

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 780**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011** **PCT/US2011/030598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011** **WO11123572**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011** **E 11763396 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2553086**

54 Título: **Reprogramación de células**

30 Prioridad:

26.10.2010 US 406892 P

15.10.2010 US 393724 P

31.03.2010 US 319494 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
Mail Drop TPC-8 10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

ZHU, SAIYONG y
DING, SHENG

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 624 780 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reprogramación de células

5 Antecedentes de la invención

La tecnología de citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC), es decir, la reprogramación de células somáticas en células pluripotentes que se asemejan mucho a embriocitoblastos (ESC) mediante la introducción de factores definidos, tiene un gran potencial en la investigación biomédica y la medicina regenerativa (Takahashi, K., y Yamanaka, S., Cell 126, 663-676 (2006); Takahashi et al., Cell 131, 861-872 (2007); Yu et al., Science 318, 1917-1920 (2007); Zhou et al., Cell Stem Cell 4, 381-384 (2009); Kim et al., Cell Stem Cell 4, 472-476 (2009); Maherali, N., y Hochedlinger, K., Cell Stem Cell 3, 595-605 (2009a); Daley et al., Cell Stem Cell 4, 200-201 (2009); Documento US 2009/0227032 de Yamanaka et al.; Documento US 2008/0268533 de Dalton et al.; Zhu et al., Cell Stem Cell 7, 651-655 (2010)). Se han desarrollado diversas estrategias para generar iPSC con menos o sin ninguna manipulación genética exógena, lo que representa un obstáculo importante para las aplicaciones iPSC (Yamanaka et al., 2009; Saha, K., Jaenisch, R., Cell Stem Cell 5, 584-595 (2009)). En el camino hacia una meta definitiva de generar iPSC con un cóctel definido de moléculas pequeñas que ofrecería significativas ventajas sobre las manipulaciones genéticas o de sustancias biológicas más difíciles de fabricar/utilizar, se han realizado esfuerzos sustanciales para identificar compuestos químicos que puedan sustituir funcionalmente los factores de transcripción de la reprogramación exógenos (TF) y/o potenciar la eficacia y la cinética de la reprogramación (Shi et al., Cell Stem Cell 2, 525-528 (2008a); Shi et al., Cell Stem Cell 3, 568-574 (2008b); Huangfu et al., Nat Biotechnol 26, 795-797 (2008a); Huangfu et al., Nat Biotechnol 26, 1269-1275 (2008b); Silva et al., Plos Bio 6, e253. doi: 10.1371/journal.pbio.0060253 (2008); Lyssiotis et al., PNAS 106, 8912-8917 (2009); Ichida et al., Cell Stem Cell 5, 491-503 (2009); Maherali, N., Hochedlinger, K., Curr Biol 19, 1718-1723 (2009b); Esteban et al., Cell Stem Cell 6, 71-79 (2010); Feng et al., Cell Stem Cell 4, 301-312 (2009); Documento WO 2011/047300). Sin embargo, la reducción adicional del número de TF exógenos ha supuesto un extraordinario desafío ya que (1) la mayor parte de las condiciones que facilitan o potencian la reprogramación (por ejemplo, aprovechar un tipo específico de célula o utilizar moléculas pequeñas) son dependientes del contexto, *es decir*, dichas condiciones específicas (por ejemplo, la una molécula pequeña de reprogramación) sería normalmente mucho menos eficaz o incluso perjudicial en un tipo de célula diferente con diferentes factores exógenos y utilizados en una ventana diferente de tratamiento; y (2) el cribado de alto rendimiento supone un desafío tecnológico cuando la eficacia y la velocidad de la reprogramación disminuyen además exponencialmente debido a que se utilizan menos TF exógenos. Hasta la fecha, solo se había demostrado que los neurocitoblastos (NSC) que expresan endógenamente Sox2 y cMyc a un alto nivel se reprogramaban a iPSC mediante la expresión endógena solo de Oct4 (Kim et al., Cell 136, 411-419 (2009a); Kim et al., Nature 461, 643-649 (2009b)). Sin embargo, los NSC fetales humanos son raros y difíciles de obtener en la práctica (Nunes et al., Nat Med 9, 439-447 (2003)). En consecuencia, sería beneficioso desarrollar condiciones de reprogramación química aplicables a otras células somáticas más accesibles y abundantes.

Sumario breve

La invención proporciona un método *in vitro* de inducir una célula humana no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido, comprendiendo el método:

(I)

(a) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Oct4 o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; y

(b) poner en contacto la célula humana no pluripotente con una receptor de TGFβ /inhibidor de ALK5 de molécula pequeña, un inhibidor de MEK de molécula pequeña, un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) de molécula pequeña, y un activador alostérico de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) de molécula pequeña en condiciones suficientes para inducir que la célula humana no pluripotente se convierta en un citoblasto pluripotente, induciendo de esta forma la célula humana no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido; o

(II)

(a) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Oct4 y un polipéptido Klf4 o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4 y un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf4; y

(b) poner en contacto la célula humana no pluripotente con una receptor de TGFβ /inhibidor de ALK5 de molécula pequeña, un inhibidor de MEK de molécula pequeña, y un activador alostérico de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) de molécula pequeña en condiciones suficientes para inducir que la célula humana no pluripotente se convierta en un citoblasto pluripotente, induciendo de esta forma la célula humana no pluripotente en un citoblasto pluripotente.

La presente divulgación proporciona también un método de inducir una célula de mamífero no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido que comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) en condiciones suficientes para inducir que la célula se convierta en un citoblasto pluripotente. El activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, ácido (Z)-5-(4-clorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS48"), ácido (Z)-5-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS08"), ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-denilpropiltio)acético, ácido (Z)-5-(naftalen-2-il)-3-fenilpent-2-enoico ("12Z"), o ácido (Z)-5-(1H-indol-3-il)-3-fenilpent-2-enoico ("13Z").

En algunos aspectos de la invención, el método comprende además poner en contacto, la célula no pluripotente con un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos de la invención, el método comprende además poner en contacto la célula no pluripotente con un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos de la invención, el método comprende además poner en contacto la célula no pluripotente con un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA).

Como se ha mencionado anteriormente, en algunos aspectos de la divulgación, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) en condiciones suficientes para inducir que la célula se convierta en un citoblasto pluripotente. En algunos aspectos, las condiciones comprenden introducir al menos un factor de transcripción exógeno en la célula no pluripotente. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende un polipéptido. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende un polipéptido Oct. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct y un polipéptido Klf. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, la condición comprende introducir al menos dos, tres o cuatro factores de transcripción exógenos en la célula no pluripotente, en el que cada uno de los factores de transcripción exógenos comprende una proteína diferente seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno se introduce mediante la introducción de un polinucleótido en la célula no pluripotente, en el que el polinucleótido codifica el factor de transcripción exógeno, expresando de esta forma el(los) factor(es) de transcripción en la célula no pluripotente. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno se introduce poniendo en contacto el factor de transcripción exógeno con la célula no pluripotente. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

En algunos aspectos, la célula no pluripotente es una célula humana. En algunos aspectos, el activador de PDK1 está presente en una concentración suficiente para aumentar en al menos un 10% la eficacia de la inducción de la célula no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido, en condiciones suficientes para inducir la conversión de la célula no pluripotente en el citoblasto pluripotente inducido.

En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) en condiciones suficientes para inducir que la célula se convierta en un citoblasto pluripotente. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1 en ausencia de un inhibidor de MEK, seguido por poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1 y un inhibidor de MEK. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1, un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, y un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) en ausencia de un inhibidor de MEK, seguido por poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1, un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de MEK.

En algunos aspectos, el método comprende además purificar las células pluripotentes para generar una población homogénea de las células pluripotentes. En algunos aspectos, en los que se induce una pluralidad de citoblastos pluripotentes, el método comprende además purificar los citoblastos pluripotentes para generar una población homogénea de citoblastos pluripotentes.

La presente invención proporciona también una mezcla que comprende:

- (I) (a) células de mamífero, que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4 exógeno; (b) un activador de PDK1 de molécula pequeña; (c) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; (d) un inhibidor de MEK de molécula pequeña; y (e) un inhibidor de HDAC de molécula pequeña; o
- (II) (a) células de mamífero; (b) un polipéptido Oct4 exógeno; (c) un activador de PDK1 de molécula pequeña alostérico; (d) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; (e) un inhibidor de MEK de molécula pequeña; y (f) un inhibidor de HDAC de molécula pequeña; o
- (III) (a) células de mamífero, que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4 exógeno y un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf4 exógeno; (b) un activador de PDK1 de molécula pequeña; (c) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; y (d) un inhibidor de MEK de molécula pequeña; o
- (IV) (a) células de mamífero; (b) un polipéptido Oct4 exógeno y un polipéptido Klf4 exógeno; (c) un activador de PDK1 de molécula pequeña alostérico; (d) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; y (e) un

inhibidor de MEK de molécula pequeña.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una mezcla que comprende células de mamífero, un activador de PDK1, y uno o más de (1) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5; (2) un inhibidor de MEK; (3) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC); o (4) uno o más factores de transcripción exógenos seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox.

En algunos aspectos, al menos un 99% de las células en la mezcla son células no pluripotentes. En algunos aspectos, esencialmente todas las células son células no pluripotentes. En algunos aspectos, las células son células humanas. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, por ejemplo, ácido (Z)-5-(4-clorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS48"), ácido (Z)-5-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS08"), ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-denilpropiltio)acético, ácido (Z)-5-(naftalen-2-il)-3-fenilpent-2-enoico ("12Z"), o ácido (Z)-5-(1H-indol-3-il)-3-fenilpent-2-enoico ("13Z"). En algunos aspectos, la mezcla comprende además un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA).

En algunos aspectos, la mezcla comprende además un factor de transcripción exógeno seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares. En algunos aspectos, el activador de PDK1 en la mezcla está presente en una concentración suficiente para aumentar en al menos un 10% la eficacia de inducción de las células no pluripotentes en la mezcla en citoblastos pluripotentes inducidos en condiciones suficientes para inducir la conversión de las células en citoblastos pluripotentes inducidos.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un kit para inducir la pluripotencia en una célula de mamífero no pluripotente, comprendiendo el kit un activador de PDK1, y uno o más de (1) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5; (2) un inhibidor de MEK; (3) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC); o (4) uno o más factores de transcripción seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, ácido (Z)-5-(4-clorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS48"), ácido (Z)-5-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS08"), ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-denilpropiltio)acético, ácido (Z)-5-(naftalen-2-il)-3-fenilpent-2-enoico ("12Z"), o ácido (Z)-5-(1H-indol-3-il)-3-fenilpent-2-enoico ("13Z"). En algunos aspectos, el kit comprende además un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos, el kit comprende además un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos, el kit comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA).

En algunos aspectos, el kit comprende además un factor de transcripción exógeno seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método de inducir una célula de mamífero no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido que comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico en condiciones suficientes para inducir que la célula se convierta en un citoblasto pluripotente, induciendo de esta forma la célula de mamífero no pluripotente en un citoblasto pluripotente. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de PDK1. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, PS48, PS08, 12Z, o 13Z. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de la glucolisis, *por ejemplo*, fructosa 2,6-bisfosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un sustrato de la glucolisis, *por ejemplo*, fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un intermediario glucolítico o sus precursores metabólicos, *por ejemplo*, ácido nicotínico, NADH, o fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del transportador de captación de glucosa. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un modulador de la respiración mitocondrial. En algunos aspectos, el modulador de la respiración mitocondrial es un inhibidor de la fosforilación oxidativa, *por ejemplo*, 2,4-dinitrofenol, o ácido 2-hidroxiglutarico. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del factor inducible por hipoxia, *por ejemplo*, N-oxaloilglicina, o quercetina. En algunos aspectos, el método comprende además poner en contacto, la célula no pluripotente con un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos, el método comprende además poner en contacto la célula no pluripotente con un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos, el método comprende además poner en contacto la célula no pluripotente con un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA).

En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico en condiciones suficientes para inducir que la célula se convierta en un citoblasto pluripotente. En algunos aspectos, las condiciones comprenden introducir al menos un factor de

transcripción exógeno en la célula no pluripotente. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende un polipéptido. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende un polipéptido Oct. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct y un polipéptido Klf. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, la condición comprende introducir al menos dos, tres o cuatro factores de transcripción exógenos en la célula no pluripotente, en el que cada uno de los factores de transcripción exógenos comprende una proteína diferente seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno se introduce mediante la introducción de un polinucleótido en la célula no pluripotente, en el que el polinucleótido codifica el factor de transcripción exógeno, expresando de esta forma el(los) factor(es) de transcripción en la célula no pluripotente. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno se introduce poniendo en contacto el factor de transcripción exógeno con la célula no pluripotente. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

En algunos aspectos, la célula no pluripotente es una célula humana. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico está presente en una concentración suficiente para aumentar en al menos un 10% la eficacia de la inducción de la célula no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido, en condiciones suficientes para inducir la conversión de la célula no pluripotente en el citoblasto pluripotente inducido.

En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico en condiciones suficientes para inducir que la célula se convierta en un citoblasto pluripotente. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico y un inhibidor de MEK. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico en ausencia de un inhibidor de MEK, seguido por poner en contacto la célula no pluripotente que promueve el metabolismo glucolítico y un inhibidor de MEK. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, y un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) en ausencia de un inhibidor de MEK, seguido por poner en contacto la célula no pluripotente con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de MEK.

