociadas se alicuotaron inmediatamente después en placas de Matrigel™ recién preparadas rellenas previamente con mTeSR1. Para mejorar la unión y supervivencia celular, se añadió el inhibidor de ROCK HA-100 (10  $\mu$ M, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a mTeSR1 durante 1 día durante los pases. Con este método, las ESCs e iPSCs humanas se sometieron a un pase cada 3 a 4 días a una proporción de fraccionamiento de 1:8 para un crecimiento óptimo.

Reprogramación de fibroblastos humanos. Los vectores de reprogramación episómica que contenían casetes de expresión para los transgenes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *c-MYC*, *KLF4* y *SV40LT* humanos fueron como se describieron previamente (Yu *et al.*, 2009). De manera específica, se usaron los vectores pEP4EO2SCK2MEN2L y pEP4EO2SET2K (combinación 4) para la optimización de la reprogramación. Se co-transfectaron alrededor de 7,3  $\mu$ g del vector pEP4EO2SCK2MEN2L y 3,2  $\mu$ g de pEP4EO2SET2K en fibroblastos de prepucio neonatales humanos a través de nucleofección (NHDF - VPD-1001 con el programa U-20, Amaxa, Walkersville, MD). Los fibroblastos transfectados (~ 1,0 x 10<sup>6</sup> células por nucleofección) se colocaron directamente en 3 x placas de 10 cm sembradas con MEF o 3 x placas de 10 cm revestidas con Matrigel™ en medio de cultivo de fibroblastos. Al día siguiente tras la transfección, se sustituyó el medio de fibroblastos por medio de ESCs humanas acondicionado con MEF complementado con 100 ng/ml de zbFGF (CM100), o medio N2B27 químicamente definido (N2B27), o medio N2B27 complementado con 100 ng/ml de zbFGF (N2B27-100), o mTeSR1. El medio N2B27 consiste en medio de cultivo DMEM/F12 complementado con el complemento N-2 (1 x, Invitrogen), complemento B-27 (1 x, Invitrogen), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, GlutaMAX 1 mM, y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM. Donde fue aplicable, se añadieron las moléculas pequeñas PD0325901 (P, 0,5  $\mu$ M), CHIR99021 (C, 3  $\mu$ M), A-83-01 (A, 0,5  $\mu$ M) (todas de Stemgent, San Diego, CA), hLIF (L, 1000 U/ml, Millipore, Billerica, MA) y HA-100 (H, 10  $\mu$ M) al cultivo de reprogramación. El medio de cultivo se renovó cada dos días. La tinción de fosfatasa alcalina (nº de cat. SCR004, Millipore) se llevó a cabo en subgrupos de los experimentos de reprogramación para facilitar la identificación de las iPSCs. La reprogramación episómica exenta de células de soporte de los fibroblastos cutáneos de adultos humanos mediante el uso de medios de cultivo definidos se llevó a cabo de forma similar a la de los fibroblastos de prepucio con cambios mínimos en el protocolo - los fibroblastos de adulto transfectados se colocaron en una en vez de tres placas de 10 cm de Matrigel™ debido a la supervivencia celular inferior tras la nucleofección. Para caracterizar las iPSCs obtenidas con la condición exenta de células de soporte, se recogieron las colonias con morfología típica de iPSCs directamente en placas de 12 pocillos revestidas con Matrigel™ en mTeSR1. Se empleó el método de fraccionamiento con EDTA para facilitar la expansión de las iPSCs a la vez que se minimizaba la transmisión de las células diferenciadas durante los pases. Se consiguió en general la pérdida completa de los vectores de reprogramación episómica alrededor del pase 14 para todos los clones de iPSCs obtenidos de fibroblastos de prepucio humanos y de fibroblastos cutáneos de adultos.

Análisis de la expresión mediante RT-PCR, análisis mediante PCR de vectores episómicos, análisis de secuenciación con bisulfito, análisis mediante citometría de flujo y cariotipado. Se llevaron a cabo análisis mediante PCR, RT-PCR, citometría de flujo como se describió previamente (Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009). Se analizó el estado de metilación de los promotores de *OCT4* y *NANOG* mediante el uso de secuenciación con bisulfito con el equipo MethylCode™ Bisulfito Conversion (Invitrogen) (Yu *et al.*, 2009). Todos los cebadores fueron los de la Tabla 1 y los anticuerpos fueron los de la Tabla 2. Se llevó a cabo un análisis de cromosomas de bandas G estándar en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Investigación WiCell (Madison, WI).

Tabla 1. Cebadores para PCR, RT-PCR y PCR de secuenciación con bisulfito.

Genes	Tamaño (pb)	Símbolo	SEQ ID N°	Secuencias (5' a 3')	
<i>Para RT-PCR cuantitativa</i>					
OCT-04	161	OCT4-F1	1	CAGTGCCCGAAACCCACAC	Total
		OCT4-R1	2	GGAGACCCAGCAGCCTCAAA	
	113	OCT4-F2	3	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTTG	Endógeno
		OCT4-R2	4	ACTTCACCTTCCCTCCAACC	
NANOG	111	NANOG-F1	5	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	Total
		NANOG-R1	6	ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC	
	194	NANOG-F2	7	TTTGAAGCTGCTGGGGAAG	Endógeno
		NANOG-R2	8	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA	

ES 2 539 487 T3

SOX2	189	SOX2-F2	9	AGTCTCCAAGCGACGAAAAA	Endógeno
		SOX2-R2	10	TTTCACGTTTGCAACTGTCC	
LIN28	104	LIN28-F2	11	AGTGGCCTGGATAGGGAAGT	Endógeno
		LIN28-R2	12	CTTGGCTCCATGAATCTGGT	
GAPDH	152	GAPDH-F	13	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	Endógeno
		GAPDH-R	14	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	
<i>Para RT-PCR normal</i>					
T-OCT4	657	Oct4-SF1	15	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	Exógeno
		IRES2-SR	16	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T-NANOG	732	Nanog-F1	17	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	Exógeno
		IRES2-SR	18	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T1-KLF4	442	Klf4-SF1	19	CCCACACAGGTGAGAAACCT	Exógeno
		IRES2-SR	20	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T2-KLF4	253	IRES2-SF	21	TGGCTCTCCTCAAGCGTATT	Exógeno
		Klf4-SR	22	GTGGAGAAAGATGGGAGCAG	
T-SV40LT	491	SV40T-SF1	23	TGGGGAGAAGAACATGGAAG	Exógeno
		IRES2-SR	24	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T-SOX2	498	IRES2-SF	25	TGGCTCTCCTCAAGCGTATT	Exógeno
		Sox2-SR	26	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC	
T-LIN28	245	IRES2-SF	27	TGGCTCTCCTCAAGCGTATT	Exógeno
		Lin28-SR	28	GCAAACCTGCTGGTTGGACAC	
T-c-MYC	298	IRES2-SF	29	TGGCTCTCCTCAAGCGTATT	Exógeno
		Myc-SR	30	CACCGAGTCGTAGTCGAGGT	
OCT4	113	OCT4-F2	31	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	Endógeno
		OCT4-R2	32	ACTTCACCTTCCTCCAACC	
GAPDH	152	GAPDH-F	33	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	Endógeno
		GAPDH-R	34	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	
<i>Para PCR</i>					
T-OCT4	657	Oct4-SF1	35	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	Exógeno
		IRES2-SR	36	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T-NANOG	732	Nanog-F1	37	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	Exógeno
		IRES2-SR	38	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T1-KLF4	442	Klf4-SF1	39	CCCACACAGGTGAGAAACCT	Exógeno
		IRES2-SR	40	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T2-KLF4	401	Klf4-SF1	41	CCCACACAGGTGAGAAACCT	Exógeno
		SV40pA-R	42	CCCCCTGAACCTGAAACATA	
T-SV40LT	491	SV40T-SF1	43	TGGGGAGAAGAACATGGAAG	Exógeno
		IRES2-SR	44	AGGAACTGCTTCCTTCACGA	
T-SOX2	534	Sox2-SF1	45	ACCAGCTCGCAGACCTACAT	Exógeno
		SV40pA-R	46	CCCCCTGAACCTGAAACATA	

T-LIN28	447	LIN28-SF1	47	AAGCGCAGATCAAAAGGAGA	Exógeno
		SV40pA-R	48	CCCCCTGAACCTGAAACATA	
T-c-MYC	352	Myc-SF1	49	TCAAGAGGCGAACACACAAC	Exógeno
		BGH-SR	50	CAACAGATGGCTGGCAACTA	
OCT4	113	Oct4-F2	51	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	Endógeno
		Oct4-R2	52	ACTTCACCTTCCCTCCAACC	
<i>Para PCR de secuenciación con bisulfito</i>					
OCT4	221	Oct4-mF3	53	ATTTGTTTTTTGGGTAGTTAAAGGT	Endógeno
		Oct4-mR3	54	CCAACCTATCTTCATCTTAATAACATCC	
NANOG	164	Nanog-mF3	55	TTAATTTATTGGGATTATAGGGGTG	Endógeno
		Nanog-mR3	56	AAACCTAAAAACAAACCCAACAAC	
	295	Nanog-mF4	57	GGTTGGTTTTAAATTTTTGATTTTAG	Endógeno
		Nanog-mR4	58	ACCAATCTCACCAAAACCATTATAA	

Tabla 2. Anticuerpos para análisis mediante citometría de flujo.

