

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 122**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2008 PCT/US2008/010249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009 WO09032194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008 E 08795697 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2198011**

54 Título: **Estimulación de la ruta de la Wnt en la reprogramación de células somáticas**

30 Prioridad:

31.08.2007 US 967028 P
06.08.2008 US 188190 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2016

73 Titular/es:

**WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL
RESEARCH (100.0%)
Five Cambridge Center
Cambridge, MA 02142-1479, US**

72 Inventor/es:

**CHEVALIER, BRETT;
MARSON, ALEXANDER;
YOUNG, RICHARD, A.;
FOREMAN, RUTH y
JAENISCH, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 589 122 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

Estimulación de la ruta de la Wnt en la reprogramación de células somáticas

5 Financiación gubernamental

La invención descrita en el presente documento fue financiada, en su totalidad o en parte, por las subvenciones 5-RO1-HDO45022, 5-R37-CA084198 y 5-R01-CAO87869 a favor de RJ y por parte de la subvención NIH HG002668 del National Institutes of Health, el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

10

Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica las ventajas de prioridad con la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 60/967.028, presentada el 31 de agosto de 2007 y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 61/188.190, presentada el 6 de agosto de 2008.

15

Antecedentes de la invención

Las células madre son células que son capaces de autorrenovarse y dar lugar a células más diferenciadas. Las células madre embrionarias (ES) pueden diferenciarse en los múltiples tipos celulares especializados que en conjunto forman el cuerpo. Además de presentar un inmenso interés científico, la propiedad de pluripotencialidad proporciona a las células ES humanas una gran proyección clínica para aplicaciones en la medicina regenerativa, tales como las terapias de sustitución de células/tejidos para el tratamiento de enfermedades.

20

Actualmente se usan varios métodos diferentes para la obtención de las células ES. En un método, una línea celular ES deriva de la masa de células internas de un embrión normal en la fase de blastocisto (véanse las Patentes de EE.UU. nº 5.843.780 y 6.200.806, Thompson, J. A. et al. Science, 282: 1145-7, 1998). Un segundo método para la creación de células ES pluripotentes utiliza la transferencia de núcleos de células somáticas (SCNT). En esta técnica se extrae el núcleo de un huevo normal, eliminando así el material genético. Se introduce directamente el núcleo de una célula diploide donante en el ovocito desnucleado, por ejemplo, mediante una micromanipulación, o la célula somática diploide donante se coloca junto al huevo desnucleado y las dos células se fusionan. La célula resultante tiene el potencial de desarrollarse en un embrión temprano a partir del cual puede obtenerse la porción que contiene la masa celular interna productora de la célula madre. En un tercer método se trasplanta el núcleo de una célula humana en un ovocito animal desnucleado de una especie diferente a la de la célula donante. Véase, por ejemplo, la Patente Publicada de EE.UU. nº 20010012513. Las células quiméricas resultantes se usan para la producción de células ES pluripotentes, en particular de células ES pluripotentes pseudohumanas. Los inconvenientes de esta técnica son que estas células quiméricas pueden contener virus desconocidos y conservan las mitocondrias de la especie animal.

25

30

35

40

Los métodos tradicionales de aislamiento de células ES adolecen de diversas limitaciones cuando se aplican a la generación de células ES humanas. Estas incluyen las controversias éticas relacionadas con la fuente de las células, así como los retos técnicos. Una limitación significativa para la utilización productiva de las células ES en aplicaciones clínicas es la dificultad asociada a la generación de células ES que sean genéticamente compatibles con los pacientes individuales. Existe una necesidad significativa de métodos alternativos para la generación de células pluripotentes.

45

Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para la reprogramación de células somáticas de mamífero en células de tipo células madre embrionarias pluripotentes ("células de tipo ES").

50

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para la reprogramación de una célula somática de mamífero, que comprende poner en contacto la célula somática de mamífero con:

- (I) un medio condicionado de Wnt que comprende una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de la proteína Wnt3a secretada; un medio no condicionado que comprende al menos un 5 % en volumen del medio condicionado; o un activador de la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: una proteína Wnt exógena soluble biológicamente activa que se une a un receptor de la Wnt y activa la ruta de la Wnt, y un antagonista de molécula pequeña GSK-3 que activa la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO); N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea (AR-AO 14418); 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 216763); 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD-8); CHIR-911 y CHIR-837; y
- (II) los factores de reprogramación Oct4, Klf4 y Sox2, reprogramando así la célula a un estado pluripotente.

55

60

El método puede comprender el cultivo de la célula somática de mamífero en un medio de cultivo que contiene el activador de la ruta de la Wnt, por ejemplo, durante al menos 10 días. En una realización, el contacto de la célula somática de mamífero con el activador de la ruta de la Wnt y los factores de reprogramación aumenta la cantidad de

65

células somáticas reprogramadas en al menos 5 veces o en al menos 10 veces.

La proteína Wnt exógena soluble biológicamente activa puede ser la Wnt3a.

5 La célula somática de mamífero puede ser una célula humana. En algunas realizaciones, la célula somática de mamífero es una célula diferenciada a término, un fibroblasto, una célula madre neural o una célula progenitora neural. La célula somática de mamífero puede ser modificada para que exprese o contenga al menos un factor de reprogramación en una cantidad mayor de la que habría presente normalmente en ese tipo de células. En algunas realizaciones, la célula somática de mamífero no ha sido modificada genéticamente. En algunas realizaciones la célula somática de mamífero no ha sido modificada genéticamente para que exprese el c-Myc en una cantidad mayor de la que hay presente normalmente en una célula de ese tipo celular.

El método del primer aspecto de la invención puede comprender adicionalmente la confirmación de que la célula reprogramada es pluripotente.

15 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la diferenciación de la célula reprogramada en un tipo celular deseado *in vitro* después de la reprogramación de la célula somática de mamífero. En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo sobre una población de células y comprende adicionalmente la identificación de las células somáticas reprogramadas según los criterios morfológicos para las células ES.

20 En una realización, el método se lleva a cabo sobre una población de células y no comprende la imposición de una selección química para la selección de las células reprogramadas.

En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo sobre una población de células y comprende adicionalmente la separación de las células que están reprogramadas a un estado pluripotente con respecto de las células que no están reprogramadas a un estado pluripotente.

25 En el método del primer aspecto de la invención, el contacto de la célula somática de mamífero con los factores de reprogramación puede comprender la modificación de la célula para que exprese al menos un factor de reprogramación en una cantidad mayor de la que hay presente normalmente en una célula de ese tipo.

30 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para la identificación de un modulador de la ruta de la Wnt útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado de tipo ES que comprende:

(a) el cultivo de una población de células somáticas de mamífero en un medio que contiene el modulador de la ruta de la Wnt, en el que las células están modificadas genéticamente o transfectadas temporalmente para que expresen Oct4, Sox2 y Klf4; y

(b) la determinación, después de un periodo de tiempo adecuado, de la presencia de las células que presentan una o más de las características de las células ES después de mantener las células y su progenie en un cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, en el que el modulador de la ruta de la Wnt es identificado como útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado de tipo ES si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en unas cantidades diferentes a las que se habría esperado si el medio no contuviera el modulador de la ruta de la Wnt.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende:

45 (a) un medio de cultivo celular que contiene un activador de la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: una proteína Wnt que se une a un receptor de la Wnt y activa la ruta de la Wnt y un antagonista de molécula pequeña GSK-3 que activa la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO); N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea (AR-AO 14418); 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 216763); 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD-8); CHIR-911 y CHIR-837; y

50 (b) una célula somática de mamífero, en el que la célula ha sido modificada para que exprese o contenga uno o más factores de reprogramación seleccionados entre el grupo que consiste en: Oct4, Nanog, Sox2, Lin28 y Klf4.

55 En algunas realizaciones, la célula somática de mamífero ha sido modificada para que exprese o contenga unos factores de reprogramación seleccionados entre el grupo que consiste en: (i) Oct4; (ii) Oct 4 y Klf4; y (iii) Oct4, Klf4 y Sox2.

En algunas realizaciones, la célula somática de mamífero no está modificada genéticamente.

60 En ciertas realizaciones, la célula ha sido modificada genéticamente para que contenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador seleccionable, unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno.

El medio de cultivo celular puede comprender un medio condicionado (MC) que comprende una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de proteína Wnt3a secretada.

65 En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición que comprende: una célula madre pluripotente inducida (iPS) y un activador de la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: una proteína Wnt

exógena soluble biológicamente activa que se une a un receptor de la Wnt y activa la ruta de la Wnt, un medio condicionado de Wnt que comprende una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de proteína Wnt3a secretada y un antagonista de molécula pequeña GSK-3 que activa la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO); N-(4-metoxibencil)-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea (AR-AO 14418); 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 216763); 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8); CHIR-911 y CHIR-837.

También se divulga un método para la reprogramación de una célula somática de mamífero que comprende el cultivo de la célula en presencia de una molécula de señalización extracelular de forma que la célula quede reprogramada.

El método puede comprender el cultivo de la célula en un medio de cultivo celular condicionado de Wnt de forma que la célula quede reprogramada. El método puede comprender el cultivo de la célula somática de forma que la célula sea inducida a transformarse en pluripotente. El medio de cultivo celular condicionado de Wnt puede comprender medio condicionado de Wnt3a (MC de la Wnt3a).

También se divulga un método para la reprogramación de una célula somática de mamífero que comprende poner en contacto la célula con un agente que aumenta la actividad de una ruta de la Wnt de forma que la célula sea inducida a transformarse en pluripotente. El agente puede ser una proteína Wnt soluble biológicamente activa, por ejemplo, una proteína Wnt3a. En algunas realizaciones el agente se selecciona entre el grupo que consiste en: (i) moléculas pequeñas que simulan el efecto de un medio condicionado de proteínas Wnt3a o Wnt solubles biológicamente activas, por ejemplo, mediante la interacción con el (los) receptor(es) celular(es) de la Wnt; (ii) agentes que modulan la interacción entre la β -catenina y un miembro de la familia TCF/LEF y/o que modulan la expresión o la actividad de un miembro de la familia TCF/LEF; (iii) agentes que inhiben la expresión o la actividad de un inhibidor endógeno de la ruta de la Wnt.

En el presente documento se divulgan células somáticas reprogramadas mediante el uso de los métodos inventivos.

En el presente documento se divulgan medios de cultivo celular que contienen un activador de la Wnt3a y un agente de reprogramación adicional capaz de sustituir la expresión modificada de Oct4, de Klf4 y/o de Sox2 (o de cualquier combinación de los mismos). Adicionalmente se divulgan (1) una composición que comprende: (i) una célula que ha sido modificada para que aumente su expresión de Oct4, de Klf4 y/o de Sox2, o de cualquier subconjunto de estos; y (ii) un modulador de la ruta de la Wnt, por ejemplo, un activador de la ruta de la Wnt; (2) una composición que comprende: (i) una célula que ha sido modificada para que aumente su expresión o el nivel intracelular de uno o más factores de reprogramación, en la que el (los) factor(es) de reprogramación se selecciona(n) opcionalmente entre Oct4, Klf4 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y (ii) un medio condicionado de Wnt; (3) una composición que comprende: (i) una célula que ha sido modificada para que aumente su expresión o el nivel intracelular de uno o más factores de reprogramación, en la que el (los) factor(es) de reprogramación se selecciona(n) opcionalmente entre Oct4, Nanog, Lin28 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y (ii) un activador de la ruta de la Wnt; y (4) una composición que comprende: (i) una célula que ha sido modificada para que aumente su expresión o el nivel intracelular de uno o más factores de reprogramación, en la que el (los) factor(es) de reprogramación se selecciona(n) opcionalmente entre Oct4, Nanog, Lin28 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y (ii) un medio condicionado de Wnt.

También se divulgan métodos para la identificación de un agente que reprograma células somáticas hacia un estado menos diferenciado y/o contribuye a dicha reprogramación junto con uno o más de otros agentes. En algunos de los métodos, las células somáticas se ponen en contacto con un agente que aumenta la actividad de la ruta de la Wnt y con un agente candidato. Se evalúan las características de pluripotencia de las células. La presencia de al menos un subconjunto de características de pluripotencia indica que el agente es capaz de reprogramar las células somáticas hacia un estado menos diferenciado. Los agentes identificados pueden usarse entonces para la reprogramación de células somáticas poniendo en contacto las células somáticas con los agentes.

También se divulgan en el presente documento métodos para el tratamiento de una afección en un individuo en necesidad de tratamiento para una afección. A partir del individuo pueden obtenerse células somáticas y reprogramarse mediante los métodos de la invención. Las células reprogramadas pueden ser expandidas en un cultivo. Las células reprogramadas pluripotentes (que se refiere a las células originales reprogramadas y/o a su progenie, que conserva la propiedad de pluripotencia) se mantienen en unas condiciones adecuadas para que las células se desarrollen en células de un tipo celular o de una estirpe celular deseados. Las células pueden ser diferenciadas *in vitro* mediante el uso de protocolos tales como los conocidos en la materia. Las células reprogramadas de un tipo celular deseado se introducen en el individuo para el tratamiento de la afección. Las células somáticas obtenidas a partir del individuo pueden contener una mutación en uno o más genes. En estos casos, las células somáticas obtenidas a partir del individuo pueden tratarse en primer lugar para reparar o compensar el defecto, por ejemplo, mediante la introducción de una o más copias naturales del (los) gen(es) en las células de forma que las células resultantes expresen la versión natural del gen. Después, las células se introducen en el individuo.

Las células somáticas obtenidas a partir del individuo pueden ser modificadas para que expresen uno o más genes después de su extracción del individuo. Las células pueden ser modificadas mediante la introducción de un gen o de un casete de expresión que comprende un gen en las células. El gen introducido puede ser uno que sea útil para el fin de identificar, seleccionar y/o generar una celular programada. En ciertas realizaciones el (los) gen(es) introducido(s) contribuye(n) a iniciar y/o a mantener el estado reprogramado. El (los) producto(s) de expresión del (los) gen(es) introducido(s) puede(n) contribuir a producir el estado reprogramado pero es (son) dispensable(s) para el mantenimiento del estado reprogramado.

Algunos de los métodos divulgados en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de individuos en necesidad de un órgano funcional. En los métodos se obtienen células somáticas a partir de un individuo en necesidad de un órgano funcional y se reprograman mediante los métodos de la invención para la producción de células somáticas reprogramadas. Dichas células somáticas reprogramadas se cultivan después en unas condiciones adecuadas para el desarrollo de las células somáticas reprogramadas en un órgano deseado, que después se introduce en el individuo.

También se divulga un método para la reprogramación de una célula somática de mamífero que comprende poner en contacto la célula somática de mamífero con un agente que modula una ruta de la Wnt de forma que la célula somática de mamífero queda reprogramada. El método puede comprender la reprogramación de la célula somática de mamífero a un estado pluripotente. Se divulgan mejoras en los métodos para la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Por ejemplo, los métodos mejoran la reprogramación de células somáticas a pluripotencia que no han sido modificadas para que expresen el c-Myc. Los métodos pueden facilitar la generación de colonias homogéneas de tipo ES y pueden mejorar la formación de colonias homogéneas de tipo ES sin imponer una etapa de selección que requiere la modificación genética de las células somáticas iniciales.

El método puede comprender el cultivo de la célula en un medio condicionado de Wnt, por ejemplo, un medio condicionado de Wnt3a. La célula puede ser una célula humana, una célula de ratón o una célula de un primate no humano. La célula somática de mamífero puede ser una célula diferenciada a término. La célula puede ser un fibroblasto o una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, un linfocito B o T). La célula somática de mamífero puede no ser una célula diferenciada a término. Por ejemplo, la célula somática de mamífero puede ser una célula precursora, por ejemplo, una célula precursora neural o una célula precursora hematopoyética. El método puede llevarse a la práctica *in vitro*. El contacto de la célula puede comprender el cultivo de la célula en un medio de cultivo que contiene el agente. El contacto puede comprender el cultivo de la célula en un medio de cultivo que comprende el agente durante al menos 10 días. El contacto puede comprender el cultivo de la célula en medio de cultivo que comprende el agente durante al menos 12 o al menos 15 días o al menos 20 días. La célula somática puede estar modificada genéticamente para que contenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador seleccionable, unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno, permitiendo así la selección de las células que han sido reprogramadas a una pluripotencia, o la célula somática pueden no estar modificada genéticamente para que contenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador seleccionable unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno, permitiendo así la selección de las células que han sido reprogramadas a una pluripotencia. La célula somática puede estar modificada para que exprese o contenga al menos un factor de reprogramación en una cantidad mayor de la que normalmente hay presente en las células somáticas de ese tipo. El factor de reprogramación puede ser Oct4, Sox2, Klf4, Nanog o Lin28. El (los) factor(es) de reprogramación puede(n) ser Oct4 y Sox2 o Oct4, Sox2 y Klf4. La célula somática puede no estar modificada genéticamente para que exprese el c-Myc en una cantidad mayor de la que normalmente hay presente en las células somáticas de ese tipo celular. La célula también puede ponerse en contacto con un segundo agente que modula la ruta de la Wnt. La célula somática puede ser cultivada en un medio que contiene la proteína Wnt exógena soluble biológicamente activa. La proteína es la proteína Wnt3a. El método puede comprender adicionalmente la confirmación de que la célula reprogramada es pluripotente. El método puede llevarse a la práctica en una población de células y puede comprender la separación de las células que están reprogramadas a un estado pluripotente de las células que no están reprogramadas a un estado pluripotente. El método puede comprender adicionalmente la administración de la célula reprogramada a un sujeto. El método puede comprender la diferenciación de la célula en un tipo celular deseado *in vitro* después de la reprogramación de la célula. El método puede comprender adicionalmente la administración de la célula diferenciada a un sujeto.

También se divulga un método para el tratamiento de un individuo en necesidad del mismo que comprende: (a) la obtención de células somáticas a partir del individuo; (b) la reprogramación de al menos algunas de las células somáticas mediante un método que comprende poner en contacto las células somáticas de mamífero con un agente que modula la ruta de la Wnt (por ejemplo, un activador de la ruta de la Wnt); y (c) la administración de al menos algunas de las células reprogramadas al individuo, opcionalmente después de la diferenciación de las células en uno o más de los tipos celulares deseados. El individuo puede ser un ser humano. El método puede llevarse a la práctica sobre una población de células y puede comprender adicionalmente la separación de las células que están reprogramadas a un estado pluripotente de las células que no están programadas a un estado pluripotente. El método puede comprender adicionalmente la diferenciación de la célula *in vitro* y, opcionalmente, la administración de la célula diferenciada a un individuo en necesidad de tratamiento para una afección para la cual es de utilidad la terapia con células. Por ejemplo, las células pueden estar diferenciadas a lo largo de una estirpe celular deseada, tal como una estirpe neural, una estirpe muscular, etc.

También se divulga una composición que comprende (i) una célula somática de mamífero que ha sido modificada o tratada de forma que expresa o contiene al menos un factor de reprogramación en una cantidad mayor de la que sería el caso sin dicha modificación o tratamiento; y (ii) un agente que aumenta la actividad de una ruta de la Wnt y que contribuye a la reprogramación de la célula somática a un estado pluripotente. El agente puede ser una proteína Wnt3a o una molécula pequeña.

También se divulga un método para la identificación de un agente útil para la modulación de la reprogramación de células somáticas de mamífero a un estado pluripotente que comprende: (a) el cultivo de una población de células somáticas de mamífero en un medio que contiene un agente que modula la actividad de una ruta de la Wnt y un agente candidato; y (b) la determinación, después de un periodo de tiempo adecuado, de si están presentes las células que presentan una o más de las características de las células ES después de mantener las células o su progenie en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, en el que el agente candidato es identificado como útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado pluripotente si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en unas cantidades diferentes a las que se esperaría si el medio no hubiera contenido el agente candidato.

Las características pueden seleccionarse entre: la morfología de la colonia, la expresión de un gen endógeno expresado selectivamente por las células ES, la expresión de un marcador detectable unido operativamente a secuencias de control de la expresión de un gen expresado selectivamente por las células ES, la capacidad para diferenciarse en células que tienen las características del endodermo, del mesodermo y del ectodermo cuando se inyectan en un ratón inmunodeprimido y la capacidad para participar en la formación de quimeras que sobreviven a término. Las células pueden haber sido modificadas para que expresen al menos un factor de reprogramación. El medio puede ser un medio condicionado de Wnt.

El medio puede ser un medio condicionado de Wnt3a. El agente que modula la actividad de una ruta de la Wnt puede ser una proteína Wnt3a o una molécula pequeña. El agente candidato puede ser una molécula pequeña. El método puede comprender la identificación de un agente útil para mejorar la reprogramación de las células somáticas de mamífero, en el que el agente candidato es identificado como útil para mejorar la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado pluripotente si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en una cantidad mayor de la que se habría esperado si el medio no contuviera el agente candidato. La etapa (b) puede comprender la determinación de si las colonias de células que presentan una o más de las características de las colonias de células ES están presentes después de mantener las células y su progenie en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, en el que el agente candidato es identificado como útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado pluripotente si las colonias de células que presentan una o más de las características de las colonias de células ES están presentes en una cantidad diferente a la que se habría esperado si el medio no hubiera contenido el agente candidato. Las células pueden expresar al menos un factor de reprogramación.

También se divulga un método para la identificación de un agente útil para la reprogramación células somáticas de mamífero a un estado pluripotente que comprende: (a) poner en contacto una población de células somáticas de mamífero con un agente que aumenta la actividad de la ruta de la Wnt y un agente candidato; (b) mantener las células en un sistema de cultivo celular durante un periodo de tiempo adecuado; y (c) determinar si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en dicho sistema de cultivo, en el que el agente es identificado como útil para la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado de tipo ES si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en una cantidad mayor de la que se había esperado si las células no hubieran estado en contacto con el agente candidato.

Las características pueden seleccionarse entre: la morfología de la colonia, la expresión de un gen endógeno expresado selectivamente por las células ES, la expresión de un marcador detectable unido operativamente a secuencias de control de la expresión de un gen expresado selectivamente por las células ES, la capacidad para diferenciarse en células que tienen las características del endodermo, del mesodermo y del ectodermo cuando se inyectan en un ratón inmunodeprimido y la capacidad para participar en la formación de quimeras que sobreviven a término.

El agente que aumenta la actividad de la ruta de la Wnt puede ser una proteína Wnt3a. El agente candidato puede ser una molécula pequeña. Las células pueden expresar al menos un factor de reprogramación. La etapa (b) puede comprender la determinación de si las colonias de células que presentan una o más de las características de las colonias de células ES están presentes después de mantener las células y su progenie en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, en el que el agente candidato es identificado como útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado pluripotente si las colonias de células que presentan una o más de las características de las colonias de células ES están presentes en una cantidad diferente a la que se habría esperado si el medio no hubiera contenido el agente candidato.

También se divulga un método para la reprogramación de una célula somática de mamífero que comprende el cultivo de la célula en presencia de una molécula de señalización extracelular de forma que la célula quede reprogramada. Dicha molécula de señalización extracelular puede ser una molécula cuya unión a un dominio

extracelular de un receptor celular inicia o modifica una ruta de transducción de señales en el interior de la célula. La ruta de transducción de señales puede ser la ruta de la Wnt.

También se divulga un método para la identificación de un modulador de la ruta de la Wnt útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado pluripotente que comprende: (a) el cultivo de una población de células somáticas de mamífero en un medio que contiene el modulador de la ruta de la Wnt; (b) la determinación, después de un periodo de tiempo adecuado, de si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes después de mantener las células y su progenie en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, en el que el modulador de la ruta de la Wnt es identificado como útil para la modulación de la reprogramación de las células somáticas de mamífero a un estado pluripotente si las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en una cantidad diferente a la que se había esperado si el medio no hubiera contenido el modulador de la ruta de la Wnt.

El método puede comprender (i) el ensayo de al menos 10 moduladores de la ruta de la Wnt; y (ii) la identificación de uno o más de los moduladores de la ruta de la Wnt por tener un efecto significativamente mayor sobre la velocidad o la eficacia de reprogramación con respecto a al menos el 50 % de los otros moduladores de la ruta de la Wnt ensayados. El método puede comprender el ensayo de al menos 20, al menos 50 o al menos 100 moduladores de la ruta de la Wnt. El método puede comprender la identificación de uno o más de los moduladores de la ruta de la Wnt por tener un efecto significativamente mayor sobre la velocidad o la eficacia de la reprogramación con respecto a al menos el 75 % o al menos el 90 % de los otros moduladores de la ruta de la Wnt ensayados. Los moduladores de la ruta de la Wnt ensayados pueden ser moléculas pequeñas y/o pueden estar relacionados estructuralmente. Por ejemplo, pueden ser miembros de un conjunto de compuestos, por ejemplo, una colección de compuestos de combinación, sintetizados en base a una estructura de núcleo común, o pueden ser derivados obtenidos mediante la modificación de una estructura de núcleo o de un compuesto de partida, tal como mediante la realización de sustituciones o de adiciones en una o más posiciones. El modulador de la ruta de la Wnt puede ser identificado como útil para aumentar la velocidad o la eficacia de la reprogramación de las células a un estado de tipo ES si, después de un periodo de tiempo adecuado, las células que presentan una o más de las características de las células ES están presentes en una cantidad mayor de la que se habría esperado si el medio no hubiera contenido el modulador de la ruta de la Wnt. El modulador de la ruta de la Wnt puede ser identificado como útil para aumentar la velocidad o la eficacia de la reprogramación de las células a un estado pluripotente si, después de un periodo de tiempo adecuado, las colonias de células que presentan una o más de las características de las colonias de células ES están presentes en una cantidad mayor de la que se había esperado si el medio no hubiera contenido el modulador de la ruta de la Wnt. Por ejemplo, los métodos pueden dar como resultado un aumento en el porcentaje de colonias que tienen las características de las colonias de células ES y/o las colonias pueden ser más homogéneas de lo que sería el caso en ausencia del modulador de la ruta de la Wnt.

También se divulga una composición de cultivo celular que comprende: (a) un medio de cultivo celular que contiene un modulador de la ruta de la Wnt; y (b) una pluralidad de células somáticas de mamífero, en la que (i) las células están modificadas genéticamente o transfectadas temporalmente para que expresen uno o más factores de reprogramación; (ii) las células están modificadas genéticamente para que contengan una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador seleccionable, unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno, permitiendo así la selección de las células que han sido reprogramadas a pluripotencia; o (iii) el medio de cultivo celular contiene una o más moléculas pequeñas, ácidos nucleicos o polipéptidos que sustituyen a un factor de reprogramación distinto al c-Myc.

El medio de cultivo celular puede comprender MC de la Wnt-3a. El medio puede contener una molécula pequeña que modula la ruta de la Wnt.

El uno o más factores de reprogramación puede(n) seleccionarse entre: Oct4, Nanog, Sox2, Lin28 y Klf4. También se divulga una composición que comprende: una célula iPS y un agente que modula, por ejemplo, que activa, la ruta de la Wnt. El agente que activa la ruta de la Wnt puede ser una proteína Wnt3a o una molécula pequeña.

También se divulga el uso de un agente que modula una ruta de la Wnt en la preparación de un medicamento para la reprogramación de una célula somática de mamífero.