En algunos aspectos, el método comprende además purificar las células pluripotentes para generar una población homogénea de las células pluripotentes. En algunos aspectos, en los que se induce una pluralidad de citoblastos pluripotentes, el método comprende además purificar los citoblastos pluripotentes para generar una población homogénea de citoblastos pluripotentes.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona una mezcla que comprende células de mamífero, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, y uno o más de (1) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5; (2) un inhibidor de MEK; (3) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC); o (4) uno o más polipéptidos exógenos seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, al menos un 99% de las células en la mezcla son inicialmente células no pluripotentes. En algunos aspectos, esencialmente todas las células son inicialmente células no pluripotentes. En algunos aspectos, las células son células humanas. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de PDK1. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, PS48, PS08, 12Z, o 13Z. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de la glucolisis, *por ejemplo*, fructosa 2,6-bisfosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un sustrato de la glucolisis, *por ejemplo*, fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un intermediario glucolítico o sus precursores metabólicos, *por ejemplo*, ácido nicotínico, NADH, o fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del transportador de captación de glucosa. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un modulador de la respiración mitocondrial. En algunos aspectos, el modulador de la respiración mitocondrial es un inhibidor de la fosforilación oxidativa, *por ejemplo*, 2,4-dinitrofenol, o ácido 2-hidroxiglutarico. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del factor inducible por hipoxia, *por ejemplo*, N-oxaloliglicina, o quercetina. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA).

En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico en la mezcla está presente en una concentración suficiente para aumentar en al menos un 10% la eficacia de inducción de las células no pluripotentes en la mezcla en citoblastos pluripotentes inducidos en condiciones suficientes para inducir la conversión de las células en citoblastos pluripotentes inducidos.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un kit para inducir la pluripotencia en una célula de mamífero no pluripotente, comprendiendo el kit un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, y uno o más de (1) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5; (2) un inhibidor de MEK; (3) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC); o (4) uno o más factores de transcripción seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox; o un polipéptido que codifica un factor de transcripción seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de PDK1. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, PS48, PS08, 12Z, o 13Z. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de la glucólisis, *por ejemplo*, fructosa 2,6-bisfosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un sustrato de la glucólisis, *por ejemplo*, fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un intermedio glucolítico o sus precursores metabólicos, *por ejemplo*, ácido nicotínico, NADH, o fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del transportador de captación de glucosa. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un modulador de la respiración mitocondrial. En algunos aspectos, el modulador de la respiración mitocondrial es un inhibidor de la fosforilación oxidativa, *por ejemplo*, 2,4-dinitrofenol, o ácido 2-hidroxiglutarico. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del factor inducible por hipoxia, *por ejemplo*, N-oxaloilglicina, o quercetina. En algunos aspectos, el kit comprende además un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos, el kit comprende además un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos, el kit comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA). En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

25 Definiciones

Un "polipéptido Oct" se refiere a cualquiera de los miembros que se producen naturalmente de la familia de octámeros de los factores de transcripción, o sus variantes que mantienen la actividad del factor de transcripción, *por ejemplo*, en al menos un 50%, 80% o 90% de actividad en comparación con el miembro de la familia más estrechamente relacionado que se produce naturalmente, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión de ADN del miembro de la familia que se produce naturalmente, y puede comprender además un dominio de activación de la transcripción. Los polipéptidos Oct ilustrativos incluyen, Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, Oct-7, Oct-8, Oct-9, y Oct-11. *por ejemplo*, Oct3/4 (denominado en el presente documento "Oct4") contiene el dominio POU, una secuencia de 150 aminoácidos conservada entre Pit-1, Oct-1, Oct-2, y uric-86. Véase, Ryan, A.K. y Rosenfeld, M.G. Genes Dev. 11, 1207-1225 (1997). En algunos aspectos, las variantes tienen al menos un 85%, 90% o 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos a través de su secuencia completa en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Oct que se produce naturalmente tal como los relacionados anteriormente o tal como los relacionados en el número de registro del Genbank NP_002692.2 (Oct4 humano) o NP_038661.1 (Oct4 de ratón). Los polipéptidos Oct (*por ejemplo*, Oct3/4) pueden ser de ser humano, ratón, rata, bovino, porcino, u otros animales. En general, las mismas especies de proteínas se usarán con las especies de células que se están manipulando.

Un "polipéptido Klf" se refiere a cualquiera de los miembros que se producen naturalmente de la familia de los factores análogos a Kruppel (Klf), proteínas de dedo de cinc que contienen secuencias de aminoácidos similares a las del Kruppel regulador del modelo embrionario de Drosophila, o variantes de los miembros que se producen naturalmente que mantienen la actividad del factor de transcripción, similar, *por ejemplo*, en al menos un 50%, 80% o 90% de actividad en comparación con el miembro de la familia más estrechamente relacionado que se produce naturalmente, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión de ADN del miembro de la familia que se produce naturalmente, y puede comprender además un dominio de activación de la transcripción. Véase, Dang, D.T., Pevsner, J. & Yang, V.W. Cell Biol. 32, 1103-1121 (2000). Los miembros de la familia Klf ilustrativos incluyen, Klf1, Klf2, Klf3, Klf4, Klf5, Klf6, Klf7, Klf8, Klf9, Klf10, Klf11, Klf12, Klf13, Klf14, Klf15, Klf16, y Klf17. Se ha descubierto que Klf2 y Klf4 eran factores capaces de generar células iPS en ratones, y los genes Klf1 y Klf5 relacionados también lo hacen, aunque con eficacia reducida. Véase, Nakagawa, et al., Nature Biotechnology 26:101-106 (2007). En algunos aspectos, las variantes tienen al menos un 85%, 90% o 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos a través de su secuencia completa en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Klf que se produce naturalmente tal como los relacionados anteriormente o tal como los relacionados en el número de registro del Genbank CAX16088 (Klf4 de ratón) o CAX14962 (Klf4 humano). Los polipéptidos Klf (*por ejemplo*, Klf1, Klf4, y Klf5) pueden ser de ser humano, ratón, rata, bovino, porcino, u otros animales. En general, las mismas especies de proteínas se usarán con las especies de células que se están manipulando. En la medida en la que un polipéptido Klf se describe en el presente documento, se puede sustituir con un polipéptido del receptor beta relacionado con estrógeno (Essrb). Por lo tanto, se pretende que para cada aspecto de polipéptido Klf descrito en el presente documento, se describa igualmente un aspecto correspondiente usando Essrb en lugar de un polipéptido Klf4.

Un "polipéptido Myc" se refiere a cualquiera de los miembros que se producen naturalmente de la familia de la familia Myc (véase, *por ejemplo*, Adhikary, S. y Eilers, M. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6:635-645 (2005)), o sus variantes que mantienen la actividad del factor de transcripción, *por ejemplo*, en al menos un 50%, 80% o 90% de actividad en

comparación con el miembro de la familia más estrechamente relacionado que se produce naturalmente, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión de ADN del miembro de la familia que se produce naturalmente, y puede comprender además un dominio de activación de la transcripción. Los polipéptidos Myc ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, c-Myc, N-Myc y L-Myc. En algunos aspectos, las variantes tienen al menos un 85%, 90% o 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos a través de su secuencia completa en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Myc que se produce naturalmente, tal como los relacionados anteriormente o tal como los relacionados en el número de acceso al Genbank CAA25015 (Myc humano). Los polipéptidos Myc (por ejemplo, c-Myc) pueden ser de ser humano, ratón, rata, bovino, porcino, u otros animales. En general, las mismas especies de proteínas se usarán con las especies de células que se están manipulando. En la medida en la que un polipéptido Myc se describe en el presente documento, se puede sustituir con un polipéptido Wnt, *por ejemplo*, Wnt 3A (*por ejemplo*, NP_149122.1), o el agente que estimula la ruta de señalización de Wnt, *por ejemplo*, un inhibidor alfa o beta de la glucógeno sintasa quinasa. Por lo tanto, se pretende que para cada aspecto del polipéptido Myc descrito en el presente documento, se describa igualmente un aspecto correspondiente usando un polipéptido Wnt o agente que estimula la ruta de señalización de Wnt en lugar de un polipéptido Myc.

Un "polipéptido Sox" se refiere a cualquiera de los miembros de los factores de transcripción HMG-box (Sox) relacionados con SRY, caracterizado por la presencia del dominio del grupo de elevada movilidad (HMG), o sus variantes, que mantienen la actividad del factor de transcripción, *por ejemplo*, en al menos un 50%, 80% o 90% de actividad en comparación con el miembro de la familia más estrechamente relacionado que se produce naturalmente, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión de ADN del miembro de la familia que se produce naturalmente, y puede comprender además un dominio de activación de la transcripción. Véase, *por ejemplo*, Dang, D.T., et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 32:1103-1121 (2000). Los polipéptidos Sox ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, Sox1, Sox2, Sox3, Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, Sox8, Sox9, Sox10, Sox11, Sox12, Sox13, Sox14, Sox15, Sox17, Sox18, Sox21, y Sox30. Se ha demostrado que Sox1 produce células iPS con una eficacia similar a Sox2, y los genes Sox3, Sox15, y Sox18 han mostrado también generar células iPS, aunque con algo menos de eficacia que Sox2. Véase, Nakagawa, et al., Nature Biotechnology 26:101 - 106 (2007). En algunos aspectos, las variantes tienen al menos un 85%, 90% o 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos a través de su secuencia completa en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Sox que se produce naturalmente tal como los relacionados anteriormente o tal como los relacionados en el número de registro del Genbank CAA83435 (Sox2 humano). Los polipéptidos Sox (por ejemplo, Sox1, Sox2, Sox3, Sox15, o Sox18) pueden ser de ser humano, ratón, rata, bovino, porcino, u otros animales. En general, las mismas especies de proteínas se usarán con las especies de células que se están manipulando.

Un "factor de transcripción exógeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un factor de transcripción que no se expresa naturalmente (es decir, de forma endógena) expresado en una célula de interés. Por lo tanto, un factor de transcripción exógeno puede expresarse a partir de un casete de expresión introducido (por ejemplo, bajo el control de un promotor diferente de un promotor del factor de transcripción nativo) o se puede introducir como una proteína desde el exterior de la célula. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende un polipéptido Oct (por ejemplo, Oct4), un polipéptido Klf (por ejemplo, Klf4), un polipéptido Myc (por ejemplo, c-Myc), o un polipéptido Sox (por ejemplo, Sox2).

"H3K9" se refiere a la lisina 9 de la histona H3. Las modificaciones de H3K9 asociadas con la actividad génica incluyen la acetilación de H3K9 y las modificaciones de H3K9 asociadas con la heterocromatina, incluyen la dimetilación o trimetilación de H3K9. Véase, *por ejemplo*, Kubicek, et al., Mol. Cell 473-481 (2007). "H3K4" se refiere a la lisina 4 de la histona H3. Véase, *por ejemplo*, Ruthenburg et al., Mol. Cell 25:15-30 (2007).

El término "pluripotente" o "pluripotencia" se refiere a células con la capacidad de dar lugar a una progenie que puede experimentar diferenciación, en las condiciones adecuadas, para dar tipos celulares que demuestran en su conjunto características asociadas con linajes celulares procedentes de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, y ectodermo). Los citoblastos pluripotentes pueden contribuir a muchos o a todos los tejidos de un animal prenatal, postnatal o adulto. Se puede utilizar un ensayo normalizado aceptado en la técnica, tal como la capacidad para formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad, para establecer la pluripotencia de una población de células, sin embargo, se puede usar también la identificación de diversas características de los citoblastos pluripotentes para detectar células pluripotentes.

"Características de citoblastos pluripotentes" se refiere a las características de una célula que distinguen los citoblastos pluripotentes de otras células. La capacidad para dar lugar a una progenie que puede experimentar diferenciación, en las condiciones adecuadas, para dar tipos celulares que demuestran en su conjunto características asociadas con linajes celulares procedentes de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, y ectodermo) es una característica del citoblasto pluripotente. La expresión o la no expresión de determinadas combinaciones de marcadores moleculares son también características de citoblastos pluripotentes. Por ejemplo, los citoblastos pluripotentes humanos expresan al menos uno, dos, o tres, y opcionalmente todos, los marcadores de la siguiente lista no limitante: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox2, E-cadherina, UTF-1, Oct4, Rex1, y Nanog. Las morfologías celulares asociadas con los citoblastos pluripotentes son también características de citoblastos pluripotentes.

Un polinucleótido "recombinante" es un polinucleótido que no está en su estado nativo, *por ejemplo*, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la naturaleza, o el polinucleótido está en un contexto diferente del que se encuentra en la naturaleza, *por ejemplo*, separado de secuencias de nucleótidos con las que está normalmente próximo en la naturaleza, o adyacente (o contiguo con) las secuencias de nucleótidos con las cuales no está normalmente próximo. Por ejemplo, la secuencia en cuestión puede ser clonada en un vector, o recombinada de otra forma con uno o más ácidos nucleicos adicionales.

"Casete de expresión" se refiere a un polinucleótido que comprende un promotor u otra secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia que codifica una proteína.