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Isotipo	Empresa
SSEA-3	PE	MC631	IgM de rata	BD Biosciences
SSEA-4	PE	MC813-70	IgG3 de ratón	BD Biosciences
TRA-1-60	FITC	TRA-1-60	IgM de ratón	BD Biosciences
TRA-1-81	FITC	TRA-1-81	IgM de ratón	BD Biosciences
CD44	APC	G44-26	IgG2b de ratón	BD Biosciences

- 5 Formación de teratomas. Para examinar la pluripotencia del desarrollo *in vivo* de las iPSCs humanas obtenidas en la condición exenta de células de soporte, se transfirieron iPSCs cultivadas en Matrigel™ en mTeSR1 a células de soporte MEF para un pase. Las células se recogieron con un tratamiento con colagenasa, y se inyectaron en los músculos de las extremidades posteriores de ratones beige SCID inmunodeprimidos de 6 semanas de edad (aproximadamente una placa de 10 cm con una confluencia del 50 al 80% por ratón) (Harlan, Madison, WI). Después de seis a ocho semanas, se disecaron los teratomas y se fijaron en un 10% de formalina (Fisher, Pittsburgh, PA).
- 10 Las muestras se incrustaron en parafina y se procesaron con tinción de hematoxilina y eosina en el Departamento de Patología Experimental del Laboratorio McArdle para la Investigación del Cáncer, Universidad de Wisconsin-Madison, WI.

## REFERENCIAS

- 15 Se dan las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan procedimientos ilustrativos u otros detalles complementarios a los aquí establecidos.
- Patente de EE.UU. 4,683,202
- Patente de EE.UU. 5,302,523
- Patente de EE.UU. 5,322,783
- Patente de EE.UU. 5,384,253
- 20 Patente de EE.UU. 5,464,765
- Patente de EE.UU. 5,478,838
- Patente de EE.UU. 5,538,877
- Patente de EE.UU. 5,538,880

- Patente de EE.UU. 5,550,318  
Patente de EE.UU. 5,563,055  
Patente de EE.UU. 5,580,859  
Patente de EE.UU. 5,589,466  
5 Patente de EE.UU. 5,610,042  
Patente de EE.UU. 5,656,610  
Patente de EE.UU. 5,702,932  
Patente de EE.UU. 5,736,524  
Patente de EE.UU. 5,780,448  
10 Patente de EE.UU. 5,789,215  
Patente de EE.UU. 5,925,565  
Patente de EE.UU. 5,928,906  
Patente de EE.UU. 5,935,819  
Patente de EE.UU. 5,945,100  
15 Patente de EE.UU. 5,981,274  
Patente de EE.UU. 5,994,624  
Patente de EE.UU. 6,833,269  
Solicitud de patente de EE.UU. 12/478,154  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2002/0076976  
20 Patente de EE.UU. N° de publicación 2003/0059913  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2003/0062225  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2003/0062227  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2003/0087919  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2003/0125344  
25 Patente de EE.UU. N° de publicación 2003/0211603  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2004/0002507  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2004/0002508  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2004/0014755  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2004/0039796  
30 Patente de EE.UU. N° de publicación 2005/0192304  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2005/0209261  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2005/123902  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2007/0116680  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2007/0238170  
35 Patente de EE.UU. N° de publicación 2008/004287  
Patente de EE.UU. N° de publicación 2008/0171385  
A practical approach, 1987.

- Adams, J. *Viol.*, 61(5):1743-1746, 1987.
- Aiyar et al., *EMBO J.*, 17(21):6394-6403, 1998.
- Alexander et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5092-5096, 1988.
- Altmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(38):14188-14193, 2006.
- 5 Amit et al., *Dev Biol.*, 227(21):271-8, 2000.
- Animal Cell Culture*, 1987.
- Aravind y Landsman, *Nucleic Acids Res.*, 26(19):4413-4421, 1998.
- Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- 10 Baer et al., *Biochemistry*, 39:7041-7049, 2000.
- Baer et al., *Nature*, 310(5974):207-211, 1984.
- Bain et al., *Biochem. J.*, 408(3):297-315, 2007.
- Bennett et al, *J. Biol. Chem.*, 277:34, 2002.
- Bertrand et al., *J. Mol Biol.*, 333(2):393-407, 2003.
- 15 Bingham, *Cell*, 90(3):385-387, 1997.
- Bochkarev et al., *Cell*, 84(5):791-800, 1996.
- Bode et al., *Biol. Chem.*, 381:801-813, 2000.
- Bode et al., *Gene Ther. Mol. Biol.*, 6:33-46, 2001.
- Bode et al., *Science*, 255(5041):195-197, 1992.
- 20 Buecker et al., *Cell Stem Cell*, 6:535-546, 2010.
- Buehr et al., *Cell*, 135:1287, 2008.
- Carbonelli et al., *FEMSMicrobiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
- Chandler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
- Chang, et al., *Frontiers in Bioscience*, 12:4393-4401, 2007.
- 25 Chaudhuri et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(18):10085-10089, 2001.
- Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Chen et al., *Cell Stem Cell*, 7:240-248, 2010.
- Chen et al., *Gene Ther.*, 11:856-864, 2004.
- Chin et al., *Molecular Brain Res.*, 137(1-2):193-201, 2005.
- 30 Chow et al., *Cytometry Commun. Clinical Cytometry*, 46:72-78, 2001.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 1987; 1995.
- DaCosta et al., *Molec. Pharmacol.*, 65(3):744-752, 2004.
- Davies et al., *Biochem J.*, 351:95-105, 2000.
- 35 de Gouville et al., *Drug News Perspective*, 19(2):85-90, 2006.
- Dhar et al., *Cell*, 106(3):287-296, 2001.
- Downey et al., *J. Biol. Chem.*, 271(35):21005- 21011, 1996.

- Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro, 1993.
- English et al., Trends in Pharmac. Sci., 23(1):40-45, 2002.
- Ercolani et al., J. Biol. Chem., 263:15335-15341, 1988.
- Ermakova et al., J. Biol. Chem., 271(51):33009-33017, 1996.
- 5 Esteban et al., J. Biol. Chem., 284:17634-17640, 2009.
- Solicitud de patente europea N° 0273085
- Evans y Kaufman, Nature, 292:154-156, 1981.
- Evans, et al., En: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
- 10 Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
- Fernandes et al., Nature Cell Biology, 6:1082-1093, 2004.
- Fischer et al., J. Virol., 71:5148-5146, 1997.
- Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
- Frame et al, Biochemical J., 359:1-16, 2001.
- 15 Frappier y O'Donnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(23):10875-10879, 1991.
- Fusaki et al., Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 85:348-362, 2009.
- Gahn y Schildkraut, Cell, 58(3):527-535, 1989.
- Gahn y Sugden, J. Virol., 69(4):2633-2636, 1995.
- Garrick et al., Nat. Genet., 18:56-59, 1998.
- 20 Gellibert, et al., J. Med. Chem., 49(7):2210-2221, 2006.
- Gene Targeting, A Practical Approach, 1993.
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987.
- Ghosh y Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- 25 Gopal, Mol. Cell Biol. 5:1188-1190, 1985.
- Gould et al, Intl. J. Neuropsychopharmacology, 7:387-390, 2004.
- Gould et al, Pharmacological Res., 48:49-53, 2003.
- Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
- Guide to Techniques in Mouse Development (1993)
- 30 Hanna et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:9222-9227, 2010.
- Harb et al., PLoS One, 3(8):e3001, 2008.
- Harland y Weintraub, J Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985.
- Hegde et al., Nature, 359(6395):505-512, 1992.
- Hogan et al., In: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- 35 Hung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(4):1865-1870, 2001.
- Inman et al., Molec. Pharmacol., 62(1):65-74, 2002.
- Jainchill et al., J. Virol., 4(5):549-53, 1969.



- Jenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (31), 11322-11327, 2004.
- Jia et al., *Nat. Methods*, 7:197-199, 2010.
- Julien et al., *Virology*, 326(2):317-328, 2004.
- Kaepler et al., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- 5 Kaji et al., *Nature*, 458:771-775, 2009.
- Kameda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349:1269-1277, 2006.
- Kaminska et al., *Acta Biochimica Polonica*, 52(2):329-337, 2005.
- Kanda et al., *Mol. Cell. Biol.*, 21(10):3576-3588, 2001.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- 10 Karin et al. *Cell*, 36:371-379, 1989.
- Kato et al, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Keller et al., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7(6):862-9, 1995.
- Kennedy y Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 23(19):6901-6908, 2003.
- Kennedy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:14269-14274, 2003.
- 15 Kim et al., *Cell Stem Cell*, 4:472, 2009.
- Kim et al., *J. Biol. Chem.*, 275(40):31245-31254, 2000.
- Kim et al., *Virology*, 239(2):340-351, 1997.
- Kim et al., *Xenobiotica*, 38(3):325-339, 2008.
- Kirchmaier y Sugden, *J. Virol.*, 69(2):1280-1283, 1995.
- 20 Kirchmaier y Sugden, *J. Virol.*, 72(6):4657-4666, 1998.
- Klein et al, *Neoplasia*, 8:1-8, 2006.
- Klein et al., *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Klimanskaya et al., *Lancet.*, 365(9471):1636-41, 2005.
- Kodama et al. *J. Cell Physiol.*, 112(1):89-95, 1982.
- 25 Langle-Rouault et al., *J. Virol.*, 72(7):6181-6185, 1998.
- Leight y Sugden, *Mol. Cell Bio.*, 21:4149-61, 2001.
- Levenson et al., *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Levitskaya et al., *Nature*, 375(6533):685-688, 1995.
- Levitskaya et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12616-12621, 1997.
- 30 Li et al., *Cell Stem Cell*, 4:16, 2009.
- Li et al., *Cell Stem Cell*, 4:16-19, 2009.
- Li et al., *Cell*, 135:1299, 2008.
- Lin et al., *Nat. Methods*, 6:805-808, 2009.
- Lindner y Sugden, *Plasmid*, 58:1-12, 2007.
- 35 Lindner et.al. *J. Virol.*, 82(12):5693-702, 2008.
- Liu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346:131-139, 2006.
- Liu et al., *Cell Stem Cell* 3, 587-590, 2008.

- Loh et al., *Blood*, 113:5476-5479, 2009.
- Lowry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:2883, 2008.
- Ludwig et al., *Nat. Biotechnol.*, 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig et al., *Nat. Methods*, 3(8):637-46, 2006a.
- 5 Ludwig et al., *Nat. Methods*, 3:637-646, 2006c.
- Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Mackey y Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 19(5):3349-3359, 1999.
- Mackey et al., *J. Virol.*, 69(10):6199-6208, 1995.
- Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- 10 Manzini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(47):17672-17677, 2006.
- Marechal et al., *J. Virol.*, 73(5):4385-4392, 1999.
- Martin, et al., *Nature Immunology*, 6:111-184, 2005.
- Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(12):7634-8, 1981.
- Mattingly et al, *J. Pharmacol. Experimen. Therap.*, 316:456-465, 2006.
- 15 Middleton y Sugden, *J. Virol.*, 66(1):489-495, 1992.
- Middleton y Sugden, *J. Virol.*, 68:4067-4071, 1994.
- Nabel et al., *Science*, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Nakagawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(32):14152-7, 2010. Nakano et al., *Science*, 272(5262):722-4, 1996.
- Nanbo et al., *EMBO J.*, 26:4252-62, 2007.
- 20 Ng, *Nuc. Acid Res.*, 17:601-615, 1989.
- Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Niller et al., *J. Biol. Chem.*, 270(21):12864-12868, 1995.
- Noble et al, *Proc. Natl. Acad. Science, USA*, 102:6990-6995, 2005.
- 25 Okita et al., *Nature*, 448:313, 2007.
- Okita et al., *Nature*, 448:313-317, 2007.
- Okita et al., *Science*, 322:949, 2008.
- Okita et al., *Science*, 322:949-953, 2008.
- Park et al., *Nature*, 451:141, 2008.
- 30 PCT Appln. WO 2007/113505
- PCT Appln. WO 2008/006583
- PCT Appln. WO 2008/094597
- PCT Appln. WO 94/09699
- PCT Appln. WO 95/06128
- 35 PCT N° de publicación PCT 2005/080554
- PCT N° de publicación WO 01/088100
- PCT N° de publicación WO 98/30679

- Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perales et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Piechaczek et al., *Nucleic Acids Res.*, 27(2):426-428, 1999.
- Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- 5 Potter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (1998)
- Quitsche et al., *J. Biol. Chem.*, 264:9539-9545, 1989.
- Rawlins et al., *Cell*, 42((3):859-868, 1985.
- Reisman y Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 6(11):3838-3846, 1986.
- 10 Reisman et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5(8):1822-1832, 1985.
- Richards et al., *Cell*, 37:263-272, 1984.
- Rinehart et al., *J. Clinical Oncol.*, 22:4456-4462, 2004.
- Ring et al., *Diabetes*, 52:588-595, 2003.
- Rippe, et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- 15 Ritzi et al., *J. Cell Sci.*, 116(Pt 19):3971-3984, 2003.
- Sambrook et al., In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Schaarschmidt et al., *EMBO J.*, 23(1):191-201, .2004.
- Schaffer et al.; *Gene*, 302(1-2):73-81, 2003.
- 20 Schepers et al., *EMBO J.*, 20(16):4588-4602, 2001.
- Sears et al., *J. Virol.*, 77(21):11767-11780, 2003.
- Sears et al., *J. Virol.*, 78(21):11487-11505, 2004.
- Shi et al., *Cell Stem Cell*, 3:568, 2008.
- Shimada et al., *Mol. Reprod. Dev*, 77:2, 2010.
- 25 Shire et al., *J. Virol.*, 73(4):2587-2595, 1999.
- Silva et al., *PLoS Biol.*, 6:e253, 2008.
- Stadtfeld et al., *Cell Stem Cell*, 2:230-240, 2008.
- Stadtfeld et al., *Science*, 322:945, 2008.
- Stadtfeld et al., *Science*, 322:945-949, 2008.
- 30 Su et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10870-10874, 1991.
- Sugden y Warren, *J. Virol.*, 63(6):2644-2649, 1989.
- Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:15720-15725, 2009.
- Suzuki et al., *Cancer Res.*, 67(5):2351-2359, 2007.
- Takahashi et al., *Cell*, 126(4):663-676, 2006.
- 35 Takahashi et al., *Cell*, 131:861, 2007.
- Thomson et al., *Science*, 282:1145, 1998.
- Tojo, et al., *Cancer Science*, 96(11):791-800, 2005,

- Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Wagman, *Current Pharmaceutical Design*, 10:1105-1137, 2004.
- Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
- Wang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 26(3): 1124-1134, 2006.
- 5 Watanabe et al., *Nat. Biotechnol.*, 25:681-686, 2007.
- Watanabe et al., *Nat. Neurosci.*, 8(3):288-96, 2005.
- Wernig et al., *Nature*, 448(7151):318-24, 2007.
- Wilson et al., *Science*, 244:1344-1346, 1989.
- Woltjen et al., *Nature*, 458:766, 2009..
- 10 Woltjen et al., *Nature*, 458:766-770, 2009.
- Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wrzesinski et al., *Clinical Cancer Res.*, 13(18):5262-5270, 2007.
- Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu y Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- 15 Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu et al., *J. Virol.*, 76(5):2480-2490, 2002.
- Wysokenski y Yates, *J. Virol.*, 63(6):2657-2666, 1989.
- Xu et al., *Nat. Biotechnol.*, 19:971, 2001.
- Xu et al., *Nat. Biotechnol.*, 19:971-974, 2001.
- 20 Yamanaka et al., *Cell*, 131(5):861-72, 2007.
- Yang y Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Yates y Guan, *J. Virol.*, 65(1):483-488, 1991.
- Yates y Guan, *J. Virol.*, 65:483-488, 1991.
- Yates et al., *J. Virol.*, 74(10):4512-4522, 2000.
- 25 Yates et al., *Nature*, 313:812-815, 1985.
- Yates et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3806-3810, 1984.
- Yates, *Cancer Cells*, (6)197-205, 1988.
- Yin et al., *Science*, 301(5638):1371-1374, 2003.
- Ying, *Nature*, 453:519-23, 2008.
- 30 Yu et al., *Science*, 318:1917, 2007.
- Yu et al., *Science*, 324:797, 2009.
- Yu et al., *Science*, 324:797-801, 2009.
- Zhang et al., *Bioorganic Med. Chem. Letters*; 10:2825-2828, 2000.
- Zhou y Freed, *Stem Cells*, 2009 (Ahead of Epub Print).
- 35 Zhou et al., *Cell Stem Cell*, 4:381-384, 2009.
- Zhou et al., *EMBO J.*, 24(7):1406-1417, 2005.