Se contempla que todas las realizaciones descritas en el presente documento sean aplicables a los diversos aspectos de la invención. También se contempla que las diversas realizaciones de la invención y los elementos de las mismas puedan combinarse con una o más de otras de dichas realizaciones y/o elementos siempre que sea apropiado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La Wnt3a promueve la reprogramación epigenética, a. Representación esquemática de la línea temporal experimental. Se infectaron MEF con lentivirus inducibles con DOX, se dividieron en cultivos con y sin un tratamiento con MC de la Wnt3 y después se indujeron con DOX (día 0). La selección con G418 se inició en unos puntos temporales fijos después de la inducción, y el tratamiento con el MC de la Wnt3a se mantuvo

durante 7 días de selección. La DOX y la G418 se mantuvieron hasta que se evaluaron las colonias resistentes, b. Recuentos de las colonias resistentes a la G418 a partir de los MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc en medio de células ES estándar o con un tratamiento con el MC de la Wnt3a. c. Imágenes de fase de las colonias resistentes a la G418 formadas con y sin un tratamiento con el MC de la Wnt3a. d. Recuentos de las colonias resistentes a la G418 a partir de los MEF infectados con una combinación diferente de factores de reprogramación en presencia y en ausencia del MC de la Wnt3a. Aparecieron colonias resistentes a la G418 sin una transducción con c-Myc en presencia de MC de la Wnt3a. e. Imagen de fase de la colonia resistente a la G418 Myc[-] formada con un tratamiento con MC de la Wnt3a. En este experimento no se observaron colonias para las células Myc[-] en ausencia de MC de la Wnt3a. f. Recuentos de colonias resistentes a la G418 a partir de los MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4 (Myc[-]) u Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc (Myc[+]) en presencia (barras rojas) y en ausencia (barras grises) de MC de la Wnt3a. La selección con G418 se inició el día 5 o el día 10 posterior a la inducción, según se indica, y las colonias (en un área de 32 cm²) fueron evaluadas el día 20. g. Gráficas de dispersión que comparan la intensidad de la GFP a autofluorescencia, mediante el uso de una citometría de flujo, en células Oct4-GFP el día 20 posterior a la inducción de Oct4/Sox2/Klf4, revelan una población de las células que expresa la GFP (indicada con una flecha) únicamente con un tratamiento con el MC de la Wnt3a. h. Imagen de fase de las células Myc[-] que expresan la GFP derivadas con un tratamiento con el MC de la Wnt3a y sin ninguna selección genética.

Figura 2. Inducción de pluripotencia en células Wnt estimuladas, a-d. La inmunotinción revela la inducción de los marcadores de pluripotencia, Nanog (a-b) y SSEA-1 (c-d) en células Myc[-] tratadas con el MC de la Wnt3a, por ejemplo. Las líneas Myc[-] tratadas con el MC de la Wnt3a formaron teratomas cuando se inyectaron por vía subcutánea en ratones SCID. Los teratomas de las líneas iPS Oct4/Sox2/Klf4/MC de la Wnt3a mostraban signos de células diferenciadas de las tres capas germinales similares a los teratomas formados a partir de las inyecciones de V6.5 mES. Las fechas indicaban el tejido neural en (e), cartílago en (f) y células endodérmicas en (g), h. Las líneas iPS Oct4/Sox2/Klf4/MC de la Wnt3a derivadas sin selección dieron lugar a ratones quiméricos (según se muestra a la izquierda) con un color de pelaje agouti y ojos pigmentados (a diferencia del ratón natural Balb/c, a la derecha), proporcionando pruebas de la contribución a las células somáticas. El color del pelaje de la descendencia confirmó que la línea iPS Oct4/Sox2/Klf4/MC de la Wnt3a aquí generada es germinalmente competente (datos no mostrados).

Figura 3. La estimulación con Wnt/ β -catenina mejora la formación de colonias iPS en ausencia de retrovirus c-Myc, a. Se muestran los recuentos de las colonias resistentes a la G418 en los MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4 cultivadas en medio de células ES, en medio condicionado de MEF, en medio condicionado que sobreexpresa la Wnt3a y en medio condicionado que sobreexpresa la Wnt3a con ICG001 (4 μ M). La selección se inició el día 15 posterior a la inducción y las colonias fueron evaluadas el día 28. El tratamiento con el MC de la Wnt3a se mantuvo hasta el día 22. Se muestra el número medio de recuentos a partir de los experimentos por triplicado, indicando las barras de error la D. T. b. Se muestran los recuentos de las colonias resistentes a la G418 (en un área de 32 cm²) en los MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc cultivadas en medio de células ES, en medio condicionado que sobreexpresa la Wnt3a y en medio condicionado que sobreexpresa la Wnt3a con ICG-001 (4 μ M). La selección se inició el día 10 posterior a la inducción, el MC de la Wnt3a se mantuvo hasta el día 17 y las colonias fueron evaluadas el día 20. c. La estimulación con Wnt promueve la formación de células iPS en ausencia de una transducción c-Myc. Esto podría ser debido a: i) una regulación directa por parte de la ruta de la Wnt de los factores de pluripotencia endógenos clave, tales como Oct4, Sox2 y Nanog según sugieren los estudios canónicos en células ES (Cole et al., 2008), ii) una activación del Myc endógeno inducida por la ruta de la Wnt (He et al., 1998; Cole et al., 2008), o por otros genes de proliferación celular, acelerando el proceso secuencial de formación de colonias de iPS.

Figura 4. (a) Línea temporal de los experimentos iniciales que muestran la capacidad del medio condicionado de Wnt3a para promover la generación de células iPS. La expresión de los factores inductores de pluripotencia se indujo el día 2. La expresión de la GFP y la formación de colonias fueron evaluadas según se indica (b). La Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc; Fig. 4 C. La Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 sin ninguna modificación en la expresión de c-Myc; (c) la Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 sin ninguna modificación en la expresión de c-Myc.

Figura 5. Estructura del ICG-001.

Descripción detallada de la invención

Introducción y definiciones

La presente invención se refiere a composiciones y a métodos para la reprogramación de células somáticas de mamífero a pluripotencia *in vitro*. También se divulgan métodos para la reprogramación de células somáticas de mamífero a un estado menos diferenciado. Las células resultantes se denominan en el presente documento "células somáticas reprogramadas" ("RSC") en el presente documento, o células madre pluripotentes inducidas (iPS) si se han reprogramado a un estado pluripotente. El término "célula somática" se refiere a cualquier célula distinta a una célula germinativa, una célula presente en, u obtenida a partir de, un embrión antes de la implantación, o una célula resultante de una proliferación de dicha célula *in vitro*. En algunas realizaciones la célula somática es una "célula somática no embrionaria", por lo que se entiende una célula somática que no está presente en, ni se obtiene a partir de, un embrión, y que no es el resultado de una proliferación de dicha célula *in vitro*. En algunas realizaciones la

célula somática es una "célula somática adulta", por lo que se entiende una célula que está presente en, o se obtiene a partir de, un organismo distinto a un embrión o un feto, o es el resultado de la proliferación de dicha célula *in vitro*. Salvo que se indique de otro modo, los métodos para la reprogramación de las células a un estado menos diferenciado se llevan a cabo *in vitro*, es decir, se realizan mediante el uso de células somáticas aisladas mantenidas en cultivo.

La invención engloba el reconocimiento de que las moléculas de señalización naturales que modulan la expresión de los factores de transcripción endógenos de las células ES son unos candidatos prometedores como agentes solubles que mejoran la reprogramación. La invención también incluye el reconocimiento de que la modulación de las rutas biológicas con las que dichas moléculas de señalización naturales interactúan es de utilidad para mejorar (por ejemplo, para aumentar la velocidad y/o la eficacia de) la reprogramación. La invención también incluye el reconocimiento de que los agentes (tanto naturales como sintéticos, por ejemplo, moléculas pequeñas) que modulan las rutas biológicas con las que dichas moléculas de señalización naturales interactúan, son candidatos prometedores como agentes solubles que mejoran la reprogramación.

Como se describe con más detalle a continuación, ciertas realizaciones de la invención se basan al menos en parte en el reconocimiento de que la modulación, por ejemplo, la activación, de la ruta de la Wnt, es de utilidad en la reprogramación de células somáticas. Algunos de los métodos comprenden un aumento de la actividad de la ruta de la Wnt en células somáticas de forma que al menos algunas de las células queden reprogramadas, por ejemplo, a un estado pluripotente. Algunos de los métodos comprenden el cultivo de células somáticas en un medio condicionado de Wnt de forma que al menos algunas de las células queden reprogramadas, por ejemplo, a un estado pluripotente.

La reprogramación, según se usa en el presente documento, se refiere a un proceso que altera o revierte el estado de diferenciación de una célula somática. La célula puede estar diferenciada parcial o terminalmente antes de la reprogramación. La reprogramación engloba una reversión completa del estado de diferenciación de una célula somática a un estado pluripotente. Como se sabe en la materia, una célula "pluripotente" tiene la capacidad de diferenciarse en, o dar lugar a, células derivadas de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) y normalmente tiene el potencial de dividirse *in vitro* durante un largo periodo de tiempo, por ejemplo, mayor de un año o mayor de 30 pases. Las células ES son un ejemplo de células pluripotentes. La reprogramación también incluye una reversión parcial del estado de diferenciación de una célula somática a un estado multipotente. Una célula "multipotente" es una célula que es capaz de diferenciarse en algunas, pero no en todas, las células derivadas de las tres capas germinales. Por lo tanto, una célula multipotente es una célula parcialmente diferenciada. Las células madre adultas son células multipotentes. Las células madre adultas incluyen, por ejemplo, células madre hematopoyéticas y células madre neurales. La reprogramación también incluye una reversión parcial del estado de diferenciación de una célula somática a un estado que hace que las células sean más susceptibles a una reprogramación completa a un estado pluripotente cuando se someten a manipulaciones adicionales tales como las descritas en el presente documento. Dicho contacto puede dar como resultado la expresión de unos genes en particular por parte de las células, expresión que contribuye a la reprogramación. En el primer aspecto de la invención, la reprogramación de una célula somática de mamífero provoca que la célula somática asuma un estado pluripotente, de tipo ES. Las células resultantes se denominan en el presente documento células somáticas pluripotentes reprogramadas o células madre pluripotentes inducidas (iPS).

La reprogramación implica una alteración, por ejemplo, una reversión, de al menos algunos de los patrones heredables de la modificación de un ácido nucleico (por ejemplo, una metilación), condensación de la cromatina, cambios epigenéticos, sellado genómico, etc., que se producen durante la diferenciación celular según se desarrolla el cigoto en un adulto. La reprogramación es distinta a mantener simplemente el estado no diferenciado ya existente de una célula que ya es pluripotente o a mantener el estado ya existente menor de completamente diferenciado de una célula que ya es una célula multipotente (por ejemplo, una célula madre hematopoyética). La reprogramación también es distinta a promover la autorrenovación o la proliferación de las células que ya son pluripotentes o multipotentes, aunque las composiciones y los métodos de la invención también pueden ser de utilidad para dichos fines. Algunas de las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento contribuyen al establecimiento del estado pluripotente. Los métodos pueden llevarse a la práctica sobre células que están completamente diferenciadas y/o restringirse para dar lugar únicamente a células de un tipo en particular, en lugar de a células que ya son multipotentes o pluripotentes.

Las células somáticas se tratan de cualquiera de una diversidad de formas para provocar una reprogramación según los métodos divulgados en el presente documento. El tratamiento puede comprender poner en contacto las células con uno o más agente(s) que contribuye(n) a la reprogramación ("agente de reprogramación"). Dicho contacto puede llevarse a cabo manteniendo la célula en un medio de cultivo que comprende el (los) agente(s). En algunas realizaciones las células somáticas están modificadas genéticamente. La célula somática puede estar modificada genéticamente para que exprese uno o más agentes de reprogramación según se describe adicionalmente a continuación.

En los métodos de la presente invención las células somáticas pueden cultivarse, en general, en unas condiciones convencionales de temperatura, pH y otras condiciones ambientales, por ejemplo, en forma de células adherentes

en placas de cultivo tisular a 37 °C en una atmósfera que contenga un 5-10 % de CO₂. Las células y/o el medio de cultivo son modificados apropiadamente para conseguir la reprogramación según se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, las células somáticas se cultivan en o en presencia de un material que simula uno o más características de la matriz extracelular o que comprende uno o más componentes de la matriz extracelular o de la membrana basal. En algunas realizaciones se usa Matrigel™. Otros materiales incluyen proteínas o mezclas de las mismas, tales como gelatina, colágeno, fibronectina, etc. En ciertas realizaciones de la invención las células somáticas se cultivan en presencia de una capa de alimentación de las células. Dichas células pueden ser, por ejemplo, de origen murino o humano. Pueden ser irradiadas, inactivadas químicamente mediante un tratamiento con un inactivador químico tal como mitomicina c, o tratadas de otro modo para inhibir su proliferación si se desea. En otras realizaciones las células somáticas se cultivan sin células de alimentación.

La generación de células pluripotentes o multipotentes mediante la reprogramación de células somáticas usando los métodos de la presente invención tiene diversas ventajas. En primer lugar, los métodos de la presente invención nos permiten la generación de células pluripotentes autólogas, que son las células específicas y genéticamente compatibles con un individuo. Las células derivan de células somáticas obtenidas a partir del individuo. En general, es menos probable que las células autólogas se vean sometidas a un rechazo inmunológico que las células no autólogas. En segundo lugar, los métodos de la presente invención permiten al artesano la generación de células pluripotentes sin el uso de embriones, ovocitos y/o de la tecnología de transferencia nuclear. Los resultados de los Solicitantes demuestran que (i) las células somáticas pueden ser reprogramadas a un estado de tipo ES sin la necesidad de modificar las células para que expresen un oncogén, tal como c-Myc; y (ii) la reprogramación de células somáticas puede efectuarse al menos en parte mediante un medio distinto a la modificación de las células para que expresen los factores de reprogramación, es decir, poniendo en contacto las células con un agente de reprogramación distinto a un ácido nucleico o a un vector vírico capaz de ser captado y de provocar una modificación genética estable en las células. En particular, la invención engloba el reconocimiento de que las moléculas de señalización extracelular, por ejemplo, las moléculas que cuando están presentes se unen extracelularmente a los receptores de la superficie de la célula y activan cascadas de transducción de señales intracelulares, son de utilidad para la reprogramación de células somáticas. La invención engloba adicionalmente el reconocimiento de que la activación de dichas rutas de señalización mediante un medio distinto a la aplicación de unas moléculas de señalización extracelular también es de utilidad en la reprogramación de células somáticas. Además, los métodos de la presente invención mejoraron la formación de colonias de células de tipo ES que eran detectables basándose en criterios morfológicos, sin la necesidad de emplear un marcador seleccionable. La presente divulgación refleja por tanto varias ventajas fundamentalmente importantes en el área de la tecnología de reprogramación de células somáticas *in vitro*.

A continuación se presentan las definiciones de algunos términos útiles para la comprensión de los aspectos de la invención:

"Agente" según se usa en el presente documento significa cualquier compuesto o sustancia tal como, pero no se limitan a, una molécula pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido, un péptido, un fármaco, un ión, etc.

Un "medio de cultivo celular" (denominado también en el presente documento "medio de cultivo" o "medio") es un medio para el cultivo de células que contiene nutrientes que mantienen la viabilidad celular y apoyan la proliferación. El medio de cultivo celular puede contener cualquiera de los siguientes en una combinación apropiada: sal(es), tampón(es), aminoácidos, glucosa u otro(s) azúcar(es), antibióticos, suero o un sustituto del suero, y otros componentes tales como factores de crecimiento peptídicos, etc. El medio de cultivo celular usado habitualmente para los tipos celulares en particular es conocido por los expertos en la materia. En el presente documento se proporcionan algunos ejemplos no limitantes.

"Línea celular" se refiere a una población de células ampliamente o sustancialmente idénticas que típicamente deriva de una única célula ancestral o de una población definida de células ancestrales idénticas y/o sustancialmente idénticas. La línea celular puede haber sido o puede ser susceptible de ser mantenida en un cultivo durante un periodo prolongado (por ejemplo, meses, años, durante un periodo de tiempo ilimitado). Puede haber experimentado un proceso de transformación espontáneo o inducido que le confiere a las células una esperanza de vida en cultivo ilimitada. Las líneas celulares incluyen todas aquellas líneas reconocidas en la materia como tales. Se apreciará que las células adquieren mutaciones y posiblemente cambios epigenéticos con el tiempo, de forma que al menos algunas de las propiedades de las células individuales de una línea celular pueden diferir entre sí.

El término "exógena" se refiere a una sustancia presente en una célula o en un organismo distinto a su fuente natural. Por ejemplo, los términos "ácido nucleico exógeno" o "proteína exógena" se refieren a un ácido nucleico o a una proteína que han sido introducidos mediante un proceso que implica la intervención humana en un sistema biológico, tal como una célula o un organismo, en el que normalmente no se encuentran o en el que se encuentran en unas cantidades menores. Una sustancia se considerará exógena si es introducida en una célula o en un ancestro de la célula que hereda la sustancia. Por el contrario, el término "endógena" se refiere a una sustancia que es natural en el sistema biológico.

"Expresión" se refiere a los procesos celulares implicados en la producción de ARN y de proteínas, y según sea apropiado, en la secreción de proteínas, incluyendo, cuando sea aplicable, pero no se limita a, por ejemplo, la transcripción, la traducción, el plegamiento, la modificación y el procesado. Los "productos de expresión" incluyen el ARN transcrito a partir de un gen y los polipéptidos obtenidos mediante la traducción del ARNm transcrito a partir de un gen.

Una célula "modificada genéticamente" o "modificada" según se usa en el presente documento se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico exógeno mediante un proceso que implica la intervención humana (o a un descendiente de dicha célula que ha heredado al menos una porción del ácido nucleico). El ácido nucleico puede contener, por ejemplo, una secuencia que es exógena a la célula, puede contener secuencias naturales (es decir, secuencias que se encuentran de forma natural en las células) pero en una disposición que no es natural (por ejemplo, una región codificante unida a un promotor de un gen diferente) o versiones alteradas de las secuencias naturales, etc. El proceso de transferir el ácido nucleico a la célula puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada. Algunas técnicas adecuadas incluyen una transfección mediada por fosfato de calcio o por lípidos, una electroporación y una transducción o una infección mediante el uso de un vector vírico. En algunas realizaciones, el polinucleótido o una porción del mismo se integran en el genoma de la célula. El ácido nucleico puede haber sido posteriormente eliminado o escindido del genoma, siempre que dicha eliminación o escisión dé como resultado una alteración detectable en la célula con respecto a una célula no modificada pero por lo demás equivalente.

"Identidad" se refiere al grado en el que la secuencia de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos es la misma. El porcentaje de identidad entre una secuencia de interés y una segunda secuencia en una ventana de evaluación, por ejemplo, a lo largo de la longitud de la secuencia de interés, puede ser calculado mediante la alineación de las secuencias, determinando el número de residuos (nucleótidos o aminoácidos) dentro de la ventana de evaluación que son opuestos a un residuo idéntico que permite la introducción de huecos para maximizar la identidad, dividiendo el número total de residuos de la secuencia de interés o de la segunda secuencia (la que sea mayor) que está en el interior de la ventana, y multiplicando por 100. Cuando se calcula número de residuos idénticos necesario para conseguir un porcentaje de identidad en particular, las fracciones se redondean al número entero más cercano. El porcentaje de identidad puede calcularse mediante el uso de diversos programas informáticos conocidos en la materia. Por ejemplo, los programas informáticos tales como BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, etc., generan alineaciones y proporcionan un porcentaje de identidad entre las secuencias de interés. El algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 22264-2268, 1990) modificado según Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.90: 5873-5877, 1993 se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Para la obtención de alineamientos con huecos con fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST según se describe en Altschul et al. (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas. Puede usarse una matriz PAM250 o BLOSUM62. El programa informático para la realización de los análisis BLAST está disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Véase la página web con la siguiente dirección URL www.ncbi.nlm.nih.gov para estos programas. En una realización específica, el porcentaje de identidad se calcula mediante el uso de BLAST2 con los parámetros por defecto proporcionados por el NCBI.

"Aislado" o "parcialmente purificado" según se usa en el presente documento se refiere, en el caso de un ácido nucleico o de un polipéptido, a un ácido nucleico o a un polipéptido separado de al menos otro componente (por ejemplo, de un ácido nucleico o de un polipéptido) que está presente con el ácido nucleico o con el polipéptido como se encuentra en su fuente natural y/o que estaría presente en el ácido nucleico o en el polipéptido cuando es expresado por una célula, o secretado en el caso de los polipéptidos secretados. Un ácido nucleico o un polipéptido sintetizado químicamente o aquel que sea sintetizado mediante el uso de una transcripción/traducción *in vitro* se considera "aislado". Una "célula aislada" es una célula que ha sido extraída de un organismo en el que se encontraba originalmente o de un descendiente de dicha célula. Opcionalmente, la célula se ha cultivado *in vitro*, por ejemplo, en presencia de otras células. Opcionalmente, la célula es introducida posteriormente en un segundo organismo o reintroducida en el organismo a partir del cual se aisló (o en la célula de la cual desciende).

El término "gen cuya función está asociada con pluripotencia", según se usa en el presente documento, se refiere a un gen cuya expresión se produce en condiciones normales (por ejemplo, en ausencia de una modificación genética o de otra manipulación diseñada para alterar la expresión génica) y típicamente está restringida a las células madre pluripotentes, y es crucial para su identidad funcional como tales. Se apreciará que un polipéptido codificado por un gen asociado funcionalmente con pluripotencia puede estar presente como un factor materno en el ovocito. El gen puede ser expresado por algunos algunas de las células del embrión, por ejemplo, a lo largo de al menos una porción del periodo de preimplantación y/o en los precursores de las células germinativas del adulto.

"Modular" se usa coherentemente con su uso en la materia, es decir, significa causar o facilitar un cambio, una alteración o una modificación cualitativa o cuantitativa en un proceso, una ruta o un fenómeno de interés. Sin limitación, dicho cambio puede ser un aumento, una disminución o un cambio en la fuerza relativa o en la actividad de los diferentes componentes o ramas del proceso, la ruta o el fenómeno. Un "modulador" es un agente que causa o facilita un cambio, una alteración o una modificación cualitativa o cuantitativa en un proceso, una ruta o un

fenómeno de interés.

El término "factor de pluripotencia" se usa para referirse al producto de la expresión de un gen cuya función está asociada con pluripotencia, por ejemplo, un polipéptido codificado por el gen. Opcionalmente, el factor de pluripotencia es aquel que normalmente no es sustancialmente expresado en los tipos celulares somáticos que constituyen el cuerpo de un animal adulto (con la excepción de las células germinativas o de los precursores de las mismas). Por ejemplo, el factor de pluripotencia puede ser aquel cuyo nivel medio en las células ES sea al menos 50 veces o 100 veces mayor que su nivel medio en aquellos tipos celulares diferenciados a término presentes en el cuerpo de un mamífero adulto. Opcionalmente, el factor de pluripotencia es aquel que es esencial para el mantenimiento de la viabilidad o del estado pluripotente de las células ES *in vivo* y/o de las células ES derivadas mediante el uso de métodos convencionales. Por lo tanto, si el gen que codifica para el factor es inactivado o inhibido (es decir, su expresión se elimina o se reduce sustancialmente), no se forman las células ES, mueren o se diferencian. Opcionalmente, la inhibición de la expresión de un gen cuya función está asociada con pluripotencia en una célula ES (que da como resultado, por ejemplo, una reducción en el nivel de estado estacionario medio del transcrito del ARN y/o de la proteína codificada por el gen en al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más) da como resultado una célula que es viable pero que ya no es pluripotente. Opcionalmente, el gen se caracteriza porque su expresión en una célula ES disminuye (dando como resultado, por ejemplo, una reducción en el nivel de estado estacionario medio del transcrito del ARN y/o de la proteína codificada por el gen en al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más) cuando la célula se diferencia en una célula diferenciada a término.

Un "gen inductor de pluripotencia", según se usa en el presente documento, se refiere a un gen cuya expresión contribuye a la reprogramación de las células somáticas hacia un estado pluripotente. "Factor inductor de pluripotencia" se refiere a un producto de la expresión de un gen inductor de pluripotencia. Un factor inductor de pluripotencia puede ser, pero no necesariamente, un factor de pluripotencia. La expresión de un factor inductor de pluripotencia introducido exógenamente puede ser temporal, es decir, puede ser necesaria durante al menos una porción del proceso de reprogramación con objeto de inducir pluripotencia y/o de establecer un estado pluripotente estable, pero después ya no es necesario para el mantenimiento de la pluripotencia. Por ejemplo, el factor puede inducir la expresión de genes endógenos cuya función está asociada con pluripotencia. Estos genes pueden mantener después las células reprogramadas en un estado pluripotente.

"Polinucleótido" se usa en el presente documento de forma intercambiable con "ácido nucleico" para indicar un polímero de nucleósidos. Típicamente, un polinucleótido de esta invención está formado por nucleósidos que se encuentran de forma natural en el ADN o en el ARN (por ejemplo, adenosina, timidina, guanósina, citadina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina) unidos por enlaces fosfodiéster. Sin embargo, el término engloba moléculas que comprenden nucleósidos o análogos de nucleósidos que contienen bases modificadas químicamente o biológicamente, esqueletos modificados, etc., ácidos nucleicos tanto si se encuentran en la naturaleza como si no, y dichas moléculas pueden ser preferidas para ciertas aplicaciones. Cuando esta solicitud se refiere a un polinucleótido se entiende que se proporcionan tanto ADN como ARN, y en cada caso tanto en la forma monocatenaria como bicatenaria (y los complementos de cada molécula monocatenaria). "Secuencia de polinucleótidos" según se usa en el presente documento puede referirse al propio material del polinucleótido y/o a la información de la secuencia (es decir, la sucesión de letras usadas como abreviaturas de las bases) que caracterizan bioquímicamente a un ácido nucleico específico. Una secuencia de polinucleótidos presentada en el presente documento se presenta en la dirección 5' a 3' salvo que se indique de otro modo.

"Polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos. Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Un péptido es un polipéptido relativamente corto, típicamente de entre aproximadamente 2 y 60 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos usados en el presente documento contienen típicamente aminoácidos tales como los 20 L-aminoácidos que se encuentran más habitualmente en las proteínas. Sin embargo, pueden usarse otros aminoácidos y/o análogos de aminoácidos conocidos en la materia. Uno o más de los aminoácidos de un polipéptido pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo ácido graso, un conector para conjugación, funcionalización, etc. Un polipéptido que tiene una fracción no polipeptídica asociada covalentemente o no covalentemente con el mismo todavía se considera un "polipéptido". Algunos ejemplos de modificaciones incluyen una glicosilación y una palmitoilación. Los polipéptidos pueden ser purificados a partir de fuentes naturales, producidos mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante, sintetizados mediante medios químicos tales como una síntesis peptídica en fase sólida convencional, etc. El término "secuencia de polipéptidos" o "secuencia de aminoácidos" según se usa en el presente documento puede referirse al propio material del polipéptido y/o a la información de la secuencia (es decir, la sucesión de letras o de códigos de tres letras usadas como abreviaturas de los nombres de los aminoácidos) que caracterizan bioquímicamente a un polipéptido. Una secuencia de polipéptidos presentada en el presente documento se presenta en una dirección desde el N-terminal hacia el C-terminal salvo que se indique de otro modo.

"Variante de un polipéptido" se refiere a cualquier polipéptido que difiere de un polipéptido natural mediante inserción(es), deleción(es) y/o sustitución(es) de aminoácidos. Las variantes pueden ser naturales o crearse mediante el uso de, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante o una síntesis química. Opcionalmente, las

"sustituciones" de aminoácidos son el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene unas propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones "conservativas" de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de la similitud de cualquiera de las diversas propiedades tales como el tamaño de la cadena lateral, la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofilia y/o anfipaticidad de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares neutros (hidrófilos) incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las inserciones o las deleciones pueden variar en tamaño desde aproximadamente 1 hasta 20 aminoácidos, por ejemplo, desde 1 hasta 10 aminoácidos. En algunos casos pueden eliminarse dominios mayores sin afectar sustancialmente a la función. Opcionalmente, la secuencia de una variante puede obtenerse mediante la realización de más de un total de 5, 10, 15 o 20 adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de una enzima natural. Opcionalmente, no más del 1 %, del 5 %, del 10 % o del 20 % de los aminoácidos de un polipéptido son inserciones, deleciones o sustituciones con respecto al polipéptido original. Puede obtenerse una guía sobre la determinación de qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, añadidos o deleccionados sin eliminar o reducir sustancialmente las actividades de interés mediante la comparación de la secuencia del polipéptido en particular con la de polipéptidos homólogos (por ejemplo, de otros organismos) y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en las regiones de alta homología (regiones conservadas) o mediante la sustitución de los aminoácidos por los que se encuentran en las secuencias homólogas, ya que es más probable que los residuos de aminoácidos que están conservados entre diversas especies sean importantes para la actividad que los aminoácidos que no están conservados.