Los términos "promotor" y "secuencia control de la expresión" se utilizan en el presente documento para referirse a una matriz de secuencias control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias próximas al sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor del tipo de la polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor incluye también opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden localizarse como mucho a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen promotores constitutivos e inducibles. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. El término "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia control de la expresión de un ácido nucleico (tal como un promotor, o matriz de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", tal como se usa en el presente documento, es la que se origina de una fuente extraña a la célula hospedadora concreta, o, si desde la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. Por lo tanto, un casete de expresión heterólogo en una célula es un casete de expresión que no es endógeno para la célula hospedadora concreta, por ejemplo, uniéndose a las secuencias de nucleótidos a partir de un vector de expresión en lugar de un ADN cromosómico, que está unido a un promotor heterólogo, que está unido a un gen indicador, etc.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros tanto en forma monocatenaria como bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de estructuras modificadas, que son sintéticas, que se producen naturalmente, y que no se producen naturalmente, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptidonucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta también abarca sus variantes modificadas conservativamente (por ejemplo, las sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con una base mixta y/o restos de desoxiinosina (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Los "inhibidores", "activadores" y "moduladores" de la expresión o de la actividad se usan para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras, o moduladoras, respectivamente, identificadas utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la expresión o actividad de una proteína diana descrita, *por ejemplo*, ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, *por ejemplo*, inhiben la expresión o se unen para bloquear parcial o totalmente la estimulación o la actividad inhibitora de la proteasa, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan por defecto la actividad de la proteína diana descrita, *por ejemplo*, los antagonistas. Los activadores son agentes que, *por ejemplo*, inducen o activan la expresión de una proteína diana descrita o se unen para, estimular, aumentar, abrir, activar, facilitar, potenciar la activación o la actividad inhibitora de la proteasa, sensibilizar o regular en exceso la actividad de la proteína diana descrita (o el polinucleótido de codificación), *por ejemplo*, los agonistas. Los moduladores incluyen ligandos que se producen naturalmente y ligandos sintéticos, antagonistas y agonistas (por ejemplo, moléculas químicas pequeñas, anticuerpos y análogos que funcionan como agonistas o como antagonistas). Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, *por ejemplo*, aplicar posibles compuestos moduladores a las células que expresan la proteína diana descrita y a continuación determinar los efectos funcionales sobre la actividad de la proteína diana descrita, tal como se describe anteriormente. Las muestras o ensayos que comprenden la proteína diana descrita que se tratan con un potencial activador, inhibidor, o modulador se comparan con las muestras del control sin el inhibidor, activador, o modulador para examinar la extensión del efecto. Las muestras del control (no tratadas con moduladores) se asignan a un valor de actividad relativa del 100%. Se consigue la inhibición de una proteína diana descrita cuando el valor de actividad relativa con respecto al control es aproximadamente del 80%, opcionalmente 50% o 25%, 10%, 5% o 1%. Se consigue la activación de la proteína

diana descrita cuando el valor de actividad relativa con respecto al control es del 110%, opcionalmente del 150%, opcionalmente del 200, 300%, 400%, 500%, o 1000-3000% o mucho mayor.

El término "alostérico" se usa para referirse a un efecto que influye sobre la actividad de una parte de una enzima (tal como un sitio activo) mediante la unión de una molécula a un sitio diferente (sitio regulador) en una localización diferente en la enzima. La unión de moléculas no de sustrato en sitios alostéricos influye sobre la cinética de unión del sitio de unión al sustrato (activo). Los "sitios de unión alostéricos" están contenidos en muchas enzimas y receptores. Como resultado de la unión a los sitios de unión alostéricos, la interacción con el ligando normal puede tanto potenciarse como reducirse. Por ejemplo, un sitio de unión alostérico en quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido-1 (PDK1) es la bolsa de unión con el fragmento que interactúa con PDK1 (PIF) situada entre la hélice C, la hélice B y las hojas 4 y 5 (Pearl et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 761-767 (2002); Biondi et al., Biochem. J. 372, 1-13 (2003); Newton et al., Chem. Rev. 101, 2353- 2364 (2001)).

Tal como se usa en el presente documento, "promueve" o "aumenta", o "promover" o "aumentar" se utilizan de forma indistinta en el presente documento. Estos términos se refieren al aumento en un parámetro medido (por ejemplo, actividad, expresión, glucolisis, metabolismo glucolítico, captación de glucosa, la biosíntesis posterior a la glucolisis) en una célula tratada (tejido o sujeto) en comparación con una célula no tratada (tejido o sujeto). Se puede hacer también una comparación de la misma célula o tejido o sujeto entre antes y después del tratamiento. El aumento es suficiente para ser detectable. En algunos aspectos, el aumento en la célula tratada es de al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más en comparación con una célula no tratada.

Tal como se usa en el presente documento, "inhibir", "evitar" o "reducir" o "que inhibe" "que evita" o "que reduce" se usan de manera indistinta en el presente documento. Estos términos se refieren a la disminución en un parámetro medido (por ejemplo, actividad, expresión, respiración mitocondrial, oxidación mitocondrial, fosforilación oxidativa) en una célula tratada (tejido o sujeto) en comparación con una célula no tratada (tejido o sujeto). Se puede hacer también una comparación de la misma célula o tejido o sujeto entre antes y después del tratamiento. La disminución es suficiente para ser detectable. En algunos aspectos, la disminución en la célula tratada es al menos de aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o está completamente inhibida en comparación con una célula no tratada. En algunos aspectos, el parámetro medido es indetectable (es decir, está completamente inhibido) en la célula tratada en comparación con la célula no tratada.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Generación de citoblastos pluripotentes inducidos humanos procedentes de queratinocitos primarios mediante un solo gen, OCT4, y moléculas pequeñas. (a) El tratamiento con PD0325901 (PD) 0,5 μ M y A-83-01 (A83) 0,5 μ M aumentó significativamente la generación de iPSC procedentes de queratinocitos humanos primarios transducidos tanto con 4TF (4F, OKSM) o 3TF (3F, OKS). Se sembraron NHEK a una densidad de 100.000 células transducidas por placa de 10 cm. (b) Los cribados químicos adicionales identificaron PS48, NaB, y su combinación, que pueden potenciar sustancialmente la reprogramación de queratinocitos humanos primarios transducidos con 2Tf (OK). Se sembraron NHEK a una densidad de 100.000 células transducidas por placa de 10 cm. (c) Esquema experimental para la generación de iPSC humanos procedentes de queratinocitos humanos primarios transducidos mediante un único gen de reprogramación, OCT4. KCM, medio de cultivo de queratinocitos; hESCM, medio de cultivo de ESC humanos. (d) Inmunotinción en vivo con TRA-1-81 de colonias de iPSC que se generaron a partir de queratinocitos humanos primarios transducidos con 2TF/OK o 1TF/OCT4 antes del repicado de las colonias. (e) Las células iPSC-OK e iPSC-O humanas establecidas expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo ALP (fosfatasa alcalina), OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4 y TRA-1-81. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Figura 2. Caracterizaciones en profundidad de células iPSC-OK e iPSC-O humanas. (a) Análisis de expresión mediante RT-PCR de los genes de pluripotencia endógenos y OCT4 y KLF4 exógenos. Se usó GAPDH como un control de entrada. (b) Análisis de metilación de los promotores OCT4 y NANOG mediante secuenciación genómica con bisulfato. Los círculos abiertos y los círculos cerrados indican CpG sin metilar y metilados en las regiones promotoras, respectivamente. (c) Gráficas de dispersión que comparan los modelos de expresión génica global entre las células iPSC-O y NHEK, y hESC. Las posiciones de los genes de pluripotencia OCT4, NANOG, y SOX2 se muestran mediante flechas. Las líneas negras indican el equivalente lineal y dos veces de cambio en los niveles de expresión génica entre las muestras. (d) iPSC-OK e iPSC-O humanas podrían diferenciarse eficazmente *in vitro* en células en las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neurales (tubulina β III⁺), células mesodérmicas (SMA⁺), y células endodérmicas (AFP⁺), utilizando el método EB. (e) Ensayo de la PCR cuantitativa de los tres marcadores de capas germinales procedentes de iPSC humanos diferenciados utilizando el método EB: ectodermo (PAX6, TUBULINA β III), mesodermo (FOXF1, HAND1) y endodermo (AFP, GATA6). Los datos denotan veces de cambio normalizadas para GAPDH con respecto a iPSC humanos parenterales indiferenciados. (f) iPSC-OK e iPSC-O humanas podrían producir eficazmente un teratoma completo, que contiene células diferenciadas en las tres capas germinales, en ratones SCID.

Figura 3. Generación y caracterización de citoblastos pluripotentes inducidos humanos procedentes de

células endoteliales de la vena umbilical humana por un único gen, OCT4, y moléculas pequeñas. (a) Esquema experimental de la generación de iPSC humanos procedentes de HUVEC transducidas por OCT4. HCM, medio de cultivo HUVEC; hESCM, medio de cultivo de ESC humanos. (b) Las células hiPSC-O establecidas procedentes de HUVEC expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (c) Análisis de expresión mediante la RT-PCR de los genes de pluripotencia endógenos. Se usó *GAPDH* como un control de entrada. (d) Análisis de metilación de los promotores *OCT4* y *NANOG* mediante secuenciación genómica con bisulfato. Los círculos abiertos y los círculos cerrados indican CpG sin metilar y metilados en las regiones promotoras, respectivamente. (e) Las células hiPSC-O procedentes de HUVEC podrían diferenciarse eficazmente *in vitro* en células de las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neurales (tubulina β III⁺), células mesodérmicas (SMA⁺), y células endodérmicas (AFP⁺), utilizando el método EB. (f) Las células hiPSC-O podrían producir eficazmente un teratoma completo, que contiene células diferenciadas en las tres capas germinales en ratones *SCID*.

Figura 4. Caracterización de células iPSC-O humanas procedentes de AHEK. (a) Las células hiPSC-O establecidas procedentes de queratinocitos adultos expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG, SOX2 y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (b) Estas células hiPSC-O podrían diferenciarse eficazmente *in vitro* en células de las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neurales (tubulina β III⁺), células mesodérmicas (SMA⁺), y células endodérmicas (AFP⁺), utilizando el método EB.

Figura 5. Caracterización de células iPSC-O humanas procedentes de AFDC. (a) Las células hiPSC-O establecidas procedentes de células derivadas de fluido amniótico expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG, SOX2 y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (b) Estas células hiPSC-O podrían diferenciarse eficazmente *in vitro* en células de las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neurales (tubulina β III⁺), células mesodérmicas (SMA⁺), y células endodérmicas (AFP⁺), utilizando el método EB.

Figura 6. Las líneas de células hiPSC adicionales expresan marcadores de pluripotencia típicos. Las otras líneas de células hiPSC-O establecidas expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Figura 7. Cultivo sin alimentador de líneas de células hiPSC. Las células hiPSC se dividieron sobre placas revestidas con Matrigel/ECM en medio hESC químicamente definido como se ha notificado anteriormente. Estas hiPSC podrían mantenerse y expandirse en un entorno sin alimentador. Las ICC mostraron la expresión de marcadores de pluripotencia, OCT4 y SSEA4. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Figura 8. Genotipación de hiPSC. El análisis de la RT-PCR utilizando ADN genómico muestra que solo el transgén OCT4 se integró en el genoma de las líneas hiPSC-O (hiPSC-O#1, hiPSC-O#3, hiPSC-O#21, hiPSC-O#26 y hiPSC-O#31). NHEK (a) y HUVEC (b) se utilizaron como controles negativos, aunque se usaron vectores como controles positivos.

Figura 9. Integración del transgén OCT4 en hiPSC. Se digirió ADN genómico (10 μ g) con EcoRI y se hibridó con la sonda de ADNc *OCT4* (un fragmento EcoRI/Spel de pSin-EF2-OCT4-Pur). Se detectaron múltiples integraciones transgénicas.

Figura 10. Cariotipación de líneas de células hiPSC. La diseminación de hiPSC-O# 1 (a) e hiPSC-O# 21 (b) en la metafase muestra un cariotipo normal tras el pase 15.

Figura 11. PS48 potencia el proceso de reprogramación facilitando un cambio metabólico hacia la glucolisis. (a) El tratamiento con PS48 activó la actividad de PDK1. Análisis de transferencia Western de la fosforilación de Akt (Thr-308) tras el tratamiento con PS48 (5 μ M) o UCN-01 (20 nM). (b) PS48 potenció la reprogramación de NHEK, mientras que UCN-01 (un inhibidor de PDK1) o 2-Desoxi-D-glucosa (10 mM) (2-DG, un inhibidor de la glucolisis) inhibió el proceso de reprogramación. Se sembraron NHEK transducidas con tres factores (Klf, Sox, y Oct) a una densidad de 100.000 células transducidas por pocillo, se trataron con compuestos durante cuatro semanas, y a continuación se contaron las colonias positivas para TRA-1-81. (c) El tratamiento con PS48 facilitó/activó un cambio metabólico hacia la glucolisis, mientras que el tratamiento de UCN-01 o 2-DG inhibió la glucolisis. Se trataron las NHEK bien con PS48, PS48 y UCN-01, o bien con PS48 y 2-DG durante 8 d y a continuación se midió la producción de lactato en el medio como un índice típico de la glucolisis utilizando el Kit de ensayo del lactato (BioVision, Mountain View, CA, EE.UU.). (d) El tratamiento con PS48 reguló en exceso la expresión de algunos genes glucolíticos clave, incluyendo *GLUT1*, *HK2*, *PFK1* y *LDHA*. (e) Las moléculas pequeñas conocidas que se han utilizado ampliamente para modular la respiración mitocondrial, el metabolismo glucolítico o la activación de HIF mostraron también efectos consistentes correspondientes sobre la reprogramación. Se sembraron HUVEC transducidas con cuatro factores (Klf, Sox, Myc, y Oct) a una densidad de 20.000 células transducidas por pocillo, se trataron con compuestos moduladores del metabolismo durante tres semanas y se contaron las colonias positivas para TRA-1-81. F2,6P, Fructosa 2,6-bisfosfato 10 mM; F6P, Fructosa 6-fosfato 10 mM; 6-AN, 6-Aminonicotinamida 10 μ M; OA, Oxalato 10 μ M; DNP, 2,4-dinitrophenol 1 μ M; NOG, N-oxaloilglicina 1 μ M; QC, Quercetina 1 μ M; 2-HA, Ácido 2-hidroxiglutarico 10 μ M; NA, Ácido nicotínico 10 μ M; Se usó DMSO como control.

