

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 949**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/074** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2008** **E 08400048 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2192174**

54 Título: **Reprogramación de células hacia un estado pluripotente**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.03.2016**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**STOLZING, ALEXANDRA;  
ARNOLD, ANTJE y  
BROWN, JEREMY**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 561 949 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 de células hacia un estado pluripotente.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar células reprogramadas, en particular para preparar células madre pluripotentes y multipotentes, y a las células madre pluripotentes y multipotentes preparadas mediante dichos procedimientos.

10 El envejecimiento, ya sea *in vivo* durante el transcurso de la vida o *in vitro* durante una escalación, afecta a las células, en particular células madre. Por ejemplo, las células envejecidas muestran mayores tasas de apoptosis, menor capacidad de diferenciación y de proliferación, y menor eficacia terapéutica. Durante el envejecimiento, las células madre se diferencian a menudo en una forma menos proliferativa y menos flexible. El envejecimiento celular representa un problema, en particular cuando se usan células procedentes de pacientes/donantes ancianos como material de partida para cultivos celulares, cuando se expanden células *in vitro*, y cuando se usan células que tienen una capacidad limitada de diferenciación para la terapia o la investigación.

15 Un enfoque para desdiferenciar células envejecidas es para crear las denominadas células madre pluripotentes inducidas (IPS). El estado actual de la técnica prevé usar una transferencia vírica de factores de transcripción para inducir una mayor potencia de diferenciación en células y rejuvenecerlas. Sin embargo, esto es potencialmente peligroso debido a que la transferencia vírica cambia permanentemente el genoma de la célula y también puede conducir a complicaciones debido a las partes víricas dejadas atrás en el genoma celular. Además, se sabe que la integración vírica en el genoma incrementa el riesgo de cáncer en células. Esencialmente lo mismo se aplica al uso de plásmidos para reprogramar células (Okita *et al.*, 2008, Science. 2008 Nov 7; 322(5903):949-53. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors).

20 Otro enfoque emplea la puesta en contacto de células que van a ser reprogramadas con extractos de células madre embrionarias humanas para reprogramar células. Sin embargo, este enfoque es ético y prácticamente problemático.

30 Algunos otros enfoques usan factores químicos para desdiferenciar células (por ejemplo, documentos US 2007/0254884 A1, US 2007/0020759 A1), pero estos factores no son eficaces a la hora de reprogramar completamente las células hasta un estado pluripotente por sí mismas.

35 El documento WO 2008/087442 A describe métodos para inducir la reprogramación de una célula diferenciada añadiendo ARNm de Nanog a un oocito de *Xenopus* que no contiene Nanog e introduciendo el extracto de ese oocito en una célula que va a ser reprogramada. Jaenisch *et al.*, Cell 133 (4), Febrero 2008:567-582, describe la reprogramación de células somáticas mediante transplante nuclear de un núcleo somático en un óvulo enucleado y por medio de retrovirus para introducir moléculas de ácido nucleico en una célula que va a ser reprogramada.

40 Zuk *et al.* "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells", Molecular Biology of the Cell, Diciembre 2002, Vol. 13, 4279-4295, describieron que el tejido adiposo contiene células madre multipotentes, en particular células madre mesenquimatosas que expresaron múltiples antígenos marcadores CD que son característicos de tales células multipotentes.

45 De este modo, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar métodos mejorados para reprogramar células, en particular para desdiferenciar células, que supere las desventajas identificadas anteriormente, en particular permitan de una manera fácil, eficiente y segura la provisión de células reprogramadas, en particular desdiferenciadas, que presenten preferentemente carácter de células madre multipotentes, muy preferentemente pluripotentes.

50 La presente invención resuelve este problema técnico mediante la provisión de un procedimiento para preparar *in vitro* células reprogramadas, comprendiendo las etapas del procedimiento, preferentemente en el orden dado, a) proporcionar células que van a ser reprogramadas; b) introducir, preferentemente transfectar, moléculas de ARNm capaces de reprogramar las células en las células proporcionadas en la etapa a), en el que las moléculas de ARNm reprogramadoras codifican por lo menos una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por: Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog y TERT; y c) cultivar las células obtenidas en la etapa b) en un medio de cultivo celular y en una condición adecuada para permitir la traducción de las moléculas de ARNm reprogramadoras introducidas, preferentemente transfectadas, a fin de obtener células reprogramadas.

60 De este modo, la presente invención prevé un procedimiento que es capaz de preparar células reprogramadas sin la necesidad de cambiar permanentemente el genoma de la célula y sin la necesidad de usar virus para transferir factores de transcripción o similares a la célula. La presente invención también es ventajosa en tanto que, con respecto a células reprogramadoras, no se necesitan extractos de células madre embrionarias humanas o factores químicos costosos y potencialmente peligrosos. De este modo, las preocupaciones éticas, los problemas de estabilidad genética y los riesgos de cáncer se reducen o incluso se evitan. Por el contrario, la presente invención proporciona la enseñanza ventajosa para introducir, preferentemente transfectar, moléculas de ARNm específicas, en lo siguiente denominadas "moléculas de ARNm reprogramadoras", en las células, en el que estas moléculas de

ARNm reprogramadoras son capaces de reprogramar las células receptoras de ARNm, preferentemente las células que son transfectadas con ellas, a un estado desdiferenciado. Ventajosamente, las moléculas de ARNm introducidas, preferentemente transfectadas, según la presente invención no se integrarán en el genoma del receptor, y por lo tanto no plantean un riesgo de cáncer o de inestabilidad genética. Por lo tanto, la invención prevé un procedimiento para preparar una o más células reprogramadas *in vitro*, en el que dicho procedimiento no incluye ninguna amplificación de clonación o proliferación de las células receptoras del ARNm. La presente invención también prevé un procedimiento para preparar una o más células reprogramadas *in vivo*, esto es, en un órgano vivo, un organismo vivo o animal, más particularmente un mamífero.

En el contexto de la presente invención, el término "reprogramar" significa preferentemente remodelar, en particular borrar y/o remodelar, marcas epigenéticas de una célula tales como metilación del ADN, metilación de histonas, o activar genes induciendo sistemas de señales de factores de transcripción con respecto a oct4. En particular, la reprogramación de la presente invención proporciona por lo menos una célula desdiferenciada y/o rejuvenecida, en particular proporciona una célula que tiene la característica de una célula madre multipotente, en particular pluripotente. De este modo, en el caso de que las células que van a ser reprogramadas sean células que ya tienen un carácter multipotente o pluripotente, la presente invención es capaz de mantener estas células mediante la reprogramación de la presente invención en su estado multi- o pluripotente durante un período de tiempo prolongado. En el caso de que las células que van a ser reprogramadas estén en un estado envejecido o diferenciado, la presente invención permite la desdiferenciación en una célula madre multipotente o pluripotente. En una forma de realización particularmente preferida, las células multipotentes se pueden reprogramar para que se conviertan en células pluripotentes.

En particular, la expresión "células reprogramadas" designa células que se han cambiado para que tengan un mayor potencial de diferenciación y/o de proliferación. También, en una forma de realización preferida, la reprogramación de una célula diferenciada somática frente a una célula madre multipotente o célula diferenciada "joven" se denomina reprogramación, y el producto se denomina una célula reprogramada.

En particular, el presente procedimiento permite enriquecer células madre inmaduras, preferentemente que muestran una elevada actividad de telomerasa, varios marcadores multipotentes, preferentemente pluripotencia, y una secreción incrementada de factores de crecimiento. La presente invención proporciona la ventaja de que las células madre envejecidas se pueden expandir durante un período de tiempo más prolongado y con un mayor rendimiento de células madre. Además, las estirpes de células madre y las selecciones de constructos manipulados mediante ingeniería tisulares obtenidos o derivados de células reprogramadas mediante el presente procedimiento muestran un riesgo inmunológico mínimo reducido, en particular si las células propias del paciente se usan como fuente para la reprogramación. De este modo, la presente invención proporciona medios y métodos para preparar en particular células madre pluripotentes, para proporcionar células madre multipotentes, para proporcionar medios y métodos para una expansión incrementada de células o células madre *in vitro*, y para el rejuvenecimiento de células envejecidas o células madre envejecidas para terapias celulares o de manipulación mediante ingeniería genética de tejidos.

En particular, la presente invención prevé, preferentemente en una primera etapa, proporcionar células que van a ser reprogramadas. Preferentemente, las células que van a ser reprogramadas pueden ser células adultas o neonatales, pero no se limitan a ellas. Preferentemente, las células que van a ser reprogramadas son células no diferenciadas adultas o neonatales. En una forma de realización preferida, todas estas células pueden ser estirpes celulares, células inmortalizadas, células mantenidas en cultivo celular, poblaciones de células aisladas, preferentemente células aisladas de un donante, ya sea un donante vivo o muerto, o células aisladas del entorno. Los tipos celulares que se pueden reprogramar según la presente invención potencialmente son todos los tipos celulares, y en casos preferidos son fibroblastos, hepatocitos, células cardíacas, cardiomiocitos, células nerviosas, condrocitos, osteoblastos, adipocitos, mioblastos, hepatoblastos, células madre hepáticas, células productoras de insulina, células madre neuronales, células cardiomiogénicas, dermatocitos, queratinocitos, células pancreáticas, monocitos, células epiteliales, o células madre mesenquimatosas (MSC). Preferentemente, las células pueden ser células de mamífero, en particular células humanas o células de animales, preferentemente células ovinas, de caballo, de mono, o en particular de roedor, preferentemente células de hámster, células de ratón o células de rata. Las células también pueden ser células de pez, de reptil, de aves, de anfibios o de insectos. Preferentemente, las células que van a ser reprogramadas son células comprometidas con la estirpe. En una forma de realización preferida adicional, las células, en particular las células del origen identificado anteriormente, son células madre, en particular células madre post-natales o células madre no embrionarias.

Una fuente adecuada y preferida de células madre como células madre mesenquimatosas es un tejido en el cuerpo humano o animal que comprende las células madre para uso en la presente invención, opcionalmente junto con otros tipos celulares. Preferentemente, la fuente adecuada de células madre es médula ósea, tanto adulta como fetal, célula periférica movilizada mediante citocinas o quimioterapia, hígado fetal, sangre de cordón umbilical, y bazo, tanto adulto como fetal; más preferentemente, la fuente de células madre es médula ósea de adulto o sangre de cordón umbilical; más preferentemente, la fuente de células madre es médula ósea. Las células de médula ósea se pueden obtener de cualquier fuente conocida, incluyendo, pero sin limitarse a, íleo, esternón, tibias, fémures, espinazo u otras cavidades óseas. Preferentemente, las células madre se aíslan de un organismo mamífero tal

como un ser humano, ratón o rata, y más preferentemente las células madre se aíslan de un organismo humano.

La expresión "población de células aisladas" pretende significar que las células no están en contacto con otras células con las que habitualmente están en contacto en el cuerpo del mamífero o en una muestra tisular obtenida directamente, es decir, sin ninguna etapa de purificación o de enriquecimiento, del mamífero. Una "población de células", según la presente invención, puede comprender no solamente células de un tipo celular, tales como fibroblastos o células madre mesenquimatosas, como se define por ejemplo mediante la expresión de una combinación específica de marcadores de superficie, sino también una mezcla de células de diferentes tipos celulares que muestran diferentes combinaciones de marcadores de superficie.

Las células cosechadas de dichas fuentes se pueden usar directamente para la transfección, o se pueden crioconservar congelándolas a una temperatura de alrededor de -196°C hasta alrededor de -130°C.

Las células que van a ser reprogramadas reciben, según la presente invención, en una segunda etapa, por lo menos una especie de moléculas de ARNm reprogramadoras, en particular moléculas de ARNm lineales y aisladas, seleccionadas del grupo de moléculas de ARNm que codifican Ronin, moléculas de ARNm que codifican Oct4, moléculas de ARNm que codifican Klf4, moléculas de ARNm que codifican Sox2, moléculas de ARNm que codifican Nanog y moléculas de ARNm que codifican TERT. Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog y TERT son proteínas con la capacidad para reprogramar células. En el contexto de la presente invención, estas proteínas se denominan "proteínas reprogramadoras", y se caracterizan por su capacidad para reprogramar células diana y por lo tanto por su función reguladora en términos de determinar el destino celular, siendo en particular capaces de desdiferenciar una célula diana y/o de mantener una célula en un estado desdiferenciado, al ser preferentemente factores de transcripción.

El comportamiento de diferenciación de las células y el estado de diferenciación se pueden detectar según los métodos expuestos más abajo. Sin embargo, igualmente es aplicable cualquier método para determinar el estado de diferenciación o potencia de una célula conocido por la persona experta.

En una forma de realización preferida, la célula que va a ser reprogramada se transfiere con una o más moléculas de ARNm reprogramadoras según la presente invención. En otra forma de realización preferida, la célula que va a ser reprogramada se suplementa con una o más moléculas de ARNm reprogramadoras según la presente invención. En otra forma de realización preferida, la célula que va a ser reprogramada se inyecta con una o más moléculas de ARNm reprogramadoras según la presente invención.

La presente invención prevé de este modo usar una o más moléculas de ARNm que codifican Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog o TERT. Estas moléculas de ARNm pueden ser, en una forma de realización preferida, moléculas que tienen la secuencia nucleotídica de tipo salvaje de mamífero, en particular ser humano, de animal, preferentemente roedor, más preferentemente ratón, hámster o rata, o cualquier otra secuencia nucleotídica de animal. En una forma de realización preferida de la presente invención, la molécula de ARNm reprogramadora se selecciona de entre el grupo constituido por moléculas de secuencia nucleotídica de ARNm que son codificadas por una cualquiera de las secuencias de ADN dadas en SEC ID No. 1 a 16.

Por supuesto, la invención también prevé usar moléculas de ARNm cuya secuencia es un equivalente funcional a la secuencia polinucleotídica dada anteriormente. En el contexto de la presente invención, un equivalente funcional es una molécula de secuencia nucleotídica que codifica con una secuencia nucleotídica diferente exactamente la misma proteína que la secuencia de ARNm codificada por una cualquiera de SEC ID No. 1 a 16, o es una secuencia de ARNm que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos diferente pero con la misma función o similar, siendo en particular capaz de reprogramar las células según la presente invención.

En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el equivalente funcional de las moléculas de ARNm es un polinucleótido con una secuencia homóloga al polinucleótido de ARNm de tipo salvaje como se codifica mediante la secuencia de ADN en una cualquiera de SEC ID No. 1 a 16. En una forma de realización preferida de la presente invención, el grado o porcentaje de homología es por lo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o 100%. En una forma de realización preferida adicional, un equivalente funcional de las moléculas de ARNm como se da en una cualquiera de SEC ID No. 1 a 16 es una secuencia de ARNm que es codificada por una secuencia de ADN que es sustancialmente complementaria a las secuencias de una cualquiera de SEC ID No. 1 a 16 o a su secuencia complementaria, preferentemente sustancialmente complementaria. En una forma de realización preferida adicional, el equivalente funcional de la molécula de ARNm como se codifica mediante una cualquiera de las secuencias de ADN de SEC ID No. 1 a 16 es una molécula de ARN que es codificada por una secuencia de ADN que es capaz de hibridarse en condiciones restrictivas o restrictivas reducidas a uno cualquiera de los polinucleótidos dados en SEC ID No. 1 a 16 o a su secuencia complementaria, preferentemente sustancialmente complementaria.

En el contexto de la presente invención, la expresión "molécula de ARNm" se refiere a un polímero lineal de moléculas ribonucleotídicas, que es monocatenario y sirve como molde para la síntesis de proteínas.

Los polinucleótidos tienen secuencias “homólogas” si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima como se describe aquí. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se lleva a cabo generalmente comparando porciones de las dos secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. La ventana de comparación tiene generalmente de alrededor de 20 a 200 nucleótidos contiguos.

El “porcentaje de homología de secuencia” para polinucleótidos, denominado aquí como homología de secuencia de 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 por ciento, se puede determinar comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede incluir adiciones o supresiones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula: (a) determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas; (b) dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación; y (c) multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de homología de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se puede realizar mediante implementaciones computerizadas de algoritmos conocidos, o mediante inspección. Los algoritmos fácilmente disponibles de comparación de secuencias y de alineamiento múltiple de secuencias son, respectivamente, los programas Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Básica (BLAST) (Altschul, S.F. *et al.* 1990. *J. Mol. Biol.* 215:403; Altschul, S.F. *et al.* 1997. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402) y ClustalW, ambos disponibles en internet. Otros programas adecuados incluyen GAP, BESTFIT y FASTA en el Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA).

Como se usa aquí, “Sustancialmente complementarias” significa que dos secuencias de ácido nucleico en cuestión tienen por lo menos alrededor de 65%, preferentemente alrededor de 70%, más preferentemente alrededor de 80%, incluso más preferentemente 90%, y lo más preferible alrededor de 98%, complementariedad de secuencia entre sí. Esto significa que la secuencia de ADN que codifica el equivalente funcional y el polinucleótido dado en cualquiera de SEC ID No. 1 a 16, o su complemento, debe exhibir, en una forma de realización preferida, suficiente complementariedad para hibridarse en condiciones restrictivas. Una secuencia sustancialmente complementaria es preferentemente aquella que tiene suficiente complementariedad de secuencia con la secuencia nucleotídica en cuestión para dar como resultado la unión.

El término “cebador”, como se usa aquí, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse a la diana de amplificación, permitiendo que se una una ADN polimerasa que sirve de ese modo como un punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto del alargamiento del cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (de la amplificación) es preferentemente monocatenario para la eficiencia máxima en la amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe de ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de alargamiento en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la fuente de cebador.

Un “par de cebadores bidireccionales”, como se usa aquí, se refiere a un cebador directo y a un cebador inverso como se usa habitualmente en la técnica de amplificación de ADN, tal como en la amplificación mediante PCR.

Los términos “restricción” o “condiciones de hibridación restrictivas” se refieren a las condiciones de hibridación que afectan a la estabilidad de los híbridos, por ejemplo temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida, y similar. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica de un oligo- o polinucleótido a su secuencia de ácido nucleico diana. Los términos según se usan incluyen la referencia a condiciones en las que un oligo- o polinucleótido se hibridará a su secuencia diana, hasta un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, por lo menos 2 veces con respecto al fondo). Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia, y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridarán específicamente a mayores temperaturas.

Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de 5 grados C (grados Celsius) menores que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (a fuerza iónica y a pH definidos) a la que 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida a un oligo- o polinucleótido perfectamente emparejado. Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que alrededor de 1,0 M de ion  $<+>$ , típicamente alrededor de 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na  $<+>$  (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es por lo menos alrededor de 30 grados C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos alrededor de 60 grados C para sondas o cebadores largos (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizadores, tales como formamida.

Condiciones de baja restricción ejemplares o “condiciones de restricción reducida” incluyen la hibridación con una disolución tampón de 30% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37 grados C, y un lavado en 2x SSC a 40 grados C. Las condiciones de restricción elevada ejemplares incluyen la hibridación en 50% de formamida, 1 M de

NaCl, 1% de SDS a 37 grados C, y un lavado en 0,1x SSC a 60 grados C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994.

5 De este modo, la presente invención prevé introducir, preferentemente transfectar, moléculas de ARNm reprogramadoras específicas en las células, moléculas de ARNm las cuales una vez introducidas, preferentemente transfectadas, en las células son capaces de ser traducidas en las denominadas proteínas reprogramadoras que pueden encender genes específicos en las células, en particular genes de multipotencia y/o pluripotencia en la célula. La molécula de ARNm usada según la presente invención es preferentemente una molécula lineal que tiene  
10 una cola poli(A) muy preferentemente producida mediante transcripción *in vitro*. De este modo, en una forma de realización preferida, las moléculas de ARNm se producen mediante transcripción *in vitro*, en particular usando sistemas bacterianos. En una forma de realización preferida particular, las secuencias de ADN de las proteínas reprogramadoras se clonan en plásmidos y se amplifican en bacterias, por ejemplo E. coli.

15 En una forma de realización preferida adicional, los plásmidos se aíslan entonces de las bacterias, se linealizan y se someten a digestión de restricción. En una forma de realización preferida adicional, ADNc preparado mediante dicho método se transcribe en ARNm, que a su vez se incuba para destruir los restos de ADNc y para obtener moléculas de ARNm para introducir las en las células.

20 Puesto que las moléculas de ARNm reprogramadoras introducidas y las proteínas traducidas a partir de ellas se degradan con el tiempo en las células, no se pueden integrar permanentemente en el genoma de la célula, proporcionando algunas de las características ventajosas de la presente invención.

25 En una forma de realización preferida de la presente invención, la presente enseñanza prevé introducir, preferentemente transfectar, las moléculas de ARNm reprogramadoras en la célula mediante electroporación, mediante lipofección, mediante inyección, mediante magnetofección, mediante bombardeo de partículas, pistola génica, o mediante cualquier otro método conocido en la técnica adecuado para introducir moléculas de ARNm en una célula diana.

30 En una forma de realización particular preferida, la presente invención prevé además en su etapa c) cultivar las células en las que se han introducido las moléculas de ARNm reprogramadoras, en un medio de cultivo celular y en una condición adecuada para permitir la traducción de las moléculas de ARNm reprogramadoras transfectantes, para obtener las células reprogramadas.

35 En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el presente procedimiento consiste por lo tanto en las etapas a), b) y c) identificadas anteriormente, preferentemente en este orden. En consecuencia, la presente invención excluye cualesquiera etapas del procedimiento adicionales, en particular cualquier etapa del procedimiento sustancial adicional, en particular cualesquiera etapas del procedimiento intermedias o subsiguientes. De este modo, la presente invención proporciona sus ventajas de una manera simple y rentable.

40 En una forma de realización particularmente preferida, el sistema de cultivo celular es un sistema de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular, preferentemente en una vasija de cultivo, en particular un medio de cultivo celular suplementado con por lo menos una denominada "sustancia inductora", que es una sustancia adecuada y determinada para proteger a las células del envejecimiento *in vitro* y/o para inducir una reprogramación  
45 no específica o específica. En una forma de realización particularmente preferida, una sustancia inductora según la presente invención es una sustancia seleccionada de entre el grupo constituido por reversina, resveratrol, selenio, un compuesto que contiene selenio, EGCG ((-)-epigallocatequina-3-galato), ácido valproico y sales de ácido valproico, en particular valproato de sodio.

50 En una forma de realización particularmente preferida, la por lo menos una sustancia inductora está presente en el medio de cultivo celular usado en la etapa c) del presente procedimiento en una concentración de 0,001 a 100  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,005 a 50  $\mu\text{M}$ .