"Purificado" o "sustancialmente purificado" según se usa en el presente documento indica que el ácido nucleico o el polipéptido indicado está presente en una ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas, y similares. En una realización, el polinucleótido o el polipéptido está purificado, de forma que constituye al menos el 90 % en peso, por ejemplo, al menos el 95 % en peso, por ejemplo, al menos el 99 % en peso, del (los) polinucleótido(s) o del (los) polipéptido(s) presente(s) (pero puede haber presente agua, tampones, iones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas con un peso molecular menor de 1.000 daltons).

"ARN interferente" se usa en el presente documento coherentemente con su significado en la materia para referirse a un fenómeno mediante el cual el ARN bicatenario (ARNbc) desencadena la degradación específica de la secuencia o la represión de la traducción de un correspondiente ARNm que presenta complementariedad con una hebra del ARNbc. Se apreciará que no es necesario que la complementariedad entre la hebra del ARNbc y el ARNm sea del 100 %, solo necesita ser lo suficiente como para mediar en la inhibición de la expresión génica (denominada también "silenciamiento" o "inactivación"). Por ejemplo, el grado de complementariedad es tal que la hebra puede (i) guiar la escisión del ARNm en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC); o (ii) usar una represión de la traducción del ARNm. En ciertas realizaciones, la porción bicatenaria del ARN es menor de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 17 y 29 nucleótidos de longitud. En las células de mamífero, el ARNi puede conseguirse mediante la introducción de un ácido nucleico bicatenario apropiado en las células o mediante la expresión de un ácido nucleico en las células que a continuación es procesado intracelularmente para producir en la misma el ARNbc. Los ácidos nucleicos capaces de mediar el ARNi se denominan en el presente documento "agentes de ARNi". Algunos ejemplos de ácidos nucleicos capaces de mediar el ARNi son un ARN de horquilla corta (ARNhc), un ARN interferente corto (ARNic) y un precursor de un microARN. Todos estos términos son bien conocidos y se usan en el presente documento coherentemente con su significado en la materia. Los ARNic comprenden típicamente dos hebras de ácidos nucleicos individuales que hibridan entre sí para formar un dúplex. Pueden ser sintetizados *in vitro*, por ejemplo, mediante el uso de las técnicas sintéticas habituales de ácidos nucleicos. Pueden comprender una amplia variedad de nucleósidos modificados, de análogos de nucleósidos, y pueden comprender bases modificadas química o biológicamente, esqueletos modificados, etc. Puede usarse cualquier modificación reconocida la materia como útil para el ARNi. Algunas modificaciones dan como resultado un aumento en la estabilidad, en la captación celular, en la potencia, etc. En ciertas realizaciones, el ARNic comprende un dúplex de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud y uno o dos salientes en 3' de 1-5 nucleótidos de longitud, que pueden estar formados por desoxirribonucleótidos. El ARNhc comprende una única hebra de ácidos nucleicos que contiene dos porciones complementarias separadas por una región predominantemente no autocomplementaria. Las porciones complementarias hibridan para formar una estructura en dúplex y la región no autocomplementaria forma un bucle que conecta el extremo 3' de una hebra del dúplex y el extremo 5' de la otra hebra. Los ARNhc experimentan un procesado intracelular para generar los ARNic.

Los microARN (miARN) son pequeños ARN monocatenarios no codificantes de aproximadamente 21-25 nucleótidos (en los sistemas de mamíferos) que inhiben la expresión génica de una forma específica de la secuencia. Se generan intracelularmente a partir de precursores que tienen una estructura secundaria característica formada por una horquilla corta (de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud) que contiene un dúplex que a menudo incluye una o más regiones de una complementariedad imperfecta. Los miARN naturales son solo parcialmente complementarios con su ARNm objetivo, y típicamente actúan a través de una represión de la traducción. Los agentes de ARNi modelados sobre precursores de microARN endógenos son de utilidad en la invención. Opcionalmente puede insertarse una secuencia que codifica para la porción del tallo de una estructura de tallo-bucle

o que codifica para un tallo-bucle completo, en un ácido nucleico que comprende al menos una porción de un transcrito primario de un microARN endógeno, por ejemplo, en lugar de la secuencia que codifica para el microARN endógeno o un microARN mínimo (~ 70 nucleótidos) en horquilla.

5 "Factor de reprogramación" se refiere a un gen, a un ARN o a una proteína que promueve o contribuye a la programación celular, por ejemplo, *in vitro*. Opcionalmente, el (los) factor(es) de reprogramación es (son) de interés para la reprogramación de células somáticas a pluripotencia *in vitro*. Algunos ejemplos de factores de reprogramación de interés para la reprogramación de células somáticas a pluripotencia *in vitro* son Oct4, Nanog, Sox2, Lin28, Klf4, c-Myc, y cualquier gen/proteína que pueda sustituir a uno o más de estos en un método de reprogramación de células somáticas *in vitro*. "Reprogramación a un estado pluripotente *in vitro*" o "reprogramación a pluripotencia *in vitro*", se usa en el presente documento para referirse a los métodos de reprogramación *in vitro* que no requieren, y que típicamente no incluyen, una transferencia nuclear o citoplasmática o una fusión celular, por ejemplo, con ovocitos, embriones, células germinativas o células pluripotentes. Cualquier realización o reivindicación de la invención puede excluir específicamente las composiciones o los métodos relacionados con, o que implican, una transferencia nuclear o citoplasmática o una fusión celular, por ejemplo, con ovocitos, embriones, células germinativas o células pluripotentes.

"Marcador seleccionable" se refiere a un gen, a un ARN o a una proteína que cuando son expresados, confieren a las células un fenotipo seleccionable, tal como una resistencia a un agente citotóxico o citostático (por ejemplo, una resistencia a un antibiótico), una prototrofia nutricional o la expresión de una proteína en particular, que puede usarse como base para distinguir las células que expresan la proteína de las células que no lo hacen. Las proteínas cuya expresión puede detectarse fácilmente, tales como una proteína fluorescente o luminiscente o una enzima que actúa sobre un sustrato para producir una sustancia coloreada, fluorescente o luminiscente ("marcadores detectables") constituyen un subconjunto de marcadores seleccionables. La presencia de un marcador seleccionable relacionado con la expresión de los elementos de control naturales de un gen que normalmente se expresa selectivamente o exclusivamente en las células pluripotentes hace posible la identificación y la selección de las células somáticas que han sido reprogramadas a un estado pluripotente. Pueden usarse diversos genes marcadores seleccionables, tales como el gen de resistencia a la neomicina (neo), el gen de resistencia a la puromicina (puro), la transferasa de fosforribosil guanina (gpt), la reductasa de dihidrofolato (DHFR), la desaminasa de adenosina (ada), la puromicin-N-acetiltransferasa (PAC), el gen de resistencia a la higromicina (hyg), un gen de resistencia multifarmacológica (mdr), la cinasa de timidina (TK), la transferasa de fosforribosil hipoxantina-guanina (HPRT) y el gen de hisD. Algunos marcadores detectables incluyen la proteína fluorescente verde (GFP), las proteínas fluorescentes azul, zafiro, amarillo, rojo, naranja y cian y las variantes de cualquiera de estas. Las proteínas luminiscentes tales como la luciferasa (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga o de Renilla) también son de utilidad. Como será evidente para el experto en la materia, el término "marcador seleccionable" según se usa en el presente documento puede referirse a un gen o al producto de la expresión del gen, por ejemplo, a una proteína codificada.

El marcador seleccionable puede conferir una ventaja de proliferación y/o de supervivencia a las células que lo expresan con respecto a las células que no lo expresan o que le expresan a unos niveles significativamente inferiores. Dicha ventaja de proliferación y/o de supervivencia se produce típicamente cuando las células se mantienen en ciertas condiciones, es decir, en unas "condiciones selectivas". Para asegurar una selección eficaz, puede mantenerse una población de células en unas condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para que las células que no expresan el marcador no proliferen ni/o no sobrevivan y sean eliminadas de la población, o su cantidad se reduzca a solo una fracción muy pequeña de la población. El proceso de selección de las células que expresan un marcador que confiere una ventaja de proliferación y/o de supervivencia mediante el mantenimiento de una población de células en unas condiciones selectivas de forma que se eliminen ampliamente o completamente las células que no expresan el marcador se denomina en el presente documento "selección positiva", y se dice que el marcador es "útil para una selección positiva". La selección negativa y los marcadores útiles para la selección negativa también son de interés en algunos de los métodos descritos en el presente documento. La expresión de dichos marcadores confiere una desventaja de proliferación y/o de supervivencia a las células que expresan el marcador con respecto a las células que no expresan el marcador o que lo expresan a unos niveles significativamente inferiores (o, considerado de otra forma, las células que no expresan el marcador tienen una ventaja de proliferación y/o de supervivencia con respecto a las células que expresan el marcador). Las células que expresan el marcador pueden ser, por lo tanto, ampliamente o completamente eliminadas de una población de células cuando se mantienen en unas condiciones selectivas durante un periodo de tiempo suficiente.

Los términos "tratar", "tratamiento", etc., aplicados a una célula aislada, incluyen someter la célula a cualquier tipo de proceso o condición, o llevar a cabo cualquier tipo de manipulación o procedimiento sobre la célula. Aplicados a un sujeto, los términos se refieren a proporcionar atención, cuidado o gestión médica o quirúrgica a un individuo. El individuo está habitualmente enfermo o lesionado, o presenta un aumento en el riesgo de caer enfermo con respecto al miembro medio de la población y tiene necesidad de dicha atención, cuidado o gestión.

El término "Wnt" o "proteína Wnt" según se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos natural de una proteína Wnt o de un fragmento, una variante o un derivado de la misma que conserva al menos en parte la capacidad de la proteína natural de unirse al (los) receptor(es) de la Wnt y activar la señalización Wnt. Además de las variantes alélicas naturales de las secuencias de la Wnt que pueden existir en la

población, se apreciará que, como es el caso de prácticamente todas las proteínas, pueden introducirse diversos cambios en las secuencias recogidas con los números de registro en la Tabla 1 (denominadas secuencias "naturales") sin alterar sustancialmente la actividad funcional (biológica) de los polipéptidos. Dichas variantes están incluidas en el ámbito de los términos "Wnt", "proteína Wnt", etc.

La variante podría ser, por ejemplo, un polipéptido con una identidad de al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % con la Wnt completa. La variante podría ser un fragmento de una Wnt completa. La variante podría ser una variante de corte y empalme natural. La variante podría ser un polipéptido con una identidad de al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % con un fragmento de la Wnt, en la que el fragmento es al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % tan largo como el polipéptido natural completo o un dominio del mismo que presenta una actividad de interés, tal como la capacidad de unirse a un receptor de la Wnt. En algunas realizaciones el dominio tiene al menos 100, 200, 300 o 400 aminoácidos de longitud, comenzando en cualquier posición de aminoácido de la secuencia y extendiéndose hacia el C-terminal. Preferentemente se evitan las variaciones conocidas en la materia para eliminar o reducir sustancialmente la actividad de la proteína Wnt. En algunas realizaciones, la variante carece de una porción N y/o C-terminal del polipéptido completo, por ejemplo, faltan hasta 10, 20 o 50 aminoácidos de cualquier extremo. En algunas realizaciones el polipéptido tiene la secuencia de un polipéptido Wnt maduro, por el cual se entiende un polipéptido Wnt en el que se han eliminado una o más porciones tales como un péptido de señalización durante el procesado proteolítico intracelular natural normal (por ejemplo, durante un procesado co-traduccional o post-traduccional). En algunas realizaciones en las que la proteína Wnt se produce de una forma distinta a la purificación a partir de las células que la expresan de forma natural, la proteína es un polipéptido quimérico, por lo cual se entiende que contiene porciones procedentes de dos o más especies diferentes. En algunas realizaciones en las que la proteína Wnt se produce una forma distinta a la purificación a partir de las células que la expresan de forma natural, la proteína es un derivado de la Wnt, por lo que se entiende que la proteína comprende secuencias adicionales no relacionadas con la Wnt siempre que esas secuencias no reduzcan sustancialmente la actividad biológica de la proteína.

El experto en la materia será consciente, o será capaz de averiguar fácilmente, si una variante, un fragmento o un derivado en particular de la Wnt es funcional mediante el uso de ensayos conocidos en la materia. Por ejemplo, la capacidad de una variante de un polipéptido Wnt de unirse a un receptor de la Wnt puede evaluarse mediante el uso de los ensayos de unión de proteínas habituales. Algunos ensayos convenientes incluyen la medición de la capacidad para activar la transcripción de un constructo indicador que contiene un sitio de unión TCF unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador detectable tal como luciferasa. Un ensayo implica la determinación de si la variante de la Wnt induce la fosforilación de la β -catenina. El estado de fosforilación puede determinarse mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo, inmunotransferencia. Otros ensayos implican el ensayo de la variante del fragmento para comprobar actividades biológicas conocidas de la Wnt. Véase, por ejemplo, Barker, N. y Clevers, Fl., Nat Rev Drug Discov. 5 (12): 997-1014, 2006, que describen los ensayos adecuados para la identificación de agentes que modulan la actividad de la ruta de la Wnt. Dichos ensayos pueden adaptarse fácilmente para identificar o confirmar la actividad de los agentes que activan la actividad de la ruta de la Wnt. En ciertas realizaciones de la invención una variante o un fragmento funcional tiene una actividad de al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o más de la actividad del polipéptido natural completo.

"Actividad de la ruta de la Wnt" o "señalización Wnt" se refiere a la serie de acontecimientos bioquímicos que resultan después de la unión de un ligando estimulador (por ejemplo, de una proteína Wnt) a un receptor para un miembro de la familia Wnt, dando lugar finalmente a cambios en la transición génica, y si es *in vivo*, dando lugar a menudo a un efecto biológico característico en un organismo.

Reprogramación de células somáticas mediante la activación de la ruta de la Wnt

La presente invención proporciona el reconocimiento de que la activación de la ruta de la Wnt es de utilidad para la reprogramación de células somáticas. La invención proporciona el reconocimiento adicional de que la activación de la ruta de la Wnt aumenta la eficacia de reprogramación de células somáticas, por ejemplo, cuando dichas células están sometidas a un tratamiento que daría como resultado la reprogramación de al menos algunas de las células. "Aumento en la eficacia de la reprogramación" significa causar un aumento en el porcentaje de células que experimentan una reprogramación cuando se somete una población de células a un tratamiento de reprogramación, que normalmente da como resultado un mayor número de colonias individuales de células reprogramadas después de un periodo de tiempo dado. La activación de la ruta de la Wnt según la invención puede aumentar el número de células reprogramadas y/o el número de colonias de células reprogramadas y/o el porcentaje de células que experimentan una reprogramación. La invención también proporciona el reconocimiento de que la activación de la ruta de la Wnt permite la reprogramación de células somáticas que no han sido modificadas genéticamente para aumentar su expresión de un oncogén tal como el c-Myc. La invención proporciona por lo tanto formas para sustituir la expresión modificada del c-Myc en cualquier método de reprogramación de células somáticas que de otro modo implicaría la modificación de las células para que expresen el c-Myc. La activación de la ruta de la Wnt puede ser suficiente para permitir la reprogramación en unas condiciones en las que de otro modo no se produciría la reprogramación.

En el presente documento se divulgan los métodos para la generación de células somáticas reprogramadas que comprenden una modulación, por ejemplo, un aumento en la actividad de la ruta de la Wnt, y las composiciones de utilidad en los métodos. También se divulga un método de reprogramación de una célula somática que comprende la modulación, por ejemplo, el aumento de la actividad de la ruta de la Wnt en la célula. Adicionalmente se divulgan métodos mejorados para la reprogramación de células somáticas, métodos que comprenden someter las células somáticas a un tratamiento que puede reprogramar al menos algunas de las células, en los que la mejora comprende un aumento en la actividad de la ruta de la Wnt en dichas células. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento conocido en la materia por ser de utilidad en la reprogramación de células somáticas o considerado como de potencial utilidad para este fin. La actividad de la ruta de la Wnt puede aumentarse mediante el uso de activadores de la ruta de la Wnt, tales como moléculas pequeñas, proteínas Wnt solubles o agentes que median en el ARN interferente y que por lo tanto inhiben los inhibidores endógenos de la ruta de la Wnt. Las células somáticas que van a ser reprogramadas pueden cultivarse en un medio condicionado de Wnt. Salvo que se indique de otro modo o sea evidente a partir del contexto, la "reprogramación" puede referirse a la reprogramación a un estado pluripotente.

Las Wnt son una familia de proteínas secretas importantes para una amplia diversidad de procesos de desarrollo y fisiológicos (Mikels, AJ y Nusse, R., *Oncogene*, 25: 7461-7468, 2006). Las secuencias de las Wnt están relacionadas entre sí y fuertemente conservadas en su estructura y función a través de múltiples especies. Por lo tanto, puede usarse una proteína Wnt que muestre actividad en una especie, en otra especie para activar la ruta de la Wnt en dicha especie, y puede esperarse que muestre una actividad similar. Algunos miembros de la familia Wnt incluyen la Wnt1, la Wnt2, la Wnt2b (denominada también Wnt13), la Wnt3, la Wnt3a, la Wnt4, la Wnt5a, la Wnt5b, la Wnt6, la Wnt7a, la Wnt7b, la Wnt7c, la Wnt8, la Wnt8a, la Wnt8b, la Wnt8c, la Wnt10a, la Wnt10b, la Wnt11, la Wnt14, la Wnt15 o la Wnt16. Las secuencias de los genes y de las proteínas Wnt son conocidas en la materia. El experto en la materia puede encontrar fácilmente la ID del gen, los números de registro y la información de la secuencia para los miembros de la familia Wnt y para otros genes y proteínas de interés del presente documento en bases de datos disponibles públicamente (véase la Tabla 1 para algunos ejemplos).

Tabla 1: proteínas, efectores y reguladores de la ruta de la Wnt

Gen	ID del gen	Números de registro (ARNm / proteína)
Wnt3a (de ratón)	22416	NM_009522 / NP_033548
Wnt3a (humano)	89780	NM_033131 / NP_149122
β -catenina (de ratón)	12387	NM_007614 / NP_031640
β -catenina (humano)	1499	NM_001098209 / NP_001091679 NM_001098210 / NP_001091680 NM_001904 / NP_001895
GSK3 α (de ratón)	606496	NM_001031667 / NP_001026837
GSK3 α (humano)	2931	NM_019884 / NP_063937
GSK3 β (de ratón)	56637	NM_019827 / NP_062801
GSK3 β (humano)	605004	NM_002093 / NP_002084
Sox2 (de ratón)	20674	NM_011443 / NP_035573
Sox2 (humano)	6657	NM_003106 / NP_003097
Klf4 (de ratón)	16600	NM_010637 / NP_034767
Klf4 (humano)	9314	NM_004235 / NP_004226
Oct4 (de ratón)	18999	NM_013633 / NP_038661
Oct4 (humano)	5460	NM_203289 / NP_976034
Oct4 (humano)	5460	NM_002701 / NP_002692
Nanog (de ratón)	71950	NM_028016.2 / NP_082292.1
Nanog (humano)	79923	NM_024865 / NP_079141
Lin28 (de ratón)	83557	NM_145833 / NP_665832
Lin28 (humano)	79727	NM_024674 / NP_078950

La señalización Wnt es iniciada por la interacción de las proteínas Wnt con diversos receptores, incluyendo miembros de la familia Frizzled (Fz) de receptores transmembranarios y miembros de la familia de la proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LRP) (por ejemplo, LRP5/LRP6). La señal de la Wnt extracelular estimula las cascadas intracelulares de transducción de señales que incluyen la ruta canónica, que regula la expresión génica en el núcleo (revisado por Logan CY y Nusse, R. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20: 781-810, 2004) y varias otras no canónicas (revisado por Kohn, AD y Moon, RT, *Cell Calcium*, 38: 439-446, 2005). En resumen, la señalización Wnt a través de la ruta canónica da lugar a la estabilización y a la localización nuclear de la β -catenina, que se asimila a los miembros de la familia del factor potenciador de los linfocitos T / factor linfoide (TCF/LEF) de factores de transcripción para formar complejos que generalmente activan la transcripción. En ausencia de la señalización Wnt, la β -catenina es en cambio dirigida para su degradación mediante la destrucción del complejo de la β -catenina, y los TCF/LEF forman complejos que generalmente reprimen la transcripción. En ausencia de la señalización Wnt, cinasas tales como la cinasa de la sintasa de glicógeno 3 (GSK3) y la cinasa de la caseína 1 (CK1) fosforilan la β -catenina, que como consecuencia es ubiquinada y dirigida para su destrucción por el proteosoma. La activación de la ruta de la Wnt da por lo tanto como resultado una disminución en la fosforilación de

la β -catenina, dando lugar así a su estabilización. Se han identificado varias proteínas endógenas como inhibidores de la señalización de Wnt, incluyendo Dickkopf (Dkk), la proteína de la región de agregación del punto de ruptura (Bcr), proteínas que comprenden un dominio WIF (factor inhibidor de la Wnt) etc.

5 Los métodos de reprogramación divulgados en el presente documento pueden comprender poner en contacto una célula con un agente que modula, por ejemplo, que aumenta, la actividad de una ruta de la Wnt. El aumento de la ruta de la Wnt puede inducir a la célula para que se haga pluripotente y presente las características que son características de las células ES. Los métodos son por tanto de utilidad en la generación de células pluripotentes de tipo ES (células iPS). Un tratamiento que provoque un aumento en la actividad de una ruta de la Wnt puede ser
10 aquel que dé como resultado un aumento en los niveles intracelulares de β -catenina, aquel que dé como resultado un aumento en la translocación nuclear de la β -catenina o aquel capaz de provocar cambios en la expresión génica característica de las células expuestas a una fuente de proteína Wnt biológicamente activa. La reprogramación puede modularse mediante el uso de un inhibidor de la ruta de la Wnt.

15 Se ha conseguido un considerable avance hacia el objetivo de reprogramación de células somáticas a un estado pluripotente *in vitro* cuando se demostró que podrían producirse líneas celulares con algunas de las propiedades de las células ES mediante la introducción de los genes que codifican para cuatro factores de transcripción asociados con pluripotencia, es decir, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, en fibroblastos cutáneos de ratón a través de una infección retroviral, y seleccionando después las células que expresaran un marcador de pluripotencia, Fbx15, en respuesta a estos factores (Takahashi, K. & Yamanaka, S. Cell 126, 663-676, 2006). Sin embargo, las células resultantes diferían de las células ES en su expresión génica y en sus patrones de metilación del ADN, y cuando se inyectaban en blastocistos de ratón normales, no daban como resultado quimeras vivas (animales portadores de células por todo su cuerpo tanto del blastocisto original como de las células introducidas). Un trabajo posterior mejoró estos resultados llevando a cabo una selección más rigurosa, dando como resultado una derivación de las líneas celulares reprogramadas estables que, basándose en los perfiles de transcripción notificados, de sellado genómico (expresión de los alelos predeterminada por el progenitor a partir del cual se originan) y de modificación de la cromatina, que aparecían esencialmente idénticas a las células ES (Okita, K., et al. 448, 313-317, 2007; Wernig, M. et al. Nature 448, 318-324, 2007; Maherali, N. et al. Cell Stem Cell 1, 55-70, 2007). Las células somáticas que han sido reprogramadas a un estado pluripotente *in vitro* mediante el uso de estos métodos o de otros métodos (por ejemplo, que implican la aplicación de moléculas pequeñas) se denominan en el presente documento, coherentemente con su uso en la materia, células "madre pluripotentes inducidas" (iPS). Posteriormente, se demostró que las células somáticas humanas también pueden ser reprogramadas a pluripotencia mediante el uso de estos factores. Adicionalmente, se demostró que la combinación de Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28 también era capaz de reprogramar las células somáticas a un estado pluripotente *in vitro* (Yu J, Science, 318 (5858): 1917-20, 2007). Sin embargo, la generación de estas células también implicaba la modificación de las células para que expresaran múltiples factores de transcripción y empleaba una transducción retroviral.

Ahora los Solicitantes han demostrado que se producía un aumento en el número de colonias formadas por células de tipo ES cuando se cultivaban células somáticas modificadas genéticamente para que expresaran Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc con medio condicionado de Wnt3a con respecto a cuando las células se cultivaban en un medio condicionado por células de control o en un medio de cultivo celular estándar usado convencionalmente para la propagación de células ES. Los Solicitantes han demostrado adicionalmente que se desarrollaban colonias formadas por células de tipo ES cuando se cultivaban las células somáticas modificadas para que expresaran Oct4, Sox2 y Klf4, pero no modificadas para que expresaran c-Myc en un medio condicionado de Wnt3a, mientras que no se forman células de las colonias de tipo ES en el periodo de tiempo de 20 días mostrado en la Figura 1 cuando dichas células se cultivaban en un medio no condicionado o en un medio condicionado por células de control. En ambos casos, las colonias mostraban unas características morfológicas características de las colonias de células ES, y la expresión de un marcador detectable indicativo de la expresión de Oct4. Según todos los criterios ensayados, las células parecían ser células pluripotentes de tipo ES (células iPS). Adicionalmente, el cultivo de las células somáticas en medio condicionado de Wnt3a parecía seleccionar las células reprogramadas. Las colonias formadas en presencia de medio condicionado de Wnt3a aparecían más homogéneas que las obtenidas en ausencia de medio condicionado de Wnt3a. Los métodos son por lo tanto de utilidad para facilitar la identificación de las células reprogramadas, y opcionalmente para facilitar la separación de dichas células de las células que no han sido reprogramadas, sin la necesidad de una selección química basada en un elemento genético introducido tal como un gen cuyo producto de expresión confiere una resistencia farmacológica o fluorescencia. Los métodos son por lo tanto de utilidad para la generación de células reprogramadas que no son portadoras de modificaciones genéticas con el fin de seleccionar o detectar las células reprogramadas. Adicionalmente, los métodos son de utilidad para aumentar el porcentaje medio de células reprogramadas en una colonia que comprende células reprogramadas con respecto al porcentaje medio de células que estarían reprogramadas en ausencia de un agente que aumenta la actividad de la ruta de la Wnt.
60

Los Solicitantes y otros han apreciado que pueden formarse algunas células de tipo iPS sin infectar las células con un virus c-Myc. Sin embargo, este es un acontecimiento de baja eficacia y podría dar como resultado, al menos en parte, una mutagénesis por inserción en la que un acontecimiento de integración viral activa directamente el c-Myc o el (los) gen(es) c-Myc objetivo. En los experimentos de los solicitantes, en unos puntos temporales muy tardíos, se observaron algunas colonias en las placas que sobreexpresaban Klf4, Sox2 y Oct4 (sin la introducción del virus c-

Myc), incluso sin medio condicionado de Wnt. El medio condicionado de Wnt redujo significativamente el tiempo necesario y aumentó la eficacia del proceso de reprogramación. Un aspecto de la invención es que la mayor rapidez de la reprogramación conseguida mediante el uso de los métodos de la invención facilitará el uso de medios de sobreexpresión temporales de factores de inducción de pluripotencia para la formación de iPS (por ejemplo, una transfección temporal) y/o para la reprogramación mediante el tratamiento de las células somáticas con agentes de reprogramación, tales como proteínas, moléculas pequeñas, etc., en lugar de una infección vírica. Además, los Solicitantes proponen que el aumento de la eficacia en la formación de las iPS mediante el uso de los métodos de la invención podría ser de particular utilidad en la reprogramación de células humanas, con o sin una sobreexpresión del Myc.