Descripción detallada

I. Introducción

La presente divulgación se basa en el sorprendente descubrimiento de que un activador de quinasas dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) aumenta mucho la eficacia de inducción de la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes. Por consiguiente, la presente divulgación de métodos para inducir pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes en el que el método comprende poner en contacto las células no pluripotentes con un activador de PDK1.

La presente divulgación se basa también en el sorprendente descubrimiento de que los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico como se describe en el presente documento aumentan mucho la eficacia de inducción de la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes. Se ha descubierto que los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico facilitan la reprogramación metabólica a partir de la oxidación mitocondrial (utilizada principalmente por células somáticas adultas) hacia la glucólisis (utilizada principalmente por embriocitoblastos (ESC)), induciendo por tanto la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes. Los compuestos que promueven la glucólisis o los compuestos que inhiben o impiden la respiración/oxidación mitocondrial son, por tanto, útiles para inducir la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes. Además, se ha descubierto que los compuestos que promueven un proceso tanto antes (por ejemplo, la ruta PDK1, la ruta del factor inducible por hipoxia, la ruta del transportador de captación de glucosa) como después de la glucólisis (por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos, la síntesis de lípidos, la síntesis de nucleótidos, y la síntesis de aminoácidos) son útiles para inducir pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona los métodos de inducir la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes en los que el método comprende poner en contacto las células no pluripotentes con uno o más compuestos que promueven el metabolismo glucolítico como se describe en el presente documento.

Hasta la fecha, se ha establecido un gran número de métodos y protocolos diferentes para inducir células de mamífero no pluripotentes en citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC). Se cree que los agentes descritos en el presente documento pueden utilizarse en combinación con esencialmente cualquier protocolo para generar iPSC y por tanto, mejorar la eficacia del protocolo. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona la incubación de células no pluripotentes con al menos un activador de PDK1, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un activador de PDK1 alostérico, en combinación con cualquier protocolo para generar iPSC. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona la incubación de células no pluripotentes con al menos un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico en combinación con cualquier protocolo para generar iPSC.

Tal como se usa en el presente documento, "eficacia de inducción", con respecto a la inducción de una célula no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido, se refiere al número de células no pluripotentes que se pueden convertir en iPSC en un marco de tiempo definido, o la cantidad de tiempo que tarda en convertirse un número definido de células no pluripotentes en iPSC, en condiciones suficientes para inducir citoblastos pluripotentes. El aumento en la eficacia de un protocolo de generación de iPSC dependerá del protocolo y de qué agentes se utilizan. En algunos aspectos, la eficacia aumenta en al menos un 10%, 20%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300% o más en comparación con el mismo protocolo sin la inclusión de los agentes utilizados de acuerdo con la divulgación (por ejemplo, un activador de PDK1, *por ejemplo*, un activador de PDK1 alostérico, o un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, *por ejemplo*, activadores de PDK1, activadores de la glucólisis, sustratos de la glucólisis, intermediarios glucolíticos y sus precursores metabólicos, activadores del transportador de captación de la glucosa, moduladores de la respiración mitocondrial tales como inhibidores de la fosforilación oxidativa, y activadores del factor inducible por hipoxia). En algunos aspectos, la eficacia se mide con respecto al aumento del número de iPSC generados en un marco de tiempo concreto (por ejemplo, comparando el número de iPSC generados a partir de células no pluripotentes en un marco de tiempo definido en condiciones que comprenden la introducción de uno o más agentes utilizados de acuerdo con la divulgación con el número de iPSC generados a partir de células no pluripotentes en un marco de tiempo definido, en condiciones que no comprenden la introducción de uno o más agentes utilizados de acuerdo con la divulgación). En algunos aspectos, la eficacia se mide con respecto al aumento de la velocidad mediante el cual se generan los iPSC (por ejemplo, comparando el lapso de tiempo que se tarda en generar un número definido de iPSC a partir de células no pluripotentes en condiciones que comprenden la introducción de uno o más agentes utilizados de acuerdo con la divulgación con el lapso de tiempo que se tarda en generar un número definido de iPSC a partir de células no pluripotentes en condiciones que no comprenden la introducción de uno o más agentes). En algunos aspectos, la eficacia de la inducción se mide en condiciones que comprenden transducir células no pluripotentes (por ejemplo, queratinocitos epidérmicos humanos normales) con Oct4 y Klf4, a continuación cultivar las células transducidas en ausencia o presencia de uno o más agentes utilizados de acuerdo con la divulgación (por ejemplo, un activador de PDK1), como se describe a continuación en la sección de Ejemplos. Se puede medir la inducción de iPSC a partir de células no pluripotentes de acuerdo con cualquier método conocido en la materia, incluyendo, aunque no de forma limitativa el análisis de marcadores (por ejemplo, utilizando marcadores de pluripotencia Tra-1-81 y/u OCT4).

De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, los regímenes de tratamiento específicos, dependientes del contexto, pueden mejorar la eficacia de la reprogramación. La eficacia de un determinado régimen de tratamiento

puede depender, en algunos aspectos, de los tipos de células, el número de pasos de células, y los factores de transcripción exógenos utilizados. Por ejemplo, en algunos aspectos, se puede observar una mejora más significativa en la eficacia de la reprogramación mediante un régimen de tratamiento específico cuando las células en reprogramación transducidas con o en contacto con menos de cuatro factores de transcripción exógenos, es *decir*, con uno, dos, o tres factores de transcripción exógenos, en comparación con las células en reprogramación transducidas con o en contacto con cuatro factores de transcripción exógenos.

Por lo general, las células humanas pueden tardar considerablemente más tiempo (por ejemplo, 6-8 semanas) en reprogramarse que las células de ratón (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas). Los efectos de un régimen de tratamiento específico, en algunos aspectos, pueden ser más exagerados cuando las células humanas en reprogramación se comparan con las células de ratón. Por consiguiente, cuando se usan periodos más largos (por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, o más semanas) en la reprogramación, se puede usar un régimen de tratamiento, por ejemplo, uno que utilice un modificador epigenético, para mejorar la eficacia de la reprogramación.

Los inventores han encontrado que los modificadores epigenéticos pueden mejorar la eficacia de la reprogramación. Como se define en el presente documento, el término "modificador epigenético" se refiere a un agente modificador de la metilación (es decir, agentes que inducen cambios producidos por metilación en el ADN o las histonas) y/o un agente modificador de la acetilación (es decir, agentes que inducen cambios producidos por acetilación en el ADN o las histonas). En algunos aspectos, el agente modificador de la metilación es un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT) tal como RG108)), el inhibidor de la histona y/o el inhibidor de la desmetilación de la histona. En algunos aspectos, el agente modificador de la acetilación es un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) (por ejemplo, ácido valproico (VPA), butirato de sodio (NaB), trichostatina A (TSA), o ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA)), un inhibidor de la histona acetiltransferasa (HAT), un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), histona desacetilasa e histona acetiltransferasa. En algunos aspectos, los modificadores epigenéticos son agentes que inhiben las metiltransferasas o las desmetilasas o agentes que activan las metiltransferasas o desmetilasas. En algunos aspectos, el modificador epigenético es un agente que inhibe la metilación de la histona H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9, *por ejemplo*, una G9a histona metiltransferasa tal como BIX01294.

Algunos modificadores epigenéticos, sin embargo, pueden inducir también la diferenciación celular. Por consiguiente, en algunos aspectos, los modificadores epigenéticos se usan solo en una etapa inicial del tratamiento, *por ejemplo*, en las primeras 1, 2, 3 o 4 semanas, en la primera mitad, el primer tercio, el primer cuarto, o el primer quinto del periodo de tratamiento. Omitiendo los modificadores epigenéticos en la última etapa del tratamiento, por ejemplo, en las últimas 1, 2, 3 o 4 semanas, en la última mitad, el último tercio, el último cuarto, o el último quinto del periodo de tratamiento, pueden evitarse, al menos parcialmente los efectos secundarios de inducir la diferenciación celular mediante estos modificadores epigenéticos.

Como alternativa, se pueden usar modificadores epigenéticos que no inducen la diferenciación, o inducen solo mínimamente la diferenciación. Por ejemplo, cuando se usa un inhibidor de HDAC en un régimen de tratamiento, se usa un inhibidor de HDAC que no induce la diferenciación o solo induce mínimamente la diferenciación *por ejemplo*, butirato de sodio.

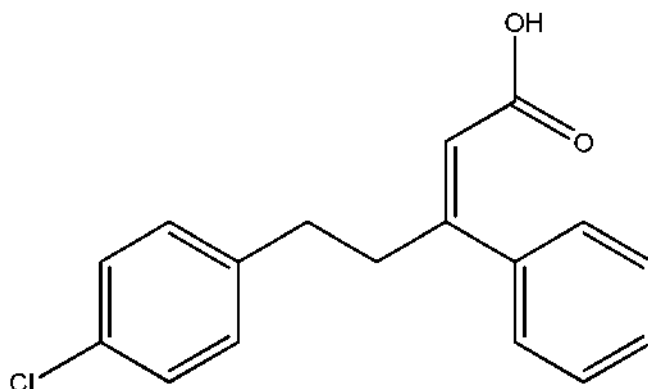
Se ha descubierto adicionalmente que el régimen de tratamiento que utiliza inhibidores de MEK puede mejorar la eficacia de la reprogramación. Los inhibidores de MEK soportan también la autorrenovación celular de las células pluripotentes inducidas. Algunos inhibidores de MEK, sin embargo, pueden inhibir la proliferación celular. Por consiguiente, en algunos aspectos, los inhibidores de MEK se usan solo en la última etapa del tratamiento, *por ejemplo*, en las últimas 1, 2, 3 o 4 semanas, en la última mitad, el último tercio, el último cuarto, o el último quinto del periodo de tratamiento. Omitiendo los inhibidores de MEK en la etapa inicial del tratamiento, por ejemplo, en las primeras 1, 2, 3 o 4 semanas, en la primera mitad, el primer tercio, el primer cuarto, o el primer quinto del periodo de tratamiento, la proliferación celular no se inhibe en la etapa inicial. Por ejemplo, se puede inducir la pluripotencia poniendo en contacto una célula de mamífero no pluripotente con un activador de PDK1 o con un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1) en ausencia de un inhibidor de MEK en la etapa inicial, seguido por poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1 o un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1) y un inhibidor de MEK en la última etapa. En algunos aspectos, el método de inducir la pluripotencia comprende poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1 o con un compuesto que promueva el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1), un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, y un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) en la etapa inicial, seguido por poner en contacto la célula no pluripotente con un activador de PDK1 o con un compuesto que promueva el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1), un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5, un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un inhibidor de MEK en la etapa inicial.

II. Activadores de PDK1

Quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido-1 o "PDK1" es una quinasa maestra asociada con la activación de AKT/PKB y muchas otras quinasas AGC incluyendo PKC, S6K, SGK. Un importante papel de PDK1 está en las rutas de señalización activadas mediante diversos factores de crecimiento y hormonas que incluyen la señalización de la

insulina. La estructura de PDK1 puede dividirse en dos dominios; la quinasa o el dominio catalítico y el dominio PH. El dominio PH funciona principalmente en la interacción de PDK1 con fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato y fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato que es importante en la localización y activación de algunos sustratos de PDK1 asociados a membrana que incluyen AKT. El dominio de la quinasa tiene tres sitios de unión a ligando; el sitio de unión al sustrato, el sitio de unión a ATP, y la bolsa de unión a PIF. Algunos sustratos de PDK1 incluyendo S6K y la proteína quinasa C requieren la unión a esta bolsa de unión a PIF. Los activadores alostéricos de molécula pequeña de PDK1 mostraron inhibir selectivamente la activación de los sustratos que requieren una interacción en el sitio de acoplamiento. Estos compuestos no se unen al sitio activo y permiten que PDK1 active otros sustratos que no requieren interacción en el sitio de acoplamiento. PDK1 es constitutivamente activo y actualmente no existen proteínas inhibitoras conocidas para PDK1. Se cree que la activación del efector principal de PDK1, AKT, requiere una orientación adecuada de la quinasa y los dominios PH de PDK1 y AKT en la membrana. quinasa dependiente de fosfoinosítido-1 ha mostrado interactuar con SGK, PRKACA, Cofactor 2 regulador del intercambio de sodio-hidrógeno, PRKCD, Proteína quinasa Mζ (PKMzeta), PKN2, PRKCI, Proteína quinasa N1, YWHAH y AKT1.

Los activadores de PDK1 ilustrativos incluyen esfingosina (King et al., Journal of Biological Chemistry, 275:18108-18113, 2000). Los activadores alostéricos ilustrativos de PDK1 incluyen PS48 (ácido (Z)-5-(4-clorofenil)-3-fenilpent-2-enoico), PS08 (ácido (Z)-5-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-fenilpent-2-enoico) (Hindie et al., Nature Chemical Biology, 5:758-764, 2009; Huse y Kuriyan, Cell 109: 275-282, 2002; Johnson & Lewis, Chem. Rev. 101:2209-2242, 2001), y el compuesto 1 (ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-fenilpropil)acético) (Engel et al., EMBO J. 25: 5469-5480, 2006); ácidos 3,5-difenilpent-2-enoico tales como el compuesto 12Z y el compuesto 13Z (12Z: ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-fenilpropil)acético, ácido (Z)-5-(naftalen-2-il)-3-fenilpent-2-enoico; 13Z: ácido (Z)-5-(1H-indol-3-il)-3-fenilpent-2-enoico (Stroba et al., J. Med. Chem. 52, 4683-4693 (2009)). PS48 tiene la siguiente fórmula:



PS48

Como se muestra en los Ejemplos, la inclusión de un activador de PDK1 en la reprogramación celular puede aumentar la eficacia mucho cuando se usa solo y da como resultado incluso aumentos de eficacia adicionales cuando se usa en combinación con un inhibidor de HDAC. Pueden incluirse también inhibidores adicionales, que incluyen, aunque no de forma limitativa, un inhibidor de ALK5 y/o un inhibidor de Mek, como se muestra en los Ejemplos, en la reprogramación, particularmente cuando menos de los cuatro factores de transcripción (Oct4, Klf4, Sox2, y c-Myc) se introducen en la célula durante la reprogramación.