**Listado de secuencias**

<110> JU, JUNYING

5 <120> REPROGRAMACIÓN EPISÓMICA CON COMPUESTOS QUÍMICOS

<130> CDIN.P0021US

<140> DESCONOCIDO

10 <141> 2010-11-04

<150> 61/258,120 <151> 2009-11-04

<160> 58

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

25 <400> 1

cagtgccga aaccacac 19

30 <210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 2

40 ggagaccag cagcctcaa 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

50 <400> 3

agttgtgcc agggtttg 20

<210> 4

55 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador sintético

<400> 4

actcacct cctccaacc 20

65 <210> 5

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 5  
 10 cagaaggcct cagcacctac 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 20 <400> 6  
 attgtccag gctggttc 20  
 <210> 7  
 25 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador sintético  
 <400> 7  
 35 tttggaagct gctgggaag 20  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 8  
 45 gatgggagga ggggagagga 20  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 55 <400> 9  
 agtctccaag cgacgaaaa 20  
 60 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>  
 <223> Cebador sintético

<400> 10  
 tttcacgttt gcaactgtcc 20

5 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 11

15 agtggcctgg ataggaagt 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA

20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

25 <400> 12  
 ctggctcca tgaatctggt 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA

30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

35 <400> 13  
 gtggacctga cctgccgtct 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA

40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 14

45 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 14

50 ggaggagtgg gtgtcgctgt 20  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA

55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

60 <400> 15  
 agtgagaggc aacctggaga 20

65 <210> 16  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 16  
  
 10 aggaactgct tccttcacga 20  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 17  
 20 cagaaggcct cagcacctac 20  
 <210> 18  
 <211> 20  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 30 <400> 18  
  
 aggaactgct tccttcacga 20  
 35 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 19  
 45 cccacacagg tgagaaacct 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 55 <400> 20  
  
 aggaactgct tccttcacga 20  
 60 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Cebador sintético



<400> 21  
 tggctctct caagcgatt 20

5 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 22

15 ggggagaaag atgggagcag 20  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA

20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

25 <400> 23  
 tggggagaag aacatggaag 20  
 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> DNA

30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

35 <400> 24  
 aggaactgct tcctcacga 20  
 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA

40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

45 <400> 25  
 tggctctct caagcgatt 20  
 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> DNA

50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

55 <400> 26  
 gcttagcctc gtcgatgaac 20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA

60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

65 <400> 26  
 gcttagcctc gtcgatgaac 20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 5 <400> 27  
 tggctctct caagcgatt 20  
 10 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 28  
 20 gcaaactgct ggttgacac 20  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 30 <400> 29  
 tggctctct caagcgatt 20  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 30  
 40 caccgagtcg tagtcgaggt 20  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 31  
 50 agtttggcc agggttttg 20  
 <210> 32  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 32  
 60  
 65

acttcacctt cctccaacc 20

5 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador sintético

15 <400> 33

gtggacctga cctgccgtct 20

20 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Cebador sintético

30 <400> 34

ggaggagtgg gtgtcgctgt 20

35 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador sintético

45 <400> 35

agtgagaggc aacctggaga 20

50 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador sintético

60 <400> 36

aggaactgct tccttcacga 20

65 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

70 <220>  
 <223> Cebador sintético

75 <400> 37

cagaaggcct cagcacctac 20

80 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 38  
 5 aggaactgct tccttcacga 20  
  
 <210> 39  
 <211> 20  
 10 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 15 <400> 39  
  
 cccacacagg tgagaaacct 20  
 20 <210> 40  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 40  
 30 aggaactgct tccttcacga 20  
  
 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 40 <400> 41  
  
 cccacacagg tgagaaacct 20  
 45 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 50 <400> 42  
  
 ccccctgaac ctgaaacata 20  
 55 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 43  
 65 tggggagaag aacatggaag 20

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 10 <400> 44  
  
 aggaactgct tcctcacga 20  
  
 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 45  
  
 accagctcgc agacctacat 20  
  
 25 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 46  
  
 35 ccccctgaac ctgaaacata 20  
  
 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 47  
  
 aagcgcagat caaaaggaga 20  
  
 50 <210> 48  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 48  
  
 60 ccccctgaac ctgaaacata 20  
  
 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 49  
 5 tcaagaggcg aacacacaac 20  
  
 <210> 50  
 <211> 20  
 10 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 15 <400> 50  
  
 caacagatgg ctggcaacta 20  
 20 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 51  
 30 agtttggtcc agggttttg 20  
  
 <210> 52  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 40 <400> 52  
  
 acttcacctt cctccaacc 20  
  
 <210> 53  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 50 <400> 53  
  
 attgttttt tggtagtta aagg 25  
 55  
 <210> 54  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 54  
 65 ccaactatct tcattctaat aacatcc 27

<210> 55  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 10 <400> 55  
  
 ttaatttatt gggattatag gggtg 25  
  
 <210> 56  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 56  
  
 aaacctaaaa acaaacccaa caac 24  
 25  
 <210> 57  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
  
 <400> 57  
 35  
 ggttggtttt aaattttga ttttag 26  
  
 <210> 58  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 45  
 <400> 58  
  
 accaatctca ccaaaacctatataa 25  
 50

## REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para producir una población de células iPS humanas capaces de diferenciarse hasta células o tejidos completamente diferenciados, en el que las células iPS están sustancialmente exentas de elementos genéticos exógenos, que comprende:
  - 5 a) obtener células somáticas que comprenden un elemento genético extracromosómico que expresa uno o más factores de reprogramación;
  - b) cultivar las células somáticas y las células de la progenie de las mismas en una condición de reprogramación que comprende el inhibidor de GSK-3 añadido externamente y al menos uno de inhibidor de MEK, e inhibidor de receptores de TGF- $\beta$ , por lo que se produce una población de células iPS; y
  - 10 c) expandir la población de células iPS en una condición de expansión que tiene un medio de expansión básicamente exento de inhibidor de GSK-3, inhibidor de MEK, e inhibidor de receptores de TGF- $\beta$  añadidos externamente.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la condición de reprogramación está básicamente exenta de células de soporte.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo se lleva a cabo en condiciones definidas exentas de suero y de células de soporte.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la condición de reprogramación comprende un componente de la matriz tal como Matrigel<sup>TM</sup>.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula somática es una célula humana, un fibroblasto, un queratinocito, una célula hematopoyética, una célula mesenquimatosa, una célula adiposa, una célula endotelial, una célula neuronal, una célula muscular, una célula mamaria, una célula hepática, una célula renal, una célula cutánea, una célula del tracto digestivo, una célula del cúmulo, una célula glandular, o una célula de islote pancreático.
- 25 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el elemento genético extracromosómico comprende ADN, ARN, o se define adicionalmente como un vector episómico que está básicamente exento de elementos bacterianos o comprende un origen de replicación y uno o más casetes de expresión para la expresión de factores de reprogramación, en el que uno o más de dichos casetes de expresión comprenden además una secuencia de nucleótidos que codifica un factor que actúa en trans que se une al origen de replicación para replicar un molde extracromosómico, y/o en el que la célula somática expresa tal factor que actúa en trans.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que el origen de replicación es un origen de replicación de un herpesvirus linfotrópico y corresponde a oriP del virus de Epstein Barr (EBV), herpesvirus de sarcoma de Kaposi (KSHV), Herpesvirus saimiri (HS), o virus de la enfermedad de Marek (MDV).
- 35 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los factores de reprogramación comprenden uno o más seleccionados del grupo que consiste en Sox, Oct, Nanog, Lin-28, Klf4, c-Myc, un mutante u homólogo de myc que es deficiente de transformación, y SV40LT.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además seleccionar las células iPS basándose en una o más características de las células embrionarias.
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el medio de reprogramación comprende además LIF añadido externamente, inhibidor de quinasa asociada a Rho (ROCK) añadido externamente o inhibidor de miosina II, o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) añadido externamente.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el inhibidor de la señalización de ROCK es HA-100.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el medio de expansión, el medio de reprogramación o ambos están definidos químicamente, preferiblemente en el que el medio de expansión, el medio de reprogramación o ambos son medio TeSR, medio de cultivo de células embrionarias humanas, o medio N2B27.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en el que el medio de reprogramación tiene FGF añadido externamente y/o en el que el medio de reprogramación está básicamente exento de TGF $\beta$  añadido externamente.