Sin limitación, los métodos son por tanto de utilidad para aumentar la velocidad de reprogramación de las células somáticas a células iPS. En el presente documento se divulga un método para aumentar la velocidad de reprogramación de las células somáticas, que comprende cultivar una población de células somáticas de mamífero en un medio de cultivo celular condicionado de Wnt, de forma que al menos parte de las células sean inducidas a transformarse en células de tipo ES en un periodo de tiempo más corto del que sería el caso en ausencia de un medio condicionado de Wnt. También se divulga un método para aumentar la velocidad de reprogramación de las células somáticas que comprende la activación de la ruta de la Wnt en una población cultivada de células somáticas, de forma que al menos algunas de las células sean inducidas a transformarse en células de tipo ES en un periodo de tiempo más corto del que sería el caso si no se activara la ruta de la Wnt. La invención también proporciona un método para aumentar la velocidad de reprogramación de las células somáticas que comprende cultivar una población de células somáticas de mamífero en presencia de un agente que aumente la actividad de la ruta de la Wnt, de forma que al menos algunas de las células sean inducidas a transformarse en células de tipo ES en un periodo de tiempo más corto del que sería el caso en ausencia de dicho agente. El periodo de tiempo puede ser de 7, de 10, de 15 o de 20 días. Las células pueden ser tratadas (por ejemplo, modificadas genéticamente) para que expresen Sox2, Klf4, Oct4 y c-Myc a unos niveles mayores de lo que sería el caso en ausencia de dicho tratamiento. Las células pueden tratarse de forma que sobreexpresen Sox2, Klf4 y Oct4 a unos niveles mayores de lo que sería el caso en ausencia de dicho tratamiento, pero no son modificadas genéticamente para que sobreexpresen el c-Myc. Un método de tratamiento es la infección de las células con virus (por ejemplo, retrovirus, lentivirus) o la transfección de las células con vectores víricos (por ejemplo, retrovíricos, lentivíricos) que contienen las secuencias de los factores unidas operativamente a unos elementos de control de la expresión adecuados para dirigir la expresión en las células después de la infección o de la transfección y, opcionalmente, la integración en el genoma, como se sabe en la materia.

También se divulga un método para la reprogramación de una célula somática, que comprende el cultivo de la célula en un medio de cultivo celular condicionado de Wnt de forma que quede reprogramada. El cultivo de la célula en un medio de cultivo celular condicionado de Wnt puede inducir a la célula a transformarse en pluripotente y poseer las características que son características de las células ES. Los métodos son por lo tanto de utilidad para la generación de células pluripotentes de tipo ES (células iPS). El medio de cultivo celular condicionado de Wnt puede comprender medio condicionado de Wnt3a.

El término "medio condicionado" se refiere a un medio de cultivo celular que se ha usado previamente para el cultivo de células. Un medio condicionado se caracteriza porque contiene sustancias solubles, por ejemplo, moléculas de señalización, factores de crecimiento, hormonas, etc., que son producidas por las células durante su cultivo y liberadas en el medio. Según se usa en el presente documento, "medio condicionado de Wnt" se refiere a un medio condicionado que se ha usado previamente para el cultivo de células que producen y secretan la Wnt. El medio puede describirse adicionalmente mediante referencia a una proteína Wnt en particular producida por las células. Por ejemplo, "medio condicionado de Wnt3a" se refiere a un medio condicionado que se ha usado previamente para el cultivo de células que producen Wnt3a. Las células también pueden producir otras Wnt además de la Wnt en particular mencionada específicamente. Cualquier realización de la invención que emplee un medio condicionado de Wnt puede emplear un medio condicionado de Wnt3a salvo que se indique de otro modo.

Se apreciará que algunas Wnt tienen unas actividades biológicas similares a la de la Wnt3a y/o sus secuencias están estrechamente relacionadas con la de la Wnt3a. En ciertas realizaciones de la invención se usan los medios condicionados preparados mediante el uso de células que producen dichas Wnt.

Un medio condicionado puede prepararse mediante métodos conocidos en la materia. Dichos métodos comprenden normalmente el cultivo de una primera población de células en un medio de cultivo celular, y recogiendo después el medio (normalmente sin recoger las células). El medio recogido puede ser filtrado para eliminar los desechos celulares, etc. Después puede usarse un medio condicionado (que contiene los componentes secretados en el medio por las células) para apoyar el crecimiento de una segunda población de células. Las células se cultivan en el medio durante un tiempo suficiente para permitir una concentración adecuada de factores liberados, tales como la Wnt (y/o el consumo de los componentes del medio) para producir un medio que apoye la reprogramación de células somáticas. En algunas realizaciones, el medio se condiciona mediante un cultivo durante 24 h a 37 °C. Sin embargo, pueden usarse unos periodos de tiempo más largos o más cortos, tales como de entre 24 y 72 horas. Las células pueden usarse para condicionar múltiples lotes de medio a lo largo de periodos de cultivo adicionales, siempre que las células conserven su capacidad de condicionar el medio de una forma adecuada para el fin previsto.

El medio en el que se cultivan las células para producir un medio condicionado puede ser cualquier medio de cultivo celular convencional capaz de mantener la viabilidad de las células. En algunas realizaciones, el medio está químicamente definido. En algunas realizaciones, el medio es similar o idéntico en su composición al medio usado convencionalmente para el cultivo de células madre embrionarias de la misma especie que las células somáticas que se van a reprogramar mediante el uso del medio condicionado. El medio de base usado para el acondicionamiento puede tener cualquiera de varias composiciones diferentes, dependiendo en parte del tipo de células usadas. El medio debe ser capaz de apoyar el cultivo de la línea celular usada para el acondicionamiento del medio. En algunas realizaciones, el medio también apoya el cultivo de las células somáticas antes de que sean reprogramadas, y opcionalmente, de las células somáticas que han sido reprogramadas. Sin embargo, el medio condicionado puede ser complementado con otros componentes, combinado con otro medio, etc., después del acondicionamiento, de forma que sea adecuado para el cultivo de las células somáticas y de las células somáticas reprogramadas.

Un medio de base adecuado puede ser elaborado a partir de los siguientes componentes: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Invitrogen n° de cat. 11965-092; medio de Eagle modificado por Dulbecco inactivado (KO DMEM), Invitrogen n° de cat. 10829-018; medio basal de Ham F12 / DMEM al 50 %; L-glutamina 200 mM, Invitrogen n° de cat. 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Invitrogen n° de cat. 11140-050; beta-mercaptoetanol; factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos recombinantes (bFGF). Un ejemplo de un medio de ES que contiene suero se elabora con un 80 % de DMEM (normalmente KO DMEM), un 20 % de suero bovino fetal (FBS) definido no termoinactivado, un 1 % de aminoácidos no esenciales, L-glutamina 1 mM y β -mercaptoetanol 0,1 mM. El medio se filtra y se almacena a 4 °C durante no más de 2 semanas. Un medio de ES exento de suero puede prepararse con un 80 % de KO DMEM, un 20 % de sustituto de suero, un 1 % de aminoácidos no esenciales, L-glutamina 1 mM y β -mercaptoetanol 0,1 mM, y un sustituto de suero tal como Invitrogen n° de cat. 10828-028. El medio se filtra y se almacena a 4 °C. Antes de combinarlo con las células usadas para el acondicionamiento, puede añadirse el bFGF humano a una concentración final de 4 ng/ml. Es de utilidad StemPro® hESC SFM (Invitrogen n° de cat. A1000701), un medio totalmente definido exento de suero y de alimento (SFM), formulado especialmente para el crecimiento y la expansión de células madre embrionarias humanas.

Las células usadas para la preparación del medio condicionado pueden producir de forma natural la Wnt. En algunas realizaciones las células usadas para la preparación del medio están modificadas genéticamente para aumentar su expresión de la Wnt, por ejemplo, mediante una transfección con un ADNc que codifica para la Wnt, en la que la secuencia que codifica para la Wnt está unida operativamente a secuencias de control de la expresión activas en las células. Véase, por ejemplo, Cai, L., et al., Cell Res. 17: 62-72, 2007. En algunas realizaciones, las células producen y secretan la Wnt en su medio, dando como resultado un medio que tiene una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de la proteína Wnt. En algunas realizaciones, las células producen y secretan la Wnt en su medio, dando como resultado un medio que tiene una concentración de entre 200 ng/ml y 500 ng/ml de la proteína Wnt. También pueden usarse células que sobreexpresan la Wnt como células de alimento con el fin de reprogramar las células somáticas.

El medio condicionado puede combinarse con un medio no condicionado antes de su uso. Por brevedad, el medio resultante todavía se denomina medio condicionado si comprende al menos un 5 % de medio condicionado en volumen. En algunas realizaciones la cantidad (en volumen) de medio condicionado es de al menos el 10 %, por ejemplo, de al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más de medio condicionado. En algunas realizaciones, la cantidad de medio condicionado es de entre aproximadamente el 50 % y el 75 % en volumen. El medio no condicionado puede ser un medio de cultivo celular estándar. En algunas realizaciones, el medio no condicionado es un medio usado convencionalmente para la propagación de células ES de la misma especie que las células somáticas que se van a reprogramar.

El medio condicionado puede usarse inmediatamente después de ser recogido de las células usadas para su producción, o puede ser almacenado (por ejemplo, a aproximadamente 4 °C o congelado) antes de su uso. El medio puede almacenarse en unas condiciones y durante un periodo de tiempo coherente para el mantenimiento de la capacidad del medio condicionado de apoyar la reprogramación en los métodos de la invención. Sin limitación, dichas condiciones y tiempo pueden ser coherentes con el mantenimiento de al menos el 20 % de la actividad biológica original de la Wnt secretada presente en el medio, que puede ser evaluada mediante el uso de los métodos indicados anteriormente. El medio condicionado puede concentrarse o procesarse de otro modo, por ejemplo, mediante el uso de los métodos habituales, siempre que dicha concentración o procesado sea coherente con el mantenimiento de la capacidad del concentrado de apoyar la reprogramación cuando se añade a un medio no condicionado. Sin limitación, dicha concentración o procesado puede ser coherente con el mantenimiento de al menos el 20 % de la actividad biológica original de la Wnt secretada presente en el medio. Como se ha indicado en los Ejemplos, los resultados de los Solicitantes sugieren que los fibroblastos normales (no modificados para que sobreexpresen la Wnt) pueden secretar factores, incluyendo quizás la Wnt3a, que promuevan la reprogramación, aumentando la posibilidad de que las células somáticas que experimentan una reprogramación *in vitro*, por ejemplo, las células en cultivo que han sido tratadas con un retrovirus o modificadas de otro modo para que expresen Oct4, Sox2, Klf4, y opcionalmente c-Myc, puedan secretar dichos factores y contribuir por lo tanto a su propia reprogramación. En ciertas realizaciones de la presente invención, el medio condicionado de Wnt tiene una mayor concentración de proteína Wnt y/o de actividad de activación de la ruta de la Wnt de lo que sería el caso cuando se

5 cultivan células somáticas no modificadas, por ejemplo, fibroblastos, que experimentan una reprogramación, en un medio conocido en la materia por ser útil en el cultivo de células somáticas que experimentan una reprogramación. Dicha capacidad de concentración y/o de activación de la ruta de la Wnt puede ser al menos 1,5, 2, 5, 10, 20 o más veces mayor que la presente en un medio en el que se cultivan fibroblastos de control según se describe en el Ejemplo 5.

10 Algunos de los métodos divulgados en el presente documento implican poner en contacto una célula somática *in vitro* con uno o más agentes definidos que modulan, por ejemplo, aumentan, la actividad de la ruta de la Wnt. Las células pueden mantenerse en un medio de cultivo celular estándar conocido en la materia. El (los) agente(s) puede(n) ser añadido(s) al medio antes del uso del mismo para el cultivo de las células, o durante el cultivo celular. El término "agente definido" en este contexto significa que la estructura, la secuencia o la identidad del agente que modula, por ejemplo, que aumenta, la actividad de la ruta de la Wnt es conocida y/o el agente es sintetizado químicamente y/o el agente es (antes de su adición al medio) aislado o al menos purificado parcialmente. Por ejemplo, el agente puede no ser un componente no caracterizado o no identificado del medio condicionado, un lisado o un extracto de células o de tejidos, un citoplasma de células o un material nuclear, etc.

15 Pueden usarse diversos agentes para aumentar la actividad de la ruta de la Wnt. Dichos agentes se denominan en el presente documento "activadores de la ruta de la Wnt" o "agonistas de la Wnt". El activador de la ruta de la Wnt puede actuar directamente mediante la interacción con un receptor de la Wnt, o indirectamente mediante la interacción con uno o más componentes intracelulares de la ruta de señalización de la Wnt, tales como la β -catenina, una cinasa o una fosfatasa que actúa sobre la β -catenina, un factor de transcripción que se une a la β -catenina, etc. El activador puede aumentar la expresión de la Wnt o de un componente de la ruta de la Wnt tal como la β -catenina. El activador de la ruta de la Wnt puede aumentar la actividad de la ruta de la Wnt hasta unos niveles suficientes para mejorar la reprogramación de células somáticas. El activador de la ruta de la Wnt puede inhibir la degradación de la β -catenina, mejorando así la reprogramación de células somáticas. Puede ser de interés inhibir la ruta de la Wnt en células somáticas o en células somáticas reprogramadas. Por ejemplo, los inhibidores de la ruta de la Wnt pueden usarse para caracterizar o explorar el mecanismo mediante el cual se produce la reprogramación y/o para identificar los agentes de reprogramación (por ejemplo, los agentes que no actúan a través de la ruta de la Wnt). Adicionalmente, los inhibidores de la ruta de la Wnt (por ejemplo, moléculas pequeñas, ARNip, proteínas, etc.) pueden ser de utilidad para facilitar la diferenciación de células pluripotentes reprogramadas de un tipo celular deseado, por ejemplo, en protocolos de diferenciación *in vitro*.

20 En ciertas realizaciones de la invención, el activador o el inhibidor de la ruta de la Wnt es una proteína o una molécula pequeña que se une a un receptor de la Wnt. Por ejemplo, el activador de la ruta de la Wnt puede ser una proteína Wnt soluble biológicamente activa.

25 En algunas realizaciones la concentración de la proteína Wnt añadida al medio es de entre 10 y 10.000 ng/ml, por ejemplo, de entre 100 y 5.000 ng/ml, por ejemplo, de entre 1.000 y 2.500 ng/ml o de entre 2.500 y 5.000 ng/ml, o de entre 5.000 y 10.000 ng/ml.

30 Como se ha mencionado anteriormente, algunas Wnt tienen unas actividades biológicas similares a las de la Wnt3a y/o su secuencia está estrechamente relacionada con la de la Wnt3a. Dichas Wnt y/o los agentes que simulan la actividad de dichas Wnt son de utilidad en ciertas realizaciones de la invención.

35 La proteína Wnt puede aislarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, de células de mamífero que producen de forma natural la proteína), producirse en células eucariotas o procariotas mediante el uso de la tecnología de expresión recombinante, o sintetizarse químicamente. Las proteínas Wnt solubles biológicamente activas pueden ser preparadas en una forma purificada mediante el uso de métodos conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la Pub. de Pat. de EE.UU. nº 20040248803 y Willert, K., et al., Nature, 423: 448-52, 2003. En ciertas realizaciones la proteína soluble biológicamente activa Wnt es la Wnt3a. En ciertas realizaciones la proteína Wnt es modificada junto con, o después de, la traducción, como sucede cuando la proteína Wnt se produce en una célula hospedadora que expresa de forma natural la proteína Wnt. En otras realizaciones la proteína Wnt no es modificada junto con, o después de, la traducción, como en la naturaleza. En ciertas realizaciones la proteína soluble biológicamente activa Wnt es modificada con una fracción lipídica tal como palmitato. La fracción lipídica puede unirse a una cisteína conservada. Por ejemplo, en ciertas realizaciones la proteína Wnt es palmitoilada en una cisteína conservada, como se sabe en la materia. En ciertas realizaciones la proteína Wnt es glicosilada, como sucede cuando la proteína Wnt es producida en una célula hospedadora de mamífero que expresa de forma natural la proteína Wnt. En otras realizaciones la proteína Wnt no está glicosilada como se encuentra en la naturaleza. La Wnt3a recombinante de ratón está disponible en el mercado (por ejemplo, en Millipore nº de cat. GF145 o en R&D Systems nº de cat. 1324-WN-002).

40 Una molécula pequeña es un compuesto orgánico que tiene múltiples enlaces carbono-carbono y un peso molecular de menos de 1.500 daltons. Normalmente dichos compuestos comprenden uno o más grupos funcionales que median en las interacciones estructurales con las proteínas, por ejemplo, puentes de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y pueden incluir al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes de molécula pequeña pueden comprender estructuras de carbono cíclicas o

heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos funcionales químicos y/o heteroátomos.

5 En ciertas realizaciones de la invención el activador de la ruta de la Wnt es un agente que inhibe la cinasa sintasa de glicógeno 3 (GSK3) seleccionado entre el grupo indicado a continuación. Estos agentes "activan" activamente la ruta de la Wnt sin la necesidad de una Wnt extracelular. La GSK3 es una cinasa de serina/treonina, identificada originalmente como un regulador del metabolismo de la glucosa (revisado en Frame y Cohen, *Biochem J* 359: 1-16, 2001; véase también Cohen, *Biochem Soc Trans* 7: 459-80, 1979; Embi et al., *Eur J Biochem* 107: 519-27, 1980). "GSK3" según se usa en el presente documento se refiere a cualquiera o a ambas de las isoformas de la GSK3 (la 10 GSK3 α y la GSK3 β). Los inhibidores que inhiben cualquiera o ambas de estas isoformas son de utilidad. En ciertas realizaciones el inhibidor de la GSK3 inhibe específicamente la GSK3 y no inhibe sustancialmente la mayoría de las demás cinasas de mamífero. En algunas realizaciones el inhibidor de la GSK3 no inhibe sustancialmente al menos 10 cinasas de mamífero diversas. En algunas realizaciones el inhibidor de la GSK3 inhibe específicamente tanto la GSK3 β como la GSK3 α . En algunas realizaciones el inhibidor de la GSK3 inhibe específicamente la GSK3 β pero no la GSK3 α . Por ejemplo, la CI50 para la GSK3 α puede ser al menos 10 veces tan alta como para la GSK3 β . En 15 algunas realizaciones el inhibidor de la GSK3 inhibe específicamente la GSK3 α pero no la GSK3 β . Por ejemplo, la CI50 para la GSK3 β puede ser al menos 10 veces tan alta como para la GSK3 α . En ciertas realizaciones la CI50 del inhibidor de la GSK3 para la GSK3 es al menos 10 veces menor que su CI50 para la mayoría de las demás cinasas de mamífero. En ciertas realizaciones la CI50 del inhibidor de la GSK3 para la GSK3 es menor de 10 μ M. En ciertas 20 realizaciones la CI50 del inhibidor de la GSK3 para la GSK3 es menor de 1 μ M. Se entenderá que el inhibidor de la GSK3 debería ser capaz de entrar en las células en una cantidad suficiente en las condiciones usadas como para inhibir la GSK3 en la misma. En algunas realizaciones la concentración del inhibidor de la GSK3 usada es al menos igual a la CI50 del compuesto medida *in vitro*. En algunas realizaciones la concentración del inhibidor de la GSK3 usada no es mayor de 100 veces la CI50 del compuesto medida *in vitro*. En algunas realizaciones la concentración usada varía entre 0,5 y 50 veces la CI50 del agente medida *in vitro*.

Ahora se han identificado muchos inhibidores potentes y selectivos de la GSK3 de molécula pequeña (Wagman AS, Johnson KW, Bussiere DE, *Curr Pharm Des.*, 10 (10): 1105-37, 2004). El inhibidor de la GSK3 que se va a usar en la invención se selecciona entre el grupo que consiste en: (1) BIO: (2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima. La 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO) es un potente inhibidor de la GSK-3 reversible y competitivo con el ATP (Polychronopoulos, P. et al. *J. Med. Chem.* 47, 935-946, 2004). (2) AR-A014418: N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea. El AR-A014418 inhibe la GSK3 (CI50 = 104 nM), de una forma competitiva con el ATP (Ki = 38 nM). El AR-A014418 no inhibe significativamente la cdk2 ni la cdk5 (CI50 > 100 μ M) ni otras 26 cinasas, lo que demuestra una elevada especificidad para la GSK3 (Bhat, R., et al., *J. Biol. Chem.* 278, 45937-45945, 2003). (3) SB 216763: 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona. Véase, por ejemplo, Smith, D. G., et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 635-639 (2001) y Cross, D. A., et al., *J. Neurochem.* 77, 94-102, (2001), (4) TDZD-8: 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona. Este compuesto es un inhibidor selectivo de la GSK-3, un derivado de una tiadiazolidinona, un inhibidor no competitivo con el ATP de la GSK-3 β (CI50 = 2 μ M). No inhibe la Cdk-1/ciclina B, la CK-II, la PKA ni la PKC a >100 μ M. Se ha propuesto que se une al sitio de la cinasa de la GSK3-3 β (Martínez et al., 30 *J. Med. Chem.* 45, 1292-1299, 2002); CHIR-911 y CHIR-837 (denominados también CT-99021 y CT-98023, respectivamente) Chiron Corporation (Emeryville, Calif.) y los compuestos relacionados, son de utilidad. El cloruro de litio, el valproato de sodio y el inhibidor de la GSK3 II (Calbiochem) son otros inhibidores de la GSK3. Otros inhibidores de la GSK3 incluyen SB 415286: 3-[(3-cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona. El SB 415286 se describe en Smith, D. G., et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 635-639, 2001 y en Coughlan, M. P., et al, *Chem. Biol.* 10, 793-803, 2000, y los descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.057.117 y 6.608.063; en las 45 publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. 20040092535, 20040209878, 20050054663. Otros inhibidores de la GSK3 se describen en el documento WO/2003/049739, que desvela PYRIMIDINE COMPOUNDS USEFUL AS GSK-3 INHIBITORS; en el documento WO/2002/085909, que desvela 9-DEAZAGUANINE DERIVATIVES AS INHIBITORS OF GSK-3, en el documento WO/2003/011287, que desvela PYRAZOLON DERIVATIVES AS INHIBITORS OF GSK-3, en el documento WO/2005/039485 y/o en el documento WO/2006/091737.

55 En el presente documento también se divulgan métodos en los que el activador de la ruta de la Wnt es un inhibidor de la cinasa de caseína 1 (CK1). Algunos ejemplos incluyen D4476, IC261, y CKI-7 (véase, por ejemplo, Rena, G., et al. *EMBO reports* 5 (1), 60-65, 2004). Los compuestos que inhiben la CK1 y la GSK3 también se divulgan en la Patente de EE.UU. nº 7098204.

60 En el presente documento también se divulgan métodos en los que el activador de la ruta de la Wnt es un activador de una fosfatasa que desfosforila de forma natural la β -catenina en uno más de los sitios fosforilados por la GSK3 o por la CK1.

65 La proteína de unión CREB (CBP) y la estrechamente relacionada proteína p300 pueden ensamblarse con la β -catenina y actuar como co-activadores transcripcionales de la unión de la β -catenina. Por ejemplo, para generar un complejo transcripcionalmente activo, la β -catenina recluta los coactivadores transcripcionales, la proteína de unión CREB (CBP) o su estrechamente relacionado homólogo p300 (Hecht et al., *EMBO J.* 19: 1839-50 (2000); Takemaru et al., *J. Cell Biol.* 149: 249-54 (2000)), así como otros componentes de la maquinaria de transcripción basal. Otros coactivadores de la β -catenina incluyen TBP, BRG1, BCL9/PYG, etc. La invención engloba directa o indirectamente

la modulación de las interacciones entre la β -catenina y uno cualquiera o más de estos coactivadores, de forma que se mejore la reprogramación de células somáticas. Por ejemplo, la participación relativa de la β -catenina en uno cualquiera o más de estos complejos puede ser alterada con respecto a su participación en uno o más de otros complejos. Pueden usarse agentes tales como moléculas pequeñas para desestabilizar selectivamente la interacción de la β -catenina con un coactivador en particular, produciendo así potencialmente la transcripción que inhibiría la reprogramación o favorecería la diferenciación. La desestabilización selectiva puede modificar el balance hacia una interacción con un coactivador diferente para formar un complejo que mejore la reprogramación. El agente puede actuar directamente sobre el complejo o indirectamente, por ejemplo, provocando una modificación post-traduccional tal como una fosforilación de la β -catenina o de un co-activador. En una realización, el agente es un compuesto descrito en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20070128669 o un análogo o un derivado del mismo, o un agente que tiene el mismo mecanismo de acción. La proteína de interacción con la β -catenina (también conocida como ICAT o CTNNBIP1) se une a la β -catenina e inhibe la interacción entre la β -catenina y los miembros de la familia TCF (Gottardi, et al., *Am J Physiol Cell Physiol.* 286 (4): C747-56, 2004). La proteína codificada es un regulador negativo de la señalización de la ruta de la Wnt. La ICAT (término que también incluye cualquier variante de transcripción o miembros de la familia que inhiben la interacción de la β -catenina y el TCF) puede ser inhibida con objeto de activar la ruta de la Wnt. El agente que activa una ruta de la Wnt puede hacerlo mediante una inhibición de la expresión o de la actividad de un inhibidor endógeno o de un regulador negativo de ruta de la Wnt. El agente puede inhibir la expresión mediante un ARN interferente (ARNi). El agente puede inhibir la expresión o la actividad de la GSK3, de la ICAT, de la CK1 o de la CTNNBIP1.

En algunos de los métodos divulgados en el presente documento un inhibidor de utilidad es un agente de ARNi. El experto en la materia será capaz de identificar un agente de ARNi apropiado para inhibir la expresión de un gen de interés. Véase, por ejemplo, Yu, J-Y., et al., *Molecular Therapy*, 7 (2): 228-236, 2003. El agente de ARNi puede inhibir la expresión lo suficiente como para reducir el nivel de estado estacionario medio del ARN transcrito a partir del gen (por ejemplo, del ARNm) o su proteína codificada en, por ejemplo, al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más). El agente de ARNi puede contener una secuencia de entre 17-29 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de 19-23 nucleótidos de longitud que es complementaria al 100 % con el ARNm o contiene hasta 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos, o hasta aproximadamente el 10-30 % de los nucleótidos, que no participa en el apareamiento de bases de Watson-Crick cuando se alinea con el ARNm para conseguir el número máximo de pares de bases complementarios. El agente de ARNi puede contener un dúplex de entre 17-29 nucleótidos de longitud en el que todos los nucleótidos participan en el apareamiento de bases de Watson-Crick o en el que hasta aproximadamente el 10-30 % de los nucleótidos no participan en el apareamiento de bases de Watson-Crick. El experto en la materia será consciente de qué características de la secuencia están asociadas a menudo con una funcionalidad superior del ARNi, y de los algoritmos y normas mediante los cuales pueden diseñarse dichos ARNi (véase, por ejemplo, Jagla, B., et al, *ARN*, 11 (6): 864-72, 2005). Los métodos divulgados en el presente documento pueden emplear, aunque no necesariamente, ARNi que tengan dichas características. La secuencia de cualquiera o de ambas hebras del agente de ARNi puede elegirse para evitar el silenciamiento de genes que no son objetivo, por ejemplo, la(s) hebra(s) puede(n) tener una complementariedad menor del 70 %, del 80 % o del 90 % con cualquier ARNm distinto al ARNm objetivo. Pueden usarse múltiples secuencias diferentes. La Tabla 1 recoge las ID de los genes humanos y de ratón que codifican para la GSK3 y los números de registro de la secuencia de ácidos nucleicos (ARNm) y de la proteína. Los agentes de ARNi capaces de silenciar genes de mamífero están disponibles en el mercado (por ejemplo, en proveedores tales como Qiagen, Dharmacon, Invitrogen, etc.). Si existen múltiples isoformas, se pueden diseñar ARNi o ARNh dirigidos contra una región presente en todas las isoformas expresadas en una célula de interés dada.

Los métodos para el silenciamiento de genes mediante la transfección de células con un ARNi o con constructos que codifican para un ARNh son conocidos en la materia. Para expresar un agente de ARNi en células somáticas, puede introducirse un constructo de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para el agente de ARNi, unido operativamente a los elementos de control de la expresión adecuados, por ejemplo, un promotor, en las células, como se sabe en la materia. Un constructo de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un ARN o un polipéptido de interés, estando la secuencia unida operativamente a elementos de control de la expresión tales como un promotor que dirigen la transcripción en una célula de interés, se denomina en el presente documento "casete de expresión". El promotor puede ser un promotor de una polimerasa de ARN I, II o III funcional en células somáticas de mamífero. La expresión del agente de ARNi puede ser condicional. La expresión puede ser regulada colocando la secuencia que codifica para el agente de ARNi bajo el control de un promotor regulable (por ejemplo, inducible o reprimible).