III. Compuestos que promueven el metabolismo glucolítico

Como se define en el presente documento, un compuesto modulador del metabolismo se refiere a un compuesto que modula (por ejemplo, promueve o inhibe) el metabolismo de los hidratos de carbono u otras moléculas. Los compuestos moduladores del metabolismo incluyen compuestos que promueven el metabolismo glucolítico. Como se define en el presente documento, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico se refiere a un compuesto que facilita la reprogramación metabólica celular desde la oxidación mitocondrial (usada principalmente por células somáticas adultas) a la glucolisis (usada principalmente por los ESC). En algunos aspectos, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un compuesto que promueve la glucolisis o un compuesto que promueve un proceso antes de la glucolisis (por ejemplo, la ruta PDK1, la ruta del factor inducible por hipoxia, la ruta transportadora de captación de la glucosa). En algunos aspectos, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un compuesto que inhibe o impide la respiración mitocondrial. En algunos aspectos, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un compuesto que promueve un proceso después de la glucolisis (por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos, la síntesis de lípidos, la síntesis de nucleótidos, y la síntesis de aminoácidos). Los ejemplos de compuestos que promueven el metabolismo glucolítico incluyen activadores de PDK1, activadores de la glucolisis, sustratos de la glucolisis, intermediarios glucolíticos y sus precursores metabólicos, activadores del transportador de captación de la glucosa, moduladores de la respiración mitocondrial tales como inhibidores de la fosforilación oxidativa, y activadores del factor inducible por hipoxia. En algunos aspectos, un compuesto que

promueve el metabolismo glucolítico no es un azúcar sencillo (por ejemplo, un azúcar sencillo comúnmente utilizado en un medio de cultivo celular). Los ejemplos de azúcares sencillos incluyen aldosas tales como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa, y cetosas tales como D-fructosa.

5 1. Activadores de la glucolisis

Se conocen en la técnica activadores de la glucolisis (por ejemplo, activadores de la ruta glucolítica). Se conocen en la técnica enzimas asociadas con la ruta de la glucolisis e incluyen hexoquinasa, glucoquinasa, fosfoglucoisomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfogliceromutasa, enolasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. En algunos aspectos, el activador de la glucolisis (por ejemplo, un activador de la ruta de la glucolisis) es un activador de una enzima asociada con la ruta glucolítica. En algunos aspectos, un activador de la glucolisis es un activador de una de tres enzimas concretas asociadas únicamente con la ruta glucolítica: hexoquinasa, fosfofructoquinasa, y piruvato quinasa.

Los ejemplos de activadores de la hexoquinasa incluyen fosfato, citrato, D-malato, 3-fosfoglicerato, catecolaminas y derivados de catecolaminas. En algunos aspectos, el activador de la hexoquinasa es un activador alostérico. En algunos aspectos, los activadores de la hexoquinasa no incluyen fosfato o citrato.

Los ejemplos de activadores de la glucoquinasa incluyen GKA1 (ácido 6-[(3-isobutoxi-5-isopropoxibenzoil)amino]nicotínico; Brocklehurst et al., Diabetes 53:535-541, 2004), GKA2 (ácido 5-[(3-isopropoxi-5-[2-(3-tienil)etoxi]benzoil)amino]-1,3,4-tiadiazol-2-carboxílico; Brocklehurst et al., Diabetes 53:535-541, 2004), RO-28-1675 (Grimsby et al., Science 301:370-373, 2003), y el compuesto A (N-Tiazol-2-il-2-amino-4-fluoro-5-(1-metilimidazol-2-il)tiobenzamida; Kamata et al., Structure 12, 429-438, 2004), LY2121260 (tiazol-2-ilamida del ácido 2-(S)-ciclohexil-1-(R)-(4-metanosulfonilfenil)-ciclopropano-carboxílico; Efanov et al., Endocrinology, 146:3696-3701, 2005). En algunos aspectos, el activador de la glucoquinasa es un activador alostérico. Se divulgan los activadores de la glucoquinasa adicionales en los documentos WO 00/058293, WO 01/44216, WO 01/83465, WO 01/83478, WO 01/85706, WO 01/85707 y WO 02/08209, WO07/075847, WO07/061923, WO07/053345, WO07/104034, WO07/089512, WO08/079787, WO08/111473, WO09/106203, WO09/140624, WO09/140624, WO08/079787, WO02/046173, WO07/006814, WO07/006760, WO06/058923, WO02/048106, WO07/125103, WO07/125105, WO08/012227, WO08/074694, WO08/078674, WO08/084043, WO08/084044, WO09/127544, WO09/127546, WO07/125103, WO07/125105, WO02/014312, WO04/063179, WO07/006761, WO07/031739, WO08/091770, WO08/116107, WO08/118718, WO09/083553, WO04/052869, WO05/123132, WO04/072066, WO07/117381, WO07/115967, WO08/005964, WO08/154563, WO09/022179, WO09/046784, WO08/005964, WO/10/080333, WO/03/095438, WO/06/016194, WO/05/066145, WO/07/115968, WO/07/143434, WO/08/005914, WO/08/149382, WO/09/018065, WO/09/047798, WO/09/046802, WO/10/029461, WO/08/005914, WO/08/149382, WO/07/143434, WO/10/103438, WO/03/047626, WO/05/095418, WO/08/104994, WO/09/082152, WO/09/082152, WO/05/049019, WO/07/048717, WO/09/042435, y WO/09/042435.

Los ejemplos de activadores de la fosfofructoquinasa (o fructosa-6-P quinasa) incluyen fructosa 2,6-bisfosfato.

Los ejemplos de activadores de la piruvato quinasa incluyen xilulosa 5-P, ceramida, un agonista de los receptores de la adenosina A1 tales como N-6-ciclopentiladenosina. Los activadores de la piruvato quinasa adicionales se divulgan en los documentos WO10/042867, WO10/042867, WO99/048490, y WO09/025781.

Se conocen en la técnica los ejemplos de los activadores de la fosfoglucoisomerasa, activadores de la aldolasa, activadores de la gliceraldehído 3P deshidrogenasa, activadores de la triosa fosfato isomerasa, fosfoglicerato quinasa, enolasa, fosfoglicerato mutasa y lactato deshidrogenasa.

50 2. Sustratos de la glucolisis

Los ejemplos de sustratos de la glucolisis incluyen glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, fructosa 1,6-bisfosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, y fosfoenolpiruvato. En algunos aspectos, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico no es un azúcar sencillo (por ejemplo, glucosa).

55 3. Intermedios glucolíticos y sus precursores metabólicos

Los intermedios glucolíticos se utilizan de forma diversa, como para la biosíntesis de otras moléculas importantes tales como ácidos grasos, lípidos, nucleótidos y aminoácidos. Por lo tanto, como se define en el presente documento, los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico incluyen compuestos que promueven un proceso que es posterior a la glucolisis (por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos, la síntesis de lípidos, la síntesis de nucleótidos, y la síntesis de aminoácidos). En algunos aspectos, los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico incluyen intermedios glucolíticos, *por ejemplo*, los intermedios glucolíticos que se utilizan en estas rutas biosintéticas posteriores. En algunos aspectos, los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico incluyen precursores metabólicos de los intermedios glucolíticos. Como se define en el presente documento, el término "precursores metabólicos" se refiere a compuestos a partir de los cuales los intermedios glucolíticos se convierten

metabólicamente, *por ejemplo*, en una célula, un tejido, u organismo humano.

Los ejemplos de intermediarios glucolíticos incluyen glucosa-6-fosfato, fructosa 6-fosfato, fructosa 1,6-bisfosfato, dihidroxiacetona fosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenol piruvato, oxaloacetato, piruvato y sus precursores metabólicos. En algunos aspectos, el intermedio glucolítico es nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un precursor metabólico de NADH. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es ácido nicotínico o nicotinamida.

4. Activadores del transportador de captación de la glucosa

Como se define en el presente documento, el término "activador del transportador de captación de la glucosa" se refiere a compuestos que estimulan o promueven de otra forma la expresión o la actividad de un transportador de captación de la glucosa. Como se define en el presente documento, el término "transportador de la glucosa" se refiere a proteínas que transportan los compuestos (tanto glucosa, análogos de glucosa, otros azúcares tales como fructosa o inositol, o no azúcares, tales como ácidos ascórbicos) a través de la membrana celular y son miembros de la "familia" de transportadores de glucosa, basándose en su similitud estructural (por ejemplo, homología con otras proteínas transportadoras de glucosa). Como se define en el presente documento, los transportadores de la glucosa incluyen también proteínas transportadoras que tienen un sustrato primario diferente a la glucosa. Por ejemplo, el transportador de glucosa GLUTS es principalmente un transportador de fructosa, y se ha notificado que también transporta glucosa con baja afinidad. De un modo similar, el sustrato primario para el transportador de glucosa HMIT es mioinositol (un alcohol azucarado). Tal como se usa en el presente documento, el término "transportador de glucosa", salvo que se especifique otra cosa, incluye transportadores de fructosa e inositol. Los ejemplos de transportadores de captación de la glucosa incluyen un transportador de la glucosa seleccionado entre los grupos de GLUTI-12, transportadores HMIT y SGLT1-6.

Los ejemplos de activadores del transportador de captación de la glucosa incluyen insulina, pinitol (véase, por ejemplo, WO/2000/071111), AMP 8-bromo-cíclico (véase, *por ejemplo*, Ogura et al., Journal of Endocrinology, 164:171-178, 2000), ácido araquidónico (Fong et al., Cellular Signalling, 8:179-183, 1996), ésteres de forbol tal como 13-acetato 12-O-tetra-decanoil-forbol (véase, *por ejemplo*, Molecular Brain Research, 15:221-226, 1992).

5. Moduladores de la respiración mitocondrial (inhibidores de la fosforilación oxidativa)

Como se define en el presente documento, el término "respiración mitocondrial" u "oxidación mitocondrial" se refiere a la oxidación de moléculas de sustrato (por ejemplo, azúcares, ácidos orgánicos, piruvato, etc.) en el interior de la mitocondria. En algunos aspectos, un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un modulador de la respiración mitocondrial. Un compuesto que puede influir sobre el grado de respiración/oxidación de la mitocondria se denomina generalmente en el presente documento "modulador de la respiración mitocondrial" u otro término similar. En algunos aspectos, un modulador de la respiración mitocondrial es un compuesto que inhibe o impide la respiración mitocondrial o la oxidación mitocondrial. En algunos aspectos, un modulador de la respiración mitocondrial es un inhibidor de la fosforilación oxidativa.

Un inhibidor de la fosforilación oxidativa puede ser cualquier inhibidor de una o más enzimas de la fosforilación oxidativa o un desacoplador de la fosforilación oxidativa. Se conocen en la técnica las enzimas de la fosforilación oxidativa e incluyen el complejo I enzimático (NADH coenzima Q reductasa), II (succinato-coenzima Q reductasa), III (coenzima Q citocromo C reductasa), IV (citocromo oxidasa), y V (F₀-F₁, ATP sintasa).

Los inhibidores del complejo I enzimático son cualquiera de los conocidos en la técnica y pueden incluir, aunque no de forma limitativa cualquiera de los siguientes: tritilioalanina, carminomicina, y piperazinadiona, rotenona, amital, 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), paraquat, azul de metileno, y ferricianuro (los 2 últimos son aceptores de electrones). Los inhibidores del complejo II enzimático son cualquiera de los conocidos en la técnica. Los inhibidores de la coenzima Q son cualquiera de los conocidos en la técnica. Los inhibidores del complejo III enzimático son cualquiera de los conocidos en la técnica y pueden incluir, aunque no de forma limitativa mioxotiazol, antimicina A, ubisemiquinona, citocromo C, derivados de 4,6-diaminotriazina, metotrexato o aceptores de electrones tales como metosulfato de fenazina y 2,6-diclorofenol-indofenol. Los inhibidores del complejo IV enzimático son cualquiera de los conocidos en la técnica y pueden incluir, aunque no de forma limitativa cianuro, sulfuro de hidrógeno, azida, formiato, fosfina, monóxido de carbono y el aceptor de electrones ferricianuro. Los inhibidores del complejo V enzimático son cualquiera de los conocidos en la técnica y pueden incluir, aunque no de forma limitativa ácido 2-hidroxiglutarico, VM-26 (4'-demetil-epipodofilotoxin tenilideno glucósido), tritilioalanina, carminomicina, piperazinadiona, dinitrofenol, dinitrocresol, 2-hidroxi-3-alkil-1,4-naftoquinonas, apoptolidin aglicona, oligomicina, osamicina, citovaricina, derivados de naftoquinona (por ejemplo, dicloroalil-lawsona y lapachol), rodamina, rodamina 123, rodamina 6G, carbonil cianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona, rotenona, safranina O, cihexatina, DDT, clordecona, arseniato, pentaclorofenol, benzonitrilo, herbicidas de tiadiazol, salicilato, fármacos anfífilos catiónicos (amiodarona, perhexilina), gramicidina, calcimicina, pentaclorobutadienil-cisteína (PCBD-cys), y trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona (FCCP). Otros inhibidores de la fosforilación oxidativa pueden incluir atractilósido, DDT, ácidos grasos libres, lipofosfolípidos, n-etilmaleimida, mersanilo, y p-benzoquinona.