55 En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención prevé usar una concentración de reversina de 0,5 a 10  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 1  $\mu\text{M}$ . En una forma de realización preferida adicional, la presente invención prevé usar resveratrol en una concentración de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , preferentemente 50  $\mu\text{M}$ . En una forma de realización preferida adicional, la presente invención prevé usar selenio o un compuesto que contiene selenio en una concentración de 0,05 a 0,5  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$ . En una forma de realización preferida adicional, la presente invención prevé usar EGCG en una concentración de 0,001 a 0,1  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,01  $\mu\text{M}$ . En una  
60 forma de realización preferida adicional, la presente invención prevé usar ácido valproico o valproato de sodio en una concentración de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , en particular de 5  $\mu\text{M}$ .

La presente invención prevé en una forma de realización preferida adicional cultivar las células obtenidas en la etapa b) en un medio de cultivo celular, en el que el medio de cultivo celular comprende, opcionalmente en combinación  
65 con la sustancia inductora como se especifica anteriormente, por lo menos un inhibidor transitorio de la proteólisis. El

5 uso de por lo menos un inhibidor de la proteólisis en el medio de cultivo celular de la presente invención incrementa el tiempo durante el cual las proteínas reprogramadoras derivadas del ARNm o de cualesquiera genes endógenos estarán presentes en las células, y de este modo facilita de una manera incluso más mejorada la reprogramación mediante los factores derivados de ARNm transfectado. La presente invención usa, en una forma de realización particularmente preferida, como inhibidor transitorio de la proteólisis, un inhibidor de proteasas, un inhibidor de proteosomas y/o un inhibidor de lisosomas. En una forma de realización particularmente preferida, el inhibidor de proteosomas se selecciona de entre el grupo constituido por MG132, TMC-95A, TS-341 y MG262.

10 En una forma de realización preferida adicional, el inhibidor de proteasas se selecciona de entre el grupo constituido por aprotinina, G-64 y hemisulfato de leupeptina. En una forma de realización preferida adicional, el inhibidor lisosómico es cloruro de amonio.

15 En una forma de realización preferida adicional, la presente invención también prevé un medio de cultivo celular que comprende por lo menos un inhibidor transitorio de la degradación del ARNm. El uso de un inhibidor transitorio de la degradación del ARNm incrementa asimismo la semivida de los factores reprogramadores.

20 En una forma de realización preferida adicional de la presente invención, una condición adecuada para permitir la traducción de las moléculas de ARNm reprogramadoras transfectadas en las células es un contenido de oxígeno en el medio de cultivo celular de 0,5 a 21%, preferentemente de 1 a 20%, más preferentemente de 5 a 19%, y particularmente preferido de 10 a 18%. Más particularmente, y sin desear estar atados por la teoría, el oxígeno se usa para inducir o incrementar adicionalmente Oct4 al disparar Oct4 vía Hif1a.

25 En una forma de realización preferida, se seleccionan condiciones que son adecuadas para apoyar la reprogramación de las células mediante las moléculas de ARNm; más particularmente, estas condiciones requieren una temperatura de 30 a 38°C, preferentemente de 31 a 37°C, más preferentemente de 32 a 36°C.

30 El contenido de glucosa del medio está, en una forma de realización preferida de la presente invención, por debajo de 4,6 g/l, preferentemente por debajo de 4,5 g/l, más preferentemente por debajo de 4 g/l, incluso más preferentemente por debajo de 3 g/l, particularmente de forma preferible por debajo de 2 g/l, y lo más preferible es 1 g/l. Los medios DMEM que contienen 1 g/l de glucosa, que son los preferidos para la presente invención, están comercialmente disponibles como "DMEM con bajo contenido de glucosa" de compañías tales como PAA, Omega Scientific, Perbio y Biosera. Más particularmente, y sin desear estar atados por la teoría, las condiciones de alto contenido de glucosa apoyan de forma adversa el envejecimiento de las células (metilación, epigenética) *in vitro*, lo que puede hacer difícil la reprogramación.

35 En una forma de realización preferida adicional de la presente invención, el medio de cultivo celular contiene glucosa en una concentración de 0,1 g/l a 4,6 g/l, preferentemente de 0,5 g/l a 4,5 g/l, y lo más preferible de 1 g/l a 4 g/l.

40 Las expresiones "cultivo celular" y "cultivo de células" se refieren al mantenimiento y propagación de células, y preferentemente células humanas, derivadas de ser humano, y animales, *in vitro*.

45 "Medio de cultivo celular" se usa para el mantenimiento de células en cultivo *in vitro*. Para algunos tipos celulares, el medio también puede ser suficiente para apoyar la proliferación de las células en cultivo. Un medio según la presente invención proporciona nutrientes tales como fuentes de energía, aminoácidos e iones inorgánicos. Adicionalmente, puede contener un colorante como rojo fenol, piruvato de sodio, varias vitaminas, ácidos grasos libres, antibióticos, antioxidantes y oligoelementos.

50 Para cultivar las células madre según la presente invención, antes de la reprogramación es adecuado cualquier medio estándar tal como medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), alfa-MEM, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio RPMI y medio de McCoy. Una vez que las células se han reprogramado, en una forma de realización preferida se pueden cultivar en un medio de células madre embrionarias.

55 Preferentemente, el medio comprende adicionalmente uno o más aditivos seleccionados de entre el grupo constituido por vitamina D3 (1,25-dihidroxitamina D3, calcitriol), resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxiestilbeno), reversina (2-(4-morfolinoanilino)-N6-ciclohexiladenina), vitamina E (RRR- $\alpha$ -tocoferol), ácido valproico (decapeno, valproato, valreleasa), EGCG (epigallocatequina-3-galato) y selenio. Preferentemente, dos de los aditivos mencionados anteriormente están presentes, más preferentemente están presentes tres de los aditivos mencionados anteriormente, incluso más preferentemente están presentes cuatro de los aditivos mencionados anteriormente, particularmente preferible están presentes cinco de los aditivos mencionados anteriormente, y lo más preferible están presentes todos los aditivos mencionados anteriormente.

60 Estos medios son bien conocidos por una persona experta en la técnica, y se pueden adquirir de compañías tales como Cambrex, Invitrogen, Sigma-Aldrich o Stem Cell Technologies.

65 En una forma de realización particular, el medio puede comprender además un componente sérico tal como suero de caballo, suero humano o suero fetal de ternera (FCS). Preferentemente, el medio contiene FCS. Si está presente,

el suero está presente en una concentración de 1-20%, preferentemente de 3-18%, más preferentemente de 5-15%, incluso más preferentemente de 8-12%, y lo más preferible de 10%. Como alternativa, el componente sérico se puede sustituir por cualesquiera de las varias mezclas de sustitución de suero estándar, que incluyen típicamente insulina, albúmina y lecitina o colesterol.

5 Una "vasija de cultivo" es cualquier vasija que sea adecuada para hacer crecer células en un medio de cultivo, en particular seleccionado de, pero sin limitarse a, agar, matrigel y colágeno, ya sea en fase fluida o adherido a una superficie interior del recipiente. Los tipos de tales vasijas especializadas incluyen botellas giratorias, matraces de agitación, cápsulas de Petri y matraces de tejidos. Las vasijas de cultivo se diseñan para ser incubadas en entornos controlados de temperatura, humedad y gas, para facilitar el crecimiento máximo de células o tejidos. Generalmente, una capa de medio de cultivo celular o de agar cubre a la superficie de crecimiento. La porción de la vasija no utilizada como superficie de crecimiento encierra el entorno gaseoso interior que rodea al cultivo celular. Las células, tejidos, microorganismos, y similares, se introducen típicamente en el interior de las vasijas de cultivo celular a través de una abertura en la vasija. Tras la introducción de las células, la abertura se puede cerrar de manera que las células no estén en contacto con el entorno durante el cultivo de las células.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la vasija de cultivo se trata para el cultivo tisular, lo que significa que la superficie de la vasija de cultivo se trata de manera que las células que habitualmente crecen en un estado adherente crezcan adherentemente, pero las células que crecen en suspensión no se adhieran o se adhieran solamente de forma holgada. Tal tratamiento puede implicar la irradiación de la vasija o el revestimiento de la vasija, por ejemplo con un plástico especial, polímero o nanoestructura, o con proteínas de la matriz extracelular. Tales vasijas pueden comprender cápsulas de cultivo tisular y matraces de cultivo celular, y están disponibles de diferentes proveedores tales como Becton Dickinson, Greiner, Sigma y TPP.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de células que muestran un carácter de células madre multipotente, preferentemente pluripotente, en el que se lleva a cabo un procedimiento según lo anterior.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para mejorar la expansión de células madre *in vitro*, en el que se lleva a cabo un procedimiento según la presente invención. De este modo, la presente invención proporciona la ventaja de prolongar la expansión de células madre, puesto que la presente invención mantiene las células que van a ser expandidas en un estado desdiferenciado.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para el rejuvenecimiento de células envejecidas, en el que se lleva a cabo un procedimiento según la presente invención.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para inducir la desdiferenciación de células, en el que se lleva a cabo un procedimiento según la presente invención, y en el que en particular las células que van a ser reprogramadas son células diferenciadas, en particular células comprometidas con el linaje.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para reprogramar células receptoras de un mamífero *in vivo*, que comprende introducir moléculas de ARNm reprogramadoras en las células receptoras del mamífero, en el que las moléculas de ARNm reprogramadoras codifican por lo menos una proteína reprogramadora seleccionada de entre el grupo constituido por Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog y TERT. De este modo, la presente invención también se refiere a un método *in vivo* para reprogramar células receptoras de un mamífero, que emplea las moléculas de ARNm reprogramadoras como se identifican anteriormente para la realización *in vitro* de la presente invención. La presente invención que se refiere al procedimiento para reprogramar células receptoras de un mamífero *in vivo* prevé de ese modo introducir directamente las moléculas de ARNm reprogramadoras en por lo menos una célula de un mamífero receptor, esto significa en por lo menos una célula receptora, por medios adecuados tales como inserción por pistola génica. Tal procedimiento permite la producción de un mamífero, en particular un ser humano, que tiene por lo menos una célula reprogramada. De este modo, esta forma de realización de la presente invención proporciona una aplicación terapéutica tremendamente mejorada, en particular en la medicina regenerativa y/o en la terapia de sustitución. De este modo, la presente invención se refiere a un método para tratar un mamífero, en particular un ser humano, en el que moléculas de ARNm reprogramadoras se introducen en por lo menos una célula del mamífero receptor, y en el que las moléculas de ARNm reprogramadoras codifican por lo menos una proteína reprogramadora seleccionada de entre el grupo constituido por Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog y TERT.

La presente invención también se refiere a una célula madre multipotente, en particular pluripotente, preparada según uno cualquiera de los métodos de la presente invención. De este modo, las células reprogramadas según la presente invención son preferentemente células madre multipotentes, en particular pluripotentes. En una forma de realización preferida, las células obtenidas según la presente invención se distinguen de las células usadas como material de partida en la etapa a) de la presente invención por la falta de uno o más marcadores. En una forma de realización preferida, estas células también se pueden caracterizar por un patrón de metilación particular, por la expresión de oct4, sox2, nanog, hTERT o klf4. La expresión de oct4, que no se encuentra en células somáticas como fibroblastos, se expresa tras transfectar ARNm (klf4, sox2 y oct4) en fibroblastos humanos, mediante potencial mejorado de crecimiento, y mediante un mayor potencial de diferenciación. Para la pluripotencia, es decir, la



formación de cuerpos embrioides, la producción de células de tres capas germinales *in vitro* e *in vivo*. Sus ejemplos se ilustran en las figuras y ejemplos que se acompañan.

5 Las células reprogramadas obtenidas mediante los presentes procedimientos se pueden caracterizar preferentemente por la expresión o no expresión de ciertos marcadores de superficie. A estos marcadores de superficie se les da habitualmente una designación de cúmulo de diferenciación (CD), que describe grupos de características inmunofenotípicas de la superficie de las células. Habitualmente las moléculas de CD son glicoproteínas unidas a la membrana que son reconocidas por un agrupamiento de anticuerpos monoclonales que presentan la misma reactividad celular. Estas moléculas de la superficie se pueden detectar, por ejemplo, por medio  
10 de un citómetro de flujo, tal como un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) fabricado por compañías tales como Becton Dickinson. Los métodos para identificar células según la presente invención son métodos para detectar proteínas específicas de células, métodos para detectar factores de transcripción específicos de células, o métodos para detectar cambios fisiológicos o morfológicos. Todos estos métodos son bien conocidos per se en la técnica anterior. En particular, estos métodos usan procedimientos de detección de proteínas o de ADN o de ARN  
15 bien conocidos, y/o los ensayos con genes informadores. Por supuesto, se pueden emplear inmunoensayos o ensayos que usan proteínas o ácidos nucleicos marcados fluorescente o radioactivamente, incluyendo métodos para medir actividades enzimáticas. Los métodos para detectar cambios morfológicos pueden incluir métodos de tinción, métodos visuales, o similares.

20 Las células reprogramadas según la presente invención se pueden usar para fines terapéuticos, de diagnóstico o científicos. En particular, estas células se pueden usar en medicina regenerativa y/o par terapia de sustitución.

El término "célula" no se refiere solamente a una única célula, sino también engloba una estirpe celular, una población de células o un clon celular.

25 La expresión "células madre" se refiere a células que han retenido la capacidad para proliferar y diferenciarse en uno o más tipos celulares. Las células madre creadas según la presente invención son preferentemente células madre pluripotentes, es decir, células madre que han retenido la capacidad para diferenciarse en distintas estirpes celulares y tipos celulares, o células madre multipotentes, que retienen un potencial de diferenciación más restringido.

30 Se entiende que la expresión "células madre" según la invención no comprende embriones humanos. Además, se entiende que la expresión "células madre" no comprende células madre pluripotentes que se han obtenido directamente de un embrión humano.

35 Una "célula madre", como se usa aquí, se refiere a cualquier célula pluripotente o célula multipotente o célula progenitora o célula precursora que se autorregenera que es capaz de diferenciarse en uno o más tipos celulares. De este modo, las células madre son células capaces de diferenciarse en uno o más de un tipo celular, y tienen preferentemente un potencial de crecimiento ilimitado. Las células madre incluyen aquellas que son capaces de diferenciarse en células de estirpe osteoblástica, una estirpe de células mesenquimatosas (por ejemplo, hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo, estroma, incluyendo estroma de soporte hematopoyético, y tendón). "Diferenciar" o "diferenciación", como se usa aquí, se refiere al proceso mediante el cual las células precursoras o progenitoras (es decir, células madre) se diferencian en tipos celulares específicos, por ejemplo osteoblastos. Las células diferenciadas se pueden identificar por sus patrones de expresión génica y de expresión de proteínas de la superficie celular. "Desdiferenciar" o "desdiferenciación", como se usa aquí, se refiere al procedimiento mediante el cual células comprometidas con la estirpe (por ejemplo, mioblastos u osteoblastos) invierten su compromiso con la estirpe y se convierten en células precursoras o progenitoras (es decir, células madre multipotentes o pluripotentes). Las células desdiferenciadas se pueden identificar, por ejemplo, mediante la pérdida de patrones de expresión génica y de expresión de proteínas de la superficie celular asociados con las células comprometidas con la estirpe.

50 Una "célula comprometida con la estirpe", como se usa aquí, se refiere a cualquier célula que se ha diferenciado o se diferenciará en un tipo celular particular o tipos celulares relacionados. Las células comprometidas con la estirpe incluyen, por ejemplo, osteoblastos, mioblastos, condrocitos, y adipocitos.

55 Las células madre totipotentes son capaces de crear todos los tipos celulares del cuerpo, incluyendo células placentarias. Las células madre fetales de etapa más temprana son consideradas totipotentes, así como el óvulo fertilizado. También tienen la capacidad para replicarse en números ilimitados sin perder su potencial.

Las células madre pluripotentes son capaces de crear células de las tres capas germinales, a saber, el ecto-, endo- y mesodermo. También tienen la capacidad para replicarse en números ilimitados sin perder su potencial.

60 Las células madre multipotentes son capaces de producir células de una o más capas germinales o varios tipos de tejidos. A menudo tienen una capacidad de autorrenovación ya limitada.

65 De este modo, las células madre son células capaces de diferenciarse en uno o más de un tipo celular, y tienen preferentemente un potencial de crecimiento ilimitado.

Las células progenitoras se pueden diferenciar en uno o más tipos celulares, pero tienen un potencial de crecimiento limitado.

5 Las células madre adultas son células madre derivadas de un organismo adulto, y pueden ser multipotentes o pluripotentes.

10 Las células madre embrionarias derivan de la masa interna de una blástula, y son pluripotentes. Las células madre embrionarias son únicas debido a que se pueden desarrollar en casi todos los tipos celulares, un atributo denominado pluripotencia. Pero para acceder a estas células, los investigadores deben destruir un embrión viable. En esta patente se describe una manera para crear células, con las características de células madre embrionarias, sin la necesidad de destruir embriones o sin el uso de células madre embrionarias.

15 Las células madre pluripotentes inducidas "IPS" son células madre pluripotentes derivadas artificialmente de células no pluripotentes, incluyendo células somáticas, células madre multipotentes adultas o células progenitoras. En principio, cada célula que contenga un núcleo se puede usar como una fuente de células IPS.

Formas de realización preferidas adicionales de la presente invención son la materia objeto de las subreivindicaciones.

20 El listado de secuencias muestra las secuencias de ADN de la técnica anterior que codifican las moléculas de secuencias nucleotídicas de ARNm usadas en la presente invención:

Tabla 1

SEC ID nº	gen	Número de acceso	longitud
1	hNanog	NM_U24865	2098
2	mNanog	NM_028016	1356
3	rNanog	NM_001100781	2358
4	hSox2	NM_003106	2518
5	mSox2	NM_011443	2457
6	rSox2	NM_001109181	2323
7	hOct4	NM_002701	1411
8	mOct4	NM_013633	1346
9	hKlf4	NM_004235	2949
10	mKlf4	NM_010637	3057
11	rKlf4	NM_053713	2393
12	hTERT	NM_198253	4018
13	mTert	ENSMUSG00000021611	4237
14	rTERT	NM_053423	3378
15	hRonin	NM_020457	1903
16	mRonin	NM_021513	1832

abreviaturas: h = humano; m = ratón; r = rata

25 Las designaciones marcadas "NM" y ENSMUSG se refieren a los números de acceso de NM(NCBI) y de ENSMUSG –como se dan en los sitios web públicamente disponibles <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y <http://www.ensembl.org>.

30 SEC ID No. 17 y 18 muestran la secuencia de ADN de cebadores usados para clonar el gen Nanog humano.

SEC ID No. 19 y 20 muestran la secuencia de ADN de cebadores usados para clonar el gen de Klf4 humano.

SEC ID No. 21 y 22 muestran la secuencia de ADN de cebadores usados para clonar el gen de Sox2 humano.

35 SEC ID No. 23 y 24 muestran la secuencia de ADN de cebadores usados para clonar el gen de Oct4 humano.

SEC ID No. 25 y 26 muestran la secuencia de ADN de cebadores usados para clonar el gen de Tert humano.

40 SEC ID No. 27 y 28 muestran la secuencia de ADN de cebadores usados para clonar el gen de GFP.

La presente invención se ilustrará ahora con más detalle por medio de un ejemplo y figuras.

Las figuras muestran:

45 Figura 1: Metilación del promotor de rex1, nanog y oct4 en fibroblastos humanos antes y después de la reprogramación (Figura 1A: Rex; Figura 1AB: Nanog; Figura 1C: Oct4). Las islas CpG se representan como cuadrados. Los cuadrados negros representan islas CpG metiladas, y los

cuadrados blancos representan islas CpG no metiladas. Todas las muestras son fibroblastos primarios de un donante masculino joven.

- 5  
 Figura 2: Fluorescencia y morfología tras electroporación amaxa (klf4, sox2, oct4): Fibroblastos primarios humanos se transfectaron con 0,6 µg/µl de ARNm por factor y 0,2 µg/µl de ARNm de GFP para visualizar la eficiencia de la transfección. La línea superior muestra fotos de fluorescencia, y la línea inferior muestra la morfología de las células después de 2 días.
- 10  
 Figura 3: Fluorescencia y morfología tras la transfección Eugene (klf4, sox2, oct4): Fibroblastos primarios humanos se transfectaron con 0,6 µg/µl de ARNm por factor y 0,2 µg/µl de ARNm de GFP para visualizar la eficiencia de la transfección. La línea superior muestra fotos de fluorescencia, y la línea inferior muestra la morfología de las células después de 7 días.
- 15  
 Figura 4: RT-PCR para Oct4: Escalera L: 20 pb (Fermentas); 1: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 1x; 2: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 6x; 3: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel; 4: factores de normoxia de hOct4 transfectados 1x; 5: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x; 6: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel; 7: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel + MG-132; 1a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 2a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 3a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 4a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 5a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 6a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 7a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 8: control negativo de Oct4.
- 20  
 Figura 5: RT-PCR para hOct4: Escalera L: 20 pb (Fermentas); 1: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 1x (fibroblastos humanos); 2: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 6x (fibroblastos humanos transfectados con ARNm); 3: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel (fibroblastos humanos transfectados con ARNm y cóctel reprogramador químico); 4: factores de normoxia de hOct transfectados 1x; 5: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x; 6: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel; 7: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel + MG-132; 8: control positivo de Oct4 (plásmido con hKlf4); 9: control negativo de hOct4 (agua).
- 25  
 Figura 6: RT-PCR para Oct4 y GAPDH: 1: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 1x; 2: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 6x; 3: factores de hipoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel químico; 4: factores de normoxia de hOct4 transfectados 1x; 5: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x; 6: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel químico; 7: factores de normoxia de hOct4 transfectados 6x + cóctel químico + MG-132; 1a ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 2a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 3a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 4a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 5a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 6a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 7a: ARN de hOct4 tras digestión con ADNasa; 8a: control negativo de Oct4; 1b: factores de hipoxia de GAPDH transfectados 1x; 2b: factores de hipoxia de GAPDH transfectados 6x; 3b: factores de hipoxia de GAPDH transfectados 6x + cóctel químico; 4b: factores de normoxia de GAPDH transfectados 1x; 5b: factores de normoxia de GAPDH transfectados 6x; 6b: factores de normoxia de GAPDH transfectados 6x + cóctel químico; 7b: factores de normoxia de GAPDH transfectados 6x + cóctel químico + MG-132; 8b: control negativo de GAPDH.
- 30  
 Figura 7: RT-PCR para hKlf4 y hNanog: Escalera L: 20 pb (Fermentas); 1a: factores de hipoxia de hKlf4 transfectados 1x (fibroblastos humanos); 2a: factores de hipoxia de hKlf4 transfectados 6x (fibroblastos humanos transfectados con ARNm); 3a: factores de hipoxia de hKlf4 transfectados 6x + cóctel (fibroblastos humanos transfectados con ARNm + cóctel reprogramador químico); 4a: factores de normoxia de hKlf4 transfectados 1x; 5a: factores de normoxia de hKlf4 transfectados 6x; 6a: factores de normoxia de hKlf4 transfectados 6x + cóctel; 7a: factores de normoxia de hKlf4 transfectados 6x + cóctel + MG-132; 8a: control positivo de hKlf4 (plásmido con hKlf4); 9a: control negativo de hKlf4 (agua); 1b: factores de hipoxia de hNanog transfectados 1x (fibroblastos humanos); 2b: factores de hipoxia de hNanog transfectados 6x (fibroblastos humanos transfectados con ARNm); 3b: factores de hipoxia de hNanog transfectados 6x + cóctel (fibroblastos humanos transfectados con ARNm + cóctel reprogramador químico); 4b: factores de normoxia de hNanog transfectados 1x; 5b: factores de normoxia de hNanog transfectados 6x; 6b: factores de normoxia de hNanog transfectados 6x + cóctel; 7a: factores de normoxia de hNanog transfectados 6x + cóctel + MG-132; 8b: control positivo de hNanog (plásmido con hNanog); 9a: control negativo de hNanog (agua).
- 35  
 Figura 8: Resultados de RNA BioAnalyzer Analysis (Agilent Nano Chip; Agilent Technologies) para oct4, sox2, y klf4
- 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

**Ejemplo**

**1. Preparación de ARNm reprogramador**

5 **1. A) Preparación de plásmidos de expresión de ARNm**

Para la construcción de plásmidos que comprenden los genes diana en un vector con el promotor T7 para la transcripción *in vitro*, usando PCR, se diseñaron sitios de digestión antes del codón de iniciación y después del codón de parada para la clonación directa de los insertos génicos (véase la Tabla 1) en la dirección correcta en el vector pCR@II-Vector (Invitrogen).