Las versiones constitutivamente activas de proteínas tales como la β -catenina o de otros componentes de la ruta de señalización Wnt también son de utilidad. Un truncamiento o una delección N-terminal del potencial sitio de fosforilación de la GSK-3 en la región N-terminal, o una mutación sin sentido de los residuos de serina o de treonina en la misma, dan como resultado la acumulación de una β -catenina truncada o con un tamaño normal, y después a una activación de la señal mediada por la β -catenina (de La Coste PNAS, 95 (15): 8847-8851, 1998). Las versiones negativas dominantes de las proteínas endógenas que inhiben la señalización Wnt también son de utilidad. Las células somáticas pueden ser modificadas para que expresen estas proteínas. La proteína puede ser añadida al medio de cultivo.

Pueden tratarse las células para mejorar la captación de un activador de la ruta de la Wnt que actúe intracelularmente. Por ejemplo, puede permeabilizarse parcialmente la membrana celular. Un activador de la ruta de la Wnt puede ser modificado para que comprenda una secuencia de aminoácidos que mejore la captación celular de las moléculas por parte de las células (denominado también "dominio de transducción de la proteína"). Dichas secuencias de aminoácidos que mejoran la captación se encuentran, por ejemplo, en la proteína TAT del VIH-1, en la proteína de unión al ADN del virus del herpes simple 1 (HSV-1) VP22, en el factor de transcripción de *Drosophila Antennapedia* (Antp), etc. También son de utilidad las secuencias artificiales. Véase, por ejemplo, Fischer et al, *Bioconjugate Chem.*, Vol. 12, nº 6, 2001, y la Patente de EE.UU. nº 6.835.810.

Las composiciones y las metodologías divulgadas en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20060147435 son útiles para promover la señalización de la Wnt/ β -catenina y pueden usarse en los métodos divulgados en el presente documento.

Pueden tratarse células somáticas de forma que expresen una proteína Wnt a unos niveles mayores de lo que sería el caso sin dicho tratamiento. Las células somáticas pueden ser modificadas genéticamente para que expresen de forma estable o temporal una proteína Wnt a unos niveles mayores de lo que sería el caso sin dicho tratamiento. Las células somáticas pueden ser tratadas de forma que expresen un componente de la ruta de la Wnt, tal como la β -catenina o un TCF/LEF, a unos niveles mayores de lo que sería el caso sin dicho tratamiento. Las células somáticas pueden ser modificadas genéticamente para que expresen de forma estable o temporal un componente de la ruta de la Wnt tal como la β -catenina o un TCF/LEF a unos niveles mayores de lo que sería el caso sin dicho tratamiento.

Los métodos de la invención pueden incluir el tratamiento de las células con múltiples agentes de reprogramación tanto simultáneamente (es decir, durante unos periodos de tiempo que se solapan al menos en parte) como secuencialmente y/o repitiendo las etapas de tratamiento de las células con un agente. El agente usado en el tratamiento de repetición puede ser el mismo o distinto al usado durante el primer tratamiento. Las células pueden ponerse en contacto con un agente de reprogramación durante unos periodos de tiempo variables. En algunas realizaciones, las células se ponen en contacto con el agente durante un periodo de tiempo de entre 1 hora y 60 días, por ejemplo, de entre 10 y 30 días, por ejemplo, durante aproximadamente 15-20 días. Los agentes de reprogramación pueden añadirse cada vez que se sustituye el medio de cultivo celular. El (los) agente(s) de reprogramación puede(n) eliminarse antes de llevar a cabo una selección para enriquecer en células pluripotentes, o de la evaluación de las características de pluripotencia de las células.

Los agentes de reprogramación o los candidatos a agentes de reprogramación de interés incluyen una diversidad de compuestos. Algunos ejemplos de compuestos incluyen agentes que inhiben la desacetilación de histonas, por ejemplo, inhibidores de la desacetilasa de histona (HDAC) y agentes que inhiben la metilación del ADN, por ejemplo, inhibidores de la metiltransferasa de ADN. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría, la desmetilación del ADN puede regular la expresión génica mediante una "apertura" de la estructura de la cromatina detectable en forma de un aumento de la sensibilidad a la nucleasa. Este remodelado de la estructura de la cromatina permite que los factores de transcripción se unan a las regiones promotoras, el ensamblaje del complejo de transcripción y la expresión génica.

Las principales clases de inhibidores de la HDAC incluyen (a) ácidos grasos de cadena pequeña (por ejemplo, ácido valproico); (b) inhibidores del hidroxamato de molécula pequeña (por ejemplo, SAHA y PXD101); (c) no inhibidores del hidroxamato de molécula pequeña, por ejemplo, MS-275; y (d) péptidos cíclicos: por ejemplo, depsipéptido (véase, por ejemplo, Carey N y La Thangue NB, *Curr Opin Pharmacol.*; 6 (4): 369-75, 2006). Algunos ejemplos de inhibidores de la desacetilasa de histona incluyen Trichostatin A: [R-(E,E)-7-[4-(dimetilamino)fenil]-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida, que inhibe la desacetilasa de histona a unas concentraciones nanomolares; la hiperacetilación de la histona resultante da lugar a una relajación de la cromatina y a la modulación de la expresión génica (Yoshida, M., et al., *Bioessays* 17, 423-430, 1995; Minucci, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94, 11295-11300, 1997; Brehm, A., et al., 1998; Medina, V., et al., Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res.* 57,3697-3707,1997; Kim, M. S., et al., Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res.* 63, 7291-7300, 2003); Apicidin: ciclo[(2S)-2-amino-8-oxodecanoil-1-metoxi-L-triptofil-L-isoleucil-(2R)-2-piperidin-xcarbonilo] (Kwon, S. H., et al. *J. Biol. Chem.* 18, 2073, 2002; Han, J. W., et al. *Cancer Res.* 60, 6068, 2000; Colletti, S. L., et al. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 107, 2001; Kim, J. S., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 866, 2001).

En la materia se conocen diversos inhibidores de la metilación del ADN y son de utilidad en la invención. Véase, por ejemplo, Lyko, F. y Brown, R., *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 97 (20) 1498-1506, 2005. Algunos inhibidores de la metilación del ADN incluyen inhibidores de la metiltransferasa de nucleósidos del ADN tales como decitabina (2'-desoxi-5-azacitidina), 5-azadesoxicitidina y zebularina, inhibidores no nucleosídicos tales como (-)-epigallocatequina-3-galato de polifenol (EGCG) y la molécula pequeña RG108 (ácido 2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)-3-(1H-indol-3-il) propanoico), los compuestos descritos en el documento WO2005085196 y ftalamida, succinimidas y los compuestos relacionados, tales como los descritos en el documento WO2007007054. Otras tres clases adicionales de compuestos son: (1) derivados del ácido 4-aminobenzoico, tales como el fármaco antiarrítmico procainamida y el anestésico local procaína; (2) tepsamaplinas, que también inhibe la desacetilasa de histona (Pina,

I. C., J OrgChem., 68 (10): 3866-73, 2003); y (3) oligonucleótidos, incluyendo ARNip, ARNhc y oligonucleótidos antisentido específicos, tales como MG98. Los inhibidores de la metilación del ADN pueden actuar mediante diversos mecanismos diferentes. Los inhibidores nucleosídicos son metabolizados por las rutas celulares antes de ser incorporados en el ADN. Después de la incorporación, funcionan como sustratos suicidas para las enzimas DNMT. Se ha propuesto que el inhibidor no nucleosídico procaína, el epigallocatequina-3-galato (EGCG) y el RG108 inhiben las metiltransferasas de ADN mediante el enmascaramiento de las secuencias objetivo de las DNMT (es decir, la procaína) o mediante un bloqueo del sitio activo de la enzima (es decir, el EGCG y el RG108). Pueden usarse combinaciones de inhibidores de la metilación del ADN. Las concentraciones pueden ser seleccionadas para minimizar los efectos tóxicos en las células. Pueden no usarse agentes que se incorporan en el ADN (o cuyos productos metabólicos se incorporan en el ADN).

La metiltransferasa de ADN (DNMT1, 3a y/o 3b) y/o uno o más miembros de la familia HDAC pueden ser inhibidos como alternativa o adicionalmente mediante el uso de agentes de ARNi.

En el presente documento también se divulga lo siguiente: 1) uso de un medio condicionado de Wnt, de una Wnt soluble o de moléculas pequeñas que modulan la señalización de la ruta de la Wnt junto con otras señales temporales, por ejemplo, moléculas pequeñas, que pueden sustituir a los retrovirus Oct4, Sox2, Klf4, Nanog y/o Lin28 en la reprogramación de células somáticas a pluripotencia; 2) una composición que comprende un modulador de la ruta de la Wnt y al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: inhibidores de la HDAC e inhibidores de la metilación del ADN; 3) una composición que comprende un modulador de la ruta de la Wnt, al menos un inhibidor de la HDAC y al menos un inhibidor de la metilación del ADN; 4) un medio de cultivo celular que contiene cualquiera de las anteriores combinaciones de agentes. El inhibidor de la HDAC puede ser cualquiera de los inhibidores de la HDAC mencionados anteriormente. El inhibidor de la metilación del ADN puede ser cualquiera de los inhibidores de la HDAC mencionados anteriormente. El modulador de la ruta de la Wnt puede activar la ruta de la Wnt. El medio de cultivo celular puede comprender un medio condicionado de Wnt, por ejemplo, un MC de la Wnt3a, como fuente del modulador de la ruta de la Wnt. El modulador de la ruta de la Wnt puede ser una molécula pequeña. La composición puede comprender células somáticas. Las células somáticas pueden ser modificadas para que expresen al menos uno de los factores de transcripción Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 y Lin28.

Células somáticas y células somáticas reprogramadas

Las células somáticas de utilidad en la invención pueden ser células primarias (células no inmortalizadas), tales como las recién aisladas de un animal, o pueden derivar de una línea celular capaz de una proliferación prolongada en cultivo (por ejemplo, durante más de 3 meses) o de una proliferación indefinida (células inmortalizadas). Las células somáticas de adulto pueden obtenerse a partir de individuos, por ejemplo, de sujetos humanos, y cultivarse según los protocolos de cultivo celular habituales disponibles para los expertos habituales en la materia. Las células pueden ser mantenidas en un cultivo celular después de su aislamiento o a partir de un sujeto. En ciertas realizaciones, las células se pasan una vez o más después de su aislamiento a partir del individuo (por ejemplo, entre 2-5, 5-10, 10-20, 20-50, 50-100 veces, o más) antes de su uso en un método de la invención. Pueden ser congeladas y posteriormente descongeladas antes de su uso. En algunas realizaciones, las células habrán sido pasadas no más de 1, 2, 5, 10, 20 o 50 veces después de su aislamiento a partir del individuo antes de su uso en un método de la invención.

Las células somáticas de utilidad en la presente invención incluyen, por ejemplo, células humanas, células de un primate no humano o células de ratón. Pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos a partir de diversos órganos, por ejemplo, la piel, el pulmón, el páncreas, el hígado, el estómago, el intestino, el corazón, los órganos reproductores, la vejiga, el riñón, la uretra y otros órganos urinarios, etc., generalmente a partir de cualquier órgano o tejido que contenga células somáticas vivas. Las células somáticas de mamífero útiles en varias realizaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, fibroblastos, células madre adultas, células de sertoli, células granulosa, neuronas, células de los islotes pancreáticos, células epidérmicas, células epiteliales, células endoteliales, hepatocitos, células del foliculo piloso, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (linfocitos B y T), eritrocitos, macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardiaco, células de músculo esquelético, etc., generalmente cualquier célula somática viva.

Las células somáticas pueden ser tratadas de forma que se provoque que expresen o contengan uno o más factores de reprogramación, factores de pluripotencia y/o factores de inducción del factor de pluripotencia, a unos niveles mayores de lo que sería el caso en ausencia de dicho tratamiento. Por ejemplo, pueden modificarse genéticamente las células somáticas para que expresen uno o más genes que codifican para uno más de dichos factores y/o pueden tratarse con agentes que aumenten la expresión de uno o más genes endógenos que codifican para dichos factores y/o que estabilizan dichos factores. El agente podría ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido, etc. En algunas realizaciones, se introducen factores tales como factores de pluripotencia en las células somáticas, por ejemplo, mediante una microinyección o poniendo en contacto las células con los factores en unas condiciones en las que los factores son captados por las células. En algunas realizaciones, los factores son modificados para que incorporen un dominio de transducción de una proteína. En algunas realizaciones, las células son permeabilizadas o tratadas de otro modo para que aumenten su captación de los factores. A continuación se analizan algunos ejemplos de factores.

El factor de transcripción Oct4 (denominado también Pou5f1, Oct-3, Oct3/4) es un ejemplo de un factor de pluripotencia. Se ha demostrado que el Oct4 es necesario para el establecimiento y el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células ES y juega un importante papel en la determinación de los acontecimientos tempranos en la embriogénesis y en la diferenciación celular (Nichols et al., 1998, Cell 95: 379-391; Niwa et al., 2000, Nature Genet. 24: 372-376). La expresión del Oct4 está regulada por disminución según se diferencian las células madre en células más especializadas. El Nanog es otro ejemplo de un factor de pluripotencia. El Nanog es un factor de transcripción que contiene una homeocaja con una función esencial en el mantenimiento de las células pluripotentes de la masa celular interna y en la derivación de las células ES a partir de éstas. Adicionalmente, la sobreexpresión de Nanog es capaz de mantener las características de pluripotencia y de autorrenovación de las células ES bajo lo que normalmente serían unas condiciones de cultivo inductoras de diferenciación (véase Chambers et al., 2003, Cell 113: 643-655; Mitsui et al., Cell. 2003, 113 (5): 631-42). El Sox2, otro factor de pluripotencia, es un factor de transcripción que contiene un dominio de HMG conocido por ser esencial para el normal desarrollo y mantenimiento de una célula pluripotente (Avilion, A., et al., Genes Dev. 17, 126-140, 2003). El Klf4 es un factor de transcripción en el dedo de cinc de tipo Kruppel identificado inicialmente como un miembro de la familia Klf expresado en el intestino (Shields, J. M, et al., J. Biol. Chem. 271: 20009-20017, 1996). Se encontró que la sobreexpresión del Klf4 en células ES de ratón impedía la diferenciación en cuerpos embrionarios formados en un cultivo en suspensión, lo que sugiere que el Klf4 contribuye a la autorrenovación de las ES (Li, Y., et al., Blood 105: 635-637, 2005). El Sox2 es un miembro de la familia de factores de transcripción SOX (caja Y de la región determinante del sexo) y es importante para el mantenimiento de la autorrenovación de las células ES. El c-Myc es un factor de transcripción que juega una miriada de papeles en el desarrollo y la fisiología normales, así como por ser un oncogén cuya expresión desregulada o mutación está implicada en diversos tipos de cáncer (revisado en Pelengaris S, Khan M., Arch Biochem Biophys. 416 (2): 129-36, 2003; Cole MD, Nikiforov MA, CurrTop Microbiol Immunol., 302: 33-50, 2006). En algunas realizaciones, dichos factores se seleccionan entre: Oct4, Sox2, Klf4 y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un miembro diferente de la familia Klf funcionalmente solapante tal como el Klf2 es sustituido por el Klf4. En algunas realizaciones, los factores incluyen al menos el Oct4. En algunas realizaciones, los factores incluyen al menos el Oct4 y un miembro de la familia Klf, por ejemplo, Klf2. La Lin28 es una proteína de unión al ARN regulada con el desarrollo. En algunas realizaciones, las células somáticas se tratan de forma que expresen o que contengan uno o más factores de reprogramación seleccionados entre: Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28 y combinaciones de los mismos. La CCAAT/proteína alfa mejoradora de la unión (C/EBPalfa) es otra proteína que promueve la reprogramación de al menos en ciertos tipos de células, por ejemplo, en células linfoides tales como las células de la estirpe B, se considera un factor de reprogramación para dichos tipos de células, y es de utilidad en ciertas realizaciones de la invención, por ejemplo, junto con uno o más de los genes de pluripotencia y/o moduladores de la ruta de la Wnt descritos en el presente documento.

Otros genes de interés están implicados en el remodelado de la cromatina y/o se ha demostrado que son importantes para el mantenimiento de la pluripotencia de las células ES. Opcionalmente, el gen es aquel que está regulado por disminución según se diferencian las células y/o que no es expresado en las células somáticas adultas. Otros genes de interés codifican para precursores de microARN que se han asociado con multipotencia o pluripotencia y/o que son expresados de forma natural en las células multipotentes o pluripotentes. Otros genes de interés incluyen codifican para agentes de ARNi que inhiben los genes que son objetivos de los microARN endógenos que son expresados de forma natural en las células multipotentes o pluripotentes.

En una realización, el gen introducido exógenamente puede ser expresado a partir de un *locus* cromosómico distinto al *locus* cromosómico de un gen endógeno cuya función está asociada con pluripotencia. Dicho *locus* cromosómico puede ser un *locus* con una estructura de cromatina abierta, y contener genes cuya expresión no sea necesaria en las células somáticas, por ejemplo, el *locus* cromosómico contiene genes cuya desestabilización no provocará la muerte de las células. Algunos ejemplos de *loci* cromosómicos incluyen, por ejemplo, el *locus* ROSA 26 de ratón y el *locus* del colágeno de tipo II (Col2a1) (véase Zambrowicz et al., 1997).

Los métodos para la expresión de genes en células son conocidos en la materia. Generalmente, se une operativamente una secuencia que codifica para un polipéptido o un ARN funcional, tal como un agente de ARNi, a las secuencias reguladoras apropiadas. El término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Algunos ejemplos de secuencias reguladoras se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, puede usarse cualquiera de una gran diversidad de secuencias de control de la expresión que controlen la expresión de una secuencia de ADN cuando están unidas operativamente a la misma en estos vectores para la expresión de ADNc.

El gen introducido exógenamente puede ser expresado a partir de una secuencia reguladora inducible o reprimible de forma que puede regularse su expresión. El término "secuencia reguladora inducible", según se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia reguladora que, en ausencia de un inductor (tal como un agente químico y/o biológico) o de una combinación de inductores, no dirige la expresión o la dirige a unos niveles de expresión bajos de una secuencia de ácidos nucleicos unida operativamente tal como un ADNc, y, en respuesta a un inductor, se mejora su capacidad para dirigir la expresión. Algunos ejemplos de promotores inducibles incluyen, por ejemplo, los promotores que responden a metales pesados (CRC Boca Raton, Fla. (1991), 167-220; Brinster et al. Nature (1982), 296, 39-42), a choques térmicos, a hormonas (Lee et al. P.N.A.S. EE.UU. (1988), 85, 1204-1208;

(1981), 294, 228-232; Klock et al. *Nature* (1987), 329, 734-736; Israel y Kaufman, *Nucleic Acids Res.* (1989), 17, 2589-2604), promotores que responden a agentes químicos, tales como glucosa, lactosa, galactosa o un antibiótico. Una "secuencia reguladora reprimible" es aquella que dirige la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos unida operativamente en ausencia de un agente específico o de una combinación de agentes que inhiben la expresión.

Un promotor inducible por tetraciclina es un ejemplo de un promotor inducible que responde a un antibiótico. Véase Gossen, M. y Bujard, H., *Annu Rev Genet.* Vol. 36: 153-173 2002 y las referencias del mismo. Un promotor inducible por tetraciclina comprende un promotor mínimo unido operativamente a uno o más operadores de tetraciclina. La presencia de tetraciclina o de uno de sus análogos da lugar a la unión de un activador de la transcripción a las secuencias operadoras de la tetraciclina, que activa el promotor mínimo y por lo tanto la transcripción del ADNc asociado. El análogo de la tetraciclina incluye cualquier compuesto que muestre una similitud estructural con la tetraciclina y sea capaz de activar un promotor inducible por tetraciclina. Algunos ejemplos de análogos de tetraciclina incluyen, por ejemplo, doxiciclina, clorotetraciclina y anhidrotetraciclina.

La expresión de un gen introducido, por ejemplo, de un gen que codifica para un factor de reprogramación o un agente de ARNi, puede ser temporal. La expresión temporal puede conseguirse mediante una transfección temporal o mediante la expresión a partir de un promotor regulable. Opcionalmente, la expresión puede ser regulada por, o dependiente de, la expresión de una recombinasa específica de sitio. Algunos sistemas de recombinasa incluyen los sistemas Cre-Lox y Flp-Frt, entre otros (Gossen, M. y Bujard, H., 2002). Opcionalmente, se usa una recombinasa para activar la expresión mediante la eliminación de una secuencia de detención que de otro modo separaría la secuencia codificante de las secuencias de control de la expresión. Puede usarse una recombinasa para escindir al menos una porción de un gen después de que se haya inducido la pluripotencia. Opcionalmente, la recombinasa es expresada temporalmente, por ejemplo, se vuelve indetectable después de aproximadamente 1-2 días, 2-7 días, 1-2 semanas, etc. Opcionalmente, la recombinasa es introducida desde fuentes externas. Opcionalmente, la recombinasa es un dominio de transducción de una proteína.

Pueden evaluarse una o más características de pluripotencia de las células somáticas reprogramadas. La presencia de las características de pluripotencia indica que las células somáticas han sido reprogramadas a un estado pluripotente. El término "características de pluripotencia", según se usa en el presente documento, se refiere a las características asociadas con, e indicativas de, pluripotencia, incluyendo, por ejemplo, la capacidad para diferenciarse en células derivadas de las tres capas germinales embrionarias, todos los tipos y patrones de expresión génica característicos de una célula pluripotente, incluyendo la expresión de factores de pluripotencia y la expresión de otros marcadores de las células ES.

Para evaluar las características de pluripotencia de las células somáticas potencialmente reprogramadas, se pueden analizar las características de crecimiento en particular de dichas células y la morfología de tipo célula ES. Las células pueden inyectarse subcutáneamente en ratones SCID inmunodeprimidos para determinar si inducen teratomas (un ensayo estándar para las células ES). Las células de tipo ES pueden ser diferenciadas en cuerpos embrionarios (otra característica específica de las ES). Además, las células de tipo ES pueden ser diferenciadas *in vitro* mediante la adición de algunos factores de crecimiento que se sabe que guían la diferenciación en unos tipos celulares específicos. La capacidad de autorrenovación, apreciable por la inducción de la actividad de la telomerasa, es otra característica de pluripotencia que puede ser controlada. Se pueden llevar a cabo ensayos funcionales con las células somáticas reprogramadas introduciéndolas en blastocistos y determinando si las células son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares. Véase Hogan et al., 2003. Si las células reprogramadas son capaces de formar unos pocos tipos celulares del cuerpo, son multipotentes; si las células reprogramadas son capaces de formar todos los tipos celulares del cuerpo, incluyendo las células germinativas, son pluripotentes.

También se puede analizar la expresión de un factor de pluripotencia individual en las células somáticas reprogramadas para evaluar sus características de pluripotencia. Adicionalmente o alternativamente, se puede evaluar la expresión de otros marcadores de las células ES. Los antígenos embrionarios específicos de etapa 1 5 1, 3 y 4 (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4) son glicoproteínas que se expresan específicamente en el desarrollo embrionario temprano, y son marcadores de las células ES (Solter y Knowles, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 75: 5565-5569; Kannagi et al., 1983, *EMBO J* 2: 2355-2361). Una elevada expresión de la enzima fosfatasa alcalina (FA) es otro marcador asociado con las células madre embrionarias indiferenciadas (Wobus et al., 1984, *Exp. Cell* 152: 212-219; Pease et al., 1990, *Dev. Biol.* 141: 322-352). Algunos marcadores adicionales de las células ES se describen en Ginis, I., et al., *Dev. Biol.*, 269: 369-380, 2004 y en *The International Stem Cell Initiative*, Adewumi O, et al., *Nat Biotechnol.*, 25 (7): 803-16, 2007 y en las referencias de los mismos. Por ejemplo, son de utilidad los TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 y GCT343, y los antígenos proteicos CD9, Thyl (también conocido como CD90), el HLA de clase 1, NANOG, TDGF1, DNMT3B, GABRB3 y GDF3, REX-1, TERT, UTF-1, TRF-1, TRF-2, conexina 43, conexina 45, Foxd3, FGFR-4, ABCG-2 y Glut-1.

Se puede llevar a cabo una caracterización de la expresión de las células somáticas reprogramadas para evaluar sus características de pluripotencia. Se sabe que las células pluripotentes, tales como las células madre embrionarias, y las células multipotentes, tales como las células madre adultas, tienen un patrón distinto de expresión génica global. Véase, por ejemplo, Ramalho-Santos et al., *Science* 298: 597-600, 2002; Ivanova et al.,

Science 298: 601-604, 2002; Boyer, LA, et al. Nature 441, 349, 2006, y Bernstein, BE, et al., Cell 125 (2), 315, 2006. Se puede evaluar la metilación del ADN, la expresión génica y/o el estado epigenético del ADN celular y/o el potencial de desarrollo de las células, por ejemplo, según se describe en Wernig, M., et al., Nature, 448: 318-24, 2007. Las células que son capaces de formar teratomas que contienen células que tienen las características del endodermo, del mesodermo y del ectodermo cuando se inyectan en ratones SCID y/o que poseen la capacidad de participar (después de una inyección en blastocistos murinos) en la formación de quimeras que sobreviven a término, se consideran pluripotentes. Otro método de utilidad para la evaluación de la pluripotencia es la determinación de si las células han reactivado un cromosoma X silente.

10 Las células somáticas pueden ser reprogramadas para que ganen un conjunto completo de características de pluripotencia. Alternativamente, las células somáticas pueden ser reprogramadas para que ganen únicamente un subconjunto de las características de pluripotencia.

15 Algunos de los métodos divulgados en el presente documento incluyen una etapa de selección de las células que expresan un marcador que es expresado por las células multipotentes o pluripotentes. El marcador puede ser expresado específicamente en dichas células. Pueden usarse los métodos de separación de células habituales, por ejemplo, una citometría de flujo, una separación por afinidad, etc. Alternativamente o adicionalmente, se podrían seleccionar las células que no expresan los marcadores característicos de las células somáticas de las cuales derivan las células potencialmente reprogramadas y que no son expresados en las células ES generadas mediante el uso de métodos convencionales. Otros métodos de separación de células pueden utilizar las diferencias en el tamaño medio o en la densidad de la célula que puedan existir entre las células pluripotentes y las células somáticas. Por ejemplo, las células pueden filtrarse a través de materiales que tengan unos poros que solo permitan el paso a su través de ciertas células.

25 Las células somáticas pueden contener un ácido nucleico que comprenda secuencias reguladoras de un gen que codifica para un factor de pluripotencia unido operativamente a un marcador seleccionable o detectable (por ejemplo, GFP o neo). La secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el marcador puede ser integrada en el *locus* endógeno del gen que codifica para el factor de pluripotencia (por ejemplo, Oct4), o el constructo puede comprender secuencias reguladoras unidas operativamente al marcador. Puede usarse la expresión del marcador para seleccionar, identificar y/o cuantificar las células reprogramadas.

30 Las células somáticas reprogramadas son generadas, seleccionadas o identificadas entre las células obtenidas o las descendientes de las células obtenidas. Opcionalmente, la(s) célula(s) es (son) expandida(s) en un cultivo antes de la generación, la selección o la identificación de la(s) células somática(s) reprogramada(s) emparejada(s) genéticamente con el donante.

35 Las colonias pueden subclonarse y/o pasarse una o más veces con objeto de obtener una población de células enriquecida en las células de tipo ES. La población enriquecida puede contener al menos un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más, por ejemplo, un 100 % de células de tipo ES. En el presente documento se divulgan las líneas celulares de las células somáticas que han sido reprogramadas de forma estable y heredable a un estado de tipo ES.