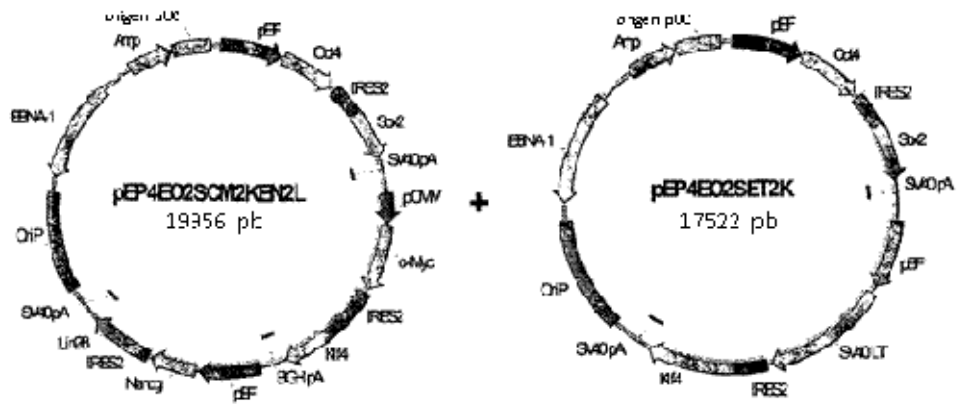


FIG. 1A

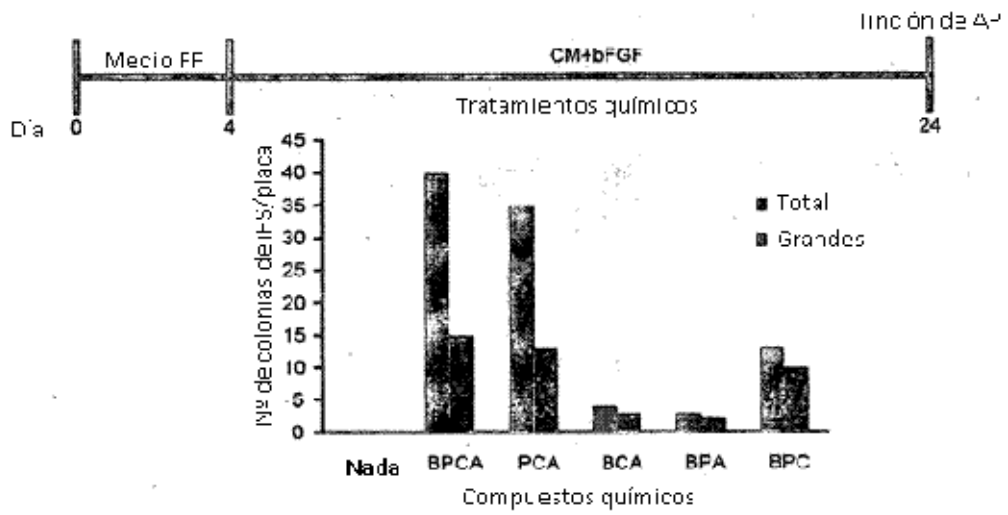


FIG. 1B

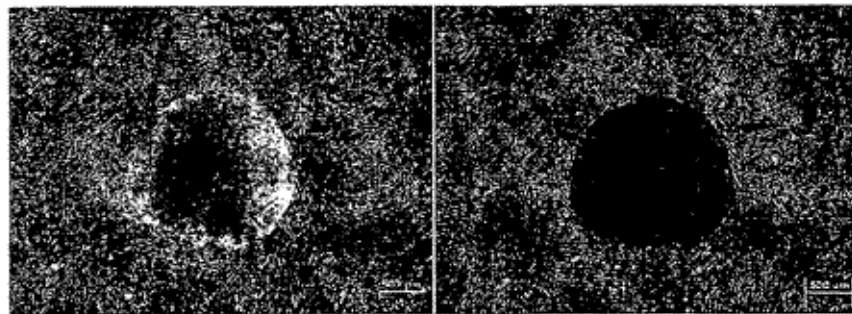


FIG. 1C

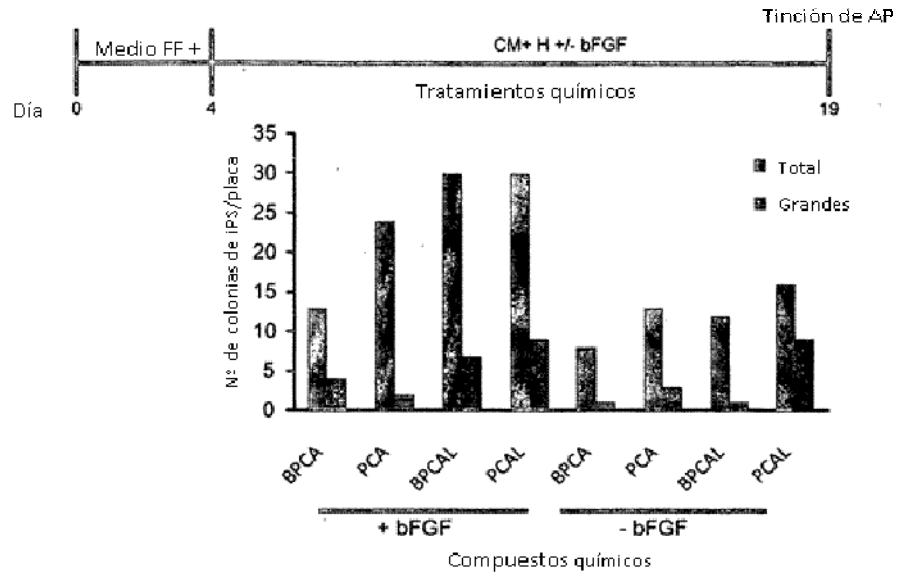


FIG. 2A

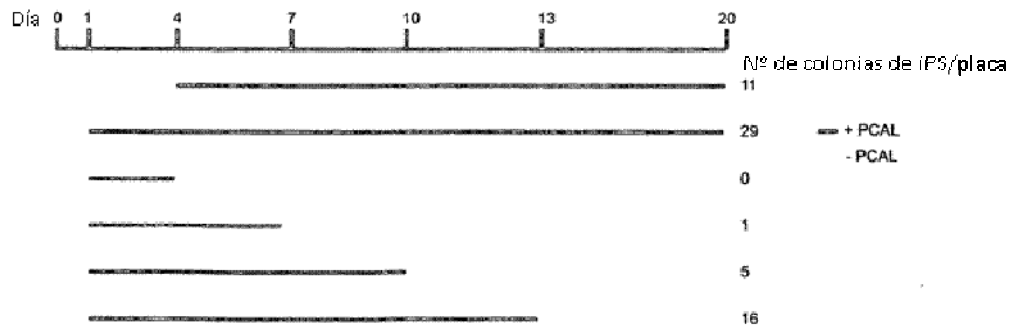


FIG. 2B

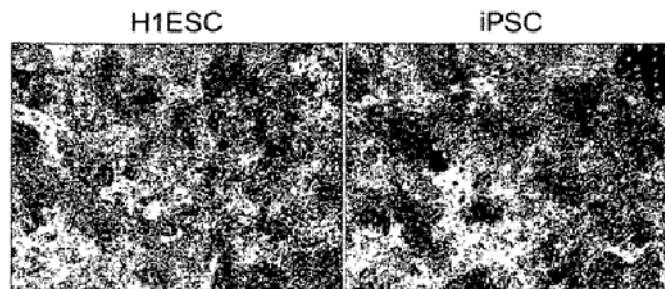
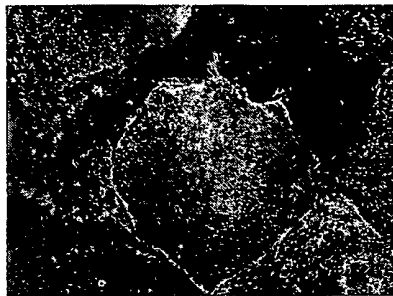