Los cebadores usados se dan en la Tabla 2.

Tabla 2

Nombre del gen	Nuevos sitios de digestión para enzimas de restricción	Secuencia del cebador 5'-3'	Tamaño del producto
Nanog_humano	XbaI y NotI	SEC ID nº 17	918 pb
Nanog_humano	SpeI y ClaI	SEC ID nº 18	
Klf4_humano	XbaI y NotI	SEC ID nº 19	637 pb
Klf4_humano	HindIII y ClaI	SEC ID nº 20	
Sox2_humano	XbaI y BamHI	SEC ID nº 21	996 pb
Sox2_humano	HindIII y ClaI	SEC ID nº 22	
Oct4_humano	XbaI y NotI	SEC ID nº 23	1100 pb
Oct4_humano	BamHI y ClaI	SEC ID nº 24	
Tert_humano	XbaI y NotI	SEC ID nº 25	783 pb
Tert_humano	HindIII y ClaI	SEC ID nº 26	
GFP	XbaI y NotI	SEC ID nº 27	724 pb
GFP	HindIII y ClaI	SEC ID nº 28	

Una PCR para obtener los sitios de digestión deseados se llevó a cabo con la Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen).

Preparación de la reacción de PCR en hielo:

- 5 µl Tampón de PCR 10x
- 1 µl Mezcla de dNTP 10 mM, 0,2 mM cada uno
- 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- 1 µl Mezcla de cebadores (10 µM cada una), 0,2 µM cada uno
- 1 µl ADN molde
- 0,2 µl Platinum® Taq DNA Polymerase 1,0 unidades
- hasta 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Programa de PCR Biometra Tprofessional):

95°C	2 min	
95°C	30 s	← 35 x
60°C	30 s	
70°C	30 s	
70°C	10 min	
4°C	para siempre	

Tras la electroforesis en un gel de agarosa con TAE al 1%, las bandas de ADN específicas (para su tamaño, véase la Tabla 2) se cortaron y el ADN se extrajo y se purificó con el Kit de Extracción en Gel QIAquick (de Qiagen).

Procedimiento:

- córtese el fragmento de ADN del gel de agarosa con un escalpelo
- pésese la rebanada de gel
- añádanse 3 volúmenes de Tampón QG a 1 volumen de gel (por ejemplo, añádanse 300 µl de Tampón QG a

## ES 2 561 949 T3

cada 100 mg de gel)

- incúbese a 50°C durante 10 min. (o hasta que la rebanada de gel se ha disuelto completamente)
- 5 - añádase 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mézclese
- colóquese una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recogida de 2 ml proporcionado
- 10 - para la unión a ADN, aplíquese la muestra a la columna QIAquick, y centrifúguese durante 1 min. a 13.000 rpm
- descártese la fracción no retenida
- 15 - añádase 0,5 ml de Tampón QG a la columna QIAquick y centrifúguese durante 1 min. a 13.000 rpm
- para el lavado, añádase 0,75 ml de Tampón PE a la columna QIAquick y centrifúguese durante 1 min. a 13.000 rpm
- 20 - descártese la fracción no retenida
- centrifúguese la columna QIAquick durante 1 min. adicional a 13.000 rpm
- colóquese la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml
- 25 - para eluir el ADN, añádase 50 µl de H<sub>2</sub>O al centro de la membrana QIAquick, déjese reposar la columna durante 1 min., y después centrifúguese durante 1 min. a 13.000 rpm

Digiérase el vector pCRII con las enzimas de restricción específicas para clonar el ADN diana

### 30 Estrategia para digerir el vector pCRII:

- digírase el vector pCRII con XbaI y SpeI para el gen diana Nanog humano
- 35 digírase el vector pCRII con XbaI y HindIII para el gen diana Klf4 humano
- digírase el vector pCRII con XbaI y BamHI para el gen diana Sox2 humano
- digírase el vector pCRII con XbaI y BamHI para el gen diana Oct4 humano
- 40 digírase el vector pCRII con XbaI y HindIII para el gen diana TERT humano
- digírase el vector pCRII con XbaI y HindIII para el gen diana GFP

### 45 Preparación de digestión en hielo:

- 45 - 5 µl de Tampón 10x
- ≥2 µg de plásmido
- 50 - 2 µl de enzima de restricción
- hasta 50 µl de agua con DEPC
- incúbese durante 1 h a 37°C (termobloque; Eppendorf)
- 55 - inactivar por calor durante 20 min. mediante la temperatura específica de la enzima

Ligación del ADN de los insertos del gen diana con el ADN del vector lineal mediante T4-DNA-Ligase (Fermentas)

### 60 Preparación de la ligación en hielo:

- 50-400 ng de ADN de vector
- 65 - 50-400 ng de ADN de inserto

## ES 2 561 949 T3

- 2 µl de Tampón 10x
- 0,2 µl (1u) de T4-DNA Ligase
- 5 - hasta 20 µl de agua con DEPC
- sométase a vórtice el tubo y centrifúguese en una microcentrifugadora durante 3-5 segundos
- incúbese a temperatura ambiente durante 1 h
- 10 - inactívese con calor durante 20 min.

### 1. B) Transformación de los plásmidos con bacterias DH5α químicamente competentes

- 15 - añádase 1 µl de los plásmidos a 10 µl de bacterias DH5α químicamente competentes
- incúbese durante 30 min. en hielo
- sométase a choque térmico a 42°C durante 45 s
- 20 - añádanse 250 µl de medio SOC a las bacterias
- incúbese a 37°C durante 1 h con agitación
- 25 - siémbrese la disolución bacteriana en una placa de agarosa con kanamicina y LB, e incúbese la placa durante 12 horas en una incubadora a 37°C
- recójase una colonia de la bacteria y colóquese la colonia en 5 ml de medio LB, e incúbese la disolución durante 12 horas en una incubadora de bacterias con agitación
- 30

### 1. C) Purificación de ADN plasmídico con NucleoSpin® Plasmid -KIT (Machery&Nagel)

- 5 ml de un cultivo LB de E. coli saturado, células peletizadas en una microcentrífuga de mesa estándar durante 30 s a 11.000 x g
- 35 - deséchese el sobrenadante
- para la lisis celular, añádanse 250 µl de Tampón A1. Resuspéndase el pelete celular completamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo
- 40 - añádanse 250 µl de Tampón A2
- mézclese suavemente invirtiendo el tubo 10 veces, e incúbese a temperatura ambiente durante hasta 5 min.
- 45 - añádanse 300 µl de tampón A3. Mézclese a conciencia invirtiendo el tubo 10 veces
- centrifúguese durante 5 min. a 11.000 x g a temperatura ambiente
- colóquese una columna de plásmido NucleoSpin® en un tubo de recogida (2 ml) y cárguese 750 µl del sobrenadante en la columna
- 50 - centrifúguese durante 1 min. a 11.000 x g
- deséchese la fracción no retenida, y colóquese la columna de plásmido NucleoSpin® nuevamente en el tubo de recogida (2 ml)
- 55 - para lavar la membrana con ADN: añádanse 600 µl de tampón A4 (suplementado con etanol)
- centrifúguese durante 1 min. a 11.000 x g
- 60 - deséchese la fracción no retenida, y colóquese la columna de plásmido NucleoSpin® nuevamente en el tubo de recogida (2 ml)
- membrana de sílice seca: centrifúguese durante 2 min. a 11.000 x g y deséchese el tubo de recogida (2 ml)
- 65

## ES 2 561 949 T3

- elución del ADN: colóquese la columna de plásmido NucleoSpin® en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y añádanse 50 µl de H<sub>2</sub>O e incúbese durante 1 min. a temperatura ambiente
- centrifúguese durante 1 min. a 11.000 x g
- mídase la concentración de ADN con el NanoDrop
- almacénese el ADN a -20°C

5

### 10 1. D) Linealización de los plásmidos pCRII-hoct4, pCRII-hSox2, pCRII-hKlf4 para la transcripción *in vitro*

- digiérase pCRII-hoct4 con BamHI
- digiérase pCRII-hSox2 con HindIII
- digiérase pCRII-hKlf4 con HindIII

15

#### Preparación de la digestión en hielo:

- 5 µl de Tampón 10x
- 2 µg de plásmido
- 2 µl de enzima de restricción
- hasta 50 µl de agua con DEPC
- incúbese durante 1 h a 37°C (termobloque; Eppendorf)
- inactivar por calor durante 20 min. mediante la temperatura específica de la enzima
- inactivar con calor ambas enzimas durante 20 min. a 80°C

20

25

30

### 35 1. E) Purificación de los plásmidos pCRII-hoct4, pCRII-hSox2, pCRII-hKlf4 linealizados con el Kit de Purificación de PCR QIAquick (de Qiagen)

- añádanse 5 volúmenes de Tampón PB a 1 volumen de la muestra de digestión, y mézclese
- colóquese una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recogida de 2 ml proporcionado
- para la unión a ADN, aplíquese la muestra a la columna QIAquick y centrifúguese durante 60 s
- deséchese la fracción no retenida
- colóquese la columna QIAquick nuevamente en el mismo tubo
- para el lavado, añádanse 0,75 ml de Tampón PE a la columna QIAquick y centrifúguese durante 60 s
- deséchese la fracción no retenida, y colóquese la columna QIAquick nuevamente en el mismo tubo
- para secar la membrana, centrifúguese la columna durante 1 min. adicional
- colóquese la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml
- para eluir el ADN, añádanse 10 µl de H<sub>2</sub>O al centro de la membrana QIAquick, déjese reposar la columna durante 1 min., y centrifúguese la columna durante 1 min.
- mídase la concentración de ADN con el NanoDrop
- almacénese el ADN a -20°C

40

45

50

55

60

### 65 1. F) Transcripción *in vitro* de los plásmidos pCRII-hoct4, pCRII-hSox2, pCRII-hKlf4 linealizados con el Kit de Transcripción de ARN encaperuzado de alto rendimiento mMessage mMachine (de Ambion) y añádase una cola poli(A) a los transcritos de ARN (Kit de Adición de Cola de Poly(A) de Ambion)

## ES 2 561 949 T3

### Preparación de la transcripción *in vitro* (reacción mMessage mMachine):

- a 20 µl de agua libre de nucleasas
- 5 - 10 µl de NTP/CAP 2x
- 2 µl de tampón de reacción 10x
- 10 - 1 µg de plásmido molde lineal
- 2 µl de mezcla de enzimas
- pipetéese la mezcla suavemente hacia arriba y hacia abajo
- 15 - centrifúguese brevemente para recoger la mezcla de reacción en la parte inferior del tubo
- incúbese durante 2 h a 37°C
- añádase 1 µl de TURBO DNase al ARNm y mézclese bien
- 20 - incúbese a 37°C durante 15 min.
- directamente tras la reacción tratada con ADNasa, añádase la cola de poli(A) al ARNm

### 25 Preparación para la reacción de la cola de poli(A)

- 20 µl de reacción mMMESSAGE mMACHINE
- 30 - 36 µl de agua libre de nucleasas
- 20 µl de tampón E-PAP 5x
- 10 µl de MnCl<sub>2</sub> 25 mM
- 35 - 10 µl de ATP mM
- 4 µl de E-PAP
- mézclese suavemente
- 40 - incúbese a 37°C durante 1 h
- colóquese la reacción en hielo
- 45 - precipitación con cloruro de litio del ARNm con cola de poli(A):
- añádanse 30 µl de disolución de precipitación de LiCl
- mézclese a conciencia
- 50 - enfríese durante 30 min. a -20°C
- centrifúguese a 4°C durante 15 min. a velocidad máxima para peletizar el ARN
- 55 - elimínese el sobrenadante
- lávese el pelete una vez con 1 ml de etanol al 70%
- centrifúguese a 4°C durante 15 min. a velocidad máxima para peletizar el ARN
- 60 - elimínese el etanol al 70%
- séquese al aire el pelete
- 65 - disuélvase el pelete de ARN con 30-50 µl de agua libre de nucleasas



- la concentración del ARN se mide con el NanoDrop
- la calidad del ARN se mide con el nanochip de Agilent

5

## **2. Preparación de células diana**

### 2. A) Preparación de MSCs de ratón y de rata

- 10 - sacrifíquese la rata o el ratón con gasificación mediante CO<sub>2</sub>
- rocíense las ratas y los ratones con etanol al 70% para matar las bacterias y las esporas fúngicas
- 15 - elimínese el pelo de la piel
- elimínense las extremidades posteriores limpiamente en la articulación de la cadera
- en condiciones estériles, retírese todo el tejido blando y sepárense los huesos
- 20 - retírense las placas de crecimiento tanto del fémur como de la tibia
- insértense orificios con una aguja en los huesos en ambos extremos
- 25 - colóquense los huesos en tubos eppendorf (para ratones) o en tubos falcon (para ratas), y centrifúguense a 2000 rpm durante 1 min. (toda la médula ósea se depositará en la parte inferior del tubo que se aloja en los espaciadores); retírense los huesos y el espaciador
- resuspéndase la médula en 0,5 ml de medio (DMEM con bajo contenido de glucosa; 10% de FCS; 1% de Pen/Estrep)
- 30 - disemínese la médula de una pata de una rata en 1 matraz T-75 con 12 ml de medio
- disemínese la médula de las dos patas de un ratón en 1 cápsula de Petri de 10 cm con 12 ml de medio

### 2. B) Preparación de MSC humana

- 35 - obténgase un aspirado de médula ósea
- 40 - resuspéndase en DMEM (bajo contenido de glucosa, 10% de FCS)
- siémbrese en un matraz de cultivo tisular
- hágase crecer durante 5 días y después cámbiese el medio
- 45 - después cámbiese el medio dos veces a la semana
- cultívese el matraz de cultivo tisular hasta 80% de confluencia, y subcultívese hasta que sea necesario

### 2. C) Preparación de fibroblastos de ratón y de rata

- 50 - córtese la cola
- aféitese la cola con un escalpelo
- 55 - rocíese la cola con etanol al 70% para matar las bacterias y esporas fúngicas
- retírese la piel de la cola
- colóquese la piel en una cápsula de Petri de 10 cm
- 60 - en condiciones estériles, córtese la piel en trozos pequeños (5 x 5 mm)
- digiéransen los trozos de piel con 0,05% de tripsina EDTA durante 20 min. en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C
- 65 - lávese la tripsina de las cápsulas con piel con medio (DMEM con alto contenido en glucosa, 10% de FCS, 1% de Pen/Estrep), elimínese el medio y lávese nuevamente durante 3-4 veces

- incúbense entonces los trozos de piel en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C y cámbiese el medio cada día; después de 1 semana, los fibroblastos crecen

5 **2. D) Preparación de fibroblastos humanos**

- colóquese prepucio en cápsula de Petri
- lávese dos veces con PBS
- 10 - elimínese la grasa
- lávese con PBS una vez
- 15 - córtese la piel en pequeños trozos (2 mm)
- añádanse 10 ml de dispasa (2 U/ml)
- incúbese a 4°C durante 16-18 h
- 20 - deséchese la disolución de dispasa
- añádanse 5 ml de PBS
- 25 - sepárense la dermis y la epidermis
- transfírase la dermis a una nueva cápsula y añádanse 10 ml de colagenasa (500 U/ml)
- obténganse trozos muy pequeños
- 30 - transfíranse los trozos a un tubo falcon de 50 ml con disolución, e incúbese durante 45 min. (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>)
- centrifúguese a 1000 rpm durante 5 min.
- 35 - deséchese el sobrenadante y resuspéndase el pelete en DMEM (10% de FCS)
- centrifúguese nuevamente
- 40 - resuspéndase el pelete en 2 ml de DMEM (10% de FCS) y transfírase a un falcon de cultivo celular T75
- expándanse las células hasta el uso

45 **3. Transfección de ARNm**

**3. A) Transfección de ARNm de fibroblastos humanos, MSC humana, fibroblastos de rata, MSC de rata, fibroblastos de ratón y MSC de ratón con AMAXA, FugeneHD, Lipofectamine™ LTX Reagent y PLUS™ Reagent**

50 **1) Transfección de AMAXA con el kit Nucleofector® de fibroblastos dérmicos humanos (placa de 6 pocillos):**

**Preparación para una electroporación en cubeta Amaxa certificada:**

- ARNm de oct4, sox2 y klf4 en total de 2 µg
- 55 - 4 x 10<sup>5</sup> células
- 100 µl de disolución de Nucleofector®
- escójase el programa U-023 por la máquina de electroporación Amaxa
- 60 - resuspéndanse las células en la cubeta con 500 µl de medio de fibroblastos o de MSC
- proporcionense 5 ml de medio de fibroblastos o de MSC con o sin cóctel en cada pocillo de una placa de 6 pocillos
- 65 - siémbrense 100.000 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos

Composición del cóctel:

- 5 - Resveratrol 0,05 mM
- selenio 0,1  $\mu$ M
- EGCG (galato de (-)-Epigallocatequina) 0,01  $\mu$ M
- 10 - TSA (Tricostatina A) 0,015  $\mu$ M
- Reversina 1  $\mu$ M
- 15 - VPA (ácido libre de ácido 2-propilpentanoico) 6  $\mu$ M
- 5'Aza (5-Aza-2'-desoxicitidina) 1  $\mu$ M
- en el día 1: el cóctel es con 5'Aza y sin TSA; después de 48 horas, 5'Aza se sustituye por TSA
- 20 - cada 72 horas nueva transfección con el reactivo de transfección FuGENE® HD (Roche)

2) Reactivo de transfección FuGENE® HD (Roche)

- 25 - antes de la transfección: cámbiese a medio libre de antibióticos

Procedimiento de transfección

- 30 - dilúyase ARNm con medio libre de suero y libre de antibióticos hasta una concentración de 2  $\mu$ g de ARNm a un volumen de 100  $\mu$ l para cada pocillo (placa de 6 pocillos)
- pipetéense 8  $\mu$ l de reactivo de transfección FuGENE® HD (relación: 8:2 de reactivo de transfección a ARNm) directamente en el medio, y pipetéese hacia arriba y hacia abajo
- 35 - Incúbese el complejo de reactivo de transfección:ARNm durante 15 minutos a temperatura ambiente
- añádase el complejo de transfección a las células gota a gota
- háganse girar los pocillos para asegurar la distribución a lo largo de toda la superficie de la placa
- 40 - después de 4-6 horas, cámbiese a medio (que contiene 10% de FCS, 1% de Pen/Estrep) con o sin cóctel
- incúbese una placa de 6 pocillos transfectada a una condición de 21% de O<sub>2</sub> (normoxia), e incúbese una segunda placa a una condición de 1% de O<sub>2</sub> (hipoxia) en una incubadora a 37°C

**3) Transfección alternativa con Lipofectamine™ LTX Reagent o PLUS™ Reagent (Invitrogen)**

a) Reactivo de transfección FuGENE® HD (Roche)

- 50 - siémbrense 7000 células en 500  $\mu$ l de medio por pocillo de una placa de 24 pocillos
- incúbese toda la noche
- para la transfección: cámbiese a medio libre de antibióticos
- 55 - dilúyanse 0,5  $\mu$ g de ARNm en 25  $\mu$ l de medio libre de suero y libre de antibióticos para cada pocillo (placa de 24 pocillos)
- pipetéense 2  $\mu$ l del reactivo de transfección FuGENE® HD (relación: 8:2 de reactivo de transfección a ARNm) directamente en el medio
- 60 - pipetéese hacia arriba y hacia abajo
- incúbese el complejo de reactivo de transfección:ARNm durante 15 minutos a temperatura ambiente
- 65 - añádase el complejo de transfección a las células gota a gota

- háganse girar los pocillos para asegurar la distribución a largo de toda la superficie de la placa
- después de 4-6 horas, cámbiese a medio (que contiene 10% de FCS, 1% de Pen/Estrep) con o sin cóctel