Los desacopladores de la fosforilación oxidativa se refieren a compuestos que actúan como desacopladores de la fosforilación oxidativa procedentes del transporte de electrones. Los ejemplos de desacopladores de la fosforilación oxidativa incluyen, aunque no de forma limitativa, DNP, 5-cloro- 3-terc-butil-2'-cloro-4'-nitrosalicilanilida (S-13), 2,3,4,5,6-pentaclorofenolato de sodio (PCP), 4,5,6,7-tetracloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (TTFB), Ácido flufenámico (ácido 2-[3-(trifluorometil)anilino]benzoico), 3,5-di-terc-butil-4-hidroxi-bencilidenomalononitrilo (SF6847), cianuro de carbonil m-cloro fenilhidrazona (CCCP), derivados de cianuro de carbonil p-[trifluorometoxi]-fenilhidrazona (FCCP), y alfa-(fenilhidrazono)fenilacetónitrilo, derivados de fenilacetónitrilo; y ácidos débiles que comprenden: Fenoles débilmente ácidos, bencimidazoles, N-fenilantranilatos, salicilanidas, fenilhidrazonas, ácidos salicílicos, acilditiocarbazatos, cumarinas, y aminas aromáticas.

6. Activadores del factor inducible por hipoxia

Se conocen en la técnica activadores de la ruta del factor inducible por hipoxia e incluyen alcaloides y otros derivados de aminoácidos, inhibidores de la HIF asparaginil hidroxilasa (factor inhibidor de HIF o FIH) y HIF proil hidroxilasas (HPH o PHD), inhibidores de la glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), donantes de óxido nítrico (NO), agentes de despolimerización de microtúbulos (MDA), compuestos fenólicos, terpenos/esteroides, y prostaglandina E2 (PGE2). Los ejemplos de alcaloides y otros derivados de aminoácidos incluyen deferroxamina y desferri-exoquelina DFE 722 SM, Ciclopiroxolamina [Loprox®, 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona 2-aminoetanol], y 8-metil-piridoxatina. Los ejemplos de inhibidores de la glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) incluye indirrubina, derivados de indirrubina tales como 5-yodoindirrubin-3'-oxima y 5-metilindirrubin-3'-oxima. Los ejemplos de donantes de óxido nítrico (NO) incluyen S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP), 3-(hidroxi-1-(1-metiletil)-2-nitrosodiazino)-1-propanamina (NOC5), diazen-1-io-1,2-diolato (NOC-18), S-nitrosoglutación (GSNO), espermina NONOato (un complejo de NO con el producto natural espermina), dietilamina NONOato, y dietiltriaina NONOato. Los ejemplos de agentes de despolimerización de microtúbulos (MDA) incluyen los alcaloides vegetales vinblastina, colchicina, y MDA sintéticos tales como nocodazol. Los ejemplos de compuestos fenólicos incluyen dibenzoilmetano (DBM), el flavonoide quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona), (-)-epicatequin-3-galato (ECG), y (-)-epigallocatequin-3-galato (EGCG). Los ejemplos de terpenos y esteroides incluyen sesquiterpeno-tropolonas (por ejemplo, picnidiona, epolona A y epolona B), 4-hidroxi estradiol (4-OHE2), dihidrotestosterona, metiltrienolona (R1881), y diterpeno éster de forbol 12-O-miristato 13-acetato (PMA, conocido también como 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato o TPA).

Los ejemplos de inhibidores de la HIF asparaginil hidroxilasa (factor inhibidor de HIF, o FIH) y HIF proil hidroxilasas (HPH o PHD) incluyen análogos de 2-oxoglutarato (2OG) tales como N-oxaloilglicina (5, NOG), derivados de ésteres de NOG (por ejemplo, DMOG (dimetil-oxalilglicina)), N-((3-hidroxi-6-cloroquinolin-2-il)carbonil)-glicina, 3-hidroxipiridina-2-carbonil-glicina, 3,4-dihidroxibenzoato, piridina-2,5-dicarboxilato, piridina-2,4-dicarboxilato, N-oxalil-2S-alanina, análogos adicionales de 2OG como se describe en Mole et al., Bioorg Med Chem Lett. 13:2677-80, 2003, alahopcina y desalanilalahopcina, análogos de la desalanilalahopcina 3-carboximetileno N-hidroxi succinimida, 3-carboxi-N-hidroxi pirrolidona, l-mimosina (L-Mim), 3,4-dihidroxibenzoato de etilo (3,4-DHB), y N-carboximetilamida del ácido 6-cloro-3-hidroxi-quinolin-2-carbónico (S956711). Los inhibidores de la HIF asparaginil hidroxilasa y las HIF proil hidroxilasas adicionales se describen en, por ejemplo, Ivan et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 13459-13464, 2002, WO03/049686, WO03/080566, y WO06/084210, WO10/056767.

Otros activadores de la ruta HIF incluyen quelantes de hierro (por ejemplo, desferroxamina, 2,2'-piridilo, 1,10-fenantrolina, quelante de Ca²⁺ BAPTA (ácido 1,2-bis(2-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético), metales de transición (por ejemplo, cobalto, níquel, cromo (VI) y cobre), el compuesto de organomercurio mersalilo, y FG-0041 (un compuesto que está estructuralmente relacionado con 1,10-fenantrolina).

Los activadores adicionales de la ruta de HIF incluyen proteínas que regulan en exceso la traducción de HIF-1. La proteína quinasa C (PKC) aumenta la velocidad de transcripción de HIF-1 α y funciona junto con la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que potencia también la traducción de HIF-1 α . La ruta de PKC activa la expresión de la proteína ribosómica s6, que reconoce específicamente los transcritos de ARNm tales como HIF-1 α . Mediante la fosforilación de la proteína S6 en condiciones normóxicas, se pueden aumentar mucho las velocidades de traducción del ARNm de HIF-1 α , contrarrestando eficazmente los efectos de la degradación del proteosoma de esta subunidad y aumentando los niveles del complejo HIF-1 en el interior de la célula. La ruta PI3K se ha identificado como los medios primarios por los cuales diversos mediadores, tales como los lipopolisacáridos, influyen sobre la activación de HIF-1 α en las células del músculo liso vascular y los macrófagos (Dery et al., Int J Biochem Cell Bio. 37:535-540, 2004; Page et al., J Biol Chem. 277:48403-48409, 2002).

El péptido PR39 derivado de macrófago ha mostrado estabilizar HIF-1 α disminuyendo su degradación, dando como resultado una formación acelerada de estructuras vasculares in vitro y una vasculatura miocárdica aumentada en ratones (Li et al., Nat Med 6: 49-55. 2000). Se ha conseguido la inducción directa de HIF-1 utilizando los extremos N o C de los polipéptidos ODDD que bloquean la degradación mediada por VHL (Maranchie et al., Cancer Cell 1: 247-255, 2002).

Los activadores de la ruta HIF incluyen además otros estímulos fisiológicos no hipóxicos tales como factores de crecimiento, citoquinas, y hormonas. Los ejemplos de factores de crecimiento que activan la ruta HIF incluyen el

factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)-1 e IGF- 2, la proteína de unión a IGF (IGFBP)-2 e IGFBP-3, EGF, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y la herregulina. Los ejemplos de citoquinas que activan la ruta HIF incluyen el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), la interleuquina-1 beta (IL-1 β), e IL-1.

- 5 Los ejemplos de hormonas que activan la ruta HIF incluyen las hormonas vasculares angiotensina II y trombina, la hormona tiroidea y la hormona estimuladora del folículo. Otros factores fisiológicos tales como la proteína redox tioredoxina-1 (Trx-1) y la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) pueden inducir también la proteína HIF-1 α y activar HIF-1.

10 7. Activadores de PDK1

En algunos aspectos, los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico son activadores de PDK1. Los activadores de PDK1 ilustrativos se describen en el presente documento en la sección II, *más arriba*.

15 IV. Inhibidores de HDAC

- Los inhibidores de HDAC ilustrativos pueden incluir anticuerpos que se unen a variantes negativas dominantes, y ARNip y ácidos nucleicos de sentido contrario que se dirigen a HDAC. Los inhibidores de HDAC incluyen, aunque no de forma limitativa, TSA (tricostatina A) (véase, *por ejemplo*, Adcock, British Journal of Pharmacology 150:829-831 (2007)), VPA (ácido valproico) (véase, *por ejemplo*, Munster et al., Journal of Clinical Oncology 25:18S (2007): 1065), butirato de sodio (NaBu) (véase, *por ejemplo*, Han y col., Immunology Letters 108:143-150 (2007)), SAHA (ácido suberoanilida hidroxámico o vorinostat) (véase, *por ejemplo*, Kelly et al., Nature Clinical Practice Oncology 2:150-157 (2005)), fenilbutirato de sodio (véase, *por ejemplo*, Gore et al., Cancer Research 66:6361-6369 (2006)), depsipéptido (documento FR901228, FK228) (véase, *por ejemplo*, Zhu et al., Current Medicinal Chemistry 3(3):187-199 (2003)), trapoxina (TPX) (véase, *por ejemplo*, Furumai et al., PNAS 98(1):87-92 (2001)), péptido 1 que contiene ácido hidroxámico cíclico (CHAP1) (véase, Furumai *más arriba*), MS-275 (véase, *por ejemplo*, Carninci et al., documento WO2008/126932), LBH589 (véase, *por ejemplo*, Goh et al., documento WO2008/108741) y PXD101 (véase, Goh, *más arriba*). En general, a nivel global, las células pluripotentes tienen más acetilación de la histona, y las células diferenciadas tienen menos acetilación de la histona. La acetilación de la histona está implicada también en la regulación de la histona y la metilación del ADN. En algunos aspectos, Los inhibidores de HDAC facilitan la activación de los genes de pluripotencia silenciados.

V. Inhibidores de ALK5

- 35 Los inhibidores del receptor de TGF β (por ejemplo, ALK5) pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes, y ácidos nucleicos de sentido contrario que suprimen la expresión de los receptores de TGF β (por ejemplo, ALK5). Los receptores de TGF β /inhibidores de ALK5 ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, SB431542 (véase, *por ejemplo*, Inman, et al., Molecular Pharmacology 62(1):65-74 (2002)), A-83-01, conocido también como 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (véase, *por ejemplo*, Tojo et al., Cancer Science 96(11):791-800 (2005), y comercialmente disponible de, *por ejemplo*, Toicris Bioscience); 2-(3-(6-metilpiridin- 2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, *por ejemplo*, Dalton et al., documento WO2008/094597), BMP4 (véase, Dalton, *más arriba*), GW788388 (-{4-[3-(piridin-2-il)-1 H-pirazol-4-il]piridin-2-il)-N-(tetrahydro-2H- piran-4-il)benzamida) (véase, *por ejemplo*, Gellibert et al., Journal of Medicinal Chemistry 49(7):2210-2221 (2006)), SM16 (véase, *por ejemplo*, Suzuki et al., Cancer Research 67(5):2351-2359 (2007)), IN-1130 (3-((5-(6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1H-imidazol-2-il)metil)benzamida) (véase, *por ejemplo*, Kim et al., Xenobiotica 38(3):325-339 (2008)), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)piridina) (véase, *por ejemplo*, de Gouville et al., Drug News Perspective 19(2):85-90 (2006)), SB-505124 (clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina) (véase, *por ejemplo*, DaCosta et al., Molecular Pharmacology 65(3):744-752 (2004)) y derivados de pirimidina (véase, *por ejemplo*, aquellos relacionados en Stiefl et al., documento WO2008/006583), SU5416; clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124); lerdelimumb (CAT-152); metelimumab (CAT-192); GC-1008; ID11; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; Gleevec; 3,5,7,2',4'- pentahidroxiflavona (Morin); activina-M108A; P144; y TBR2-Fc soluble (véase, *por ejemplo*, Wrzesinski et al., Clinical Cancer Research 13(18):5262-5270 (2007); Kaminska et al., Acta Biochimica Polonica 52(2):329-337 (2005); y Chang et al., Frontiers in Bioscience 12:4393-4401 (2007)). Además, aunque no se pretende que "un inhibidor de ALK5"abarque los inhibidores de la quinasa no específicos, debe entenderse que un "inhibidor de ALK5" abarca los inhibidores que inhiben ALK4 y/o ALK7 además de ALK5, tales como, por ejemplo, SB-431542 (véase, *por ejemplo*, Inman et al., J. Mol. Pharmacol. 62(1): 65-74 (2002). Sin pretender limitar el alcance de la divulgación, se cree que los inhibidores de ALK5 influyen sobre el proceso de conversión/transición mesenquimal a epitelial (MET). La ruta TGF β /activina es una ruta impulsora de la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Por lo tanto, inhibir la ruta TGF β /activina puede facilitar el proceso MET (es decir, la reprogramación).

- A la vista de los datos del presente documento que muestran el efecto de inhibir ALK5, se cree que la inhibición de la ruta TGF β /activina tendrá efectos similares. Por lo tanto, cualquier inhibidor (por ejemplo, antes o después) de la ruta TGF β /activina se puede usar en combinación con, o en vez de, los inhibidores ALK5, que se han descrito en todos los párrafos del presente documento. Los inhibidores de la ruta TGF β /activina ilustrativos incluyen, aunque no de

forma limitativa: inhibidores del receptor TGF β , inhibidores de la fosforilación de SMAD2/3, inhibidores de la interacción de SMAD2/3 y SMAD4 y activadores/agonistas de SMAD6 y SMAD7. Además, las clasificaciones descritas a continuación tienen meramente fines organizativos y un experto en la materia sabría que los compuestos pueden influir sobre uno o más puntos de una ruta y, por tanto, los compuestos pueden funcionar en más de una de las categorías definidas.