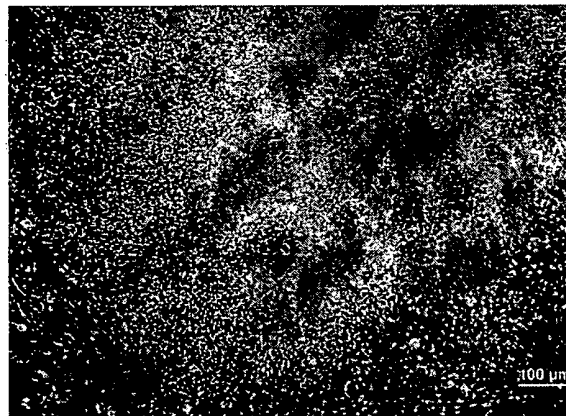
FIG. 3A



**FIG. 3B**



**FIG. 3C**



**FIG. 3D**

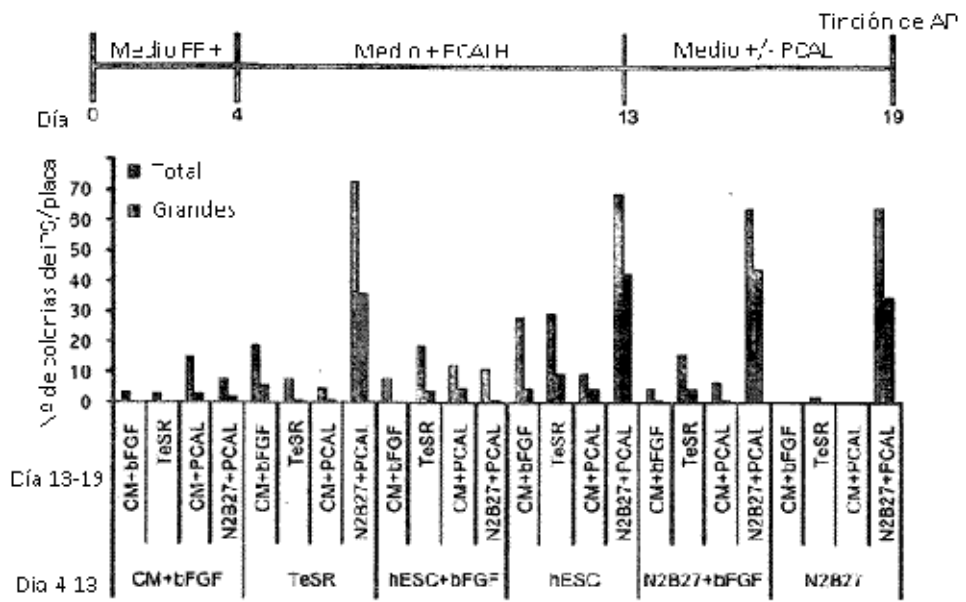


FIG. 4A

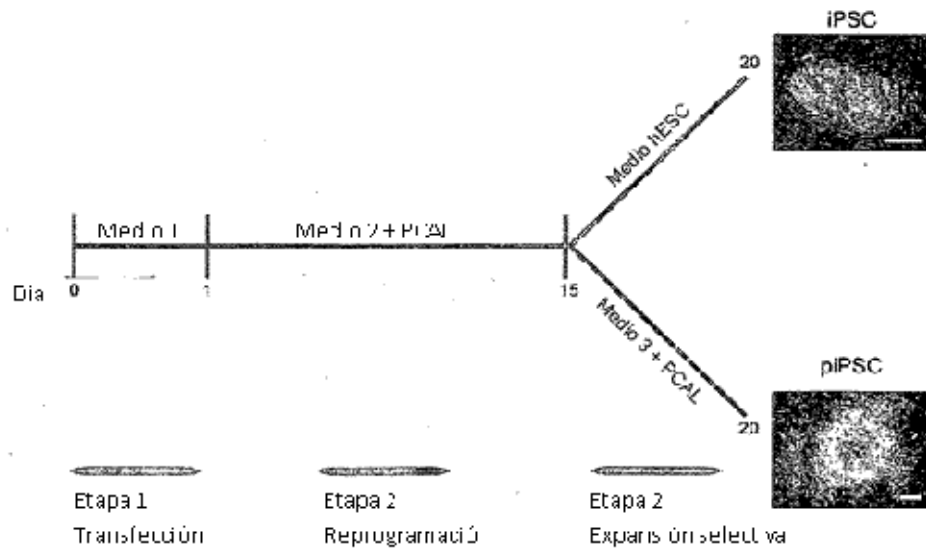


FIG. 4B

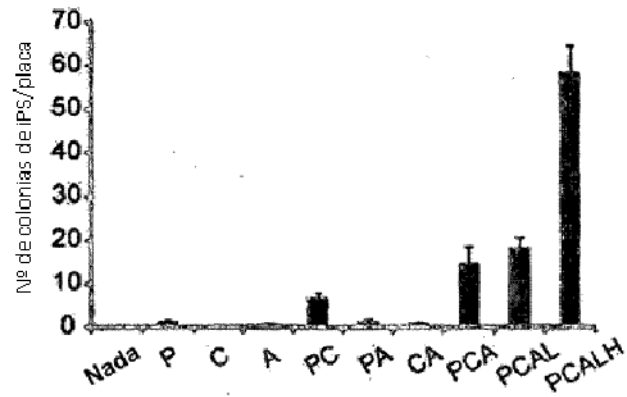


FIG. 5A

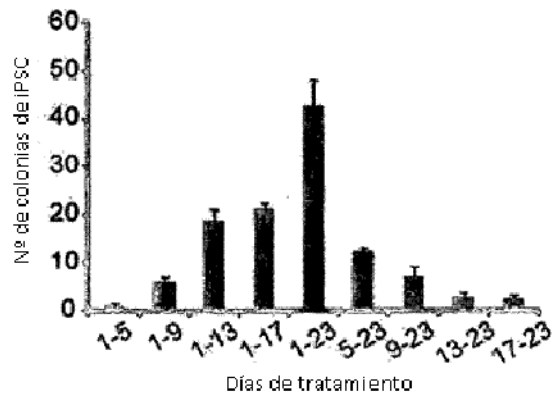


FIG. 5B



FIG. 5C

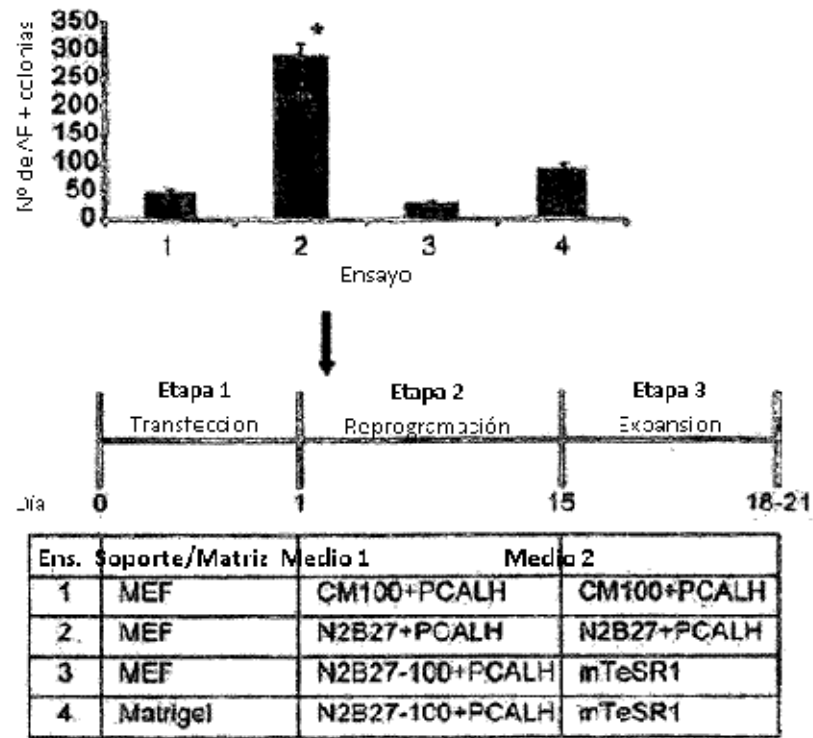


FIG. 6A

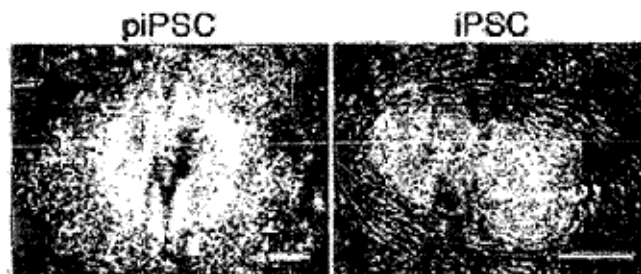