5 **b) Lipofectamine™ LTX Reagent and PLUS™ Reagent (Invitrogen)**

- siémbrense 7000 células en 500 µl de medio por pocillo de una placa de 24 pocillos
- 10 - incúbese durante toda la noche
- antes de la transfección: cámbiese a medio libre de antibióticos
- 15 - dilúyanse 0,5 µg de ARNm en 100 µl de medio libre de suero y libre de antibióticos para cada pocillo (placa de 24 pocillos)
- mézclese suavemente
- 20 - mézclese PLUS™ Reagent suavemente antes del uso
- añádase 0,5 µl de PLUS™ Reagent en la mezcla del medio de ARNm, mézclese suavemente e incúbese 5 min. a temperatura ambiente
- mézclese Lipofectamine™ LTX Reagent suavemente antes del uso
- 25 - añádase 1,25 µl directamente al ARNm diluido; mézclese suavemente
- incúbese durante 30 min. a temperatura ambiente
- 30 - añádase los 100 µl del complejo de ARNm-Lipofectamine™ LTX Reagent al pocillo
- mézclese suavemente moviendo la placa hacia delante y hacia atrás
- incúbense las células a 37°C en la incubadora de CO2 durante 4-6 horas
- 35 - cámbiese a medio con o sin cóctel
- durante la optimización de la eficiencia de la transfección → increméntese la cantidad de la concentración de ARNm a 1 µg por pocillo (placa de 24 pocillos)
- 40 - cada 72 h repítase la transfección con FuGENE® HD o Lipofectamine™ LTX Reagent y PLUS™ Reagent

45 **4. Tratamiento con inhibidor de proteasas (MG132) para incrementar la semivida de las proteínas producidas por el ARNm transfectado:**

- 48 h después de la transfección: trátense dos pocillos en cada placa con MG-132 (10 µM/pocillo) con y sin cóctel durante 6 h, y cámbiese después el medio

50 **5. Resultados**

Análisis de la cantidad de ARNm (por PCR) de los genes transfectados o internos (oct4, nanog, hTERT, sox2, klf4) y análisis del promotor (de nanog, sox, oct4)

55 Los resultados de la reprogramación se exponen en las figuras 1 a 8.

**6. Herramientas y métodos**

6.1 Aislamiento de ARN con TriFaSt™ (Peglab)

- 60 - 1 ml de Trifast por 10 cm<sup>2</sup> del área de la cápsula de cultivo
- las muestras se pueden almacenar durante un tiempo prolongado a -80°C, o se pueden usar directamente
- las muestras se deberían de mantener durante 5 minutos a temperatura ambiente

65

## ES 2 561 949 T3

- añádanse 0,2 ml de cloroformo
- agítense vigorosamente las muestras de forma manual durante 15 segundos
- 5 - incúbese durante 3 minutos a temperatura ambiente
- centrifúguese a 12.000 x g
- 10 - transfírase la fase acuosa con ARN a un nuevo tubo (guárdese la interfase y la fase orgánica a 4°C para el aislamiento de ADN y proteínas)
- precipítese el ARN con 0,5 ml de isopropanol por 1 ml de Tri-Fast™ usado para la homogeneización inicial
- incúbese en hielo durante 15 min.
- 15 - centrifúguese durante 10 minutos a 4°C a 12.000 x g
- elimínese el sobrenadante
- 20 - lávese dos veces el pelete de ARN con etanol al 75% mediante vórtice
- centrifúguese subsiguientemente durante 8 minutos a 7.500 x g (4°C)
- elimínese el exceso de isopropanol del pelete de ARN mediante secado al aire
- 25 - resuspéndase el pelete de ARN en agua libre de ARNasa (DEPC-H<sub>2</sub>O) → 30 µl-50 µl
- disuélvase el pelete de ARN haciendo pasar la disolución a través de una punta de pipeta varias veces
- 30 - incúbese la disolución durante 10 min. a 55°C
- pipetéese hacia arriba y hacia abajo
- el calentamiento de la muestra a 55-60°C puede ayudar a disolver el pelete
- 35 - mídase la concentración de ARN → NanoDrop
- almacénense las muestras a -80°C durante 2-3 meses
- 40 **6.2 Aislamiento del ADN**
- elimínese cualquier fase acuosa que quede tras la eliminación del ARN
- hágase precipitar el ADN con 0,3 ml de etanol al 100% por ml de Tri-Fast™
- 45 - mézclese bien por inversión
- almacénense las muestras a temperatura ambiente durante 2-3 minutos
- 50 - centrifúguese a 2.000 x g a 4°C durante 5 minutos
- muévase el sobrenadante del ADN (almacénese a 4°C para el aislamiento de proteína)
- lávese el pelete de ADN dos veces con 1 ml de citrato de sodio 0,1 M en etanol al 10%
- 55 - en cada etapa de lavado, manténgase el ADN en citrato de sodio 0,1 M/etanol al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente (con mezclado periódico)
- centrifúguese a 4°C durante 5 minutos a 2.000 x g
- 60 - después de estos dos lavados, suspéndase el pelete de ADN en 2 ml de etanol al 75%
- manténgase a temperatura ambiente con mezclado periódico durante 15 minutos
- 65 - centrifúguese a 2.000 x g durante 5 minutos a 4°C

## ES 2 561 949 T3

- séquese brevemente el pelete de ADN durante 5-10 minutos a vacío, y
  - disuélvase en NaOH 8 mM haciendo pasar lentamente el pelete a través de una pipeta de calibre ancho
- 5
- ajústese la concentración final de ADN a 0,2-0,3 µg/µl con NaOH 8 mM

### 6.3 Tratamiento del ARN con DNase I (Fermentas):

- 10
- 1 µg de ARN
  - 1 µl de tampón de reacción 10x con MgCl<sub>2</sub>
  - 1 µl (1 u) de ADNasa
- 15
- hasta 9 µl de DEPC-H<sub>2</sub>O
  - incúbese a 37°C durante 30 minutos
  - inactivación de DNase 1: añádase 1 µl de EDTA 25 mM e incúbese a 65°C durante 10 min.
- 20

### 6.4 RT-PCR con transcriptasa inversa SuperScript™ III (Invitrogen)

#### Condición de reacción:

- 25
- 1 µl de cebador oligo(dT)<sub>20</sub>
  - 1 µg de ARN
- 30
- 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM (10 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
  - hasta 13 µl de DEPC-H<sub>2</sub>O
  - caliéntese la mezcla hasta 65°C durante 5 minutos
- 35
- incúbese en hielo durante 1 min.

#### Añádanse:

- 40
- 4 µl de Tampón de Primera Hebra 5x
  - 1 µl de DTT 0,1 M
  - 1 µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl)
- 45
- mézclese pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo
  - incúbese a 50°C durante 60 min.
  - inactívese la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos
- 50
- almacénese el ADNc a -20°C

### 6.5 PCR de oct4 humana (control de los fibroblastos humanos):

- 55
- Secuencia de cebador: hoct4\_S: gaggatcacctgggatataca  
hoct4\_as: agatggtcgtttgctgaatac
- Tamaño de producto: 100 pb
- 60

### 6.6 PCR con Platinum Taq-Poymerase (Invitrogen)

#### Preparación de la reacción de PCR en hielo:

- 65
- 5 µl de Tampón de PCR 10x

- 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 0,2 mM cada uno
- 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- 1 µl de mezcla de cebadores (10 µM cada una), 0,2 µM cada uno
- 1 µl de ADN molde
- 0,2 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase 1,0 unidades
- hasta 50 µl de DEPC-H<sub>2</sub>O

Programa de PCR (Biometra Tprofessional):

95°C	2 min	
95°C	30 s	← 35 x
60°C	30 s	
70°C	30 s	
70°C	10 min	
4°C	para almacenamiento	

Control de PCR con gel de agarosa y TAE al 3% para electroforesis

6.7 Protocolo para producir células iPS

6.7.1 Matriz cualificada para hESC Matrigel™ de BD

- colóquese la caja de puntas esterilizadas y los tubos eppendorf toda la noche en un congelador a -20°C
- descongélese la botella de Matrigel en hielo en el refrigerador a 4°C toda la noche
- distribúyase Matrigel en alícuotas para hESC a su llegada, almacénese a -80°C, descongélese solamente una vez y no se vuelva a congelar para evitar la ruptura de los factores de crecimiento
- con fines de revestimiento, dilúyase Matrigel apropiadamente usando medio libre de suero (0,3 µg/µl para iPS, 1 µg/µl para hESC)
- añádanse 50 µl de dilución de Matrigel por cm<sup>2</sup> de superficie de crecimiento
- incúbese 60 min. a RT en condiciones estériles o toda la noche a 4°C
- empátese el Matrigel/medio restante
- medio: mTeSR1 (Stem Cell Technology)

La receta del revestimiento (0,3 µg/µl) depende del tipo celular que se use para generar iPS. Se recomienda revestir y no gelificar plásticos para cultivo de hESC usando 1 µg de Matrigel/µl. Úsense las placas inmediatamente o almacénese durante un máximo de 7 días a 4°C cubiertas con medio libre de suero en condiciones asépticas (cerradas herméticamente).

Las placas de Matrigel revestidas siempre se deberían de procesar, almacenar y usar exactamente de la misma manera para evitar variabilidades (principalmente a través de la ruptura de los factores de crecimiento). Al comienzo o para el establecimiento, es necesario valorar un volumen de revestimiento y una concentración (por ejemplo, 3 diluciones 0,3, 0,6, 1 µg/ul) que se adecuan lo mejor posible a su tipo de células específico.

6.7.2 Matriz de membrana de basamento de Matrigel™ de BD, reducida en factores de crecimiento (GFR)

- tómense alícuotas de Matrigel, tal como Matrigel cualificada para hESC
- descongélese el tubo toda la noche en hielo a 4°C

- dilúyase con 6 ml de medio basal frío, y mézclese bien
- añádase 1 ml por pocillo de placa de 6 pocillos
- incúbese la placa a temperatura ambiente durante una hora o toda la noche a 4°C
- la placa se puede usar ya sea inmediatamente o se puede almacenar a 4°C (la placa durará bien durante por lo menos una semana)
- elimínese el líquido en exceso y lávese una vez con medio basal
- componente de medio basal: D-MEM/F-12; 20% de KO Serum Replacer; 1% de aminoácidos no esenciales; L-glutamina 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM; bFGF 100 ng/ml
- úsense células de ratón y después añádase sobrenadante de LIF al medio basal

#### 6.7.3 Producción de sobrenadante de LIF

- cápsula de Petri revestida (145 mm) con 0,1% de gelatina (bovina tipo B, Sigma)
- siémbrense  $3 \times 10^{10}$  células alimentadoras SNL productoras de LIF en cada cápsula
- componente del medio: D-MEM rico en glucosa, 10% de FCS, 1% de Pen/Estrep; 1% de L-glutamina
- después de 24 horas, recójase el medio de la cápsula y fíltrese a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$
- distribúyase en alícuotas el medio que contiene LIF en alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  y almacénese a -20°C
- cámbiese el medio tras 24 horas o 48 horas

#### **Listado de secuencias**

- <110> Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V.
- <120> Reprogramación de células hacia un estado pluripotente
- <130> 201763 EP
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 2098
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*



<400> 1

attataaatc tagagactcc aggattttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60  
 gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat accttctctt ctggaggtec 120  
 ttttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taacctttt tccagtccac 180  
 ctcttaaatt ttttctctct ctctctctat actaacatga gtgtggatcc agcttgtecc 240  
 caagcttgc ctgctttga agcatccgac tgtaaagaat cttcacctat gcctgtgatt 300  
 tgtgggctg aagaaaacta tccatccttg caaatgtctt ctgctgagat gcctcacag 360  
 gagactgtct ctctctctcc tctctccatg gatctgetta ttcaggacag ccttgattct 420  
 tccaccagtc ccaaaggcaa acaaccact tctgcagaga agagtgtcgc aaaaaaggaa 480  
 gacaaggtec cggtaagaa acagaagacc agaactgtgt tctcttccac ccagctgtgt 540  
 gtactcaatg atagatttca gagacagaaa tacctcagcc tccagcagat gcaagaactc 600  
 tccaacatcc tgaacctcag ctacaaacag gtgaagacct ggttccagaa ccagagaatg 660  
 aatctaaga ggtggcagaa aaacaactgg ccgaagaata gcaatggtgt gacgcagaag 720  
 gcctcagcac ctacctacc cagcctttac tcttcttacc accagggatg cctgggtaac 780  
 ccgactggga accttccaat gtggagcaac cagacctgga acaattcaac ctggagcaac 840  
 cagaccaga acatccagtc ctggagcaac cactcctgga acactcagac ctgggtgcacc 900  
 caatcctgga acaatcaggc ctggaacagt ccttcttata actgtggaga ggaatctctg 960  
 cagtctgca tgcagttcca gccaaattct cctgccagt acttgaggc tgccttggaa 1020  
 gctgctggg aaggccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtattttag tactccaaa 1080  
 accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga 1140  
 gtgaaactga tattactcaa tttcagctg gacactggct gaatcctcc tctccctcc 1200  
 tccccctct cataggattt ttcttgttg gaaaccagct gttctggttt ccatgatgcc 1260  
 catccagtc atctcatgga ggggtggagta tggttggagc ctaatcagcg aggtttcttt 1320  
 ttttttttt tctctattgg atcttctctg agaaaatact ttttttttt ttttttttga 1380  
 aacggagtct tgctctgctg cccaggctgg agtgcagtgg cgcggtcttg gctcactgca 1440  
 agctccgtct cccgggttca cgcattctc ctgctcagc ctcccagca gctgggacta 1500  
 caggcgcctg ccacctgccc cggctaatat ttgtatttt tagtagagac ggggtttcac 1560  
 tgtgttagcc aggatggtct cgatctctg accttgtgat ccacctgct cggcctccct 1620  
 aacagctggg atttacagge gtgagccacc gcgccctgccc tagaaaagac attttaataa 1680  
 ccttggctgc cgtctctggc tatagataag tagatctaact actagtttgg atatcttag 1740  
 ggtttagaat ctaacctcaa gaataagaaa tacaagtaca aattggtgat gaagatgat 1800  
 tcttattgtt tgggattggg aggcttctct cattttttaa aaactattga ggtaaagggt 1860  
 taagtgtaa catacttaat tgatttctta ccgttttttg ctctgttttg ctatatcccc 1920  
 taatttgttg gttgtgctaa tctttgtaga aagaggcttc gtatttctg catcgtaatg 1980  
 acatgagtac tgctttagtt ggtttaagtt caaatgaatg aaacaactat ttttctttaa 2040  
 gttgatttca cctgatttc accgagtgtt tcaatgagta aatatacagc ttaacat 2098

5

<210> 2

<211> 1356

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 561 949 T3

<400> 2

tctatcgccct	tgagccgttg	gccttcagat	aggctgattt	ggttggtgtc	ttgctctttc	60
tgtgggaagg	ctgcggctca	cttcctcttg	acttcttgat	aattttgcat	tagacattta	120
actcttcttt	ctatgatctt	tcctctctaga	cactgagttt	tttggttgtt	gcctaaaacc	180
ttttcagaaa	tcccttcctc	cgccatcaca	ctgacatgag	tgtgggtctt	cctggtcccc	240
acagtttgcc	tagttctgag	gaagcatcga	attctgggaa	cgctcatca	atgcctgcag	300
tttttcatcc	cgagaactat	tcttgcttac	aagggtctgc	tactgagatg	ctctgcacag	360
aggctgectc	tcctcgccct	tcctctgaag	acctgcctct	tcaaggcagc	cctgattctt	420
ctaccagtcc	caaacaaaag	ctctcaagtc	ctgaggctga	caagggccct	gaggaggagg	480
agaacaagg	ccttgccagg	aagcagaaga	tgcggactgt	gttctctcag	gccagctgt	540
gtgcactcaa	ggacaggttt	cagaagcaga	agtacctcag	cctccagcag	atgcaagaac	600
tctctccat	tctgaacctg	agctataagc	aggttaagac	ctggtttcaa	aaccaaagga	660
tgaagtgcaa	gcggtggcag	aaaaaccagt	ggttgaagac	tagcaatggt	ctgattcaga	720
agggctcagc	accagtggag	tatcccgca	tccattgcag	ctatccccag	ggctatctgg	780
tgaacgcac	tggagcctt	tccatgtggg	gcagccagac	ttggaccaac	ccaacttggg	840
gcagccagac	ctggaccaac	ccaacttggg	acaaccagac	ctggaccaac	ccaacttggg	900
gcagccaggc	ctggaccgct	cagtcctgga	acggccagcc	ttggaatgct	gctccgctcc	960
ataacttcgg	ggaggacttt	ctgcagcctt	acgtacagtt	gcagcaaac	ttctctgcca	1020
gtgatttggg	ggtgaatttg	gaagccacta	gggaaagcca	tgcgcatttt	agcaceccac	1080
aagccttggg	attattcctg	aactactctg	tgactccacc	aggtgaaata	tgagacttac	1140
gcaacatctg	ggcttaaagt	cagggcaag	ccaggttcct	tcctctctcc	aaatattttc	1200
atattttttt	taaagattta	tttattcatt	atagttaagt	acactgtagc	tgtcttcaga	1260
cactccagaa	gagggcgta	gatcttgta	cgatgggttg	tgagccacca	tgtggttgc	1320
5	gggatttggg	ctcctgacct	tcggaagagc	agtcgg		1356

<210> 3

<211> 2358

<212> ADN

10 <213> *Rattus norvegicus*

ES 2 561 949 T3

<400> 3

tcagataggc tgatttcgag tctttctctt ttgtgggaag accgaggctc gcttcttttt	60
ggcttgttga ctcttttaca tctggacatt taactcttac ttttaagatc tttccctcta	120
gacactgagt tttaaagtct taactttttg gttgttaaaa actttttttt ttttaaagtc	180
ccttcccttg ccgttgggct gacatgagcg tggatctttc tggccccac agtctgccta	240
gttgtgagga agcatcgaac tctggggatt cctcgccgat gcctgccgtt catcttctg	300
aggaaaatta ttcttgctta caagtgtctg ctactgagat gctctgcaca gagactgect	360
ctcctccgcc ttctcttggg gacctacctc ttcaagatag ccctgattct tctagcaatc	420
ccaagctaaa gctgtctggt cccgaggctg acgagggccc tgagaagaaa gaagagaaca	480
aggctctcac caagaagcag aagatgcgga ctgtgttctc tcaggcccag ttgtgtgcac	540
tcaaggatag gtttcagagg caaagggtacc tcagcctcca gcagatgcaa gatctctcta	600
ccattctgaa cctgagctat aagcaggtga agacctggtt ccaaaaccaa agaatgaagt	660
gcaagaggtg gcagaaaaac caatggttga agactagcaa cggcctgact cagaagggt	720
cagcgcgggt ggagtatccc agcatccatt gcagctatc tcagggtat ctgatgaacg	780
cgtctgaaa ccttccagta tggggcagtc agacctggac caaccaact tggacaacc	840
agacctggac caaccaacc tggagcaacc agacctggac caaccaact tggagcaacc	900
aggcctggag cactcagtc tgggtgtactc aggcctggaa cagccagact tggaacgctg	960
ctccgctcca taacttcggg gaggactccc tgcagcctta tgtgccgttg cagcaaaact	1020
tctccgccag tgatttggag gcgaatttg aagccactag ggaaagccag gcgcatttta	1080
gtaccccgca agccttggaa ttgttctga actactccgt gaattctcca ggcgaaatat	1140
gaggtttaca caacaactgg gcttaaagtc agggcagggc cagggctcagc tttcttctt	1200

cttccaaaga gttttatatt gttcttattt tttttttaat tattattttg tttttgttt 1260  
 ttgtttatca aggtagggtt tctctgtgtg gttctggctg tccttgaatt cactctgtag 1320  
 accaggtctg cctctactc agagatctgc ctacttttgc ctcttgaagg ctagggttaa 1380  
 agattttcta aagattttca tagtttttat ttttttaatt attatctgtt ttcattgtttg 1440  
 tgtttttttg tttttgtttt gttttgtttt ttgtttatca agatagggtt tctctgtgtg 1500  
 gctctagtag tccccgaaac tggctctgta gaccaggtctg tccttgaact cagaaatctg 1560  
 cctttgcctc cggactgcgg ggactaaagg cagtatataa ccacctggca cattgttttt 1620  
 atttttatc ttttgggtgc agaaagcaaa cctaggactt tgagctgggc acccactcaa 1680  
 ccactgagct ctgtttgcga cccccgtgtt ggctgcattt gtctgagctg ggtaacttgt 1740  
 ctttttttcc gtgttaacga tgggcttcgg agacagtga ctatacactc tatectccc 1800  
 caggtctcac acaccaccc tactccatc caaccaggc ttgtctgtct ttttttttt 1860  
 tggagctgag gactgaacct agggccttgc gctttcttag caagcgtctt acctctgagc 1920  
 taaatcccca acccttgtct gtctttttag aagcttgggt cttgggtgtg actgtgtatc 1980  
 gttttgaggg gtgaggttta aaagtataca aattataaag attcatgcag atatgggtggc 2040  
 tcctctcaag gacgagacag aaggatcacc agtttgaggc tatctcagat ataaaataag 2100  
 ttcaagacca gcctgtacta tgtctaaata gtaagacagc atctcaacaa aataataaaa 2160  
 ctaaggtaag gagataaaaag taaagtetca acaaaataca agatctcgcc tgttacagtt 2220  
 ctttgatttc cctcgtgtct ttgcagtcc gccaaaggc ttctatgtta atatctgtag 2280  
 aaagatgttt atatttgact gtaccatgat aaaccagtgc cagctggact agtttaata 2340  
 aaacactaat tttatcca 2358

<210> 4  
 <211> 2518  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4  
 ctattaactt gttcaaaaaa gtatcaggag ttgtcaaggc agagaagaga gtgtttgcaa 60  
 aagggggaaa gtatgtttgct gcctctttaa gactaggact gagagaaga agaggagaga 120  
 gaaagaaagg gagagaagtt tgagccccag gcttaagcct ttccaaaaa taataatac 180  
 aatcatcggc ggcgccagga tcggccagag gaggagggaa gcgctttttt tgatcctgat 240  
 tccagtttgc ctctctcttt ttttccccca aattattctt egcctgattt tctcteggga 300  
 gccctgcgt cccgacacc cgcgccgect cccctcctc tctcccccg ccgcgggcc 360  
 ccccaaaatc ccggccgggc cgagggctgg cggccgccgg cgggccccgc ccgcccacag 420  
 cgccccatg tacaacatga tggagacgga gctgaagccg cggggccccg agcaaaacttc 480