Los inhibidores de la fosforilación de SMAD2/3 pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes, y ácidos nucleicos de sentido contrario que se dirigen a SMAD2 o SMAD3. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen PD169316; SB203580; SB-431542; LY364947; A77-01; y 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin). Véase, *por ejemplo*, Wrzesinski, *más arriba*; Kaminska, *más arriba*; Shimanuki, et al., *Oncogene* 26:3311-3320 (2007); y Kataoka et al., EP1992360.

Los inhibidores de la interacción de SMAD2/3 y SMAD4 pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes, y ácidos nucleicos de sentido contrario que se dirigen a SMAD2, SMAD3 y/o SMAD4. Los ejemplos específicos de inhibidores de la interacción de SMAD2/3 y SMAD4 incluyen, aunque no de forma limitativa, Trx-SARA, Trx-xFoxH1b y Trx-Lefl. (Véanse, *por ejemplo*, Cui et al., *Oncogene* 24:3864-3874 (2005) y Zhao et al., *Molecular Biology of the Cell*, 17:3819-3831 (2006).)

Los activadores/agonistas de SMAD6 y SMAD7 incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos, variantes negativas dominantes, y ácidos nucleicos de sentido contrario que se dirigen a SMAD 6 o SMAD 7. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, aunque no de forma limitativa, oligonucleótidos PTO como smad7. Véase, *por ejemplo*, Miyazono et al., documento US6534476, y Steinbrecher et al., US2005119203.

VI. Inhibidores de MEK

Los inhibidores de MEK pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes, y ARNip y ácidos nucleicos de sentido contrario que suprimen la expresión de MEK. Los ejemplos específicos de los inhibidores MEK incluyen, aunque no de forma limitativa, PD0325901, (véase, *por ejemplo*, Rinehart, et al., *Journal of Clinical Oncology* 22:4456-4462 (2004)), PD98059 (disponible, *por ejemplo*, de Cell Signaling Technology), U0126 (disponible, *por ejemplo*, de Cell Signaling Technology), SL 327 (disponible, *por ejemplo*, de Sigma-Aldrich), ARRY-162 (disponible, *por ejemplo*, de Array Biopharma), PD184161 (véase, *por ejemplo*, Klein et al., *Neoplasia* 8:1-8 (2006)), PD184352 (CI-1040) (véase, *por ejemplo*, Mattingly et al., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:456-465 (2006)), sunitinib (véase, *por ejemplo*, Voss et al., US2008004287), sorafenib (véase, Voss *supra*), Vandetanib (véase, Voss *supra*), pazopanib (véase, *por ejemplo*, Voss *supra*), Axitinib (véase, Voss *supra*) y PTK787 (véase, Voss *supra*).

Actualmente, algunos inhibidores de MEK están sometidos a evaluación en ensayos clínicos. CI-1040 se ha evaluado en ensayos clínicos en Fase I y Fase II para el cáncer (véase, *por ejemplo*, Rinehart et al., *Journal of Clinical Oncology* 22(22):4456-4462 (2004)). Otros inhibidores de MEK que están sometidos a evaluación en ensayos clínicos incluyen PD184352 (véase, *por ejemplo*, English et al., *Trends in Pharmaceutical Sciences* 23(1):40-45 (2002)), BAY 43-9006 (véase, *por ejemplo*, Chow et al., *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46:72-78 (2001)), PD-325901 (también PD0325901), GSK1120212, ARRY-438162, RDEA119, AZD6244 (también ARRY-142886 o ARRY-886), RO5126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704). Véase, *por ejemplo*, la información de los National Institutes of Health localizada en la World Wide Web en clinicaltrials.gov, así como la información procedente del National Cancer Institute localizada en la World Wide Web en cancer.gov/clinical trials.

VII. Reprogramación

Hasta la fecha, se ha establecido un gran número de métodos y protocolos diferentes para inducir células de mamífero no pluripotentes en citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC). Los iPSC tienen una morfología, proliferación, y pluripotencia, similar a ESC, juzgado por la formación del teratoma y la contribución de la quimera. Se cree que los activadores de PDK1 o los compuestos que promueven el metabolismo glucolítico (por ejemplo, los activadores de PDK1), opcionalmente, en combinación con un inhibidor de HDAC, y opcionalmente un inhibidor de ALK5 y opcionalmente un inhibidor de Mek, mejorarán esencialmente cualquier protocolo de reprogramación para generar iPSC. Se cree que los protocolos de reprogramación que se pueden mejorar incluyen aquellos que implican la introducción de uno o más factores de transcripción de la reprogramación seleccionados entre un polipéptido Oct (incluyendo, aunque no de forma limitativa Oct 3/4), un polipéptido Sox (incluyendo, aunque no de forma limitativa Sox2), un polipéptido Klf (incluyendo, aunque no de forma limitativa Klf4) y/o un polipéptido Myc (incluyendo, aunque no de forma limitativa c-Myc). Por lo tanto, en algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir una célula a convertirse en un citoblasto pluripotente comprenden condiciones en las que uno o más factores de transcripción de la reprogramación se seleccionan entre un polipéptido Oct (incluyendo, aunque no de forma limitativa Oct 3/4), un polipéptido Sox (incluyendo, aunque no de forma limitativa Sox2), un polipéptido Klf (incluyendo, aunque no de forma limitativa Klf4) y/o un polipéptido Myc (incluyendo, aunque no de forma limitativa c-Myc) se introducen en la célula. Como se señala en los Ejemplos, se ha demostrado que los activadores de PDK1 mejoran la reprogramación incluso con un único factor de transcripción de la reprogramación (por ejemplo, Oct4 solo). Por lo tanto, en algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir a una célula a convertirse en un citoblasto pluripotente

comprenden condiciones en las que un factor de transcripción de la reprogramación (por ejemplo, Oct4 solo) se introduce en la célula.

- En algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir a una célula a convertirse en un citoblasto pluripotente comprenden introducir factores de reprogramación en las células, por ejemplo, mediante la expresión de un casete de expresión recombinante que se ha introducido en la célula diana, o incubando las células en presencia de polipéptidos de factores de transcripción de la reprogramación exógenos de tal manera que los polipéptidos penetren en la célula.
- Los estudios han mostrado que la transducción retroviral de los fibroblastos de ratón con cuatro factores de transcripción que están muy expresados en ESC (Oct 3/4, Sox2, KLF4 y c-Myc) generan citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC). Véase, Takahashi, K. & Yamanaka, S. Cell 126, 663-676 (2006); Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Nature 448, 313-317 (2007); Wernig, M. et al. Nature 448, 318-324 (2007); Maherali, N. et al. Cell Stem Cell 1,55-70 (2007); Meissner, A., Wernig, M. & Jaenisch, R. Nature Biotechnol. 25, 1177-1181 (2007); Takahashi, K. et al. Cell 131,861-872 (2007); Yu, J. et al. Science 318, 1917-1920 (2007); Nakagawa, M. et al. Nature Biotechnol. 26, 101-106 (2007); Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. & Jaenisch, R. Cell Stem Cell. 2, 10-12 (2008). Los estudios han demostrado también la reprogramación de células somáticas humanas con factores de transcripción que están muy expresados en ESC: Hockemeyer et al. Cell Stem Cell. 11;3(3):346-53 (2008); Lowry et al. Proc Natl Acad Sci USA. 105(8):2883-8 (2008); Park et al. Nature. 10;451(7175):141-6 (2008); Nakagawa et al. Nat Biotechnol. Ene; 26(1):101-6 (2008); Takahashi et al. Cell. 131(5):861-72 (2007); y Yu et al. Science. 318(5858):1917-20 (2007). Se cree que dichos métodos mejorarán con la inclusión de un activador de PDK1 o uno de más compuestos que promueven el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1) y, opcionalmente, otros agentes como se describe en el presente documento.
- Para hacer frente a los problemas de seguridad que surgen de los genomas de las células diana que hospedan secuencias exógenas integradas, se han desarrollado adicionalmente numerosos protocolos genéticos modificados que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación. Estos protocolos producen células iPSC con riesgos potencialmente reducidos, e incluyen adenovirus no integrantes para administrar los genes de reprogramación (Stadtfeld, M., et al. (2008) Science 322, 945-949), transfección transitoria de plásmidos de reprogramación (Okita, K., et al. (2008) Science 322, 949-953), sistemas de transposición piggyBac (Woltjen, K., et al. (2009). Nature 458, 766-770, Yusa et al. (2009) Nat. Methods 6:363-369, Kaji, K., et al. (2009) Nature 458, 771-775), Virus rescindibles (Soldner, F., et al. (2009) Cell 136, 964-977), y sistema de expresión episómica basado en oriP/EBNA1-(Yu, J., et al. (2009) Science DOI: 10.1126). Por lo tanto, en algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir a una célula a convertirse en un citoblasto pluripotente comprenden condiciones en la que los factores de reprogramación se administran por adenovirus no integrantes, transfección transitoria de plásmidos de reprogramación, sistemas de transposición piggyBac, virus rescindibles (Soldner, F., et al. (2009) Cell 136, 964-977), y/o sistemas de expresión episómica basados en oriP/EBNA1-, de acuerdo con cualquiera de los protocolos descritos anteriormente. En algunos aspectos, un activador de PDK1 o uno de más compuestos que promueven el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1) y opcionalmente otros agentes que se describen en el presente documento se incuban con las células en cualquiera de los protocolos descritos anteriormente.

Tal como se ha señalado anteriormente, la reprogramación puede implicar cultivar células diana en presencia de una o más proteínas en condiciones que permitan la introducción de las proteínas en la célula. Véase, por ejemplo, Zhou H et al., Cell Stem Cell. 8 de mayo de 2009; 4(5):381-4; documento WO/2009/117439. Se puede introducir un polipéptido exógeno (es decir, una proteína proporcionada desde el exterior de la célula y/o que no está producida por la célula) a la célula mediante numerosos métodos diferentes que no implican la introducción de un polinucleótido que codifica el polipéptido. En algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir a una célula a convertirse en un citoblasto pluripotente comprenden introducir en la célula una o más proteínas exógenas, comprendiendo cada proteína exógena un polipéptido del factor de transcripción de interés unido (por ejemplo, unido como una proteína de fusión o unido de otra manera de forma covalente o no covalente) a un polinucleótido que potencia la capacidad del factor de transcripción de penetrar en la célula (y en algunos aspectos, el núcleo de la célula).

Los ejemplos de secuencias de polipéptidos que potencian el transporte a través de las membranas incluyen, aunque no de forma limitativa, la proteína de transcripción de la homeoproteína de *Drosophila antennapedia* (AntHD) (Joliot et al., New Biol. 3: 1121-34,1991; Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 1864-8,1991; Le Roux et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 9120-4, 1993), la proteína VP22 estructural del virus del herpes simple (Elliott y O'Hare, Cell 88: 223-33, 1997); la proteína TAT del activador de la transcripción de VIH-1 (Green y Loewenstein, Cell 55: 1179-1188, 1988; Frankel y Pabo, Cell 55: 1 289-1193, 1988); Secuencia señal FGF de Kaposi (kFGF); el dominio 4 de transducción de la proteína (PTD4); Penetratin, M918, Transportan-10; una secuencia de localización nuclear, un péptido PEP-I; un péptido anfipático (por ejemplo, un péptido MPG); los transportadores potenciadores de la administración tales como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 6.730.293 (que incluyen, aunque no de forma limitativa, una secuencia peptídica que comprende al menos 5-25 o más argininas contiguas o 5-25 o más argininas en un conjunto contiguo de 30, 40 o 50 aminoácidos; incluyendo, aunque no de forma limitativa un péptido que tiene suficientes, por ejemplo, al menos 5, restos guanidino o amidino); y el péptido Penetratin™ 1 comercialmente disponible, y los vectores peptídicos Diatos ("DPV") de la plataforma Vectocell®, disponibles de

Daitos S.A. de París, Francia. Véanse también los documentos WO/2005/084158 y WO/2007/123667 y los transportadores adicionales descritos en los anteriores. No solo estas proteínas pueden pasar a través de la membrana plasmática sino que la unión de otras proteínas, tales como los factores de transcripción descritos en el presente documento, es suficiente para estimular la captación celular de estos complejos. Se han descrito anteriormente numerosos polipéptidos capaces de mediar en la introducción de moléculas asociadas en una célula y se pueden adaptar a la presente invención. Véase, por ejemplo, Langel (2002) Cell Penetrating Peptides CRC Press, Pharmacology and Toxicology Series.

Las secuencias polipeptídicas ilustrativas que potencian el transporte a través de las membranas incluyen:

VP22: G S P P T A P T R S K T P A Q G L A R K L H F S T A P P N P D A P W T P R V A
G F N K R V F R F S P Q T A R R A T T T R I; **kFGF**: A G S G G A A V A L L P A V L L
A L L A P G G E F A; **PTD4**: A G S G G Y A R A A A R Q A R A G G E F A;
PENETRATIN: R Q I K I W F Q G R R M K W K K; **TAT**: Y G R K K R R Q R R R;
M918: M V T V L F R R L R I R R A C G P P R V R V; **TRANSPORTAN-10**: A G Y L L G
K I G L K A L A A L A K K I L.