40 En algunas realizaciones, los métodos se llevan a la práctica mediante el uso de células somáticas que no están modificadas genéticamente con el fin de identificar o de seleccionar las células reprogramadas. Las células somáticas reprogramadas resultantes no contienen material genético exógeno que ha sido introducido en dichas células (o en los ancestros de dichas células) mediante la intervención humana, por ejemplo, con el fin de identificar o de seleccionar las células reprogramadas. En algunas realizaciones, las células somáticas y las células somáticas reprogramadas derivadas de las mismas no contienen material genético exógeno en su genoma, pero dicho material genético es introducido con el fin de corregir un defecto genético en dichas células o para permitir que dichas células sinteticen una proteína deseada con fines terapéuticos, y no se usa para la identificación ni para la selección de las células reprogramadas.

45 En algunas realizaciones, los métodos emplean unos criterios morfológicos para la identificación de las células somáticas reprogramadas entre una población de células somáticas que no están reprogramadas. En algunas realizaciones, los métodos emplean unos criterios morfológicos para la identificación de las células somáticas que han sido reprogramadas a un estado de tipo ES entre una población de células que no están reprogramadas o que solo están parcialmente reprogramadas a un estado de tipo ES. "Criterios morfológicos" se usa en un sentido amplio para referirse a cualquier característica detectable visualmente de las células o de las colonias. Algunos criterios morfológicos incluyen, por ejemplo, la forma de las colonias, la definición de los límites de la colonia, la densidad, un tamaño pequeño y la forma redondeada de las células con respecto a las células no reprogramadas, etc. La Figura 1 muestra colonias de células que muestran unos criterios morfológicos indicativos de las células que han sido reprogramadas a un estado de tipo ES. Nótese las densas colonias formadas por pequeñas células redondeadas, y los definidos límites de las colonias. Las colonias (o las células de las colonias) pueden ser identificadas, y opcionalmente aisladas cuando las colonias muestran una o más de dichas características. Las células somáticas reprogramadas pueden ser identificadas como colonias que crecen en una primera placa de cultivo celular (término que se refiere a cualquier recipiente, placa, plato, receptáculo, envase, etc., en el que puedan mantenerse células

vivas *in vitro*) y las colonias, o las porciones de las mismas, transferidas a una segunda placa de cultivo celular, aislando así las células somáticas reprogramadas. Las células pueden ser después expandidas adicionalmente.

Métodos de cribado de un agente que reprograma o que contribuye a la reprogramación de células somáticas

En el presente documento se divulgan métodos para la identificación de un agente que, solo o junto con uno o más de otros agentes, reprograman las células somáticas a un estado menos diferenciado, y los agentes identificados según los métodos. Los métodos pueden comprender poner en contacto las células somáticas con un activador de la ruta de la Wnt y un agente candidato, y la determinación de si la presencia del agente candidato da como resultado una mejora en la reprogramación (por ejemplo, un aumento en la velocidad y/o en la eficacia de reprogramación) con respecto a lo que se produciría si las células no hubieran entrado en contacto con el agente candidato. El activador de la Wnt y el agente candidato pueden estar presentes juntos en el medio de cultivo celular, o el activador de la Wnt y el agente candidato puede no estar presentes juntos (por ejemplo, las células son expuestas a los agentes secuencialmente). Las células pueden mantenerse en cultivo durante, por ejemplo, al menos 3 días, al menos 5 días, hasta 10 días, hasta 15 días, hasta 30 días, etc., tiempo durante el cual están en contacto con el activador de la Wnt y el agente candidato durante todo o parte del tiempo. El agente puede ser identificado como un agente que reprograma las células si hay al menos 2, 5 o 10 veces tantas células reprogramadas o colonias que comprenden células predominantemente reprogramadas después de dicho periodo de tiempo que si las células no hubieran estado en contacto con el agente.

Un agente candidato puede ser cualquier molécula o complejo supramolecular, por ejemplo, un polipéptido, un péptido (que se usa en el presente documento para referirse a un polipéptido que contiene 60 aminoácidos o menos), una molécula pequeña orgánica o inorgánica (es decir, moléculas que tienen un peso molecular menor de 1.500 Da, de 1.000 Da o de 500 Da), un polisacárido, un polinucleótido, etc. cuya capacidad para reprogramar las células se va a ensayar. Los agentes candidatos pueden ser moléculas orgánicas, particularmente moléculas orgánicas pequeñas, que comprenden grupos funcionales que median en las interacciones estructurales con las proteínas, por ejemplo, puentes de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y en algunas realizaciones, al menos dos de los grupos funcionales químicos. Los agentes candidatos pueden comprender estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos funcionales químicos y/o heteroátomos.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de una gran diversidad de fuentes, como apreciarán los expertos en la materia, incluyendo colecciones de compuestos sintéticos o naturales. Los agentes candidatos pueden ser compuestos sintéticos. Hay disponibles numerosas técnicas para la síntesis aleatoria y dirigida de una gran diversidad de compuestos y biomoléculas orgánicas. Los moduladores candidatos pueden proporcionarse en forma de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, caldos de fermentación, medios condicionados, etc., que están disponibles o pueden ser fácilmente producidos.

Puede cribarse una colección de compuestos. Una colección es normalmente un conjunto de compuestos que puede presentarse de forma que los compuestos pueden ser identificados en un ensayo de cribado. Los compuestos de la colección pueden estar alojados en pocillos individuales (por ejemplo, de placas de microtitulación), en recipientes, en tubos, etc., para facilitar la conveniente transferencia a los pocillos o a los recipientes individuales para ponerlos en contacto con las células, para la realización de ensayos exentos de células, etc. La colección puede estar formada por moléculas que tienen unas características estructurales comunes que difieren en el número o en el tipo de grupo unido a la estructura principal, o pueden ser completamente aleatorias. Algunas colecciones incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, colecciones de expresión en fago, colecciones de péptidos, colecciones de polisomas, colecciones de aptámeros, colecciones de pequeñas moléculas sintéticas, colecciones de compuestos naturales y colecciones de compuestos químicos. Los métodos para la preparación de colecciones de moléculas son bien conocidos en la materia, y hay disponibles muchas colecciones en fuentes comerciales o no comerciales. Algunas colecciones de interés incluyen colecciones sintéticas orgánicas combinatorias. Algunas colecciones, tales como las colecciones de pequeñas moléculas sintéticas y las colecciones de compuestos químicos, pueden comprender un conjunto estructuralmente diverso de moléculas químicas. Algunas moléculas pequeñas incluyen moléculas orgánicas que a menudo tienen múltiples enlaces carbono-carbono. Las colecciones pueden comprender estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos funcionales. La molécula pequeña puede tener entre 5 y 50 átomos de carbono, por ejemplo, entre 7 y 30 carbonos. Los compuestos pueden ser macrocíclicos. Algunas colecciones de interés también incluyen colecciones de péptidos, colecciones aleatorias de oligonucleótidos, y similares. Las colecciones pueden ser sintetizadas con peptoides y con fracciones sintéticas no peptídicas. Dichas colecciones pueden ser sintetizadas adicionalmente para que contengan unas fracciones sintéticas no peptídicas que son menos susceptibles a una degradación enzimática en comparación con sus homólogos naturales. También pueden generarse colecciones combinatorias de moléculas pequeñas. Una colección combinatoria de compuestos orgánicos pequeños puede comprender un conjunto de análogos estrechamente relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad y que son sintetizados mediante técnicas orgánicas mediante el uso de procesos multietapa. Las colecciones combinatorias pueden incluir una amplia cantidad de compuestos orgánicos pequeños. Una "matriz de compuestos" según se usa en el presente documento es un conjunto de compuestos identificable por sus direcciones espaciales en coordenadas cartesianas y dispuesto de tal forma que cada compuesto tiene un

núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variables. Los compuestos de dicha matriz de compuestos se producen en paralelo en recipientes de reacción individuales, identificándose cada compuesto y siendo ubicado por su dirección espacial. Algunos ejemplos de mezclas de síntesis paralelas y de métodos de síntesis en paralelo se proporcionan en la Patente de EE.UU. nº 5.712.171. Pueden cribarse mezclas que contengan dos o más compuestos, extractos u otras preparaciones obtenidas a partir de fuentes naturales (que pueden comprender docenas de compuestos o más), y/o compuestos inorgánicos, etc.

Los métodos pueden usarse para el cribado de "fármacos aprobados". Un "fármaco probado" es cualquier compuesto (término que incluye moléculas biológicas tales como proteínas y ácidos nucleicos) que ha sido aprobado para su uso en seres humanos por la FDA o estadounidense o una agencia gubernamental similar en otro país, para cualquier fin. Ésta puede ser una clase particularmente útil de compuestos para cribar debido a que representa un conjunto de compuestos que se cree que son seguros y, al menos en el caso de los fármacos aprobados por la FDA, son terapéuticos para al menos un fin. Por lo tanto, existe una elevada probabilidad de que estos fármacos sean al menos seguros para otros fines.

Algunos ejemplos representativos de colecciones que podrían cribarse incluyen DIVERSet™, disponible en ChemBridge Corporation, 16981 Via Tazon, San Diego, Calif. 92127. DIVERSet contiene entre 10.000 y 50.000 moléculas pequeñas similares a fármacos sintetizadas manualmente. Los compuestos son preseleccionados para formar una colección "universal" que cubre la máxima diversidad de farmacóforos con el mínimo número de compuestos, y es adecuada para un cribado tanto de alto rendimiento como de bajo rendimiento. Para las descripciones de colecciones adicionales, véase, por ejemplo, Tan, et al., Am. Chem Soc. 120, 8565-8566, 1998; Floyd C D, Leblanc C, Whittaker M, Prog Med Chem 36: 91-168, 1999. En el mercado hay disponibles numerosas colecciones, por ejemplo, en AnalytiCon EE.UU. Inc., P.O. Box 5926, Kingwood, Tex. 77325; en 3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 665 Stockton Drive, Suite 104, Exton, Pa. 19341-1151; en Tripos, Inc., 1699 Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144-2913, etc. Por ejemplo, en el mercado están disponibles colecciones basadas en ácido quínico y ácido shikímico, hidroxiprolina, santonina, dianhidro-D-glucitol, ácido hidroxipicolínico, andrografolida, una colección basada en el ácido piperazin-2-carboxílico, citosina, etc.

Los agentes candidatos pueden ser ADNc de una genoteca de expresión de ADNc preparada a partir de células, por ejemplo, de células pluripotentes. Dichas células pueden ser células madre embrionarias, ovocitos, blastómeros, teratocarcinomas, células germinales embrionarias, células de la masa celular interna, etc.

Se apreciará que el agente candidato de reprogramación que se va a ensayar normalmente es aquel que no está presente en un medio de cultivo habitual, o que si está presente, está presente en unas cantidades menores de las que se usan en los métodos divulgados en el presente documento.

También se apreciará que no es necesario que un agente de reprogramación útil u otra forma de tratamiento de reprogramación sea capaz de reprogramar todos los tipos de células somáticas, ni que sea capaz de reprogramar todas las células somáticas de un tipo celular dado. Sin limitación, es de utilidad un agente candidato que dé como resultado una población que está enriquecida en células reprogramadas en un factor de 2, de 5, de 10, de 50, de 100 o más (es decir, la fracción de células reprogramadas en la población es 2, 5, 10, 50 o 100 veces más que la presente en una población de células de partida tratada de la misma forma pero que no haya entrado en contacto con el agente candidato).

El método de cribado puede usarse para la identificación de un agente o de una combinación de agentes que sustituye al Klf4 en la reprogramación de las células a un estado de tipo ES. El método puede llevarse a la práctica mediante el uso de células somáticas modificadas para que expresen Sox2 y Oct4 y poniéndolas en contacto con un activador de la ruta de la Wnt. El método puede usarse para la identificación de un agente que sustituye al Sox2 en la reprogramación de las células a un estado de tipo ES. El método puede llevarse a la práctica mediante el uso de células somáticas modificadas para que expresen Klf4 y Oct4 y poniéndolas en contacto con un activador de la ruta de la Wnt. El método puede usarse para la identificación de un agente que sustituye al Oct4 en la reprogramación de las células a un estado de tipo ES. El método puede llevarse a la práctica mediante el uso de células somáticas modificadas para que expresen Sox2 y Klf4 y poniéndolas en contacto con un activador de la ruta de la Wnt. Se contempla que la expresión modificada de Klf4, de Sox2, de Oct4 y de c-Myc se sustituya mediante el tratamiento de las células somáticas con una combinación de moléculas pequeñas y/o de polipéptidos o de otros agentes que no impliquen una modificación del genoma. Los métodos pueden llevarse a la práctica mediante el uso de células humanas, de células de ratón o de células de un primate no humano.

Algunos de los métodos divulgados en el presente documento engloban el ensayo de moduladores de la ruta de la Wnt, por ejemplo, colecciones de moléculas pequeñas de las que se sabe o se sospecha que modulan la ruta de la Wnt, para identificar aquellas que son eficaces en la mejora de la reprogramación y/o que tienen una capacidad superior para mejorar la reprogramación de células somáticas a pluripotencia, por ejemplo, con respecto a otros compuestos ensayados. En algunas realizaciones, se ensayan al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100 o al menos 1.000 moléculas pequeñas, por ejemplo, moléculas relacionadas estructuralmente, al menos algunas de las cuales se sabe o se cree que modulan la actividad de la ruta de la Wnt. Un inhibidor de la Wnt puede usarse para confirmar que un compuesto que mejora la reprogramación y que es sospechoso de hacerlo mediante la

modulación de la actividad de la ruta de la Wnt actúa de hecho a través de la ruta de la Wnt. Por ejemplo, si el inhibidor de la ruta de la Wnt bloquea el efecto de un compuesto de ensayo sobre la reprogramación, puede concluirse que el compuesto de ensayo actúa a través de la ruta de la Wnt.

5 Los métodos y las composiciones de la presente invención relacionados con la modulación de la ruta de la Wnt puede ser aplicados o usarse junto con otros diversos métodos y composiciones útiles para la reprogramación de células somáticas y/o para la identificación de agentes de reprogramación para su uso en la reprogramación de células somáticas. Por ejemplo, algunas realizaciones de la invención emplean unos tipos de células (por ejemplo, células madre neurales o células progenitoras) que expresan de forma natural uno o más factores de reprogramación a unos niveles mayores de los que dichos factores son expresados en otros muchos tipos de células (véase, por ejemplo, Eminli, et al., *Reprogramming of Neural Progenitor Cells in iPS Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression, Stem Cells*. 17 de julio de 2008, publicación electrónica antes de impresión).

15 Los métodos y las composiciones pueden usarse junto con los métodos y las composiciones divulgados en el documento PCT/US2008/004516:

se han derivado células somáticas "secundarias" genéticamente homogéneas que portan factores de reprogramación en forma de transgenes definidos inducibles por doxiciclina (dox) Wernig, et al., *A novel drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types*. *Nature Biotechnology*; publicación electrónica del 1 de julio de 2008; doi:10.1038/nbt1483). Estas células se produjeron mediante la infección de fibroblastos con lentivirus inducibles por dox, una reprogramación mediante la adición de dox, seleccionando las células madre pluripotentes inducidas y produciendo ratones quiméricos. Las células derivadas de estas quimeras se reprograman tras la exposición a dox sin la necesidad de una infección vírica, con unas eficacias 25 y 50 veces mayores que las observadas mediante el uso de una infección directa y una selección farmacológica para la reactivación del marcador de pluripotencia. En algunas realizaciones de la invención, dichas células somáticas secundarias se usan en realizaciones de la presente invención y/o se generan células somáticas secundarias sin el uso de un virus c-Myc mediante el empleo de una estimulación de la ruta de la Wnt según se describe en el presente documento. La presente invención contempla el uso de la modulación de la ruta de la Wnt en composiciones y métodos relacionados con células somáticas secundarias.

En algunas realizaciones de la invención, las células somáticas contienen una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador seleccionable, unido operativamente a un promotor de un gen de pluripotencia endógeno, por ejemplo, Oct4 o Nanog. La secuencia que codifica para el marcador puede ser integrada en el genoma en un *locus* endógeno. El marcador seleccionable puede ser, por ejemplo, una proteína fácilmente detectable, tal como una proteína fluorescente, por ejemplo, la GFP o un derivado de la misma. La expresión del marcador es indicativa de reprogramación, y por lo tanto puede usarse para la identificación o la selección de las células reprogramadas, para la cuantificación de la eficacia de reprogramación y/o para la identificación, la caracterización o el uso de agentes que mejoran la reprogramación y/o cuya capacidad para mejorar la reprogramación se está ensayando.

40 Células somáticas reprogramadas y usos de las mismas

En el presente documento se divulgan células somáticas reprogramadas (RSC), que incluyen células madre pluripotentes inducidas (células iPS), producidas mediante los métodos de la invención u otros métodos divulgados en el presente documento. Estas células tienen numerosas aplicaciones en medicina, agricultura y otras áreas de interés, algunas de las cuales se describen aquí.

También se divulgan métodos para el tratamiento o la prevención de una afección en un mamífero. Los métodos pueden implicar la obtención de células somáticas a partir del individuo, la reprogramación de las células somáticas así obtenidas mediante los métodos de la presente invención para obtener RSC, por ejemplo, células iPS. Las RSC se cultivan después en unas condiciones adecuadas para su desarrollo en células de un tipo celular deseado. Las células desarrolladas del tipo celular deseado se introducen en el individuo para el tratamiento de la afección. Alternativamente, los métodos pueden comenzar con la obtención de células somáticas a partir del individuo, la reprogramación de las células somáticas así obtenidas mediante los métodos de la presente invención. Después, las RPC se cultivan en unas condiciones adecuadas para que las RPC se desarrollen en un órgano deseado, que es recogido e introducido en el individuo para el tratamiento de la afección. La afección puede ser cualquier afección en la que una célula o un órgano tiene un funcionamiento normal y/o unos niveles reducidos por debajo de lo normal. Por lo tanto, en el presente documento se divulgan las etapas de obtención de las células somáticas a partir de un individuo en necesidad de una terapia celular, la reprogramación de las células mediante un proceso que comprende la activación de una ruta de la Wnt y/o el cultivo de las células en medio condicionado de Wnt, opcionalmente la diferenciación de las células somáticas reprogramadas para generar células de uno o más tipos celulares deseados, y la introducción de las células en el individuo. Un individuo en necesidad de terapia celular puede padecer cualquier afección, en la que la afección o uno o más síntomas de la afección pueden ser aliviados mediante la administración de las células al donante y/o en la que la progresión de la afección puede ser ralentizada mediante la administración de las células al individuo. El método puede incluir una etapa de identificación o de selección de las células somáticas reprogramadas y de su separación de las células que no están reprogramadas.

Las RSC pueden ser células de tipo ES, denominadas también células iPS, y por lo tanto pueden ser inducidas para que se diferencien para obtener los tipos celulares deseados según los métodos conocidos para la diferenciación de células ES. Por ejemplo, las células iPS pueden ser inducidas para que se diferencien en células madre hematopoyéticas, en células musculares, en células musculares cardíacas, en células hepáticas, en células pancreáticas, en células de cartílago, en células epiteliales, en células del tracto urinario, en células del sistema nervioso (por ejemplo, en neuronas) etc., mediante el cultivo de dichas células en un medio de diferenciación y en unas condiciones que proporcionen la diferenciación celular. El medio y los métodos que dan como resultado la diferenciación de células madre embrionarias obtenidas mediante el uso de los métodos tradicionales son conocidos en la materia, al igual que las condiciones de cultivo adecuadas. Dichos métodos y condiciones de cultivo pueden aplicarse a las células iPS obtenidas según la presente invención. Véase, por ejemplo, Trounson, A., The production and directed differentiation of human embryonic stem cells, *Endocr Rev.* 27 (2): 208-19, 2006 y las referencias del mismo, para algunos ejemplos. Véase también Yao, S., et al, Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 103 (18): 6907-6912, 2006 y las referencias del mismo.

Por lo tanto, mediante el uso de los métodos y los medios de cultivo conocidos, el experto en la materia puede cultivar las células pluripotentes reprogramadas para obtener los deseados tipos celulares diferenciados, por ejemplo, células neurales, células musculares, células hematopoyéticas, etc. Las células en cuestión pueden usarse para obtener cualquier tipo celular diferenciado deseado. Dichas células humanas diferenciadas proporcionan una multitud de oportunidades terapéuticas. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas humanas derivadas de las células reprogramadas según la presente invención pueden usarse en tratamientos médicos que requieren un trasplante de médula ósea. Dichos procedimientos se usan para el tratamiento de muchas enfermedades, por ejemplo, de cánceres en fase terminal y de neoplasias tales como la leucemia. Dichas células también son de utilidad para el tratamiento de la anemia, de enfermedades que comprometen el sistema inmunitario, tales como el SIDA, etc. Los métodos divulgados en el presente documento también pueden usarse para el tratamiento, la prevención o la estabilización de una enfermedad neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o la ELA, de enfermedades de almacenamiento lisosómico, de la esclerosis múltiple o de una lesión de la médula espinal. Por ejemplo, pueden obtenerse células somáticas a partir del individuo que necesita el tratamiento, y reprogramarse para que consigan una pluripotencia, y cultivarse para que deriven en células del neurectodermo que pueden usarse para sustituir o ayudar al normal funcionamiento del tejido enfermo o dañado.

Las células reprogramadas que producen un factor de crecimiento o una hormona, tal como insulina, etc., pueden ser administradas a un mamífero para el tratamiento o la prevención de trastornos endocrinos. Las células epiteliales reprogramadas pueden ser administradas para reparar daños en el revestimiento de una cavidad corporal o de un órgano, tal como un pulmón, el intestino, una glándula exocrina o el tracto urogenital. También se contempla que las células reprogramadas puedan ser administradas a un mamífero para el tratamiento de una lesión o de una deficiencia en las células de un órgano tal como la vejiga, el cerebro, el esófago, una trompa de Falopio, el corazón, el intestino, la vesícula biliar, el riñón, el hígado, el pulmón, los ovarios, el páncreas y, la próstata, la médula espinal, el bazo, al estómago, los testículos, el timo, la tiroides, la tráquea, un uréter, la uretra o el útero.

La presente invención tiene el potencial de proporcionar un suministro esencialmente ilimitado de células genéticamente compatibles adecuadas para su trasplante. Dicho suministro abordaría el significativo problema relacionado con los actuales métodos de trasplante, es decir, el rechazo del tejido trasplantado que puede producirse debido a un rechazo del hospedador frente al injerto o del injerto frente al hospedador. Las RSC también pueden combinarse con una matriz para formar un tejido o un órgano *in vitro* o *in vivo* que puede usarse para reparar o sustituir un tejido o un órgano en un receptor mamífero. Por ejemplo, pueden cultivarse las RSC *in vitro* en presencia de una matriz para producir un tejido o un órgano del sistema urogenital, cardiovascular o musculoesquelético. Alternativamente, puede administrarse una mezcla de las células y una matriz a un mamífero para la formación del tejido deseado *in vivo*. Las RSC producidas según la invención pueden usarse para producir células diferenciadas modificadas genéticamente o transgénicas, por ejemplo, mediante la introducción de un gen o genes deseados, o mediante la eliminación de todos o de parte de un gen o genes endógenos de las RSC producidas según la invención, y permitiendo que dichas células se diferencien en el tipo celular deseado. Un método para conseguir dicha modificación es mediante una recombinación homóloga, técnica que puede usarse para insertar, delecionar o modificar un gen o genes en un sitio o sitios específicos del genoma.

Esta metodología puede usarse para sustituir genes defectuosos o para introducir genes que dan como resultado la expresión de proteínas terapéuticamente beneficiosas tales como factores de crecimiento, hormonas, lincinas, citocinas, enzimas, etc. Por ejemplo, puede introducirse el gen que codifica para el factor de crecimiento cerebral en células embrionarias o de tipo madre humanas, diferenciarse las células en células neurales y trasplantarse las células un paciente con Parkinson para retrasar la pérdida de las células neurales durante dicha enfermedad. Mediante la utilización de métodos conocidos para la introducción de los genes/mutaciones deseados en las células ES, las RSC puede ser modificadas genéticamente, y las células modificadas resultantes diferenciarse en los tipos celulares deseados, por ejemplo, en células hematopoyéticas, en células neurales, en células pancreáticas, en células de cartílago, etc. Algunos genes que pueden ser introducidos en las RSC incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento básico de fibroblastos, factor de crecimiento neurotrófico derivado de

la glía, factor de crecimiento insulinoide (I y II), neurotrofina 3, neurotrofina 4/5, factor neurotrófico ciliar, AFT-1, genes de citocinas (interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonias, factores de necrosis tumoral (alfa y beta), etc.), genes que codifican para enzimas terapéuticas, colágeno, albúmina sérica humana, etc.

5 Si se desea pueden usarse los sistemas de selección negativa conocidos en la materia para la eliminación de las células terapéuticas de un paciente. Por ejemplo, las células transportadas con el gen de la cinasa de timidina (TK) darán lugar a la producción de células embrionarias (por ejemplo, de tipo ES) que contienen el gen de la TK. La diferenciación de estas células dará lugar al aislamiento de las células terapéuticas de interés que también expresan el gen de la TK. Dichas células pueden ser eliminadas selectivamente en cualquier momento de un paciente tras la
10 administración de ganciclovir. Dicho sistema de selección negativa se describe en la Patente de EE.UU. nº 5.698.446. Las células pueden ser modificadas para que contengan un gen que codifica para un producto tóxico cuya expresión está bajo el control de un promotor inducible. La administración del inductor provoca la producción del producto tóxico, dando lugar a la muerte las células. Por lo tanto, cualquiera de las células somáticas divulgadas en el presente documento puede comprender un gen suicida, contenido opcionalmente en un casete de expresión, que puede estar integrado en el genoma. El gen suicida es aquel cuya expresión sería letal para las células. Algunos ejemplos incluyen genes que codifican para la toxina diftérica, la toxina colérica, ricino, etc. El gen suicida puede estar bajo el control de elementos de control de la expresión que dirigen la expresión en circunstancias normales en ausencia de un agente o estímulo inductor específico. Sin embargo, la expresión puede ser inducida en unas condiciones apropiadas, por ejemplo, (i) mediante la administración de un agente de inducción apropiado a una
20 célula o un organismo o (ii) si un gen en particular (por ejemplo, un oncogén, un gen implicado en el ciclo de división celular o un gen indicativo de desdiferenciación o de pérdida de diferenciación) es expresado en las células, o (iii) si se pierde la expresión de un gen, tal como un gen de control del ciclo celular o de un gen indicativo de diferenciación. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 6.761.884. El gen puede ser expresado únicamente después de un acontecimiento de recombinación mediado por una recombinasa específica de sitio. Dicho acontecimiento puede poner la secuencia codificante en una asociación operativa con elementos de control de la expresión, tales como un promotor. Puede inducirse la expresión del gen suicida si se desea eliminar las células (o su progenie) del cuerpo de un sujeto después de que se hayan administrado las células (o sus ancestros) al sujeto. Por ejemplo, si una célula somática reprogramada da lugar a un tumor, el tumor puede ser eliminado mediante la inducción de la expresión del gen suicida. La formación de tumores puede estar inhibida debido a que las células son eliminadas automáticamente tras su desdiferenciación o porque pierden el apropiado control del ciclo celular.

Algunos ejemplos de enfermedades, trastornos o afecciones que pueden tratarse o prevenirse incluyen enfermedades, trastornos o afecciones neurológicos, endocrinos, estructurales, esqueléticos, vasculares, urinarios, digestivos, integumentarios, sanguíneos, inmunitarios, autoinmunes, inflamatorios, endocrinos, renales, vesiculares, cardiovasculares, cancerosos, circulatorios, digestivos, hematopoyéticos y musculares. Además, las células reprogramadas pueden usarse para aplicaciones de reconstrucción, tales como la reparación o la sustitución de tejidos o de órganos. Puede ser ventajosa la inclusión de factores de crecimiento y de proteínas o de otros agentes que promuevan la angiogénesis. Alternativamente, la formación de los tejidos puede efectuarse totalmente *in vitro*, con los apropiados medios y condiciones de cultivo, factores de crecimiento y matrices poliméricas biodegradables.