FIG. 6B

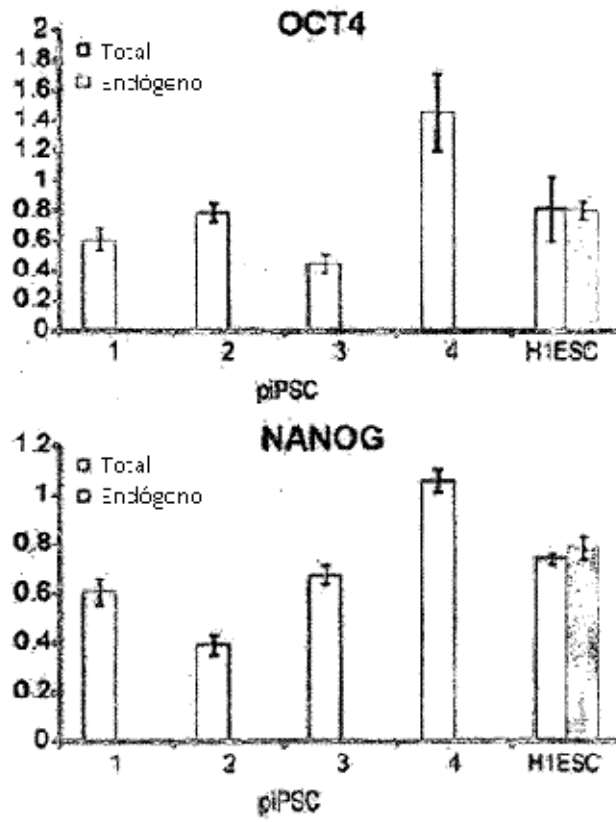


FIG. 6C

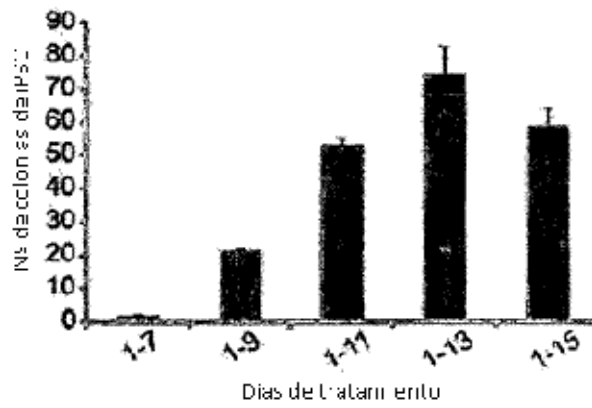


FIG. 6D

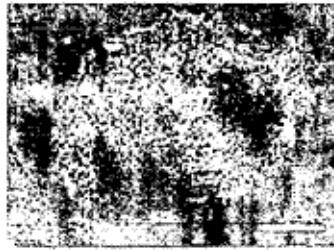


FIG. 7A



FIG. 7B

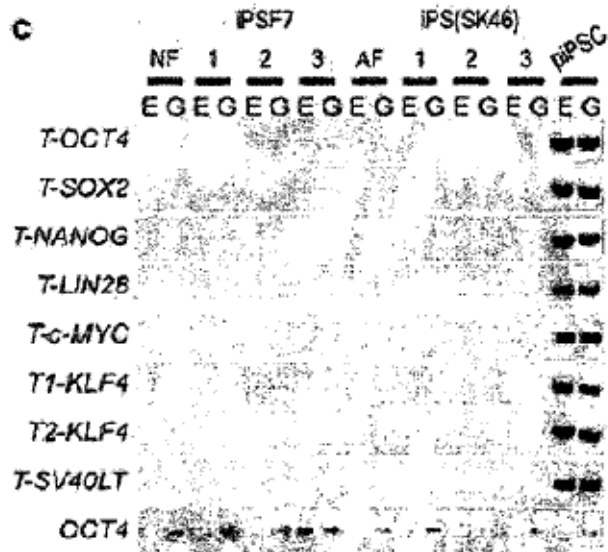


FIG. 7C



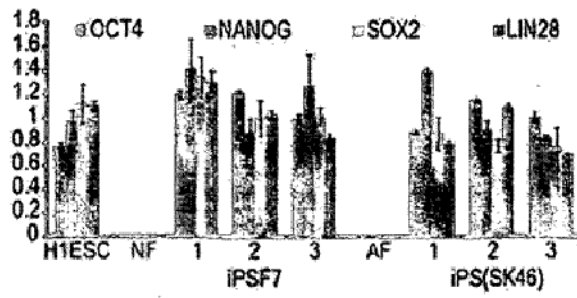


FIG. 7D

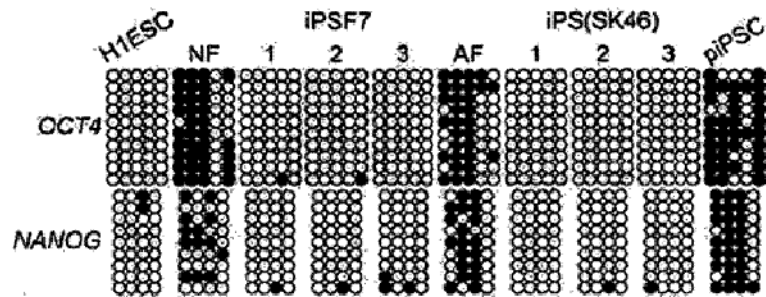


FIG. 7E

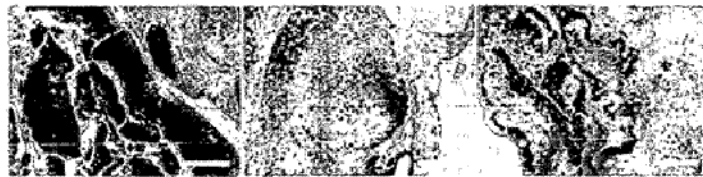
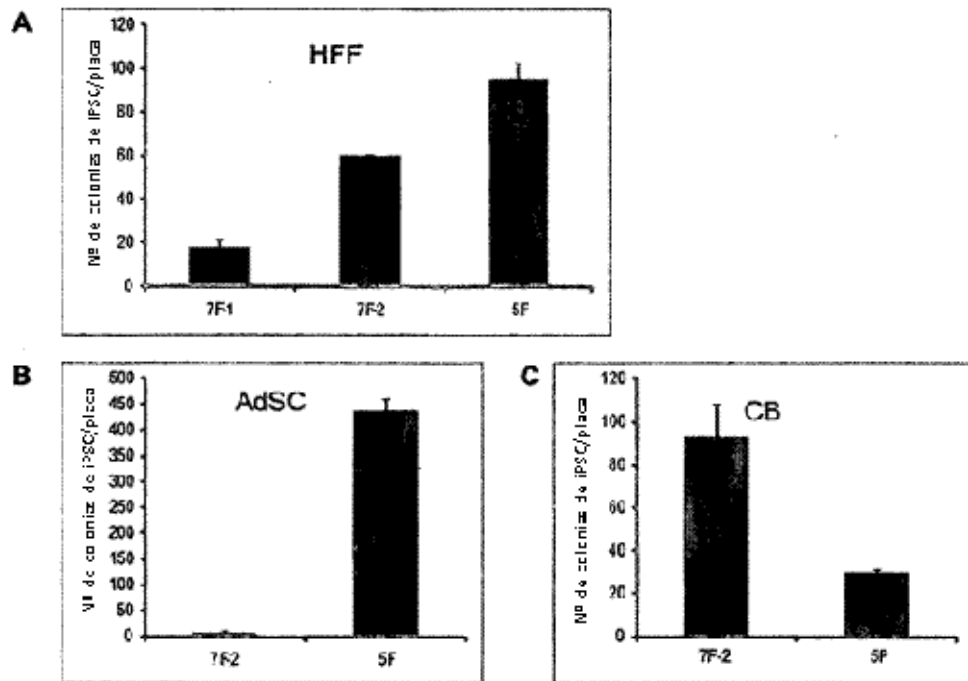