10

ES 2 561 949 T3

ggggggcggc ggcggcaact ccaccgcggc ggcggccggc ggcaaccaga aaaacagccc	540
ggaccgcgtc aagcggccca tgaatgcctt catggtgtgg tcccgcggc agcggcgcaa	600
gatggcccag gagaacccca agatgcacaa ctccggagatc agcaagcgcc tgggcgcccga	660
gtgaaaactt ttgtcggaga cggagaagcg gccgttcate gacgaggcta agcggctgcg	720
agcgtgac atgaaggagc acccggatta taaataccgg ccccgccgga aaaccaagac	780
gctcatgaag aaggataagt acacgctgce eggcgggctg ctggcccccg gcggcaatag	840
catggcgagc ggggtcgggg tgggcgcccg cctggcgcg ggcgtaacc agcgcattga	900
cagttacgcg cacatgaacg gctggagcaa cggcagctac agcatgatgc aggaccagct	960
gggtacccc cagcaccg gcctcaatgc gcacggcgca gcgcagatgc agcccattga	1020
ccgctacgac gtgagcgccc tgcagtacaa ctccatgacc agctcgaga cctacatgaa	1080
eggctcgccc acctacagca tgtcctactc gcagcagggc acccctggca tggctcttgg	1140
ctccatgggt tcggtggtca agtccgaggc cagctccagc ccccctgtgg ctacctctc	1200
ctcccactcc agggcgccct gccagggcgg ggacctccgg gacatgatca gcattgatct	1260
ccccggcgcc gaggtgcccg aaccggccgc cccagcaga ettcacatgt cccagcacta	1320
ccagagcggc ccggtgcccg gcacggccat taacggcaca ctgcccctc cacacatgtg	1380
agggcgggac agcgaactgg aggggggaga aattttcaaa gaaaaacgag ggaaatggga	1440
ggggtgcaaa agaggagagt aagaacagc atggagaaaa cccggtagc tcaaaaagaa	1500
aaaggaaaa aaaaaatccc atcaaccaca gcaaatgaca gctgcaaaag agaaccacaa	1560
tcccatccc actcacgcaa aaaccggat gccgacaaga aaacttttat gagagagatc	1620
ctggacttct ttttggggga ctatttttgt acagagaaaa cctggggagg gtggggaggg	1680
cgggggaatg gacctgtat agatctggag gaaagaaagc tacgaaaaac tttttaaag	1740
ttctagtggt acggtaggag ctttgcagga agtttgcaaa agtctttacc aataatattt	1800
agagctagtc tccaagcagc gaaaaaatg ttttaatat tgcaagcaac ttttgtacag	1860
tatttatcga gataaacatg gcaatcaaaa tgtccattgt ttataagctg agaatttgc	1920
aatatttttc aaggagaggc ttcttctga attttgatc tgcagctgaa atttaggaca	1980
gttgcacacg tgaaaagaag aaattattc aaatttgac attttaattg tttaaaaatt	2040
gtacaaaagg aaaaaattag aataagtact ggcyaacct ctctgtggtc ttgtttaaaa	2100
agggcaaaag ttttagactg tactaaattt tataacttac tgttaaaagc aaaaatggcc	2160
atgcaggttg acaccgttgg taatttataa tagcttttgt tcgatcccaa ctttccattt	2220
tgttcagata aaaaaacca tgaattact gtgttgaaa tattttctta tggttttaa	2280
tatttctgta aatttattgt gatattttaa ggttttcccc ctttatttt ccgtagttgt	2340
attttaaaag attcggctct gtattattg aatcagctc ccgagaatcc atgtatatat	2400
ttgaactaat atcatcctta taacaggtac attttcaact taagttttta ctccattatg	2460
cacagtttga gataaataaa tttttgaaat atggacactg aaaaaaaaa aaaaaaaa	2518

- 5 <210> 5
- <211> 2457
- <212> ADN
- <213> *Mus musculus*

ES 2 561 949 T3

<400> 5

ctattaactt gttcaaaaaa gtatcaggag ttgtcaaggc agagaagaga gtgtttgcaa	60
aaagggaaaa gtactttgct gcctctttaa gactagggct gggagaaaaga agaggagaga	120
gaaagaaag agagaagttt ggagcccag gcttaagcct tcccaaaaac taatcacaac	180
aatcgcggcg gcccgaggag gagagcgcct gttttttcat cccaattgca cttegccegt	240
ctcagctcc gcttcccccc aactattctc cgccagatct ccgcgcaggg ccgtgcacgc	300
cgaggcccc gcccgcgcc cctgcatccc ggccccagag cgcggcccc acagtcccgg	360
ccgggcccag ggttgcgggc cgcggcggg ccgcgcccgc ccagcggccg catgtataac	420
atgatggaga cggagctgaa gccgccgggc ccgcagcaag cttcgggggg cggcggcgga	480
ggaggaacg ccacggcggc ggcgaccggc ggcaaccaga agaacagccc ggaccgcgctc	540
aagaggccca tgaacgcctt catggtatgg tccccggggc agcggcgtaa gatggcccag	600
gagaacccca agatgcacaa ctccggagatc agcaagcgc tgggcgcgga gtggaaactt	660
ttgtccgaga ccgagaagcg gccgttcate gacgaggcca agcggctgcg cgtctgcac	720
atgaaggagc acccggatta taaataccgg ccgcggcgga aaaccaagac gctcatgaag	780
aaggataagt acacgcttcc cggaggcttg ctggcccccg gcgggaacag catggcgagc	840
ggggttgggg tgggcgcccg cctgggtgcg ggcgtgaacc agcgcattga cagctacgcg	900
cacatgaacg gctggagcaa cggcagctac agcatgatgc aggagcagct gggctacccg	960
cagcacccgg gcctcaacgc tcacggcgcg gcacagatgc aaccgatgca ccgctacgac	1020
gtcagcggcc tgcagtacaa ctccatgacc agctcgcaga cctacatgaa cggctcggcc	1080
acctacagca tgctctactc gcagcagggc acccccggta tggcgctggg ctccatgggc	1140
tctgtggtca agtccgaggc cagetccagc cccccgtgg ttacctctc ctcccactec	1200
agggcgccct gccaggcccg ggacctccg gacatgatca gcatgtacct ccccggcgcc	1260
gaggtgcccg agcccgctgc gcccagtaga ctgcacatgg cccagcacta ccagagcggc	1320
ccggtgcccg gcacggccat taacggcaca ctgcccctgt cgcacatgtg agggctggac	1380
tgcgaactgg agaaggggag agattttcaa agagatacaa ggggaattggg aggggtgcaa	1440
aaagaggaga gtaggaaaaa tctgataatg ctcaaaagga aaaaaatct ccgcagcgaa	1500
acgacagctg cggaaaaaaa ccaccaatcc catccaaatt aacgcaaaa ccgtgatgcc	1560

ES 2 561 949 T3

gactagaaaa cttttatgag agatcttggg acttcttttt gggggactat tttgtacag 1620  
 agaaaacctg agggcggcgg ggagggcggg ggaatcggac catgtataga tctggaggaa 1680  
 aaaaactacg caaaactttt ttttaaagt ctagtggtag gttaggcget tgcagggag 1740  
 ttcgcaaaag tctttaccag taatatttag agctagactc cgggcatga aaaaaagtt 1800  
 ttaatatgtg caagcaactt ttgtacagta tttatcgaga taaacatggc aatcaaatgt 1860  
 ccattgttta taagctgaga atttgccaat attttctgag gaaagggctt ttgctgggtt 1920  
 ttgattctgc agcttaaatt taggaccgtt acaacaagg aaggagtta ttcggatttg 1980  
 aacattttag ttttaaaatt gtacaaaagg aaaacatgag agcaagtact ggcaagaccg 2040  
 tttctgtggt ctgtttaag gcaaacgtt tagattgtac taaattttta acttactgtt 2100  
 aaaggcaaaa aaaaaatgtc catgcaggtt gatctcgtg gtaatttata atagcttttg 2160  
 ttcaatecta ccctttcatt ttgttcacat aaaaaatag gaattactgt gtttgaata 2220  
 tttcttatg gtttgaata tttctgtaa ttgtgatatt ttaaggtttt tccccctt 2280  
 tattttccgt agttgtattt taaaagattc ggctctgtta ttggaatcag gctgccgaga 2340  
 atccatgtat atatttgaac taataccatc ctataacag ctacatttct aacttaagtt 2400  
 tttactccat tatgcacagt ttgagataaa taaatttttg aaatatggac actgaaa 2457

<210> 6  
 <211> 2323  
 <212> ADN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 6  
 gtgtttgcaa aaagggaaaa gtactttgct gcctctttaa gactagggct gggagaaaga 60  
 agaggagaga aaaaagaaag agagaagttt ggagcccgag gcttaagcct ttccaaaaac 120  
 taateacaac aatcgcggeg gcccgaggag gagagcgact gttttttcat cccaattgca 180  
 cttegccctg ctgagctec gcttcccccc aactattctc cgccagatct ccgcgcaagg 240  
 ccgtgcacgc cgacgacccc gccgcggcc cctgcatccc ggcccccgcg cgcggcccc 300  
 gcagtccccg ccgggcccag ggtcgggcgc cgccggcggg ccgcgccccg gcccagcgcc 360  
 cgcattgata acatgatgga gacggagctg aagccgccgg gccctcagca agcttcgggg 420  
 ggcggcggcg gaggaggcaa cgccacggcg gcggcgaccg gggcaacca gaagaacagc 480  
 ccggaccgcg tcaagaggcc catgaatgcc ttcattggtt ggtcccgggg gcagcggcgt 540  
 aagatggccc aggagaacc caagatgac aactcggaga tcagcaagcg cctgggcgcc 600  
 gagtggaaac tttgtcggg gaccgagaag cggccgttca tcgacgaggc caagcggctg 660  
 cgcgctctgc acatgaagga gcaccgggat tataaatacc ggcccgggcg gaaaaccaag 720  
 acgctcatga agaaggataa gtacacgctt cccggaggct tgctggcccc cggcgggaac 780

10

agcatggcga gcggggttg ggtgggcgcc ggcctgggtg eggcgtgaa ccagcgcacg 840  
 gacagctacg cgcacatgaa cggtcggagc aacggcagct acagcatgat gcaggagcag 900  
 ctgggctacc cgcagcaccc gggcctcaac gctcacggcg eggcacagat gcagccgatg 960  
 caccgctacg acgtcagcgc cctgcagtac aactccatga ccagctcgca gacctacatg 1020  
 aacggctcgc ccacctacag catgtcctac tcgcagcagg gcacccccgg tatggcgctg 1080  
 ggtcccatgg gctctgtggt caagtccgag gccagttcca gccccccgt ggttacctct 1140  
 tcctccccact ccagggcgcc ctgccaggcc ggggacctcc gggacatgat cagcatgtac 1200  
 ctccccggcg ccgaggtgcc ggagccccgt gcgcccagta gactgcacat ggcccagcac 1260  
 taccagagcg gcccggtgcc cggcacggcc attaacggca cactgcccct gtcgcacatg 1320  
 tgagggccgg accgcgaact ggagaagggg agagattttt caaaaagata caaggaatt 1380  
 gggaggggtg caaaagagga gagtaagaaa aatctgaatg ctcaaaagga aaaaaaat 1440  
 ctcatcacc gcagcaaat gacagctcgc gaaaaaac accaatcca tccaaattaa 1500  
 cgcaaaaacc gtgatgccga ctagaaaact tttatgagag atctggagga aaaaaactac 1560  
 gcaaaacttt ttttaaaagt tctagtggta cgttaggcgc ttcgcaggga gttctcaaaa 1620  
 gtctttacca gtaatattha gaactagact ccgggcgatg aaaaaagttt taatatttgc 1680  
 aagcaacttt tgtacagtat ttatcgagat aaacatggca atcaaatgtc cattgtttat 1740  
 aagctgagaa tttgccata ttttcgagg aaagggttct tgcggggtt tgattctgca 1800  
 gcttaaatga aggaccgta cagacaagga aggaatttat teggatttga acgttttagt 1860  
 tttaaaattg taaaaagga aaacatgaga gcaagtactg gcaagaccat tttcgtggtc 1920  
 ttgtttaggg caaacgttct agattgtact aaatttttaa cttactgtta aaggcaaaaa 1980  
 aaaaatgtcc atgcaggttg atatcgttgg taatttataa tagcttttgt tcaatcccac 2040  
 ccttttcatt ttgttcacat aaaaataggg aaattactgt gttgaaata ttttcttatg 2100  
 gtttgtaata tttctgtaaa ttgtgatatt ttaaggtttt tcccccttt tattttccgt 2160  
 agttgtatth taaaagattc ggctgttatt ggaaccaggc tgccgagaat ccatgtatat 2220  
 atttgaacta ataccatcct tataacagtt acgtttccaa cttaagtttt tactccatta 2280  
 tgcacagttt gagataaata aatttttgaa atatggacac tga 2323

<210> 7  
 <211> 1411  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7  
 ccttcgcaag ccctcatttc accaggcccc cggcttgggg cgccttcctt ccccatggcg 60  
 ggacacctgg cttcggattt cgccttcctg cccccccag gtggtggagg tgatgggcca 120

10



ES 2 561 949 T3

```

ggggggccgg agcegggctg ggttgatcct cggacctggc taagcttcca aggccctcct      180
ggagggccag gaatcgggce gggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattcececa      240
tgccccccgc cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgtaact gtgggcecca ggttggagtg      300
gggetagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtccgg      360
gtggagagca actccgatgg ggcctccccg gagccctgca ccgtcacccc tggtgccgtg      420
aagetggaga aggagaagct ggagcaaac ccgaggaggc cccaggacat caaagctctg      480
cagaagaac tcgagcaatt tgccaagctc ctgaagcaga agaggatcac cctgggatat      540
acacaggccg atgtggggct caccctgggg gttctatttg ggaaggtatt cagccaaacg      600
accatctgcc gctttgaggc tctgcagctt agcttcaaga acatgtgtaa gctgcggccc      660
ttgctgcaga agtgggtgga ggaagctgac aacaatgaaa atcttcagga gatatgcaa      720
gcagaaaccc tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga      780
ggcaacctgg agaatttgtt cctgcagtgc ccgaaacca cactgcagca gatcagccac      840
atcggccagc agcttgggct cgagaaggat gtggtccgag tgtggttctg taaccggcgc      900
cagaaggga agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggattttga ggctgctggg      960
tctcctttct cagggggacc agtgtccttt cctctggccc cagggcecca ttttggtaac     1020
ccaggctatg ggagccctca cttcaetgca ctgtactcct cggtccectt ccctgagggg     1080
gaagccttcc cccctgtctc cgtcacccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt     1140
gcctgccctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg     1200
agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt cttcattcac taaggaagga attgggaaca     1260
caaaggttg gggcagggga gtttggggca actggttgga gggaaagtga agttcaatga     1320
tgctcttgat ttaaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga     1380
cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a                                     1411

```

<210> 8  
 <211> 1346  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

```

<400> 8
aaccgtccct aggtgagccg tctttccacc aggcccccg ctcggggtgc ccacctccc      60
catggctgga cacctggcct cagaettegc etttccacc ccaccaggty ggggtgatgg      120
gtcagcaggg ctggagccgg gctgggtgga tectcgaacc tggctaagct tccaagggcc      180
tccaggtggg cctggaatcg gaccaggctc agaggtattg gggatctccc catgtccgce      240
cgcatacag tctctggggag ggatggcata ctgtggacct caggttggac tgggcctagt      300
cccccaagt ggcgtggaga ctttgcagcc tgagggccag gcaggagcac gagtggaaag      360

```

10

caactcagag ggaacctcct ctgagccctg tgccgaccgc cccaatgccg tgaagttgga 420  
 gaaggtggaa ccaactcccc aggagtccca ggacatgaaa gccctgcaga aggagctaga 480  
 acagtttgcc aagctgctga agcagaagag gatcaccttg ggttacacc caggccgacgt 540  
 ggggtctacc ctgggcgttc tctttgaaa ggtgttcagc cagaccacca tctgtcgtt 600  
 cgaggccttg cagctcagcc ttaagaacat gtgtaagctg cggccccctgc tggagaagt 660  
 ggtggaggaa gccgacaaca atgagaacct tcaggagata tgcaaatcgg agaccctggt 720  
 gcaggccccg aagagaaaag gaactagcat tgagaaccgt gtgaggtgga gtctggagac 780  
 catgtttctg aagtgccega agccctccct acagcagatc actcacatcg ccaatcagct 840  
 tgggctagag aaggatgtgg ttcgagtatg gttctgtaac cggcgccaga agggcaaaag 900  
 atcaagtatt gagtattccc aacgagaaga gtatgaggct acagggacac ctttcccagg 960  
 gggggctgta tcttttctc tgccccagg tccccacttt ggcaccccag gctatggaag 1020  
 cccccacttc accacactct actcagtcct ttttctgag ggcgaggcct ttcctctgtc 1080  
 tcccgtcact gctctgggct ctcccatgca ttcaaacga ggcaccagcc ctccctgggg 1140  
 atgctgtgag ccaaggcaag ggaggtagac aagagaacct ggagctttgg ggttaaattc 1200  
 ttttactgag gagggattaa aagcacaaca ggggtggggg gtgggatggg gaaagaagct 1260  
 cagtgatgct gttgatcagg agcctggcct gtctgtcact catcattttg ttcttaata 1320  
 aagactggga cacacagtag atagct 1346

<210> 9  
 <211> 2949  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 9  
 agtttcccga ccagagagaa cgaacgtgtc tgccggcgcg cggggagcag aggcggtgdc 60  
 gggcggcggc ggcaccggga gccgcgagt gaccctccc cgccctctg gccccacc 120  
 ctcccaccg cccgtggccc gcgcccattg ccgcgcgcgc tccacacaac tcaccggagt 180  
 ccgcgccttg cgcgcgcgac cagttcgag ctccgcgcca cggcagccag tctcactgg 240  
 cggcaccgcc cgcaccgc cccggccaca gccctgcgc ccacggcagc actcgaggcg 300  
 accgcgacag tgggtgggga cgctgctgag tggaaagag cgcagcccgg ccaccggacc 360  
 tacttactcg ccttgctgat tgtctatctt tgcgtttaca acttttctaa gaaactttgt 420  
 atacaaagga actttttaa aaagacgctt ccaagttata tttaatcaa agaagaagga 480  
 tctcgccaa tttggggtt tgggttttg cttcgtttct tctctctgtt gactttgggg 540  
 ttcaggtgcc ccagctgctt cgggctgccc aggaccttct gggccccac attaatgagg 600  
 cagccacctg gcgagtctga catggctgtc agcgacgcgc tgctcccatc tttctccag 660

10

ES 2 561 949 T3

ttcgcgtctg gcccgcggg aaggagaaag aactgcgtc aagcaggtgc cccgaataac	720
cgctggcggg aggagctctc ccacatgaag cgacttcccc cagtgttcc cggccgcccc	780
tatgacctgg cggcggcgac cgtggccaca gacctggaga gcggcggagc cggtcggct	840
tgcgcggtg gcaacctggc gccctacct cggagagaga ccgaggagt caacgatctc	900
ctggacctgg actttattct ctccaattcg ctgacctatc ctccggagt agtggccgcc	960
accgtgtctt cgtcagcgtc agcctctctc tcgtcgtgc cgtcagcag cggccctgcc	1020
agcgcgccct ccaactgcag ctccacctat ccgatccggg cgggaacga cccggcggtg	1080
gcgcggggcg gcaaggcgg aggcctctc tatggcaggg agtccgctcc cctccgacg	1140
gctcccttca acctggcggg catcaacgac gtgagccct cggcggctt cgtggccgag	1200
ctcctgcggc cagaattgga cccggtgtac attccgcgc agcagccga gccgccaggt	1260
ggcgggctga tggcaagt cgtgtgaag gcgtcgtga gcgccctgg cagcagtag	1320
ggcagccgt cgtcatcag cgtcagaaa ggcagccctg acggcagcca cccggtggtg	1380
gtggcgccct acaacggcg gccgcgcgc acgtgcccc agatcaagca ggaggcggtc	1440
tcttcgtgca cccacttggg cgctggacct cctctcagca atggccaccg gccggctgca	1500
cacgaettcc cctggggcg gcagctcccc agcaggacta ccccgacct gggctttag	1560
gaagtgtga gcagcaggga ctgtaccct gccctgcgc ttcctcccg cttccatccc	1620
cacccggggc ccaattacc atcctctctg cccgatcaga tgcagccga agtcccgccg	1680
ctccattacc aagagctcat gccaccggt tctgtatgc cagaggagcc caagccaaag	1740
aggggaagac gatcgtggc ccgaaaagg accgccccc aacttgtga ttacggggc	1800
tgcgcaaaa cctacacaaa gagtcccat ctcaaggcac acctgcgaac ccacacaggt	1860
gagaaacctt accactgtga ctgggacggc tgtggatgga aattcgccc ctcagatgaa	1920
ctgaccaggc actacegtaa acacacggg caccgccct tccagtgcc aaaaatgcgac	1980
cgagcatttt ccaggctcgg ccacctcgc ttacacatga agaggcattt ttaaatccca	2040
gacagtggat atgaccaca ctgccagaag agaattcagt atttttact tttcacactg	2100
tcttcccgat gagggaagg gccccagccag aaagcactac aatcatggtc aagtcccaa	2160
ctgagtcac tttgtagtgg ataatcagga aaaatgagga atccaaaaga caaaaatcaa	2220
agaacagatg ggtctgtga ctggatctc tatcattcca attctaaatc cgacttgaat	2280
attcctggac ttacaaaatg ccaaggggg gactggaagt tgtggatctc agggataaa	2340
ttatatccgt gagttgggg agggaagacc agaattcctt tgaattgtgt attgatgcaa	2400
tataagcata aaagatcacc ttgtattctc tttacctctc aaaagccatt attatgatgt	2460
tagaagaaga ggaagaatt caggtacaga aaacatgttt aatagccta aatgatggtg	2520

ES 2 561 949 T3

cttggtgagt cttggttcta aaggtaacca acaaggaagc caaagttttc aaactgctgc 2580  
 atactttgac aaggaaaatc tatatttgtc ttccgatcaa catttatgac ctaagtcagg 2640  
 taatatacct ggtttaactc tttagcattt ttatgcagac agtctgttat gcactgtggt 2700  
 ttcagatgtg caataatttg tacaatggtt tattcccaag tatgccttaa gcagaacaaa 2760  
 tgtgtttttc tatatagttc cttgccttaa taaatatgta atataaattt aagcaaacgt 2820  
 ctattttgta tatttghtaa ctacaaagta aatgaacat tttgtggagt ttgtattttg 2880  
 cataactcaag gtgagaatta agtttttaaat aaacctataa tattttatct gaaaaaaaaa 2940  
 aaaaaaaaaa 2949