40 Con respecto a los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento, la administración de las RSC a un mamífero no se limita a un modo de administración, dosis o frecuencia de dosificación en particular; la presente invención contempla todos los modos de administración, incluyendo intramuscular, intravenoso, intraarticular, intralesional, subcutáneo, o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para la prevención o el tratamiento de una enfermedad. Las RSC pueden ser administradas al mamífero en una única dosis o en dosis múltiples. Cuando se administran múltiples dosis, las dosis pueden estar separadas entre sí por, por ejemplo, una semana, un mes, un año o diez años. También pueden administrarse uno o más factores de crecimiento, hormonas, interleucinas, citocinas u otras células antes, durante o después de la administración de las células para predisponerlas adicionalmente hacia un tipo celular en particular.

50 Las RSC divulgadas en el presente documento pueden usarse como un modelo de diferenciación *in vitro*, en particular para el estudio de los genes que están implicados en la regulación del desarrollo temprano. Las células de los tejidos y órganos diferenciadas generadas mediante el uso de las células reprogramadas pueden usarse para estudiar los efectos de fármacos y/o para la identificación de agentes farmacológicos potencialmente útiles.

55 Aplicaciones adicionales de los métodos de reprogramación de células somáticas y de las células reprogramadas

Los métodos de reprogramación divulgados en el presente documento pueden usarse para generar RSC, por ejemplo, células iPS, para una diversidad de especies animales. Las RSC generadas puede ser útiles para producir los animales deseados. Algunos animales incluyen, por ejemplo, aves y mamíferos, así como cualquier animal que pertenezca a una especie en peligro. Algunos ejemplos de pájaros incluyen pájaros domesticados (por ejemplo, codornices, pollos, patos, gansos, pavos y gallinas). Algunos ejemplos de mamíferos incluyen murino, caprino, ovino, bovino, porcino, canino, felino y primates no humanos. De éstos, algunos miembros preferidos incluyen animales domesticados, que incluyen, por ejemplo, ganado, cerdos, caballos, vacas, conejos, cobayas, ovejas y cabras.

Métodos para la identificación de genes

En el presente documento se divulgan métodos para la identificación de un gen cuya expresión inhibe la generación de células reprogramadas. Un método comprende: (i) la activación de la ruta de la Wnt en células somáticas; (ii) la reducción de la expresión de un gen candidato por parte de un ARNi; (iii) la determinación de si la reducción de la expresión del gen candidato da como resultado un aumento en la eficacia de reprogramación, y si lo hace, la identificación del gen candidato como aquel cuya expresión inhibe la reprogramación de células somáticas. Un método comprende: (i) cultivar las células somáticas en medio condicionado de Wnt; (ii) reducir la expresión de un gen candidato mediante un ARNi; (iii) determinar si la reducción en la expresión del gen candidato da como resultado un aumento en la eficacia de reprogramación, y si es así, identificar el gen candidato como aquel cuya expresión inhibe la reprogramación de células somáticas. Opcionalmente las células somáticas son modificadas para que expresen al menos un gen seleccionado entre: Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 y Klf4. Opcionalmente las células se ponen en contacto con un modulador de la ruta de la Wnt. Las colecciones de ARNhc o de ARNip de utilidad en el método están disponibles en el mercado. El gen identificado es un objetivo de inhibición con objeto de mejorar la reprogramación celular. Los agentes que inhiben el gen (tanto agentes de ARNi como otros agentes, tales como moléculas pequeñas) son de utilidad en la reprogramación de células somáticas, por ejemplo, junto con un activador de la Wnt.

Demostración

Habiéndose descrito ahora la invención de forma general, será más fácilmente comprensible mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen con fines meramente ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Materiales y métodos para el Ejemplo 1

Cultivo celular, infecciones víricas, inducción de la expresión génica. Las células se cultivaron en un 15 % de FBS, DMEM-KO, Pen/Estep, glutamina, aminoácidos no esenciales, β -ME y LIF. Se infectaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) con un constructo Oct4-IRES-eGFP (Meissner, A., et al., Nature Biotechnology, Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts in pluripotent stem cells. Publicado electrónicamente: 27 de agosto de 2007 | doi:10.1038/nbt1335) insertado en el *locus* endógeno Oct4 con vectores lentivíricos que guían la expresión inducible por doxiciclina de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc o únicamente de Oct4, Sox2 y Klf4. Los vectores se basaban en el esqueleto del vector lentivírico FUGW (Lois C, et al., Science 2002; 295: 868-872.), modificado para que incluyera un promotor inducible por tet. Dos días después de la infección las células se dividieron y se indujeron con doxiciclina en presencia o en ausencia de medio condicionado de Wnt3a (usado a una dilución de 1:1 con medio de ES con 2x de LIF normal). Se controló la expresión de la GFP de estas células mediante una citometría de flujo el día 13 y de nuevo el día 20. Paralelamente se infectaron MEF con Oct4 inducible por doxiciclina expresado a partir del *locus* del colágeno y Oct4-IRES (resistencia a la neo) insertado en el *locus* endógeno Oct4 con lentivirus que guían la sobreexpresión de Sox2, Klf4 y c-Myc o de Sox2 y Klf4. De nuevo, dos días después de la infección las células se dividieron y se indujeron con doxiciclina en presencia o en ausencia de medio condicionado de Wnt3a. Se seleccionaron placas individuales de estas células con G418 el día 7 y el día 13, respectivamente. Después de al menos una semana de selección con G418, se analizaron y se contaron las colonias resistentes.

Medio condicionado. Se recogió medio condicionado de Wnt 3a (MC) a partir de células L de ratón que habían sido transfectadas con ADNc de Wnt3a (Shibamoto et al. 1998). Estas células son susceptibles, a través de ATCC (CRL-2647) junto con la línea celular parental no transfectada (CRL-2648), de ser utilizadas para el medio condicionado de control. Las células transfectadas con la Wnt3a secretan Wnt, alcanzando unos niveles de hasta 400 ng/ml de la proteína Wnt3a en su medio de crecimiento. El medio basal consistía en DMEM, un 15 % de FBS, Pen/Estep, glutamina y aminoácidos no esenciales, preparado según el protocolo de Singla et al. (Singla, et al., Biochem Biophys Res Commun., 345 (2): 789-95, 2006). El medio recogido de los fibroblastos secretores se filtró y se diluyó a 1:1 con medio regular de células ES (15 % de FBS, DMEM-KO, Pen/Estep, glutamina, aminoácidos no esenciales, β -ME y LIF). Después se usó este medio para tratar las células ES. Los Solicitantes y otros han demostrado que el medio condicionado de Wnt3a activa la ruta de señalización de la Wnt en células ES, según se demuestra mediante las inmunotransferencias que analizan la fosforilación de la beta-catenina.

Ejemplo 1: generación de células de tipo ES mediante el uso de medio condicionado de Wnt3a

Formulamos la hipótesis de que la estimulación de la estimulación de la ruta de la Wnt mediante el uso de factores solubles podría modular la eficacia de la inducción de pluripotencia en células somáticas. Este Ejemplo describe los experimentos iniciales que se llevaron a cabo para determinar el efecto de la estimulación de la ruta de la Wnt sobre la reprogramación. Las células que contienen un constructo Oct4-IRES-eGFP u Oct4-IRES-neo se infectaron con vectores lentivíricos que codifican para tres o para cuatro factores, como se ha descrito anteriormente. La expresión de los factores de pluripotencia se indujo el día 2. En algunos experimentos las células se cultivaron en medio condicionado de Wnt3a o en medio no condicionado, según se muestra en la Figura 4A (parte superior) desde los días 2-13. La expresión de la GFP se analizó mediante un FACS los días 13 y 20. En otros experimentos, las células se cultivaron en medio condicionado de Wnt3a o en medio no condicionado, según se muestra en la Figura 4A

(parte inferior) desde los días 2-13 o 2-20. La selección con G418 se impuso el día 7 o 13. Las colonias supervivientes se contaron el día 20.

Los resultados demostraron que el medio condicionado de Wnt 3a aumenta la tasa de formación de iPS en fibroblastos transducidos con los cuatro factores de transcripción de reprogramación. Según se muestra en la Figura 4B, la Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Las células seleccionables que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc formaron robustas colonias resistentes a la G418 más tempranamente en presencia de medio condicionado de Wnt3a que en ausencia de este medio. Cuando se seleccionaron el día 7, solo se formaron pequeñas colonias en ausencia de Wnt, ninguna de las cuales pudo ser propagada en cultivo. Las colonias formadas en presencia de medio condicionado de Wnt en este punto eran mayores y podían ser pasadas en forma de clones. Cuando la selección comenzaba el día 13, se observaban colonias en ausencia de medio condicionado de Wnt3a que pudieron ser propagadas. Aunque había menos colonias en este punto temporal en presencia de medio condicionado de Wnt que en ausencia de medio condicionado de Wnt, las colonias que se formaron eran grandes, relativamente homogéneas de aspecto y de nuevo podían ser mantenidas en cultivo. Este resultado sugiere que el medio condicionado de Wnt3a no solo aumentaba la tasa de reprogramación, sino que también seleccionaba las colonias de células reprogramadas.

El medio condicionado de Wnt3a también permite que se formen las células iPS sin la adición del factor de transcripción oncogénico c-Myc. Mientras que en nuestro experimento inicial no se formaron células iPS cuando los fibroblastos fueron transducidos con Oct4, Sox2 y Klf4, sí que observamos colonias iPS con estos tres factores cuando las células se cultivaban en medio condicionado de Wnt3a. Estas colonias parecían ser verdaderas células iPS basándose en la morfología y en la activación del *locus* endógeno Oct4, un acontecimiento restringido normalmente a las células pluripotentes. Según se muestra en la Figura 4C, en presencia de medio condicionado de Wnt3a se observaron robustas colonias resistentes a neo en las células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 seleccionadas tanto el día 7 como el día 13. En ausencia de medio condicionado de Wnt, se encontró que ninguna célula no infectada con el virus c-Myc era resistente a la neo en ningún punto temporal. Sin selección, se encontró que las células Oct4-IRES-eGFP infectadas con los lentivirus Sox2 y Klf4 expresaban la GFP (indicativo de la activación del *locus* endógeno Oct4) alrededor del día 20 únicamente en presencia de medio condicionado de Wnt.

30 Análisis

Los hallazgos descritos anteriormente son significativos por al menos dos razones principales. En primer lugar, existe un gran interés en la creación de células iPS que no tengan interacciones víricas del factor de transcripción oncogénico c-Myc. Los ratones quiméricos con células iPS creados con Myc muestran unas elevadas tasas de cáncer asociado con la reactivación somática del virus c-Myc. Incluso *in vitro* apreciamos que las líneas celulares iPS generadas con el virus c-Myc contienen una población mixta, teniendo algunas células un aspecto morfológicamente mucho más parecido a las células ES y creciendo otras más como células transformadas cancerosas. Nuestros resultados obtenidos hasta ahora indican que las líneas iPS creadas sin c-Myc en medio condicionado de Wnt3a parecen ser más homogéneamente de tipo ES en su morfología. En segundo lugar, el medio condicionado de Wnt3a parece ejercer un efecto selectivo que favorece la formación de grandes colonias homogéneas. El uso de medio condicionado de Wnt3a o de activadores de la ruta de la Wnt3a podría usarse por lo tanto como un proceso de selección alternativo en lugar de imponer una etapa de selección que requiere una modificación genética de las células somáticas iniciales. El uso de medio condicionado de Wnt3a o de activadores de la ruta de la Wnt3a durante la reprogramación nos proporcionaría por tanto una mejora valiosa para cualquier método de reprogramación de células somáticas conocido actualmente en la materia o desarrollado en el futuro.

Materiales y métodos para los Ejemplos 2-8

50 Cultivo celular.

Se cultivaron células murinas V6.5 (C57BL/6-129) ES y células iPS en las condiciones típicas de ES en fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEF). Los MEF transgénicos usados en las infecciones con lentivirus inducibles con DOX (T. Brambrink, R. Foreman, Cell Stem Cell 2, 151-159 (2008)) se recogieron en 13.5dpc y se seleccionaron con 2 µg/ml de puromicina a partir de los embriones después de la inyección de células ES inducibles con Oct4-IRES-GFPneo/Oct4 (M. Wernig, A. Meissner, Nature 448, 318-324 (2007).) o se recogieron a partir de cruces de F1 entre ratones R26-M2rtTA (C. Beard, K. Hochedlinger, Genesis 44, 23-28 (2006)) y ratones Oct4-GFP (A. Meissner, M. Wernig, Nat Biotechnol 25, 1177-1181 (2007)). Se generó medio condicionado de Wnt3a y medio condicionado de control según los protocolos habituales (ATCC) (K. Willert, J. D. Brown, Nature 423, 448-452 (2003), descrito también anteriormente) y se usó en una proporción de 1:1 con medio estándar de células ES). Se disolvió el inhibidor de la Wnt ICG-001 en DMSO hasta una concentración madre de 0,1 M. La concentración final de trabajo del inhibidor de la Wnt era de 4 µM.

60 Transducción vírica.

65 Se usaron constructos lentivíricos inducibles por tetraciclina que expresan los ADNc de Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc como se ha descrito previamente (Brambrink, *supra*). El virus se preparó mediante la transfección de células

FIEK293T con una mezcla del plásmido vírico y de constructos empaquetados que expresaban las funciones de empaquetado víricas y la proteína VSV-G (Fugene, Roche). El medio se sustituyó 24 horas después de la transfección y los sobrenadantes víricos se recogieron a las 48 horas y a las 72 horas. Después de la filtración, los sobrenadantes se agruparon y se cultivaron $2,5 \times 10^5$ MEF con los sobrenadantes víricos y medio reciente a una proporción de 1:1 durante 24 horas. Después, las células infectadas se dividieron en unas proporciones de entre 1:5 y 1:12 en placas de 10 cm recubiertas con gelatina. Un día después de la división, el medio de ES se complementó con 2 µg/ml de DOX y, en las placas apropiadas, con medio condicionado y/o con un inhibidor químico.

Inmunotinción y células de anticuerpos se tiñeron según se ha descrito previamente (Wernig, *supra*). Se usaron anticuerpos contra Nanog (Betil) y SSEA1 (R&D systems, Minneapolis, MN) según las recomendaciones del proveedor.

Formación de teratomas

Se ensayó la formación de teratomas como se ha descrito previamente. En resumen, las células se tripsinizaron y se inyectaron 5×10^5 células subcutáneamente en ratones SCID. Después de 14-21 días, se extrajeron los teratomas, se fijaron en formalina al 10 % tamponada con fosfato durante una noche y posteriormente se incluyeron en cera de parafina mediante el uso de una máquina de inclusión Tissue-Tek VIP (Miles Scientific, Naperville, IL) y un Thermo Shandon HistoCenter 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Las secciones se cortaron con un espesor de 2 µm mediante el uso de un Leica RM2065 (Leica, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (K. Hochedlinger, Y. Yamada, Cell 121, 465-477 (2005).

Inyección en los blastocistos. Las inyecciones de las células iPS en blastocistos de hospedadores Balb/c se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Beard, *supra*).

Ejemplo 2: experimentos adicionales relacionados con la generación de células de tipo ES mediante el uso de medio condicionado de Wnt3a

Para definir adicionalmente el efecto de la Wnt3a sobre la reprogramación, infectamos MEF que portan un ADNc de *Oct4* inducible con doxicilina (DOX) (Hochedlinger, 2005) con vectores lentivíricos inducibles con DOX que codifican para Sox2, Klf4 y c-Myc (Brambrink, et al., 2008). Estas células también contenían un casete de resistencia a la G418 en el *locus* endógeno *Oct4* que permite la selección farmacológica de las células iPS (Meissner et al., 2007).

Se indujo la expresión de cuatro factores mediante la adición de DOX en células cultivadas en presencia o en ausencia de medio condicionado de Wnt3a (MC de la Wnt3a), la selección con G418 se inició después de 5 días y el número de colonias resistentes al fármaco se determinó 24 días después de la inducción (Figura 1 a). La Figura 1 b muestra que el número total de colonias resistentes al fármaco aumentó más de 7 veces cuando las células eran cultivadas en el MC de la Wnt3a. También apreciamos que las colonias resistentes al fármaco eran más grandes y más de tipo ES en su morfología cuando se cultivaban en el MC de la Wnt3a con respecto a un medio de células ES (Figura 1 c). Adicionalmente, las colonias que aparecían en el MC de la Wnt3a con la selección con G418 iniciada el día 5 podían ser propagadas adicionalmente, al contrario que las pequeñas colonias derivadas en medio de células ES estándar.

Dado que el MC de la Wnt3a tenía un efecto positivo sobre la reprogramación en concierto con los cuatro factores de transcripción, a continuación analizamos si el MC de la Wnt3a podría ser sustituido por cualquiera de los factores nucleares. En experimentos paralelos transdujimos fibroblastos con subconjuntos de factores de transcripción, y los observamos en presencia y en ausencia de MC de la Wnt3a (Figuras 1 d y 1 e). No se formaron colonias resistentes en ausencia de una infección por Oct4 o Klf4. Se observó una colonia en ausencia del retrovirus Sox2, pero esta colonia no pudo ser propagada adicionalmente en las condiciones de cultivo de las células ES. Por el contrario, en presencia del MC de la Wnt3a, se formaron múltiples y robustas colonias resistentes a la G418 en ausencia de c-Myc en las células que sobreexpresan Oct4, Sox2 y Klf4 (Figuras 1 d y 1 e). De forma similar a las colonias de MEF transducidas con los cuatro factores, estas líneas iPS pudieron ser propagadas en medio de células ES estándar sin ninguna selección adicional y conservaron la morfología de las células ES. En experimentos repetidos se formaron ocasionalmente colonias resistentes a la G418 sin ninguna transducción con c-Myc en ausencia del MC de la Wnt3a. Sin embargo, de forma coherente con los informes publicados (8, 9), estas colonias eran raras. En lo sucesivo, las células iPS generadas únicamente con tres factores y sin c-Myc se denominaron células Myc^{L1} iPS.

Para analizar más estrechamente los efectos del tratamiento con el MC de la Wnt3a sobre el proceso de reprogramación, se cultivaron MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4 y Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc con y sin el MC de la Wnt3a, y la selección con G418 se inició en diferentes momentos después de la adición de la DOX. La Figura 1f muestra que cuando se cultivaron células que sobreexpresan tres factores en el medio MC de la Wnt3a, aparecían aproximadamente 3 veces más colonias Myc^{L1} iPS cuando se añadió G418 el día 5 y aproximadamente 20 veces más colonias que cuando se añadió G418 el día 10 después de la inducción en comparación con el cultivo en medio de células ES (Figura 1f, panel izquierdo). El medio MC de la Wnt3a también aumentó el número de colonias resistentes al fármaco tras la inducción de los cuatro factores, a pesar de que el aumento era menos pronunciado que en las células inducidas con tres factores (Figura 1f, panel derecho). Estos resultados indican que el MC de la

Wnt3a aumentó el número de colonias resistentes a fármacos en las células inducidas tanto con los tres factores como con los cuatro factores, con el efecto más pronunciado en las células que sobreexpresan los tres factores con la selección aplicada en el último punto temporal.

5 Ejemplo 3: generación de clones de Myc^{-/-} iPS sin selección genética.

Recientemente se han generado células iPS sin el retrovirus c-Myc (Myc^{-/-}), pero en ausencia de un c-Myc exógeno la eficacia y la cinética de la reprogramación se reducen significativamente (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008). Ensayamos si el MC de la Wnt3a también podría ayudar en la generación de células iPS en ausencia de una selección para la reactivación de *Oct4*. Para esto se utilizaron células con una GFP guiada por el promotor endógeno *Oct4* (Meissner, et al., 2008). Se analizó la expresión de la GFP en las células infectadas Oct4/Sox2/Klf4 con y sin un tratamiento con el MC de la Wnt3a mediante una citometría de flujo los días 10, 15 y 20 después de la inducción con DOX. No había presentes células positivas para la GFP con o sin un tratamiento con el MC de la Wnt3a el día 10 ni el día 15. Alrededor del día 20 se detectó una pequeña población de células que expresan la GFP en las células cultivadas en el MC de la Wnt3a, pero no en el medio de ES estándar (Figura 1 g). Los cultivos expuestos al MC de la Wnt3a formaron colonias que expresaban la GFP con una morfología típica de las células ES o iPS (Figura 1 h). Sin embargo, al contrario que las células transducidas con los cuatro factores, que habitualmente forman una población muy heterogénea de células cuando se propagan sin selección, las colonias de Oct4/Sox2/Klf4/MC en Wnt3a parecían homogéneamente de tipo ES similares a los clones de Myc^{-/-} iPS notificados previamente (Nakagawa, et al., 2008).

5 Ejemplo 4: potencial de desarrollo de las células Myc^{-/-} iPS derivadas con MC de la Wnt3a

Se llevaron a cabo varios ensayos para caracterizar el potencial de desarrollo de las células Myc^{-/-} iPS derivadas con un tratamiento con el MC de la Wnt3a. La inmunocitoquímica confirmó la expresión de los marcadores de pluripotencia, incluyendo el factor nuclear Nanog (Figuras 2 a y 2 b) y la glicoproteína de superficie SSEA1 (Figuras 2 c y 2 d). Los ensayos funcionales confirmaron que, al igual que las células ES, estas células iPS eran pluripotentes. Cuando se inyectaron subcutáneamente en ratones SCID, las células Myc^{-/-} iPS dieron lugar a teratomas con pruebas histológicas de células diferenciándose en las tres capas germinales (Figuras 2 e, 2 f y 2 g). Lo más importante, las células Myc^{-/-} iPS derivadas con un tratamiento con el MC de la Wnt3a contribuyeron a la formación de tejidos diferenciados en ratones quiméricos (Figura 2 h). Estos resultados indican que los clones Myc^{-/-} tratados con el MC de la Wnt3a son células pluripotentes que son morfológica y funcionalmente indistinguibles de las células ES.

35 Ejemplo 5: efecto de un inhibidor de molécula pequeña de la ruta de la Wnt sobre la generación de células iPS Myc^{-/-} e iPS en presencia de MC de la Wnt3a

Para cuantificar los efectos del MC de la Wnt3a, se llevaron a cabo experimentos por triplicado con MEF inducibles con Oct4/Sox2/Klf4 seleccionables con G418 (Figura 3 a). Se añadió G418 a los cultivos 15 días después de la inyección para seleccionar las células que tenían reactivado el *locus* Oct4. Cuando se puntuaron el día 28 después de la inyección, solo se detectaron unas pocas colonias Myc^{-/-} resistentes a la G418 (formándose entre 0-3 colonias sobre cada placa de diez centímetros) en unas condiciones de cultivo de células ES estándar. Por el contrario, se formaron ~ 20 veces más colonias resistentes al fármaco cuando la selección con la G418 se inició en las células tratadas con el MC de la Wnt3a, de forma coherente con la conclusión de que la activación de la ruta de la Wnt mejora la reprogramación. Debería apreciarse que el medio condicionado de los fibroblastos de control, que carece de una sobreexpresión de la Wnt3a, también provocó un aumento moderado en el número de colonias resistentes a la G418 con respecto al medio de ES estándar, lo que sugiere que los fibroblastos normales pueden secretar factores, que quizás incluyen la Wnt3a, que promueven la reprogramación.

Para evaluar de forma independiente el efecto de la Wnt3a sobre la reprogramación, cultivamos células en presencia de ICG-001 (Teo et al., 2005; McMillan y Kahn, 2005; véase la Figura 5), un inhibidor de la ruta de la Wnt/ β -catenina. La Figura 3 a (columnas de la derecha) muestra que el ICG-001 a 4 μ M inhibió fuertemente el efecto del MC de la Wnt3a sobre la formación de las Myc^{-/-} iPS. También se analizaron los efectos del MC de la Wnt3a y del ICG-001 en MEF que sobreexpresan los cuatro factores de reprogramación, incluyendo el c-Myc (Figura 3 b). Se observaron grandes cantidades de colonias resistentes a la G418 tanto en el medio de células ES estándar como en el MC de la Wnt3a en las células reprogramadas con los cuatro factores, con únicamente un sutil aumento en el número de las colonias con el MC de la Wnt3a. Al contrario que el drástico efecto del ICG-001 sobre las células Myc^{-/-}, a la misma dosis, el compuesto solo tuvo un sutil efecto sobre el número de colonias G418 en las células transducidas con c-Myc, y se observó un número relativamente mayor de colonias resistentes en estas condiciones. A unas dosis mayores de ICG-001, se redujo adicionalmente la cantidad de colonias iPS, pero incluso a 25 μ M se observaron múltiples colonias de iPS Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc (datos no mostrados). Estos resultados son coherentes con la noción de que la Wnt3a puede sustituir, al menos en parte, el papel del c-Myc en la reprogramación.

Se ha demostrado que la ruta de señalización de la Wnt se conecta directamente con el núcleo del circuito regulador de la transcripción de las células ES, lo que sugiere un mecanismo mediante el cual esta ruta podría promover directamente la inducción de pluripotencia en ausencia de una transducción con c-Myc (Figura 3 c). Se ha

demostrado que la ruta de señalización de la Wnt ruta se conecta directamente con el núcleo del circuito regulador de la transcripción de las células ES, lo que sugiere un mecanismo mediante el cual esta ruta podría promover directamente la inducción de pluripotencia en ausencia de una transducción con c-Myc (Figura 2 c). En las células ES, el Tcf3 ocupa y regula los promotores de Oct4, Sox2 y Nanog (Cole et al., 2008; Tam et al., 2008; Yi et al., 2008). En los MEF, estos factores de transcripción endógenos de pluripotencia están silenciados. Durante la reprogramación, como los Oct4, Sox2 y Klf4 exógenos contribuyen a la reactivación de los factores de pluripotencia endógenos (Jaenisch y Young, 2008), la señalización de la Wnt podría potenciar directamente el efecto de estos factores de transcripción, como lo hace en las células ES (Cole et al., 2008). Adicionalmente o alternativamente, la Wnt podría servir para activar directamente el c-Myc endógeno, sustituyendo así el c-Myc exógeno. De hecho, el c-Myc es un objetivo bien establecido de la ruta de la Wnt en células de cáncer colorrectal (He et al., 1998). En las células ES, el Tcf3 ocupa el promotor c-Myc, y la Wnt3a contribuye positivamente a la expresión del gen (Cole et al., 2008). El hecho de que la sobreexpresión forzada de c-Myc contrarreste el efecto negativo del inhibidor de la Wnt ICG-001 en el proceso de reprogramación, sugiere que la estimulación de la Wnt podría estar actuando cascada arriba del Myc endógeno. Los efectos inducidos por la Wnt sobre la proliferación celular, mediada por el c-Myc o por otros factores de proliferación endógenos, podrían ayudar a acelerar la secuencia de acontecimientos que da lugar a la generación de las colonias de Myc⁺ iPS.

Una meta importante de la investigación actual es la identificación de señales temporales que puedan reprogramar las células somáticas, eliminando la necesidad de retrovirus. Los estudios aquí descritos establecen que puede usarse la estimulación de la Wnt para mejorar la eficacia de reprogramación junto con factores nucleares, Oct4, Sox2 y Klf4. Al mejorar la eficacia de reprogramación en ausencia de retrovirus c-Myc, es probable que la Wnt soluble o pequeñas moléculas que modulan la ruta de señalización de la Wnt resulten útiles junto con otras señales temporales que puedan sustituir al resto de retrovirus.

Ejemplo 6: identificación de agentes de reprogramación adicionales

El Ejemplo 3 se ha modificado porque el medio contiene adicionalmente, además del MC de Wnt3a, un agente de reprogramación candidato que se va a ensayar para evaluar su potencial para mejorar o inhibir la reprogramación. En algunas realizaciones las células son infectadas de forma que expresen únicamente 2 de los 3 siguientes factores de reprogramación: Oct4, Klf4 y Sox2. Se identifican los agentes que mejoran la generación de células reprogramadas (por ejemplo, que aumentan la velocidad con la eficacia de la reprogramación). El proceso se repite para identificar los agentes capaces de sustituir la expresión modificada de Oct4, Klf4, y/o Sox2 en la reprogramación de células somáticas.