FIG. 7F



FIGS. 8A-8C

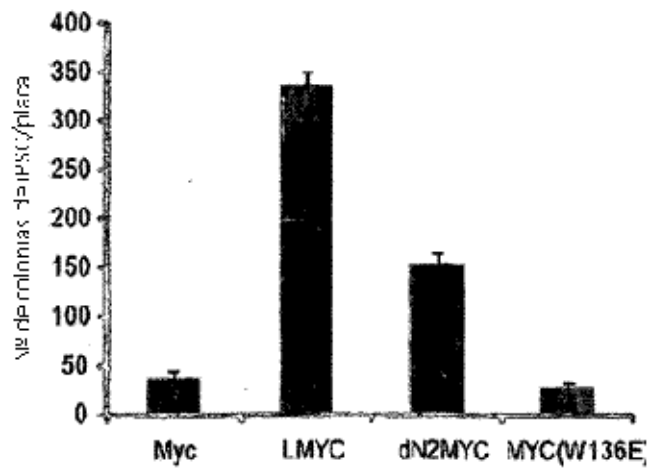


FIG. 9

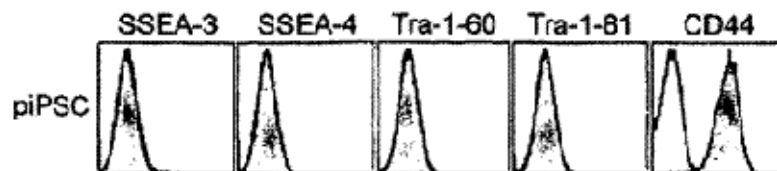


FIG. 10A

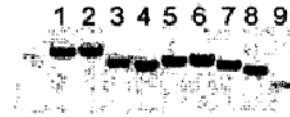


FIG. 10B

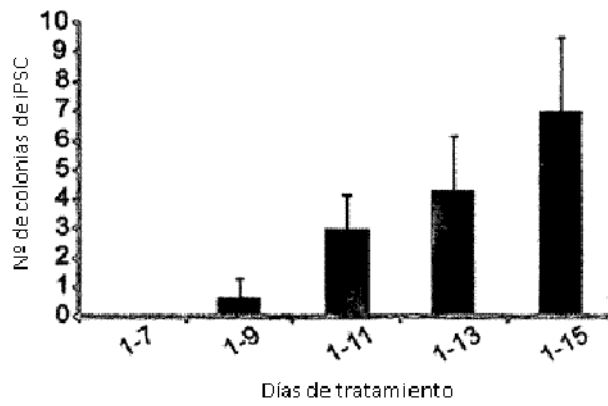


FIG. 10C



FIG. 11A

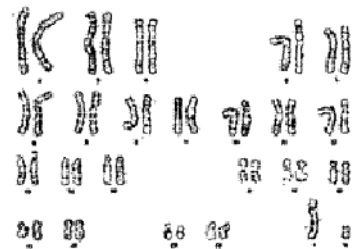


FIG. 11B

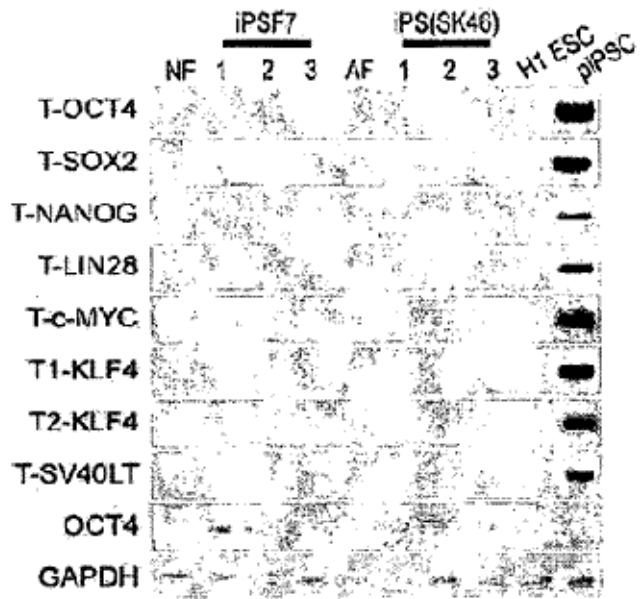


FIG. 11C

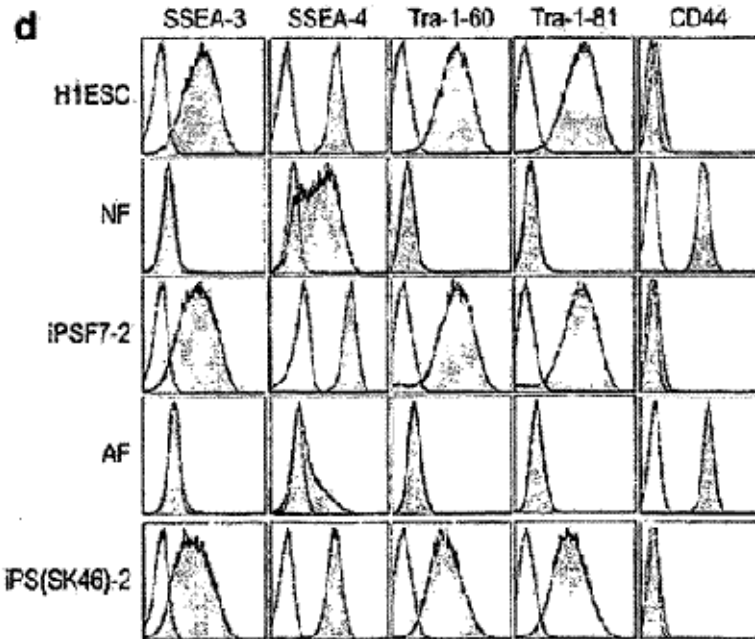


FIG. 11D



FIG. 11E

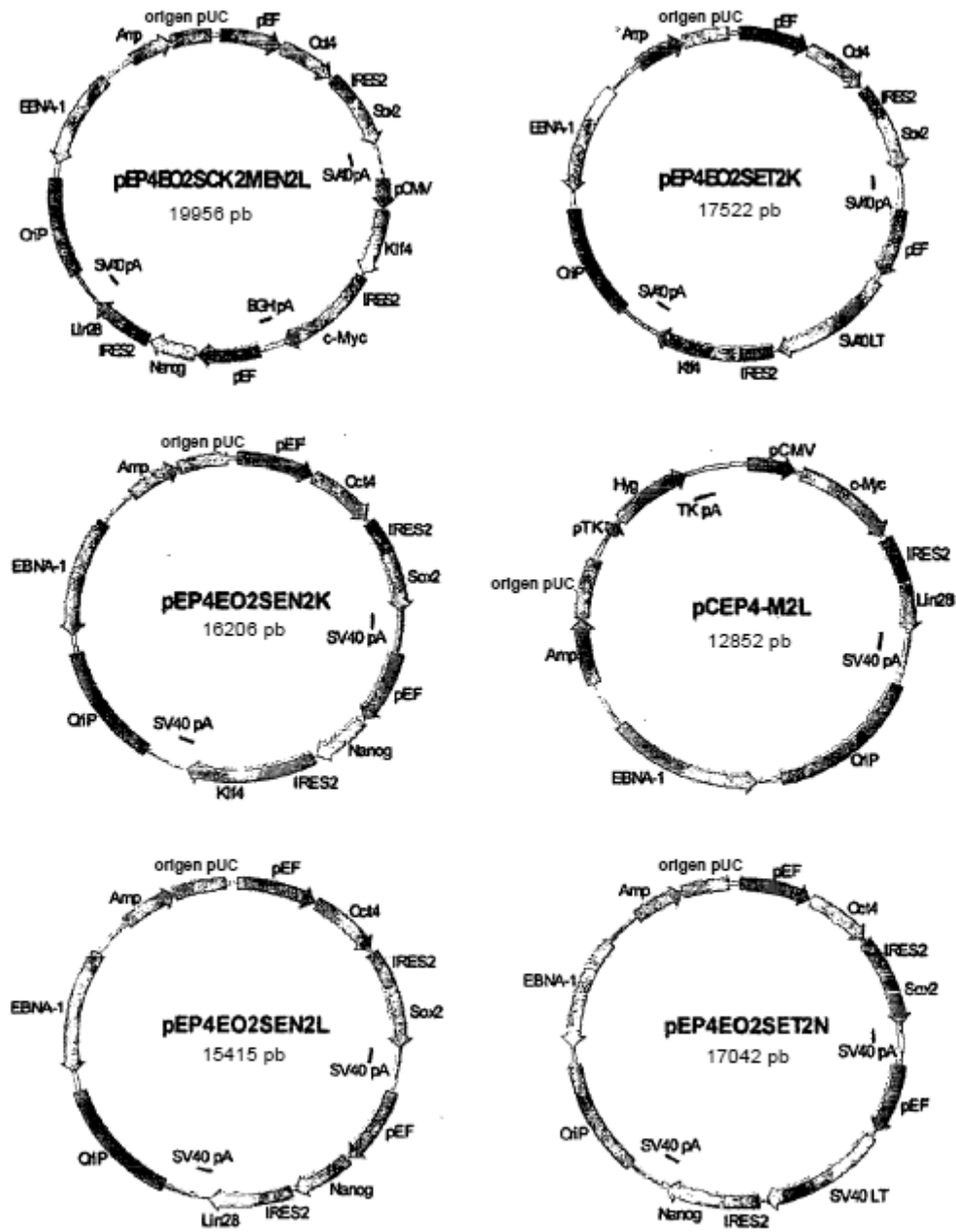


FIG. 12