<210> 10  
 <211> 3057  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10  
 agttccccgg ccaagagagc gagcgcggct ccgggcgcgc ggggagcaga ggcggtggcg 60  
 ggcgcgggcg gcacccggag cgcgcgagtg cccctccccg cccctccagc cccccaccca 120  
 gcaacccgcc cgtgacccgc gcccatggcc gcgcgcaccc ggcacagtcc ccaggactcc 180  
 gcaccccgcg ccaccgcccc gctcgcagtt ccgcgccacc gcggccattc tcacctggcg 240  
 gcgcgcggcg cccaccgccc ggaccacagc ccccgcgccg ccgacagcca cagtggccgc 300  
 gacaacggtg ggggacactg ctgagtccaa gagcgtgcag cctggccatc ggacctactt 360  
 atctgccttg ctgattgtct atttttataa gagtttacia cttttctaa aatttttgta 420  
 tacaagaa cttttttaa gacatcgccg gtttatattg aatccaaaga agaaggatct 480  
 cgggcaatct gggggttttg gtttgaggtt ttgtttctaa agtttttaaat cttcgttgac 540  
 tttggggctc aggtaccctt ctctctcttt cggactccgg aggaccttct gggccccac 600  
 attaatgagg cagccacctg gcgagtctga catggctgtc agcgacgctc tgcctccgtc 660  
 cttctccaeg ttgcgctccg gcccgcgggg aagggagaag acactgcgtc cagcaggtgc 720  
 cccgactaac cgttggcgtg aggaactctc tcacatgaag cgacttcccc cacttccccg 780  
 ccgccccac gacctggcgg cgacggtggc cacagacctg gagagtggcg gagctggtgc 840  
 agcttgacag agtaacaacc cggccctcct agcccgagg gagaccgagg agttcaacga 900  
 cctcctggac cttagactta tcctttccaa ctcgctaacc caccaggaat cggtgggcgc 960  
 caccgtgacc acctcggcgt cagcttcatc ctcgtcttcc ccggcgagca gcggccctgc 1020  
 cagcgcgcc tcacactgca gcttcagcta tccgatccgg gccgggggtg acccgggcgt 1080  
 ggtgcccagc aacacaggtg gagggtcctt ctacagccga gaatctgcgc caectccac 1140  
 gggccccctc aacctggcgg acatcaatga cgtgagcccc tcgggcggtt tcgtggtga 1200

10

.gctcctgctg cgggagttgg acccagtata cattccgcca cagcagcctc agccgcccagg 1260  
 tggcgggctg atgggcaagt ttgtgctgaa ggcgtctctg accacccttg gcagcgagta 1320  
 cagcagccct tgggtcatca gtgttagcaa aggaagccca gacggcagcc accccgtggt 1380  
 agtggcgccc tacagcggtg gcccgcgcg catgtgcccc aagattaagc aagaggcggt 1440  
 cccgtcctgc acggtcagcc ggtccctaga ggcccatttg agcgctggac cccagctcag 1500  
 caacggccac cggcccaaca cacacgactt ccccctgggg cggcagctcc ccaccaggac 1560  
 taccctaca ctgagtcccg aggaactgct gaacagcagg gactgtcacc ctggcctgcc 1620  
 tcttccccca ggattccatc cccatccggg gcccaactac cctcctttcc tgccagacca 1680  
 gatgcagtca caagtcccct ctctccatta tcaagagctc atgccaccgg gttcctgcct 1740  
 gccagaggag cccaagccaa agaggggaag aaggtcgtgg ccccgaaaaa gaacagccac 1800  
 ccacacttgt gactatgcag gctgtggcaa aacctatacc aagagtcttc atctcaaggc 1860  
 acacctgcga actcacacag gcgagaaaacc ttaccactgt gactgggacg gctgtgggtg 1920  
 gaaattcgcc cgctccgatg aactgaccag gcactacegc aaacacacag ggcaccggcc 1980  
 ctttcagtgc cagaagtgtg acagggcctt ttccaggteg gaccaccttg ccttacacat 2040  
 gaagaggcac ttttaaatcc cacgtagtgg atgtgaccca cactgccagg agagagagtt 2100  
 cagtattttt ttttctaacc tttcacactg tcttcccacg aggggaggag cccagctggc 2160  
 aagcgtaca atcatggtca agttcccagc aagtcagctt gtgaatggat aatcaggaga 2220  
 aaggaagagt tcaagagaca aaacagaaat actaaaaaca aacaaacaaa aaaacaaca 2280  
 aaaaaaaaaa gaaaaaaaaa tcacagaaca gatgggtct gatactggat ggatcttcta 2340  
 tcattccaat accaaatcca acttgaacat gcccgactt acaaaatgcc aaggggtgac 2400  
 tgggaagttt tggatatcag ggtatacact aaatcagtga gcttgggggg agggaagacc 2460  
 aggatccct tgaattgtgt ttcgatgatg caatacacac gtaaagatca cettgtatgc 2520  
 tctttgcctt cttaaaaaaaa aaaaaagcca ttattgtgtc ggaggaagag gaagcgattc 2580  
 aggtacagaa catgttctaa cagcctaaat gatggtgctt ggtgagtcgt ggttctaaag 2640  
 gtaccaaacg ggggagccaa agttctccaa ctgctgcata cttttgacaa ggaaaatcta 2700  
 gttttgtctt ccgatctaca ttgatgacct aagccaggta aataagcctg gtttatttct 2760  
 gtaacatttt tatgcagaca gtctgttatg cactgtgggt tcagatgtgc aataatttgt 2820  
 acaatggttt attcccagt atgcctttaa gcagaacaaa tgtgttttcc tatatagttc 2880  
 cttgccttaa taaatatgta atataaattt aagcaactt ctattttgta tatttgtaa 2940  
 ctacaaagta aaaaaaaaaatg aacattttgt ggagtttgta ttttgctac tcaaggtgag 3000  
 aaataagttt taaataaacc tataatattt tatctgaacg aaaaaaaaaa aaaaaaa 3057

<210> 11  
 <211> 2393  
 <212> ADN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5

ES 2 561 949 T3

<400> 11

atetteggtg actteggggg ttgggtaccc ctctctcttc tteggactcc ggaggacctt	60
ctgggcccc acattaatga ggcagccacc tggcgagtct gacatggctg tcagcgacgc	120
tctgctcccg tcttctccca cgttecgctc cggccccggc ggaagggaga agacaactgcg	180
tccagcaggt gcccegaeta accgttggcg agaggaacte tctcacatga agcgaacttcc	240
cccacttccc ggccgcccct acgacctggc ggcgacggtg gccacagacc tggaaagtgg	300
tggagctggt gcagcttgca gcagtaacaa cccggcccta ccccgagggg agaccgagga	360
gttcaacgat ctctctggacc tagactttat cctttccaac tegtatccc accaggaatc	420
ggtggccgcc accgtgacca cctcggcgtc agcttcatcc tegtcttccc cagctagcag	480
cggccctgcc agcgcgccct ccacctgcag ctctcagctat ccgatccggg ccgggggtga	540
cccggcgctg gctgcgggca acacaggtgg agggctctc tacagccgag aatctgcgcc	600
acctcccacg gcccccctca acctggcgga catcaatgac gtgagcccct cgggcggtt	660
cgtggctgag ctctctcgcc cggagttgga cccagtatac attccgccac agcagcctca	720
gccgccaggt ggcgggctga tgggcaagtt tgtgctgaag gcgtctctga gcacccctgg	780
cagcgagtac accagcctt cggtcactcag tgttagcaaa ggaagcccag acggcagcca	840
ccctgtggtg gtggcgccct acagcggggt cccgcgcgt atgtgccccca agattaagca	900
agagggcgtc ccgtctctgca cggtcagccg gtccctagag gccacttga gcgctggacc	960
ccagctcagc aacggccaca ggcccacac acacgaette cccctggggc ggcagctccc	1020
caecaggact acccctacac tgagteccga ggaactgctg aacagcaggg actgtcacc	1080
tggcctgect ctccccccag gattccatcc ccatccgggg cccagctacc ctctttct	1140
gccagaccag atgcagtcgc aagtcctcctc tctccattat caagagctca tgccaccggg	1200
atcctgcctg ccagaggagc ccaagccaaa gagggaaga aggtcttggc cccggaaaag	1260
aacagccacc cacacttgty actatgcagg ctgtggcaaa acctatacga agagttctca	1320
tctcaaggca cacctgcgaa ctcacacagg cgagaaacct taccactgtg actgggacgg	1380
ctgtgggtgg aaatctgccc gctcagatga actgaccagg cactaccgca aacacaccgg	1440
gcaccggccc tttcagtgcc agaagtgcga cagggccttt tccaggtcgg accaccttgc	1500
cttacacatg aagaggcact tttaaattcc acatcgtgga catgaccac actgccagga	1560
gagagttcag tatttttttt taacctttca cactgtcttc ccacgagggg aggagcccag	1620
ctggraagcy ctacaatcat ggtcaagttc ccagcaagtc agcttgtgaa tggataatca	1680
ggagaaagga agagtccaag ggacaaaaga aaagaaaga aaaaaatact aaaaaacaaa	1740

caaacaaaaa aaaaaaacia aagaaaaaaa tcacagaaca gatggggtct gagactggat 1800  
 cttctatcat tccaatacca aatccgactt gaacaagact ggacttacia aatgccaagg 1860  
 ggtgactgga agtttgtgga tatcagggta tacattaat cagtgcctg gggggaggga 1920  
 agaccagagt tccettgaat tgtgettcaa tgatgcaata tacatggaaa gaccaccttg 1980  
 tatgetcttt gccttctaaa aagccattat gacgtcagag gaagaggaa caattcaggt 2040  
 acagaacgtg ttctaatagc ctaaacgatg gtgcttggtg agtcgtggtt ctaaaggtag 2100  
 caaacggggg agccaaagtt ctccaactgc tgcatacttt gacaaggaaa atctatcttt 2160  
 gtcttccgat ctacatttat gacctaagtc aggtaaataa gcctggttta tttctgtaac 2220  
 attttttatg cagacagtct gttatgcact gtggtttcag atgtgcaata atttgtacia 2280  
 tggtttattc ccaagtatgc cttaagcag aacaaatgtg ttttctata tagttccttg 2340  
 ccttaataaa tatgtaatat aaatttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2393

<210> 12  
 <211> 4018  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 12  
 caggcagcgc tgcgtctcgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca ccccccgat 60  
 gccgcgcgct ccccgctgcc gagccgtgcg ctccctgctg cgcagccact accgcgaggt 120  
 gctgcgcgctg gccacgttcg tgcggcgcct ggggccccag ggctggcggc tgggtcagcg 180  
 cggggacccg gcggctttcc gcgcgctggt gggccagtgc ctggtgtgcg tgcctggga 240  
 cgcacggccg cccccgcgc cccctcctt ccgccaggtg tctgctga aggagctggt 300  
 ggcccagatg ctgcagaggc tgtgcgagcg cggcgcgaag aacgtgctgg ccttcggctt 360  
 cgcgctgctg gacggggccc gcggggggccc ccccgaggcc ttcaccacca gcgtgcgag 420  
 ctacctgccc aacacggtga ccgacgcact gcgggggagc ggggcgtggg ggctgctgct 480  
 gcgccgcgctg ggcgacgagc tgetggttca cctgctggca cgtgcgcgc tctttgtgct 540  
 ggtgctccc agctgcgct accaggtgtg cgggcccgcg ctgtaccagc tggcgctgc 600  
 cactcaggcc cggccccgc cacacgttag tggaccccga aggcgtctgg gatgcgaacg 660  
 ggcctggaac catagcgtca gggaggccgg ggtccccctg ggctgccag ccccggtgc 720  
 gaggagggcg gggggcagtg ccagccgaag tctgcccgtg cccaagaggc ccaggcgtgg 780  
 cgtgccccct gagccggagc ggaacgccgt tgggcagggg tccctggccc acccgggcag 840  
 gacgcgtgga ccgagtgacc gtagtttctg tgtggtgtca cctgccagac ccgccgaaga 900  
 agccacctct ttggaggggt cgtctctctg cacgcgccac tcccacccat ccgtggggcg 960  
 ccagcaccac gggggcccc catccacatc gcggccacca cgtccctggg acacgccttg 1020

10

teccccggtg tacgccgaga ccaagcactt cctctactcc tcagggcaca aggagcagct	1080
ggggccctcc ttctactca gctctctgag gccagcctg actggcgctc ggaggctcgt	1140
ggagaccatc tttctgggtt ccagggcctg gatgccaggg actccccgca ggttgccccg	1200
cctgccccag cgctactggc aaatgcgcc cctgtttctg gagctgettg ggaaccacgc	1260
gcagtgcctc tacgggggtg tcctcaagac gcactgcccg ctgctgagctg cggtcacccc	1320
agcagccggt gtctgtgccc gggagaagcc ccagggctct gtggcgccc ccgaggagga	1380
ggacacagac ccccgctgcc tgggtgcagct gctccgccag cacagcagcc cctggcaggt	1440
gtacggcttc gtgcgggcct gcctgcgccg gctggtgccc ccaggcctct ggggctccag	1500
gcacaacgaa cgccgcttcc tcaggaacac caagaagttc atctccctgg ggaagcatgc	1560
caagctctcg ctgcaggagc tgactggaa gatgagcgtg cgggactgcg cttggctgcg	1620
caggagccca ggggttggt gtgttcggc cgcagagcac cgtctgctg aggagatcct	1680
ggccaagtcc ctgcactggc tgatgagtg gtacgtcgtc gagctgctca ggtcttctct	1740
ttatgtcacg gagaccacgt ttcaaaagaa caggtcttt ttctaccgga agagtgtctg	1800
gagcaagtty caaagcattg gaatcagaca gcacttgaag agggtgcac tgcgggagct	1860
gtcggaaaca gaggtcaggc agcatcggga agccaggccc gccctgctga cgtccagact	1920
ccgcttcate cccaagcctg acgggctgcg gccgattgtg aacatggact acgtcgtggg	1980
agccagaacg ttccgcagag aaaagagggc cgagcgtctc acctcgaggg tgaaggcact	2040
gttcagcgtg ctcaactacg agcgggctcg gcgccccggc ctctggggcg cctctgtgct	2100
gggctggac gatatccaca gggcctggcg cacctcctg ctgctgtgctc gggcccagga	2160
cccgcgcct gagctgtact ttgtcaaggt ggatgtgacg ggcgctacg acaccatccc	2220
ccaggacagc ctacggagg tcatcgccag catcatcaaa ccccagdaca cgtactcgt	2280
gcgtcggat gccgtggtcc agaagccgc ccatggcac gtccgcaagg ccttcaagag	2340
ccacgtctct acctgacag acctccagcc gtacatgca cagttcgtgg ctacacctgca	2400
ggagaccagc ccgctgagg atgcccgtct catcgagcag agctcctccc tgaatgaggc	2460
cagcagtggc ctcttcgacg tcttctacg ctcatgtgc caccacgccc tgcgcatcag	2520
gggcaagtcc tacgtccagt gccaggggat ccgcagggc tccatcctct ccacgctgct	2580
ctgcagcctg tgctacggcg acatggagaa caagetgtt gcggggatc ggcgggacgg	2640
gctgtcctg cgtttgggtg atgatttctt gttggtgaca cctcacctca cccacggaa	2700
aaccttctc aggaccctg tccgaggtgt ccctgagtat ggtgctggtg tgaacttgcg	2760
gaagacagtg gtgaacttcc ctgtagaaga cgaggccctg ggtggcacgg cttttgttca	2820
gatgcccggc cagggctat tcccctggtg cggcctgctg ctggataccc ggaccctgga	2880



ggtgcagagc gactactcca gctatgcccg gacctccatc agagccagtc tcaccttcaa 2940  
 ccgcggcttc aaggetggga ggaacatgcs tgcxaaetc tttgggtct tgcggetgaa 3000  
 gtgtcacagc ctgtttctgg atttgcaggt gaacagectc cagacgggtgt gcaccaacat 3060  
 ctacaagatc ctectgctgc aggcgtacag gtttcacgca tgtgtgctgc agcteccatt 3120  
 tcatcagcaa gtttgaaga accccacatt tttcctgccc gtcactctctg acacggcctc 3180  
 cctctgctac tccatcctga aagccaagaa cgcagggatg tcgctggggg ccaagggcgc 3240  
 cgccggccct ctgcccctcg aggcctgca gtggctgtgc caccaagcat tcctgctcaa 3300  
 gctgactcga caccgtgtca cctacgtgcc actcctgggg tcaactcagga cagcccagac 3360  
 gcagctgagt cggaagctcc cggggacgac gctgactgcc ctggaggccg cagccaaccc 3420  
 ggcactgccc tcagacttca agaccatcct ggactgatgg ccacccgcc acagccaggc 3480  
 cgagagcaga caccagcagc cctgtcacgc cgggctctac gtcccaggga gggaggggcg 3540  
 gccacacccc aggccegcac cgctgggagt ctgaggcctg agtgagtgtt tggccgaggc 3600  
 ctgcatgtcc ggctgaaggc tgagtgtccg gctgaggcct gagcagtggt ccagccaagg 3660  
 gctgagtgtc cagcacacct gccgtcttca ettecccaca ggcctggcct cggtctcacc 3720  
 ccagggccag ctttctctea ccaggagccc ggcttccact ccccacatag gaatagtcca 3780  
 tcccagatt cgccattgtt caccctcgc cctgcccctc tttgccttc acccccacca 3840  
 tccaggtgga gacctgaga aggacctgg gagctctggg aatttgaggt gaccaaagg 3900  
 gtgccctgta cacaggcgag gacctgcac ctggatgggg gtccctgtgg gtcaaattgg 3960  
 ggggaggtgc tgtgggagta aaatactgaa tatatgatt tttcagttt gaaaaaaaa 4018

<210> 13  
 <211> 4237  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 13  
 ggttccccga cgtgggagge ccataccggc cttgagcaca atgaccegcg ctctctgttg 60  
 ccccggggtg cgctctctgc tgcgcagecg ataccgggag gtgtggcgc tggcaacctt 120  
 tgtgcggcgc ctggggcccg agggcaggcg gcttgtgcaa cccggggacc egaagatcta 180  
 ccgcactttg gttgcccatt gcctagtgtg catgcaactg ggcctcacagc ctccacctgc 240  
 cgacctttcc ttcaccaggy tgteatccct gaaagagctg gtggccaggg ttgtgcagag 300  
 actctgcgag cgcaacgaga gaaacgtgct ggcttttggc tttgagctgc ttaacgagge 360  
 cagaggcggg cctcccatgg ccttactag tagcgtgcgt agctacttgc ccaacactgt 420  
 tattgagacc ctgcgtgtca gtgggtgatg gatgctactg ttgagccgag tgggagacga 480  
 cctgtcggte tacctgctgg cacactgtgc tctttatctt ctgggtcccc ccagctgtgc 540

10

ES 2 561 949 T3

ctaccaggtg tgtgggtctc ccctgtacca aatttgtgcc accacggata tctggcctc	600
tgtgtccgct agtta <del>c</del> aggc ccaccgacc cgtgggcagg aatttcacta accttaggtt	660
cttacaacag atcaagagca gtagtgc <del>c</del> ca ggaagcaccg aaaccctgg ccttgccatc	720
tcgaggtaca aagaggcatc tgagtctcac cagtacaagt gtgccttcag ctaagaaggc	780
cagatgctat cctgtcccga gagtggagga gggaccc <del>c</del> ac aggcagggtgc taccaacccc	840
atcaggcaaa tcatgggtgc caagtcctgc t <del>c</del> gg <del>t</del> cccc gaggtgecta ctgcagagaa	900
agatttgtct tctaaaggaa aggtgtctga cctgagctc <del>c</del> tctgggtcgg tgtgctgtaa	960
acacaagccc agctccacat ctctgctgc accaccccgc caaaatgcct ttcagctcag	1020
gccatttatt gagaccagac atttcttta ctccagg <del>g</del> ga gatggccaag agcgtctaaa	1080
ccccctatc ctactcagca acctccagcc taacttgact gggg <del>c</del> cagga gactggtgga	1140
gatcatcttt ctgggctcaa ggcttaggac atcaggacca ctctgcagga cacaccgtct	1200
atcgcgtcga tactggcaga tgcggcccct gttccaacag ctgctggtga accatgcaga	1260
gtgccaatat gtcagactcc tcaggtcaca ttgcaggtt cgaacagcaa accaacagg <del>t</del>	1320
gacagatgcc ttgaacacca gccaccgca cctcatggat ttgctccgc tgcacagcag	1380
tccctggcag gtatatggtt ttcttcgggc ctgtctctgc aagg <del>t</del> ggtgt ctgctagtct	1440
ctgggtacc aggcacaatg agcgcgctt ct <del>t</del> taagaac ttaaagaagt tcatctcgtt	1500
ggggaat <del>a</del> c ggcaagctat cactgcagga actgatgtgg aagatgaaag tagaggattg	1560
ccactggctc cgcagcagcc cggggaagga ccgtgtccc gctgcagagc accgtctgag	1620
ggagaggatc ctggctacgt t <del>c</del> ctgtctg gctgatggac acatacgtgg tacagctgct	1680
taggtcattc ttttcatca cagagagcac attccagaag aacaggctct tcttctaccg	1740
taagagtgtg tggagcaagc tgcagagcat tggagt <del>c</del> agg caacacctg agagagtgcg	1800
gctacgggag ctgtcacaag aggaggtcag gcatcaccag gacacctg <del>c</del> tagccatgcc	1860
catctgcaga ctgcgcttca tccccagcc caacggcctg cggcccattg tgaacatgag	1920
ttatagcatg ggtaccagag ctttgggcag aaggaagcag gccacgatt tcaccagcg	1980
tctcaagact ctctcagca tgctcaacta tgagcggaca aaacatcctc accttatggg	2040
gtcttctgta ctgggtatga atgacatcta caggacctgg cgggcctttg tgctgcgtgt	2100
gcgtgctctg gaccagacac ccaggatgta ctttgttaag gcagatgtga cggggccta	2160
tgatgccatc ccccagggt <del>a</del> agctgggtgga ggttgttgc aatatgatca ggcactcgga	2220
gagcacgtac tgtatccgcc agtatgcagt ggtccggaga gatagccaag gccaa <del>g</del> tcca	2280
caagtccttt aggagacagg tcaccacct ctctgacctc cagccataca tggg <del>c</del> cagtt	2340
ccttaagcat ctgcaggatt cagatgccag tgcactgagg aactccgtg tcatcagca	2400
gagcatctct atgaatgaga gcagcagcag cctgtttgac ttcttctgc acttctcgcg	2460

tcacagtgtc gtaaagattg gtgacaggtg ctatacgcag tgccagggca tccccaggg	2520
ctccagccta tccaccctgc tctgcagtct gtgtttcgga gacatggaga acaagctgtt	2580
tgctgaggtg cagcgggatg ggttgccttt acgttttgtt gatgactttc tgttggtgac	2640
gcctcaectg gaccaagcaa aaacettect cagcaccctg gtccatggcg ttcctgagta	2700
tgggtgcatg ataaacttgc agaagacagt ggtgaacttc cctgtggagc ctggtagcct	2760
gggtggtgca gctccatacc agctgcctgc tcactgcctg tttccctggg gtggcttgct	2820
gctggacact cagactttgg aggtgttctg tgactactca ggttatgcc agacctcaat	2880
taagacgagc ctcaccttcc agagtgtctt caaagctygg aagaccatgc ggaacaagct	2940
cctgtcggtc ttgctggtga agtgtcacgg tctatttcta gacttgcagg tgaacagcct	3000
ccagacagtc tgcataata tatacaagat cttctgtctt caggcctaca ggttccatgc	3060
atgtgtgatt cagcttccct ttgaccagcg tgttaggaag aacctcacat tctttctggg	3120
catcatctcc agccaagcat cctgctgcta tgctatcctg aaggtcaaga atccaggaat	3180
gacactaaag gcctctggct cetttctctc tgaagccgca cattggctct gctaccaggc	3240
cttctgtctc aagctggctg ctcattctgt catctacaaa tgtctcctgg gacctctgag	3300
gacagcccaa aaactgctgt gccggaagct cccagagggc acaatgacca tccttaaagc	3360
tgcagctgac ccagccctaa gcacagactt tcagaccatt ttggactaac cctgtctcct	3420
tccgctagat gaacatgggc attgtagcct cagcactcct ggatccacgt cacaagaggg	3480
actggtcagt tgtgaggeta ggtcactctc caaacctctg tgtcatgggt ggtatgggag	3540
attgtcccag tgccttgttt cctgtaacag gcttgatttc tttctgatg ccctcagggg	3600
ggcagatcct atcccttcta gtggcagggg tccactagca ccagcacatg aggagtgcac	3660
ccagtgcaca tgggcactgy gacagtggac aggtgtgaga ttctggggcc ctggagtctt	3720
ttcacaccta acctggagc ctgtcccagt acatcagagt gcctcggaga tgaaaagga	3780
catcgagcca gtgacctaaa ttacagcctg aatatactct gaattcatgt gactgcctta	3840
gctacttctc tactgtctgy tagtaaaaca ccaagccaac ttataaaagc aggattttcc	3900
tactggagca gcagctgaga gtttacatct tgatccataa gcacaaaagc acaagacaga	3960
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagtca	4020
gtcagtcagt ctaacaaata actaagaaag gtyaagggty atgaagtcca cagggatcac	4080
gctagggatg ttccatgcct tctctgaagc taagattcct tggcagcgtt tgacagtaac	4140
catagtgggt acctactgag atcactataa agataaaata gggggaagcg tatttgtact	4200
gaactggaaa aacatacaaa taaagagtaa atcatgy	4237