Ejemplo 7: identificación de agentes de reprogramación adicionales

El Ejemplo 3 se ha modificado porque el medio MC de Wnt3a contiene adicionalmente un agente de reprogramación candidato. En algunas realizaciones, las células son infectadas de forma que expresen únicamente 1 o 2 de los siguientes factores de reprogramación: Oct4, Lin28, Sox2 y Nanog (por ejemplo, únicamente Oct4, Oct-4 y Sox2). Se identifican los agentes que mejoran la generación de células reprogramadas. El proceso se repite para identificar los agentes capaces de sustituir la expresión modificada de Oct4, Lin28, Sox2, y/o Nanog en la reprogramación de células somáticas.

Ejemplo 8: uso de un modulador de molécula pequeña de la ruta de la Wnt en la reprogramación

El Ejemplo 3 se repite excepto porque en lugar de usar el MC de la Wnt3a, se usa medio de células ES que contienen un activador de molécula pequeña de la ruta de la Wnt.

Referencias

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H. y Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct programming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151-159.

Cai, L., Ye, Z., Zhou, B. Y., Mali, P., Zhou, C. y Cheng, L. (2007). Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions. *Cell Res* 17, 62-72.

Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H. y Young, R. A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes and Development* 15; 22 (6): 746-55 (2008).

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M. y Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

- Hochedlinger, K., Yamada, Y., (2005) *Cell* 121, 465-477.
- Jaenisch, R. y Young, R. A. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- 5 Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J. y Orkin, S. H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049-1061.
- Knoepfler, P. S. (2008). Why Myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell* 2, 18-21.
- 10 McMillan, M. y Kahn, M. (2005). Investigating Wnt signaling: a chemogenomics safari. *Drug Discov Today* 10, 1467-1474.
- Meissner, A., Wernig, M. y Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1177-1181.
- 15 Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. y Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-106.
- 20 Ogawa, K., Nishinakamura, R., Iwamatsu, Y., Shimosato, D. y Niwa, H. (2006). Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 159-166.
- Okita, K., Ichisaka, T. y Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- 25 Reya, T. y Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. y Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- 30 Singla, D. K., Schneider, D. J., LeWinter, M. M. y Sobel, B. E. (2006). wnt3a but not wnt1 1 supports self-renewal of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 789-795.
- 35 Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. y Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell en la prensa*.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. y Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- 40 Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- 45 Tam, W. L., Lim, C. Y., Han, J., Zhang, J., Ang, Y. S., Ng, H. H., Yang, H. y Lim, B. (2008). Tcf3 Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal by the Transcriptional Control of Multiple Lineage Pathways. *Stem Cells*.
- 50 Teo, J. L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C. y Kahn, M. (2005). Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by apresenilin-1 mutation. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 102, 12171-12176.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. y Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10-12.
- 55 Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3º y Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- 60 Yi, F., Pereira, L. y Merrill, B. J. (2008). Tcf3 Functions as a Steady State Limiter of Transcriptional Programs of Mouse Embryonic Stem Cell Self Renewal. *Stem Cells*.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- 65

- La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, las técnicas de genética con ratones convencionales, biología del desarrollo, biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están en la pericia de la técnica. Dichas técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Cell Biology, ed. by Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford y Yamada, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999; Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual, 3ª Ed., de Hogan et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2003; Gene Targeting: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1993; y Gene Targeting Protocols, Human Press, Totowa, Nueva Jersey, 2000.
- El experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los resultados y ventajas mencionadas, así como los inherentes a la misma. Los métodos, los sistemas y los kits son representativos de ciertas realizaciones, son ejemplares y no pretenden ser limitaciones del ámbito de la invención. A los expertos en la materia se les ocurrirán modificaciones de la misma y otros usos.
- Debería entenderse que los artículos "un" y "uno/a" según se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, salvo que claramente se indique lo contrario, incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o las descripciones que incluyan "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o están de otro modo relacionados con, un producto o proceso dado, salvo que se indique lo contrario o sea por lo demás evidente a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en o está relacionado de otro modo con, un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o están relacionados de otro modo con, un proceso producto dado. Adicionalmente, debe entenderse que la invención engloba todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que se introduzcan una o más limitaciones, elementos, estipulaciones, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones indicadas en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación de base (o, según sea relevante, de cualquier otra reivindicación) salvo que se indique de otro modo o salvo que fuera evidente para el experto habitual en la materia si pudiera surgir una contradicción o una incoherencia. Cuando los elementos se presentan en forma de listas, por ejemplo, en grupos de Markush o en un formato similar, debe entenderse que cada subgrupo de elementos también está divulgado, y que cualquier elemento puede ser eliminado del grupo. Debería entenderse que, en general, cuando se indica que la invención, o los aspectos de la invención, comprenden elementos, características, etc., particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, dichos elementos, características, etc. Con el fin de simplificar, esas realizaciones no se han establecido específicamente en cada caso en el presente documento. Debería entenderse que cualquier realización de la invención puede ser explícitamente excluida de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica está mencionada en la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede excluirse cualquier modulador de la Wnt, por ejemplo, cualquier agente activador de la ruta de la Wnt, cualquier tipo de célula somática, cualquier agente de reprogramación, etc.
- Cuando en el presente documento se proporcionan intervalos en el presente documento, la invención incluye las realizaciones en las que están incluidos los puntos terminales, las realizaciones en las que ambos puntos terminales están excluidos y las realizaciones en las que se incluye un punto terminal y el otro se excluye. Debería asumirse que ambos puntos terminales están incluidos salvo que se indique de otro modo. Adicionalmente, debe entenderse que, salvo que se indique de otro modo o sea por lo demás evidente a partir del contexto y según la comprensión del experto habitual en la materia, los valores que están expresados en forma de intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico de los intervalos establecidos en las diferentes realizaciones de la invención, hasta un décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. También debe entenderse que cuando se establece una serie de valores numéricos en el presente documento, la invención incluye las realizaciones que se refieren de forma análoga a cualquier valor o intervalo interviniente definido por dos valores cualesquiera de la serie, y que el valor más bajo puede tomarse como un mínimo y el valor más alto puede tomarse como un máximo. Los valores numéricos, según se usa en el presente documento, incluyen los valores expresados en forma de porcentajes. Para cualquier realización de la invención en la que un valor numérico está precedido por "aproximadamente", la invención incluye una realización en la que se indica el valor exacto. Para cualquier realización de la invención en la que un valor numérico no está precedido por "aproximadamente", la invención incluye una realización en la que el valor está precedido por "aproximadamente". "Aproximadamente" pretende incluir las cifras que están en un intervalo de $\pm 10\%$ de una cifra, en algunas realizaciones en el $\pm 5\%$ de una cifra, en algunas realizaciones en el $\pm 1\%$, de una cifra, en algunas realizaciones en el $\pm 0,5\%$ de una cifra, en algunas realizaciones en el $\pm 0,1\%$ de una cifra salvo que se indique de otro modo o sea por lo demás evidente a partir del contexto (excepto cuando dicha cifra exceda de forma no permisible el 100% de un posible valor).
- Algunas de las reivindicaciones se presentan en una forma dependiente por conveniencia, pero el Solicitante se reserva el derecho de volver a redactar cualquier reivindicación dependiente de una forma independiente para que incluya las limitaciones de la reivindicación independiente y cualquier otra reivindicación de la cual dependa dicha reivindicación, y dicha reivindicación vuelta a redactar debe considerarse equivalente en todos los aspectos a la reivindicación dependiente en cualquiera que sea su forma (tanto modificada como no modificada) antes de ser

redactada de nuevo en un formato independiente. También debería entenderse que, salvo que se indique claramente lo contrario, en cualquiera de los métodos reivindicados en el presente documento que incluya más de un acto, el orden de los actos del método no se limita necesariamente al orden en el que se indica el acto del método, sino que la invención incluye realizaciones en las que el orden está así limitado.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para la reprogramación de una célula somática de mamífero, que comprende poner en contacto la célula somática de mamífero con:

- 5 (I) un medio condicionado de Wnt que comprende una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de proteína Wnt3a secretada; un medio no condicionado que comprende al menos un 5 % del medio condicionado en volumen; o un activador de la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: una proteína Wnt exógena soluble biológicamente activa que se une a un receptor de la Wnt y activa la ruta de la Wnt, y un
- 10 antagonista de molécula pequeña GSK-3 que activa la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: 6-bromindirrubin-3'-oxima (BIO); N-(4-metoxibencil)-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea (AR-AO 14418); 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 216763); 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD-8); CHIR-911 y CHIR-837; y
- 15 (II) los factores de reprogramación Oct4, Klf4 y Sox2, reprogramando así la célula a un estado pluripotente.

2. El método de la reivindicación 1, en el que

- 20 (a) el método comprende el cultivo de la célula somática de mamífero en un medio de cultivo que contiene el activador de la ruta de la Wnt, o
- (b) el método comprende el cultivo de la célula somática de mamífero en un medio de cultivo que comprende el activador de la ruta de la Wnt durante al menos 10 días, o
- (c) al poner en contacto la célula somática de mamífero con el activador de la ruta de la Wnt y los factores de reprogramación, mejora el número de células somáticas reprogramadas en al menos 5 veces, o
- 25 (d) al poner en contacto la célula somática de mamífero con el activador de la ruta de la Wnt y los factores de reprogramación, mejora el número de células somáticas reprogramadas en al menos 10 veces.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína Wnt exógena soluble biológicamente activa es la Wnt3a.

30 4. El método de la reivindicación 1, en el que la célula somática de mamífero

- (a) es una célula humana,
- (b) es una célula humana diferenciada a término,
- (c) es un fibroblasto,
- 35 (d) está modificada para que exprese o contenga al menos un factor de reprogramación en una cantidad mayor de la que habría normalmente presente en las células de ese tipo,
- (e) no está modificada genéticamente,
- (f) no está modificada genéticamente para que exprese el c-Myc en una cantidad mayor de la que habría normalmente presente en una célula de ese tipo celular, o
- 40 (g) es una célula madre neural o una célula progenitora neural.

5. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la confirmación de que la célula reprogramada es pluripotente.

45 6. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la diferenciación de la célula reprogramada a un tipo celular deseado *in vitro* después de la reprogramación de la célula somática de mamífero.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el método se lleva a la práctica sobre

- 50 (a) una población de células y el método comprende adicionalmente la identificación de las células somáticas reprogramadas mediante criterios morfológicos para las células ES, o
- (b) una población de células y el método no comprende la imposición de una selección química para la selección de las células reprogramadas, o
- 55 (c) una población de células y el método comprende adicionalmente la separación de las células que están reprogramadas a un estado pluripotente a partir de las células que no están reprogramadas a un estado pluripotente.

8. Un método para la identificación de un modulador de la ruta de la Wnt útil para la modulación de la reprogramación de células somáticas de mamífero a un estado de tipo ES que comprende:

- 60 (a) el cultivo de una población de células somáticas de mamífero en un medio que contiene el modulador de la ruta de la Wnt, en el que las células están modificadas genéticamente o transfectadas temporalmente para que expresen Oct4, Sox2 y Klf4; y
- 65 (b) la determinación, después de un periodo de tiempo adecuado, de si están presentes las células que tienen una o más características de las células ES después de mantener las células y su progenie en cultivo durante un periodo de tiempo adecuado, en el que el modulador de la ruta de la Wnt es identificado como útil para la

modulación de la reprogramación de células somáticas de mamífero a un estado de tipo ES si las células que tienen una o más características de las células ES están presentes en unas cantidades diferentes de lo que se esperaría si el medio no contuviera el modulador de la ruta de la Wnt.

5 9. Una composición que comprende:

(a) un medio de cultivo celular que contiene un activador de la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: una proteína Wnt que se une a un receptor de la Wnt y activa la ruta de la Wnt, y un antagonista de molécula pequeña GSK-3 que activa la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO); N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea (AR-AO 14418); 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-H-pirrol-2,5-diona (SB 216763); 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD-8); CHIR-911 y CHIR-837; y

(b) una célula somática de mamífero, en la que la célula ha sido modificada para que exprese o contenga uno o más factores de reprogramación seleccionados entre el grupo que consiste en: Oct4, Nanog, Sox2, Lin28 y Klf4.

10 10. La composición de la reivindicación 9, en la que la célula somática de mamífero se ha modificado para que exprese o contenga los factores de reprogramación seleccionados entre el grupo que consiste en: (i) Oct4; (ii) Oct4 y Klf4; y (iii) Oct4, Klf4 y Sox2.

20 11. La composición de la reivindicación 9 o 10, en la que la célula somática de mamífero no está modificada genéticamente.

25 12. La composición de la reivindicación 9, en la que la célula se ha modificado genéticamente para que contenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un marcador seleccionable unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno.

30 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en la que el medio de cultivo celular comprende medio condicionado (MC) que comprende una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de proteína Wnt3a secretada.

35 14. Una composición que comprende: una célula madre pluripotente inducida (iPS) y un activador de la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: una proteína Wnt exógena soluble biológicamente activa que se une a un receptor de la Wnt y activa la ruta de la Wnt, un medio condicionado de Wnt que comprende una concentración de entre 100 ng/ml y 1.000 ng/ml de proteína Wnt3a secretada, y un antagonista de molécula pequeña GSK-3 que activa la ruta de la Wnt seleccionado entre el grupo que consiste en: 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO); N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea (AR-AO 14418); 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 216763); 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD-8); CHIR-911 y CHIR-837.

40 15. El método de la reivindicación 1, en el que poner en contacto la célula somática de mamífero con los factores de reprogramación comprende la modificación de la célula para que exprese al menos un factor de reprogramación en unas cantidades mayores de las que habrá presentes normalmente en una célula de ese tipo.

Figura 1

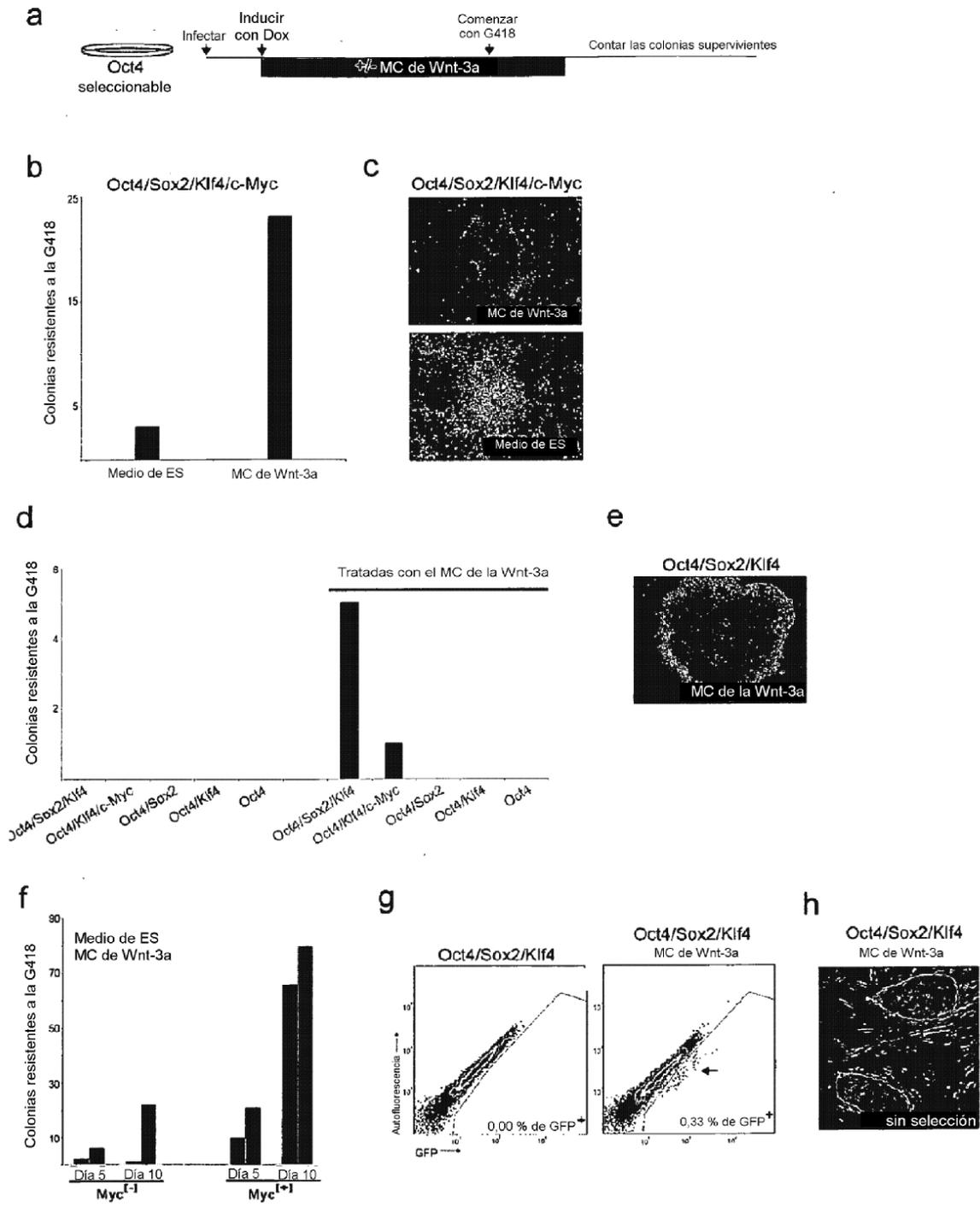


Figura 2

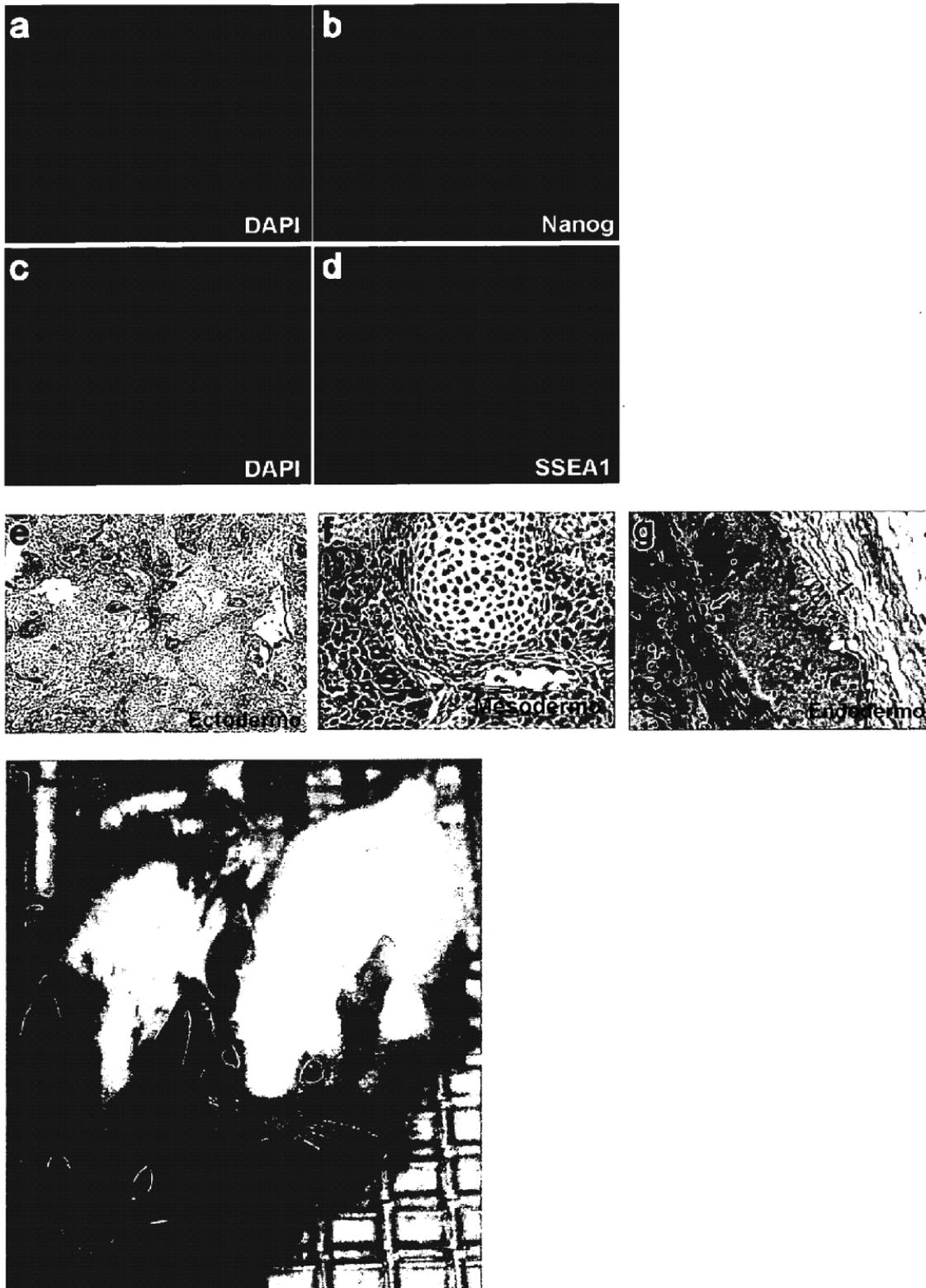
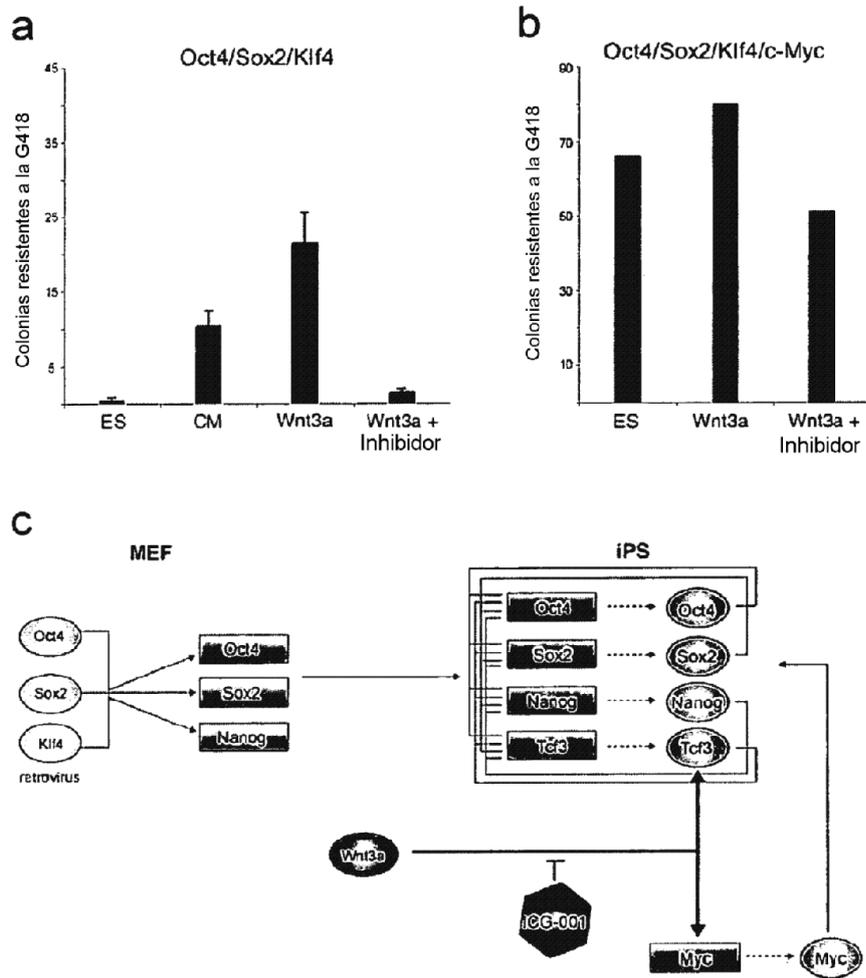
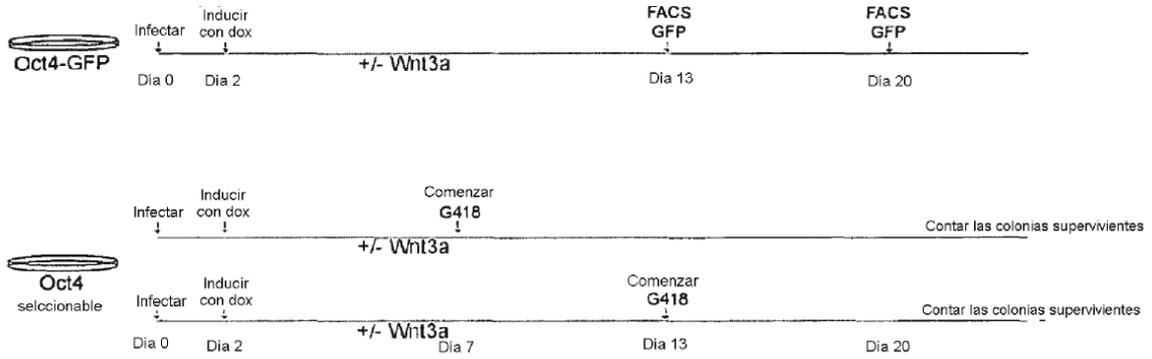


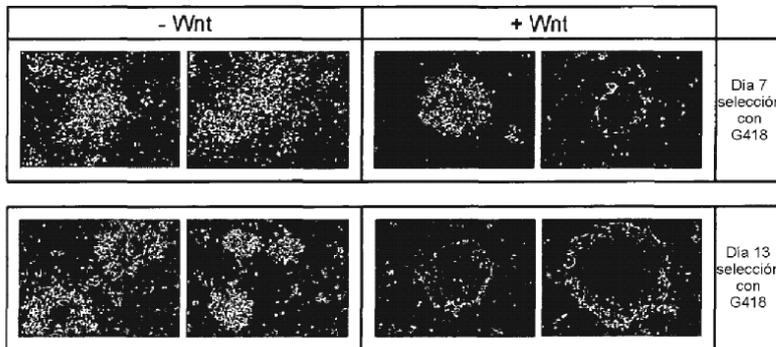
Figura 3



A. Cronograma del experimento



B. La Wnt-3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 y c-Myc



C. La Wnt-3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 (no c-Myc)

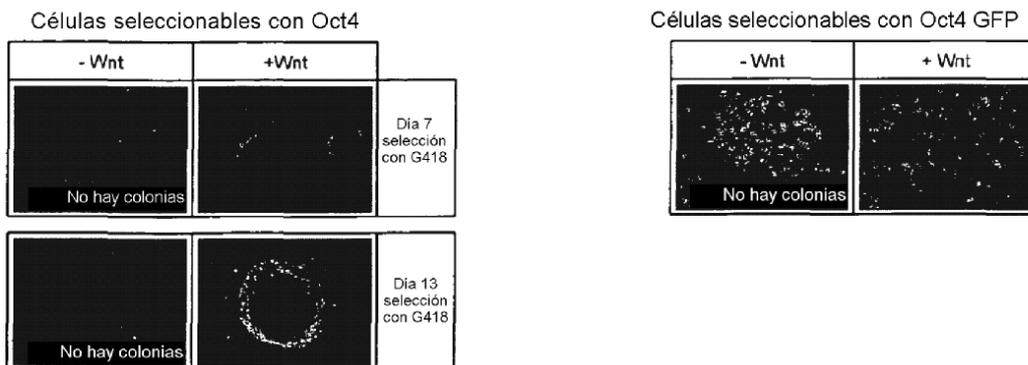


Figura 4

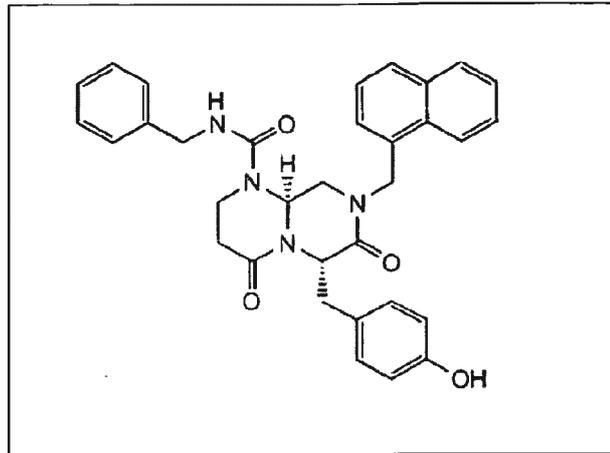


Figura 5