<210> 14  
 <211> 3378  
 <212> ADN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5

ES 2 561 949 T3

<400> 14

atgeccccgcg ctcctcgttg cccccccgtg cgctctctac tgcgcagccg atatcggggag	60
gtgtggccgc tggcgacctt tgtgcggcgc ctggggcttg agggcagtcg gcttgtgcaa	120
ccccgggacc cgaaggtctt ccgcacgttg gttgccagtg gcctagtgtg cgtgccctgg	180
ggctcacagc cggcacctgc tgacctttcc tccaccagg tgcacccct gaaagagctg	240
gtgtccaggg ttgtgcagaa actttgcgag cgcggtgaga ggaatgtgct ggcttttggc	300
tttgcactgc ttaacggggc cagagggtgg cctcccattg ccttcacgac cagcgtgcat	360
agctacttgc ccaactcggg tactgagtec ctgtgtgtca gtggtgcatg gatgctactg	420
ttgagccgag tggcgacgga cctgctggtc tacctgctgt cgcactgtgc gctctacctg	480
ctggtgcccc ceagctgtgc ctaccaggtg tgcgggtcac ccctgtacca aatttgtgcc	540
accacggata cctggctctc tgtgcccgct ggttacagge ccactcgacc cgtgggcggg	600
aatttcacta accttgggtc cgcacaccag atcaaaaaca gtggtcacca ggaagcacca	660
aaaccccagg ccttgccatc acgaggtagc aagaggcttc tgagtctcac cagtacaaac	720
gtgcctteag ctaagaaggc caggttttaa cctgccctga gagtggataa gggaccccc	780
aggcaggtgg taccaccccc atcaggcaaa acatgggggc caagtccctgc tgcgtcccc	840
aaggtgcctc ctgcagcgaa aaacttgtct ttgaaaggaa aggcactctga cccgagtctc	900
tctgggtcgg tgtgctgtaa acacaagccc agctcctcgt ccctgtgtgc atcaccacce	960
caagtgtctg aaaagctcag gccattcact gagaccagac atttccttta ctccagggga	1020
ggtggccaag aggagctaaa tccctcattc ctactcaaca gcctcccgcc tagcttgacc	1080
ggggccagga gactggtgga gatcatcttt ctgggetcaa ggcttaggac atcaggacca	1140
ttctgcagga cccgcgcctt gcccgctcga tactggcaga tgcgacccct attccagcag	1200
ctgctcatga accacgcaaa gtgccaatat gtcagattcc tccggtcgca ctgcagattt	1260
cgaacagcaa accagcgggt gccggatgcc atggacacca gcccatccca cctcacgagt	1320
ttgtccgggt tacacagcag cccctggcag gtatacggct ttcttcgggc ctgcctccgc	1380
gagctggtgc ctgccggtct ctggggcacc aggcacaatg agcgcgcgctt cttaaagaac	1440
gtgaagaagt tcatctcgtt ggggaagtac gccaaagctat ccctgcagga actgatgtgg	1500
agggtgaaa gggaggactg ccactggctc cgcagcagcc cagagaagga cactgtccct	1560
gccgcagagc accgtctgag ggagaggatc cttgccatgt tccgtttctg gctaattggac	1620
acatatgtgg tacagctgct gaggctattc ttctacatca cagagaccac gttccagaag	1680
aaccgccttt tcttctaccg taagagtgtg tggagcaagc tgcagagcat tggaatcagg	1740

ES 2 561 949 T3

caacagcttg agagagttca gctacgggaa ctgtcacaag aggaggtcaa gcatcaccag 1800  
 gacacttggc tggccatgcc tatctgcaga ttgcgcttea tccccaaagct caatgggtctc 1860  
 cggcccattg tgaacatgag ttatggcatg gacaccagag cttttggcaa aaagaagcag 1920  
 acccagtgtt tcaactcagag tctcaagact ttgttcagcg tgctcaacta cgagcggacc 1980  
 aaacatccta accttatggg tgcttcagta ctgggtacga gtgacagcta caggatctgg 2040  
 cggaccttcg tgctgcgtgt gcgtgctctg gaccagacac ccaggatgta ctttgtaag 2100  
 gcagatgtga caggggacct tgatgccatc ccccaggaca agctcgtgga aattgtcgcc 2160  
 aatataatca ggcgctcaga gagcatgtac tgtatccgcc agtatgcagt ggttcagaaa 2220  
 gatagccaag gccaaagtcca caagtccttc aggagacagg tctccaccct ctctgacctc 2280  
 cagccataca tgggcccagtt caccaagcat ctgcaggact cagatgccag tgcactgagg 2340  
 aactctgttg tcatcgagca gagcatctcc atgaatgaga ctggcagtag cctgctccac 2400  
 ttcttctctg gctttgtccg tcacagtgtc gtgaagatcg atggcagggt ctatgtgcaa 2460  
 tgccagggca tccccagggg ctccagcctg tccaccctgc tctgcagtct gtgtttcggg 2520  
 gacatggaga acaagctggt tgcccagggt cagcaggacg gcttgccttt acgttttctc 2580  
 gatgacttte tgttggtgac acctcacctg gcccatgcaa aagcctttct cagcaccctg 2640  
 gtccatggcg tgcccagta tggtgcatg ataaactgc agaagacagt ggtgaacttc 2700  
 cctgtggaga cgggcccctt gggaggtgca gcccgcacc agctgcctgc tcaactgcctg 2760  
 tttcctggt gtggcttact gctggacact cggactttgg aagtattctg tgactactca 2820  
 ggttacggac ggacctcaat taagatgagc ctcaccttc aggggtgtct cagggccggg 2880  
 aagaccatgc ggtacaagct cttgtcagtc ttgcggttga agtgtcatgg tctgtttcta 2940  
 gacttgcagg tgaaacacct gcagacagtc tgcataata tatacaagat cttcctgctt 3000  
 caggcctaca ggttccatgc atgtgtgatt cggcttcctt ttggccagca tgttaggaag 3060  
 aaccatgcat tctttctggg catcatctcc aacctagcat cctgctgcta cgccatcctg 3120  
 aaggtaaga atccaggagt gtcactaagg gccaaagggt cccctggctc ctttccgccc 3180  
 gaggccacac gttggctctg ctaccaagcc ttctgtctca agctggctgc tcattctgtc 3240  
 acctacaagt gtctcctggg acctcttagg acagcccaaa aacagctgtg ccggaagctc 3300  
 ccagaggcaa caatgaccct ccttaagact gcagctgacc cagccctaag cacagatctt 3360  
 cagaccattt tggactaa 3378

<210> 15  
 <211> 1903  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 561 949 T3

<400> 15

```

cggcgteccc ggggcccact cccgagcgca ggcgggcagc caggcgggcg gcgcggcgcg      60
ggccggcagc aagegtatlc tgggcacggg gcgcggggcg ggccggctgc gccgagcggc      120
agtgggtggga taccacccaa ggcctcgcgc ggcgcgcgcc gtcgaggggc ggcgcggcggc      180
gtagccactg ggccgtcga gagegcagga ggcgggtggg ccgggcccggg ccgcgcggcg      240
cagccatgcc tggctttacg tgcctcgtgc caggctgcta caacaactcg caccgggaca      300
aggcgctgca cttctacacg tttccaaagg acgctgagtt gcgggcctc tggctcaaga      360
acgtgtcgcg tgccggcgtc agtgggtgct tctccacctt ccagcccacc acaggccacc      420
gtctctgcag cgttcaactc cagggcggcc gcaagaccta cacggtacgc gtccccacca      480
tcttcccget gcgcggcgtc aatgagcgca aagtagcgcg cagaccgcct ggggcccgcg      540
ccgcccgcg caggcagcag cagcaacagc agcagcagca gcaacagcag caacagcagc      600
agcagcagca acagcagcag cagcagcagc agcagcagca gtcctcacc tctgcctcca      660
ctgcccagac tgcccagctg cagccgaacc tggtatctgc tcccgggcc gtgcttctca      720
cccttcagc cactgtagac agcagtcagg ctccgggatc cgtacagccg gcgcccacca      780
ctcccactgg agaagacgtg aagcccatcg atctcacagt gcaagtggag tttgcagccg      840
cagagggcgc agccgctgcg gccgcgcgct cggagttaca ggctgctacc gcagggctgg      900
aggctgccga gtgccctatg ggccccagc tgggtggtgt aggggaagag ggcttccctg      960
atactggctc cgaccattcg tactccttgt cgtcaggcac cacggaggag gagctcctgc     1020
gcaagctgaa tgagcagcgg gacatcctgg ctctgatgga agtgaagatg aaagagatga     1080
aaggcagcat tcgccacctg cgtctcaactg aggccaagct gcgcgaagaa ctgcgtgaga     1140
aggatcggct gcttgccatg gctgtcatcc gcaagaagca cggaatgtga actggtgccc     1200
cggcagcctg ctggactccc agaccccatc cagccagggg accgcaggcc attggtgaac     1260
tcctctatac tcctgggca tgggtgacag tactgaggct taaggcagct ggactctctt     1320
gctggtgacc tggcatcctc aattgtttcc tcctgaagtg gaagctgggg ccttagactc     1380
tgccctgggt acaccagcaa ttatgacttt gtctaccctt cctccccagc tattgttgca     1440
gattctgggt aagcagagc ttcagaacca ctgaacttga aacttaccct ctagggatgc     1500
agggtgggatg tccagggact ataggtttgg gaaaaccata ccttaaggtt ggtcagcagt     1560
cagacaacte taatgtgtgt agtgataaga gattcaagta acatcagttc tectcctttt     1620
catgcttttc ctteccaggt gcagcctgtg attctgatgg ggactggtaa atctgtgcct     1680
ctgcctccta ggaettatth tcccaggagg ccatttaciaa ggggatctgg atgacctget     1740
gatggagatc cagcttgcca gggacttagg tttatcctgt tttgtttgct actggttaca     1800
aattctatth tctgtacaat tagtcagact aaagtthtca ctgtgtttgt ttggcaaac     1860
aaattaaca aaaagtaagg tttttaaaaa aaaaaaaaaa aaa                       1903

```

<210> 16

<211> 1832

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

5

ES 2 561 949 T3

<400> 16  
 gaagcgcagg cggacggccg ggtgggtagc agcggcgcgg gcggtccgca accatattct 60  
 gggcacgggg cctcggcccc ggacgactgc gccgggcggc aatagtgaga ggcctctgag 120  
 agcctcgcgc ggcgccgccc gtcgaggagc tgagacaggg gccagaccgc gccgtcgaag 180  
 agctcgagag gccgggtggc cggggccgcgc gtcgcagcca tgcctggctt tacgtgctgc 240  
 gttccgggct gctacaacaa ttcacaccgg gacaaggcgc tgcacttcta cacgtttccc 300  
 aaggacgctg agttcggcg cctctggctc aagaacgtgt cccgtgctgg cgtcagtgagg 360  
 tgcttctcca ctttccaacc caccaccggc caccgtctct gcagcgtcca ctttcagggc 420  
 ggccgcaaga cctacacggg gcgcgttccc accattttcc cgctcgtgg cgtcaatgag 480  
 cgcaaatgag ctcggagacc tgcgggagct gcggcagccc gccgtaggca gcagcagcag 540  
 caacaacaac agcagcagca gcaacagcag cagctgcaac agcagcagcc gtctccgtcc 600  
 tcctccactg cccagaccac ccagttgcag ccgaacctgg tgtctgcctc tgcagctgtg 660  
 cttcttacgc ttcaggccgc cgtagacagc aaccaggctc cgggatccgt ggttcccgtg 720  
 tccacgactc cctcgggaga tgatgtgaag cccatcgacc tcacagtgca agtcgagttt 780  
 gcagctgctg aaggggcagc cgccgctgcc gccgcctcag agctagaggg tgctacggct 840  
 gggctggagg ccgctgagtg cactctgggc cctcagctgg tggtagtagg ggaagagggc 900  
 ttccctgaca ctggtctga ccactcgtac tccttgcct cgggtaccac ggaggaggag 960  
 ctctcgcga agctgaacga gcagcgggac atcttggccc tgatggaagt gaagatgaag 1020  
 gagatgaagg gtagcatccg ccactcgcgt ctcaccgagg ccaagctccg tgaagaactt 1080  
 cgagagaagg atcgtctgct tgccatggct gtcatecgtg agaagcacgg catgtgaatg 1140  
 gttccccca gaaacctgca gaattcgtga ctccttccag cccaaggaat cctcaggcaa 1200  
 atgttgact ccccagtatt cctgttgaca gtgccgaggt ttaggacagc gggactccag 1260  
 ttggtcagtt ggcaccttct ttcgtctcct cgtgaagtaa gagtggggg cttcagaatc 1320  
 tggtagacc agcagttatg actttgtctc tcaactccca gtttatggtg cagattctgg 1380  
 ttatacacag gcttcagaac cactgaactt ggaacttacc ctggaggggg tgcagatgga 1440  
 actcttaagg gactgtgggt ttgaggaaac cacttcttca ggttggccag caatcagaga 1500  
 cagctttgct gtgtgtagtg ataagagatc tcagtaacat cgtttctcct ttccatgcta 1560  
 cccggttcag gtgcagctcg tgattctgat ggggactagc tgatctgtgc ctctgtctct 1620  
 taggacctct ctaccagaa ggtcatttat gagagggctc tgggtgactt gctgatggag 1680  
 atccagctca ccagggactt aggtttatct cgttatggtt gctactgggt acaaaattcta 1740  
 tttctgtac aattagactg aagttttcac tgtttggcaa aacaaattaa acaaaaaagt 1800  
 aaggttttta aaaaaaaaaa aaaaaggcca ca 1832

5

<210> 17  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

10

<400> 17  
 tctagagcgg ccgcccggcg ggtcgccacc atgagtgtag atccagcttg tcccc 55

15

<210> 18  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

ES 2 561 949 T3

	<400> 18 catgcaacct gaagacgtgt gaagactagt atcgat	36
5	<210> 19 <211> 51 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
10	<400> 19 tctagagcgg ccgcccggcg ggtcgccacc atggctgtca gcgacgcgct g	51
15	<210> 20 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
20	<400> 20 ccacctcgcc ttacacatga agaggcattt taaaagctt atcgat	46
25	<210> 21 <211> 50 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
30	<400> 21 tctagaggat ccccgccggg tcgccacat ggccggccgc ggaattcgat	50
35	<210> 22 <211> 39 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
40	<400> 22 ggcacactgc cccttcaca catgtgaaag cttatcgat	39
45	<210> 23 <211> 51 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
50	<400> 23 tctagagcgg ccgcccggcg ggtcgccacc atggcgggac acctggcttc g	51
55	<210> 24 <211> 37 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
60	<400> 24 gggctctccc atgcattcaa actgaggatc catcgat	37
65	<210> 25 <211> 50 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 25 tctagagcgg ccgcccggcg ggtcgccacc atgccgcgcg ctccccgctg	50
	<210> 26 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	



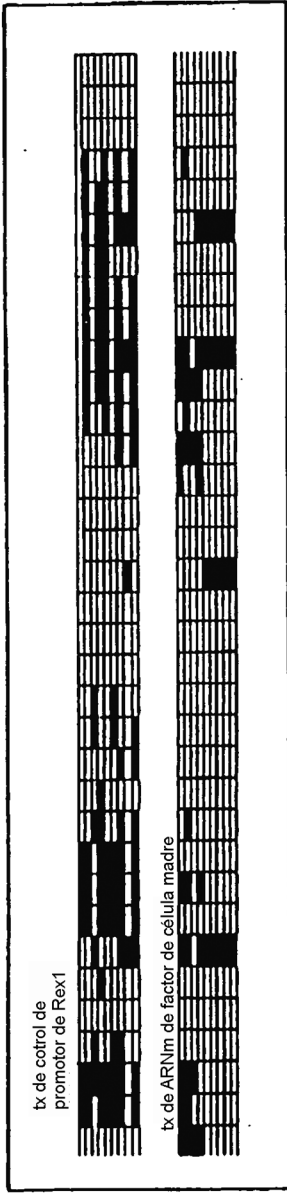
# ES 2 561 949 T3

	<400> 26 caaaatccca agcgtggcgc tgccttaaa agcttatcga t	41
5	<210> 27 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
10	<400> 27 tctagagcgg ccgcccggcg ggtcgccacc atggtgagca agg	43
15	<210> 28 <211> 38 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 28 ctcggcatgg acgagctgta caataaaagc ttatcgat	38

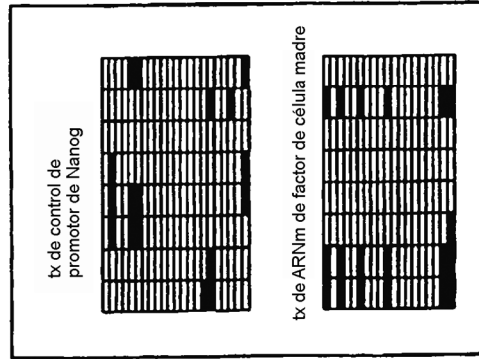
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para preparar *in vitro* células de mamífero reprogramadas sin el uso de un virus, que comprende
- 5 a) proporcionar unas células de mamífero aisladas que van a ser reprogramadas,
- b) transfectar una o más moléculas de ARNm reprogramadoras en las células proporcionadas en la etapa a), en el que las moléculas de ARNm reprogramadoras codifican por lo menos una proteína reprogramadora seleccionada de entre el grupo constituido por Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog y TERT,
- 10 c) cultivar las células obtenidas en la etapa b) en un medio de cultivo celular y en una condición adecuada para permitir la traducción de las moléculas de ARNm reprogramadoras transfectadas, conteniendo el medio de cultivo celular por lo menos un inhibidor transitorio de la proteólisis, para obtener las células reprogramadas, siendo dichas células reprogramadas unas células de mamífero que presentan un carácter de célula madre pluripotente o multipotente.
- 15
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la condición adecuada para permitir la traducción es un contenido de oxígeno en el medio de cultivo celular comprendido entre 0,5% y 21%.
- 20
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la condición adecuada para permitir la traducción es una temperatura comprendida entre 30°C y 38°C.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de cultivo celular tiene un contenido de glucosa comprendido entre 0,1 g/l y 4,6 g/l.
- 25
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de cultivo celular contiene por lo menos una sustancia inductora seleccionada de entre el grupo constituido por reversina, resveratrol, selenio, compuestos que contienen selenio, EGCG (epigallocatequina-3-galato), ácido valproico, sales de ácido valproico y valproato de sodio.
- 30
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor transitorio de la proteólisis se selecciona de entre el grupo constituido por inhibidor de proteasa, inhibidor de proteosoma e inhibidor de lisosoma.
- 35
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho inhibidor de proteosomas se selecciona de entre el grupo constituido por MG132, TMC-95A, TS-341, y MG262.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho inhibidor de proteasa se selecciona de entre el grupo constituido por aprotinina, G-64 y hemisulfato de leupeptina.
- 40
9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho inhibidor de lisosoma es cloruro de amonio.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células que van a ser reprogramadas son células humanas.
- 45
11. Procedimiento para inducir la desdiferenciación de células de mamífero, en el que se lleva a cabo un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 50
12. Procedimiento para mejorar la expansión *in vitro* de células madre de mamífero, en el que se lleva a cabo un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende
- a) proporcionar células de mamífero aisladas que van a ser reprogramadas,
- 55 b) transfectar una o más moléculas de ARNm reprogramadoras en las células proporcionadas en la etapa a), codificando las moléculas de ARNm reprogramadoras por lo menos una proteína reprogramadora seleccionada de entre el grupo constituido por Ronin, Oct4, Klf4, Sox2, Nanog y TERT,
- c) cultivar las células obtenidas en la etapa b) en un medio de cultivo celular y en una condición adecuada para permitir la traducción de las moléculas de ARNm reprogramadoras transfectadas, conteniendo el medio de cultivo celular por lo menos un inhibidor transitorio de la proteólisis, para obtener células reprogramadas, siendo dichas células reprogramadas unas células de mamífero que presentan un carácter de célula madre pluripotente o multipotente,
- 60
- en el que dicho cultivo en la etapa c) se caracteriza por que prolonga la expansión de las células madre pluripotentes o multipotentes obtenidas, siendo dichas células madre que van a ser expandidas mantenidas en un estado desdiferenciado.
- 65

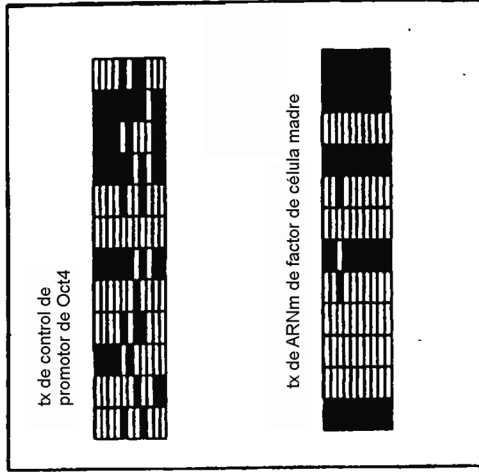
13. Procedimiento para el rejuvenecimiento de células de mamífero envejecidas, en el que se lleva a cabo un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.



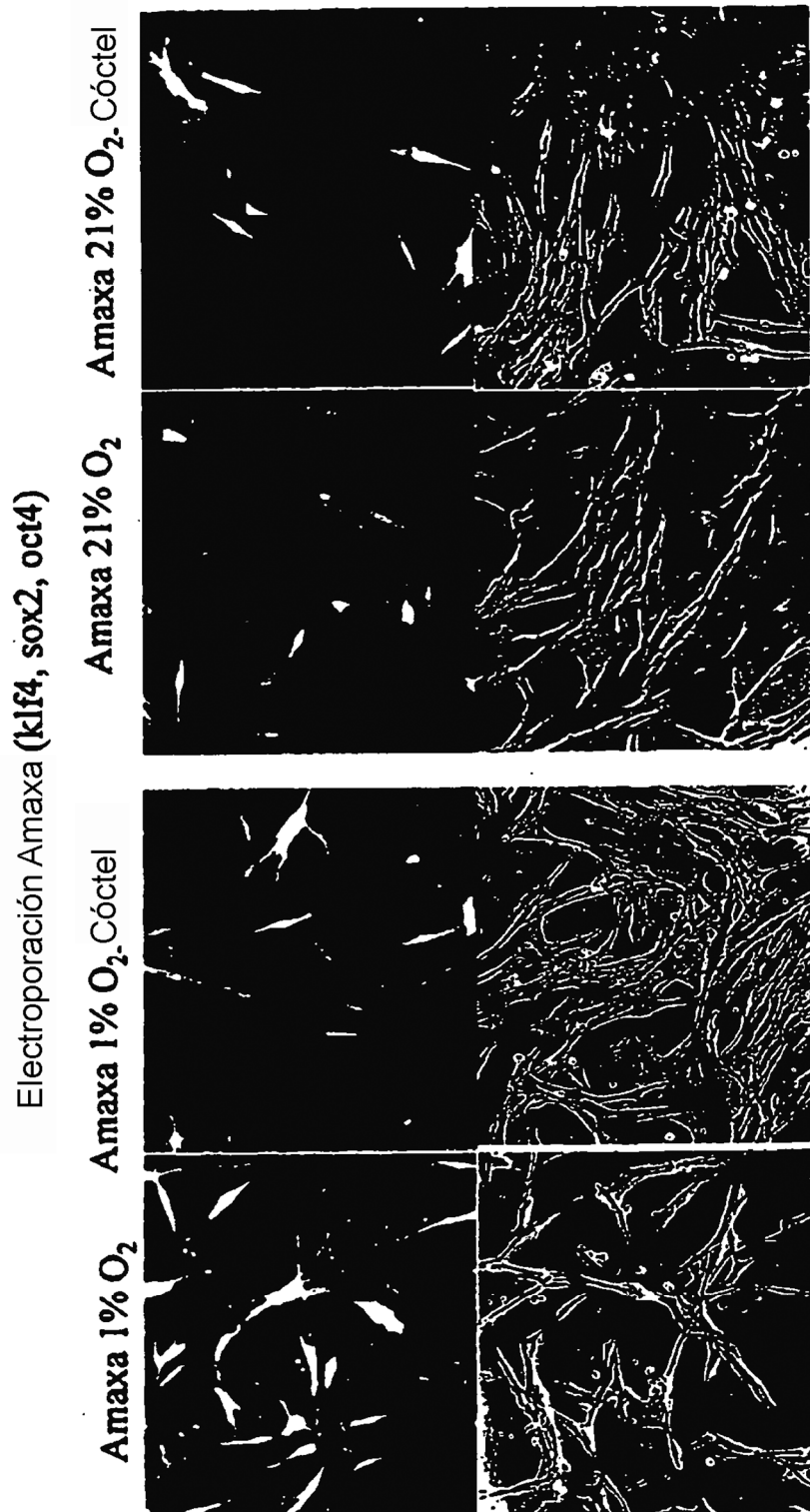
**Fig. 1A**



**Fig. 1B**

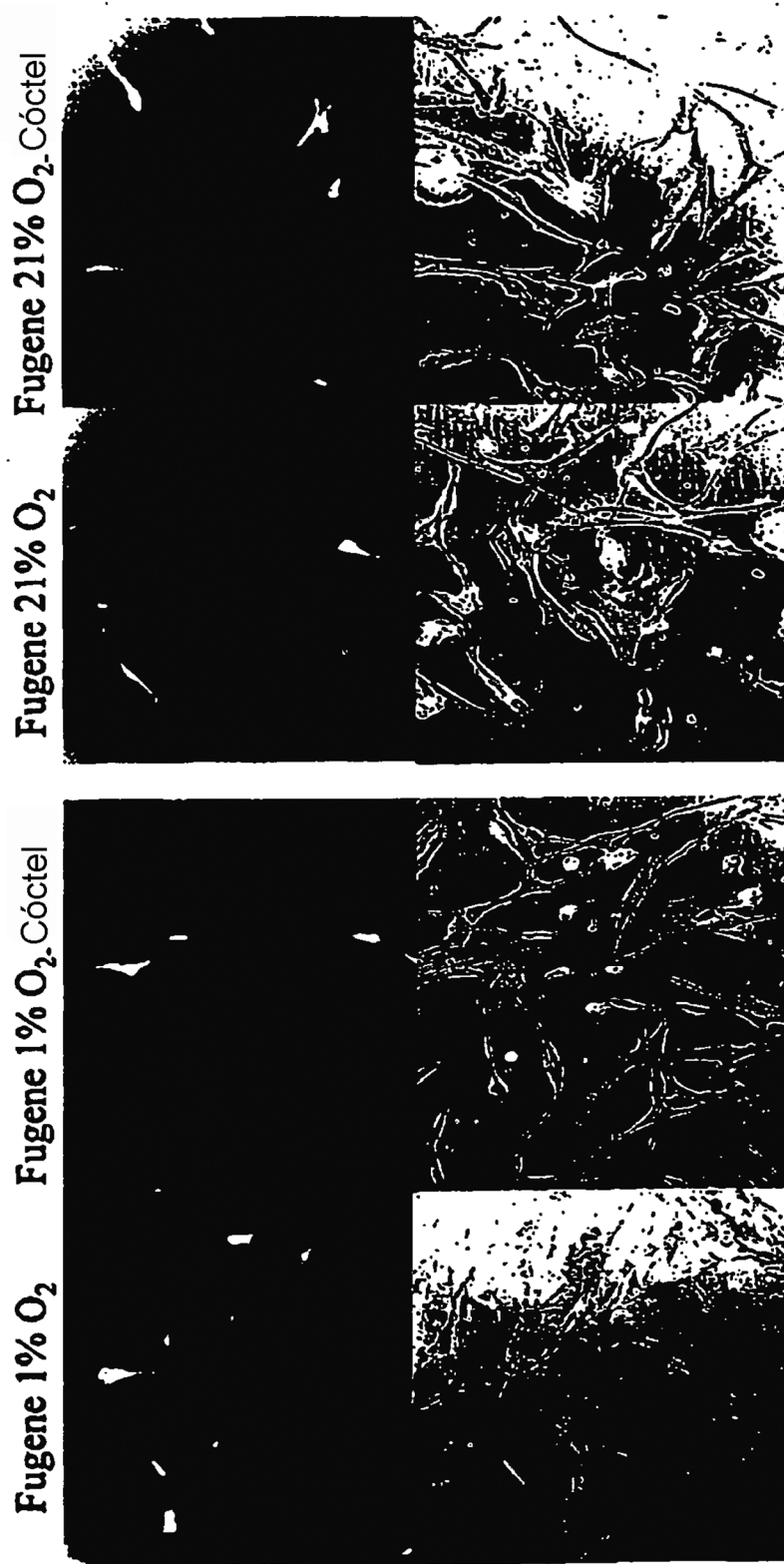


**Fig. 1C**



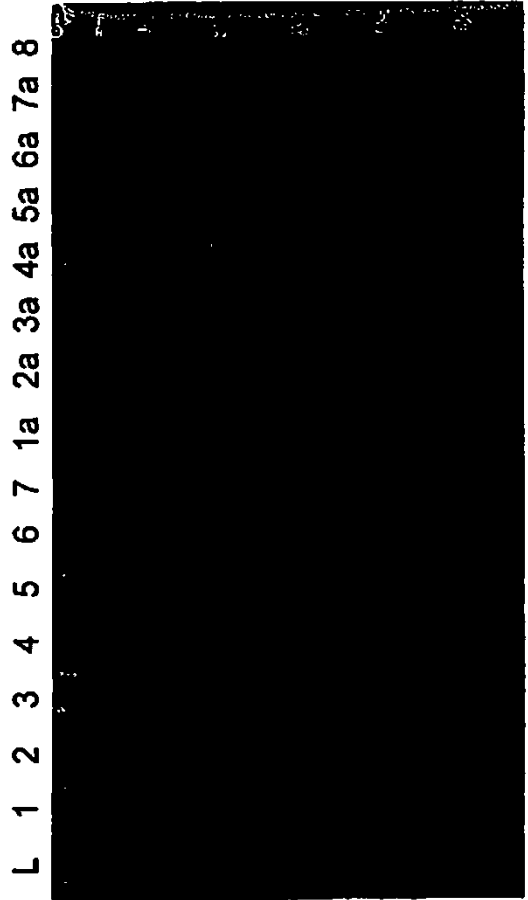
**Fig. 2**

Transfección de Fugene (klf4, sox2, oct4)



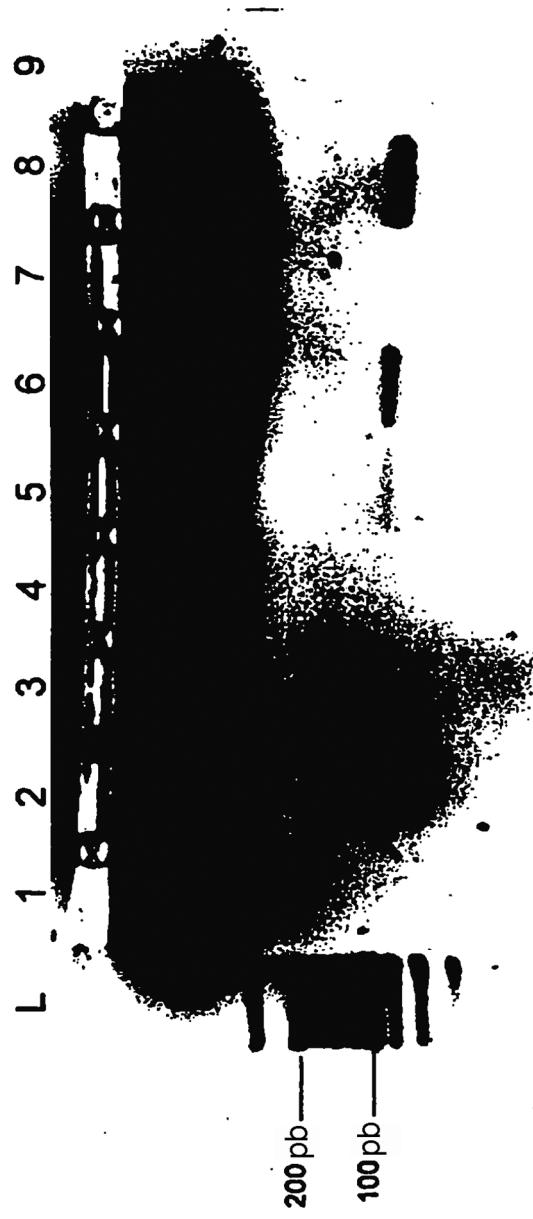
**Fig. 3**

RT-PCR Oct4



**Fig. 4**

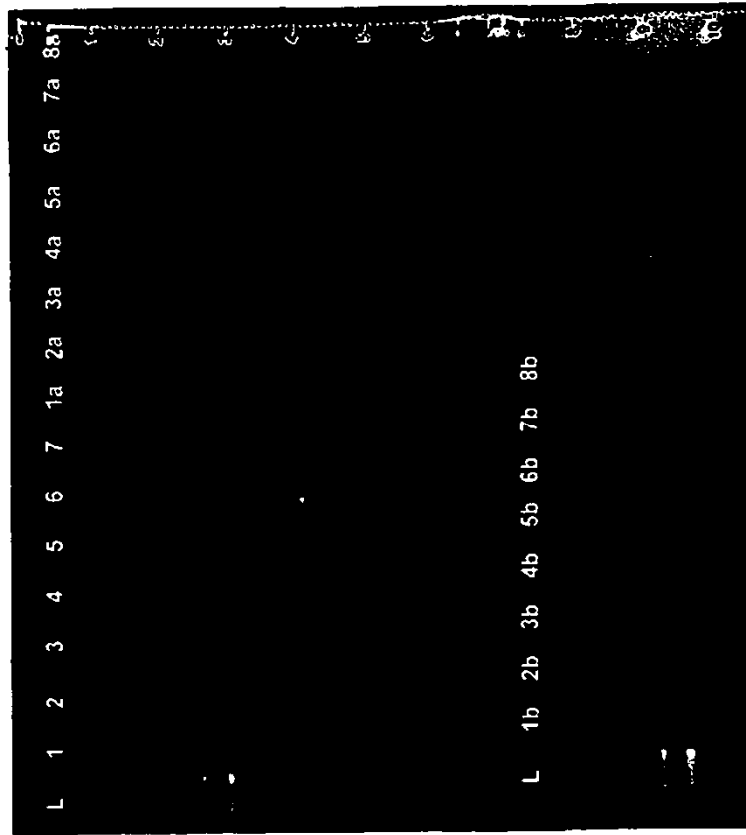
RT-PCR hOct4



**Fig. 5**

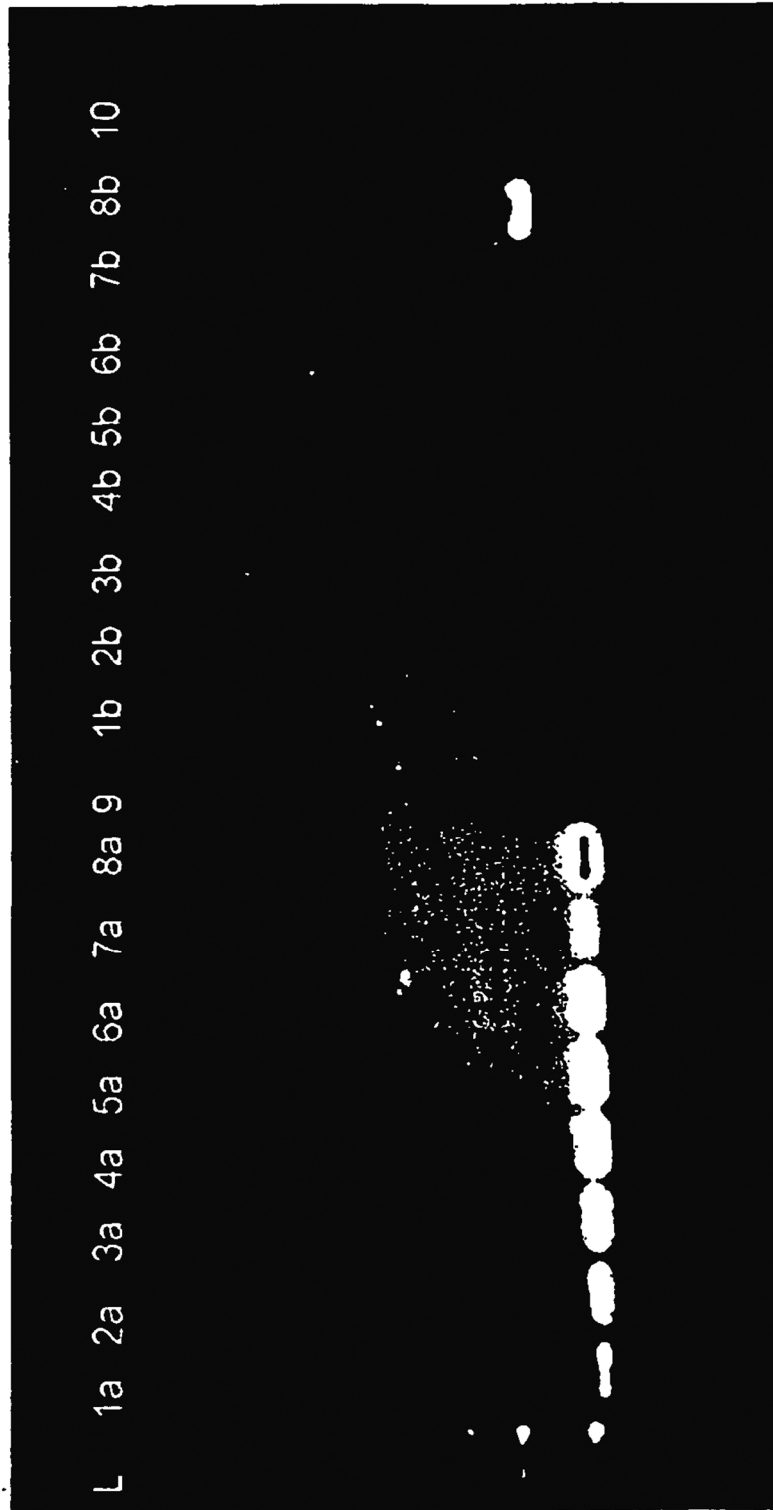


RT-PCR hOct4 + GAPDH



**Fig. 6**

RT-PCR hKlf4 y hNanog



**Fig. 7**

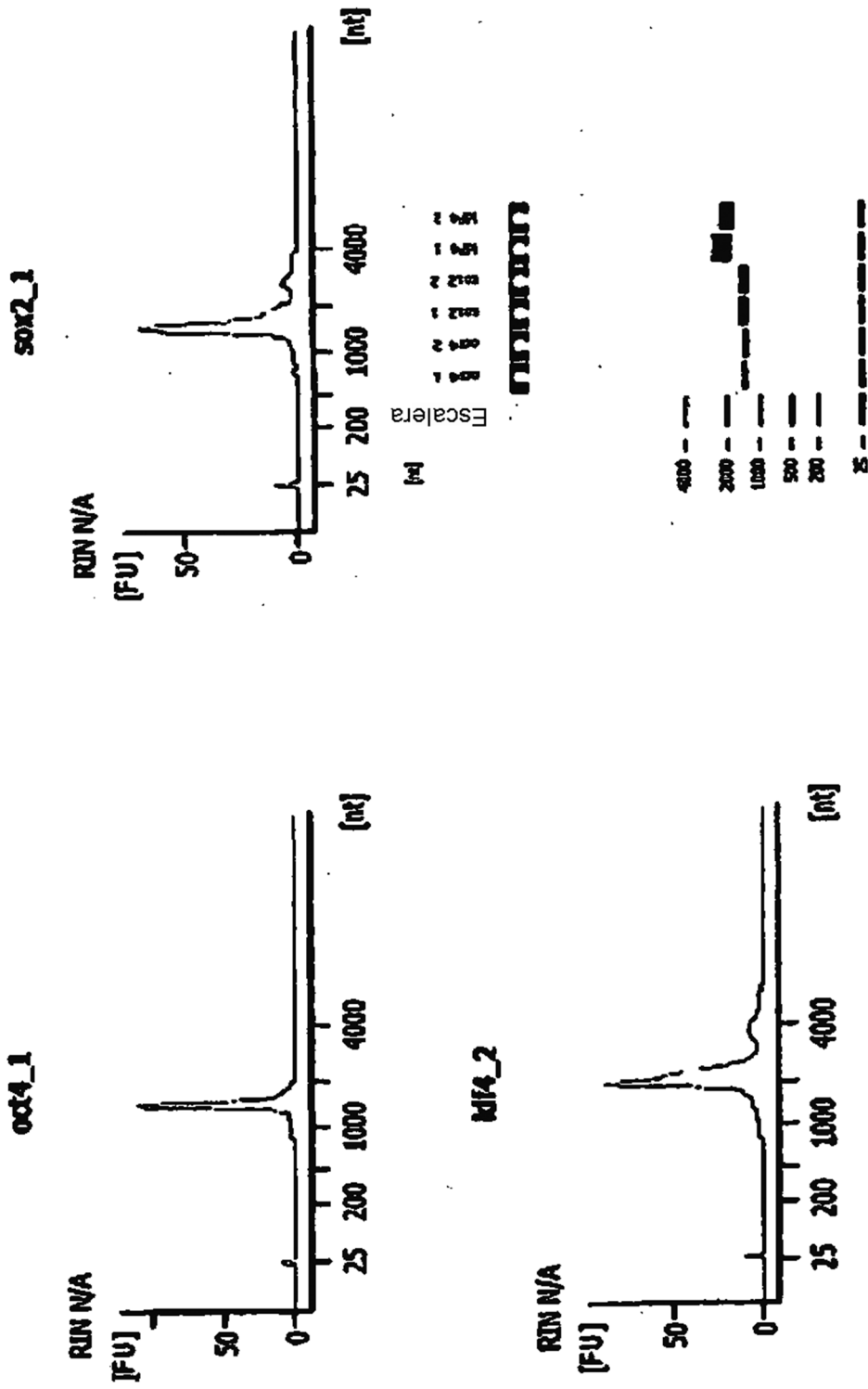


Fig. 8