En algunos aspectos, el polipéptido que potencia el transporte a través de las membranas es una secuencia peptídica que comprende al menos 5 o más argininas contiguas o no contiguas (por ejemplo, un péptido de 8 argininas). En algunos aspectos, el polipéptido que potencia el transporte a través de las membranas es una secuencia peptídica que comprende al menos 7 o más argininas contiguas o no contiguas. Por ejemplo, el polipéptido que potencia el transporte a través de las membranas es una secuencia peptídica que comprende 11 argininas contiguas, por ejemplo, E S G G G S P G R R R R R R R R R R. Tal como se ha señalado anteriormente, las argininas en la secuencia potenciadora del transporte no tienen que ser contiguas. En algunos aspectos, la región de la poliarginina (por ejemplo, la contigua o no contigua) tiene al menos 5, 8, 10, 12, 15, 20 o más aminoácidos contiguos largos y tiene al menos, por ejemplo, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más argininas.

En algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir a una célula a convertirse en un citoblasto pluripotente comprenden condiciones en las que uno o más polipéptidos exógenos, por ejemplo, un polipéptido Oct (incluyendo, aunque no de forma limitativa Oct 3/4), un polipéptido Sox (incluyendo, aunque no de forma limitativa Sox2), un polipéptido Klf (incluyendo, aunque no de forma limitativa Klf4) y/o un polipéptido Myc (incluyendo, aunque no de forma limitativa c-Myc), se introduce en las células mediante métodos tradicionales tales como lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, bombardeo de partículas y/o microinyección, o se puede introducir en las células mediante un agente de administración de proteínas. Por ejemplo, se puede introducir el polipéptido exógeno en las células mediante lípidos unidos de forma covalente o no covalente, por ejemplo, mediante un grupo miristoílo unido de forma covalente. Los lípidos utilizados para la lipofección están excluidos opcionalmente de los módulos de administración celular en algunos aspectos. En algunos aspectos, los polipéptidos del factor de transcripción descritos en el presente documento se introducen exógenamente como parte de un liposoma, o un cóctel de lípidos (tal como Eugene6 y Lipofectamina comercialmente disponibles). En otra alternativa, las proteínas del factor de transcripción pueden microinyectarse o introducirse directamente de otra forma en la célula diana. En algunos aspectos, los polipéptidos del factor de transcripción se administran a las células utilizando reactivos de administración de proteínas Profect, por ejemplo, Profect-P1 y Profect-P2 (Targeting Systems, El Cajon, CA), o utilizar reactivos de transfección Pro-Ject® (Pierce, Rockford IL, EE.UU.). En algunos aspectos, los polipéptidos del factor de transcripción se administran a las células utilizando nanotubos de una sola pared (SWNT).

Como se describe en los Ejemplos del documento WO/2009/117439, la incubación de las células con los polipéptidos del factor de transcripción utilizados de acuerdo con la invención durante periodos prolongados puede ser tóxica para las células. Por lo tanto, en algunos aspectos, las condiciones suficientes para inducir que una célula de mamífero no pluripotente se convierta en un citoblasto pluripotente comprenden incubar un activador de PDK1 o uno de más compuestos que promueven el metabolismo glucolítico (por ejemplo, un activador de PDK1) y opcionalmente un inhibidor de HDAC, un inhibidor de ALK5 y/o un inhibidor de Mek, e incubar de forma intermitente la célula de mamífero no pluripotente con uno o más de un polipéptido Oct (incluyendo, aunque no de forma limitativa Oct 3/4), un polipéptido Sox (incluyendo, aunque no de forma limitativa Sox2), un polipéptido Klf (incluyendo, aunque no de forma limitativa Klf4) y/o un polipéptido Myc (incluyendo, aunque no de forma limitativa c-Myc) con periodos intervinientes en la incubación de la célula en ausencia de uno o más polipéptidos. En algunos aspectos, el ciclo de incubación con y sin los polipéptidos puede repetirse durante 2, 3, 4, 5, 6, o más veces y llevarse a cabo durante lapsos de tiempo suficientes (es decir, las incubaciones con y sin proteínas) para conseguir el desarrollo de células pluripotentes.

Los diversos agentes (por ejemplo, activadores de PDK1 o compuestos que promueven el metabolismo glucolítico,

inhibidores de HDAC, receptores de TGF β /inhibidores de ALK5, inhibidores de la ruta MEK/ERK, y/o inhibidores de Rho GTPasa/ROCK, etc.) se pueden poner en contacto con células no pluripotentes tanto antes como, simultáneamente o después de la administración de, los factores de transcripción de la programación (por ejemplo, administrados como casetes de expresión o como proteínas). Por conveniencia, el día que se administran los factores de reprogramación se designa "día 1". En algunos aspectos, los inhibidores se ponen en contacto con las células en un agregado (es decir, como un cóctel) en aproximadamente 3-7 días y se continúa durante 7-14 días. Como alternativa, en algunos aspectos, el cóctel se pone en contacto con las células en el día 0 (es decir, un día antes de los factores de preprogramación) y se incuba durante aproximadamente 14-30 días.

La célula en la que una proteína de interés se introduce puede ser una célula de mamífero. Las células pueden ser humanas o no humanas (por ejemplo, primate, rata, ratón, conejo, bovino, perro, gato, cerdo, etc.). La célula puede estar, *por ejemplo*, en cultivo o en un tejido, fluido, etc., y/o proceder o estar en un organismo. Las células que se pueden inducir a pluripotencia incluyen, aunque no de forma limitativa, queratinocitos, células de folículos pilosos, HUVEC (Células endoteliales de vena umbilical humana), células sanguíneas de cordón umbilical, células progenitoras neurales y fibroblastos.

En algunos aspectos, las moléculas pequeñas pueden mejorar la eficacia de un proceso para generar células pluripotentes (por ejemplo, células iPSC). Por ejemplo, se puede manifestar una eficacia mejorada acelerando el tiempo para generar dichas células pluripotentes (por ejemplo, acortando el tiempo de desarrollo de las células pluripotentes en al menos un día en comparación con un proceso similar o igual sin la molécula pequeña). De forma alternativa, o en combinación, una molécula pequeña puede aumentar las células pluripotentes generadas por un proceso concreto (por ejemplo, aumentar el número en un periodo de tiempo dado en al menos 10%, 30%, 50%, 100%, 200%, 500%, etc., en comparación con un proceso similar o igual sin la molécula pequeña).

Opcionalmente, o además, las moléculas pequeñas pueden "complementar" o sustituir lo que generalmente se entiende de otra forma como una expresión necesaria de una de estas proteínas para dar como resultado células pluripotentes. Poniendo en contacto una célula con un agente que sustituye funcionalmente uno de los factores de transcripción, es posible generar células pluripotentes con todos los factores de transcripción anteriormente relacionados excepto por el factor de transcripción sustituido o complementado por el agente.

VIII. Transformación

La presente invención emplea técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que divulgan los métodos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)). En algunos aspectos, se introducen en una célula casetes de expresión para la expresión de uno o más factores de transcripción de la reprogramación.

En algunos aspectos, las especies de células y proteínas que se van a expresar son iguales. Por ejemplo, si se usa una célula de ratón, se introduce un ortólogo de ratón en la célula. Si se utiliza una célula humana, se introduce un ortólogo humano en la célula.

Se apreciará que cuando se van a expresar dos o más proteínas en una célula, se pueden usar uno o múltiples casetes de expresión. Por ejemplo, cuando un casete de expresión expresa múltiples polipéptidos, se puede usar un casete de expresión policistónico.

Se puede usar cualquier tipo de vector para introducir un casete de expresión de la invención en una célula. Los vectores ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, plásmidos y vectores víricos. Los vectores víricos ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, vectores adenovíricos, vectores VAA, y vectores retrovíricos (por ejemplo, vectores lentivíricos).

Los métodos adecuados para la administración de ácidos nucleicos para la transformación de una célula, un tejido o un organismo para uso con la invención actual se cree que incluyen virtualmente cualquier método por el cual un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) se puede introducir en una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o conocería una persona normalmente experta en la materia (por ejemplo, Stadtfeld y Hochedlinger, *Nature Methods* 6(5):329-330 (2009); Yusa et al., *Nat. Methods* 6:363-369 (2009); Woltjen, et al., *Nature* 458, 766-770 (9 de abril de 2009). Dichos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, la administración directa de ADN tal como mediante transfección ex vivo (Wilson et al., *Science*, 244:1344-1346, 1989; Nabel y Baltimore, *Nature* 326:711-713, 1987), opcionalmente con Eugene6 (Roche) o Lipofectamina (Invitrogen), mediante inyección (patentes de Estados Unidos con números 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985; patente de Estados Unidos n.º 5.789.215); mediante electroporación (patente de Estados Unidos n.º 5.384.253; Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984); mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973; Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990); utilizando DEAE-dextrano seguido por polietilenglicol (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985); mediante carga

sónica directa (Fechheimer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982; Fraley et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987; Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980; Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989; Kato et al., J Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, Biochemistry, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987); y cualquier combinación de dichos métodos, cada una de las cuales se incorpora al presente documento por referencia.

IX. Mezclas

Como se describe en el presente documento, la presente divulgación proporciona células de mamífero en una mezcla con un activador de PDK1 o un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, y uno o más de (a) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5; (b) un inhibidor de MEK; (c) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC); o (d) un polipéptido exógeno seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un activador del transportador de captación de glucosa. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de PDK1. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, PS48. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de la glucólisis, *por ejemplo*, fructosa 2,6-bisfosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un sustrato de la glucólisis, *por ejemplo*, fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un intermediario glucolítico o sus precursores metabólicos, *por ejemplo*, ácido nicotínico, NADH, o fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del transportador de captación de glucosa. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un modulador de la respiración mitocondrial. En algunos aspectos, el modulador de la respiración mitocondrial es un inhibidor de la fosforilación oxidativa, *por ejemplo*, 2,4-dinitrofenol, o ácido 2-hidroxiglutarico. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del factor inducible por hipoxia, *por ejemplo*, N-oxaloilglicina, o quercetina.

En algunos aspectos, la mezcla comprende además un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5. Los receptores de TGFβ/inhibidores de ALK5 incluyen, aunque no de forma limitativa A-83-01. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un inhibidor de MEK. Los inhibidores de MEK incluyen, aunque no de forma limitativa PD0325901. En algunos aspectos, la mezcla comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC). Los inhibidores de HDAC incluyen, aunque no de forma limitativa, butirato de sodio (NaB) y ácido valproico (VPA). En algunos aspectos, la mezcla comprende además un factor de transcripción exógeno, *por ejemplo*, un factor de transcripción exógeno seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

En algunos aspectos, el compuesto (por ejemplo, el activador de PDK1 o el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico) está presente en la mezcla a una concentración suficiente para inducir o mejorar la eficacia de inducción hasta pluripotencia. Por ejemplo, en algunos aspectos, los compuestos están en una concentración de al menos 0,1 nM, *por ejemplo*, al menos 1, 10, 100, 1000, 10000, o 100000 nM, *por ejemplo*, entre 0,1 nM y 100000 nM, *por ejemplo*, entre 1 nM y 10000 nM, *por ejemplo*, entre 10 nM y 10000 nM. En algunos aspectos, las mezclas están en un recipiente sintético (por ejemplo, un tubo de ensayo, una placa Petri, etc.). Por lo tanto, en algunos aspectos, las células son células aisladas (no parte de un animal). En algunos aspectos, las células se aíslan de un animal (humano o no humano), se introducen en un recipiente, se ponen en contacto con uno o más compuestos como se describe en el presente documento. Las células se pueden cultivar posteriormente y opcionalmente, reintroducirse en el mismo animal o en otro diferente, opcionalmente después que las células se hayan estimulado para convertirse en un tipo o linaje celular concreto. En algunos aspectos, la concentración de los inhibidores es suficiente para mejorar en al menos 10%, 20%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300% o más, la eficacia de inducción de las células no pluripotentes en la mezcla a citoblastos pluripotentes inducidos cuando la mezcla se somete a condiciones suficientes para inducir la conversión de las células en citoblastos pluripotentes inducidos.

Como se explica en el presente documento, en algunos aspectos, las células comprenden un casete de expresión para la expresión heteróloga de al menos uno o más de un polipéptido Oct, un polipéptido Myc, un polipéptido Sox y un polipéptido Klf. En algunos aspectos, las células no incluyen un casete de expresión que expresa uno o más (incluyendo en algunos aspectos, cualquiera) de los polipéptidos Oct, Myc, Sox, o Klf.

Las células utilizadas de acuerdo con la presente invención pueden ser humanas o no humanas (por ejemplo, primate, rata, ratón, conejo, bovino, perro, gato, cerdo, etc.). Los ejemplos de células no pluripotentes incluyen aquellas descritas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, las células procedentes de un tejido seleccionado entre médula ósea, piel, músculo esquelético, tejido graso y sangre periférica. Los tipos de células ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, fibroblastos, hepatocitos, mioblastos, neuronas, osteoblastos, osteoclastos, linfocitos T, queratinocitos, células de folículos pilosos, células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células sanguíneas del cordón umbilical, y células progenitoras neurales. En algunos aspectos, al menos un 99% de las células en la mezcla son inicialmente células no pluripotentes. En algunos aspectos, esencialmente todas las células en la mezcla son inicialmente células no pluripotentes.

En algunos aspectos, al menos un 0,001%, al menos un 0,002%, al menos un 0,005%, al menos un 0,01%, al menos un 0,05%, al menos un 0,1%, al menos un 0,5%, al menos un 1%, al menos un 2%, al menos un 3%, al menos un 4%, al menos un 5%, al menos un 6%, al menos un 7%, al menos un 8%, al menos un 9%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% de las células en la mezcla se inducen en células pluripotentes. En algunos aspectos, al menos un 99% de las células en la mezcla se inducen en células pluripotentes. En algunos aspectos, esencialmente todas las células se inducen en células no pluripotentes.

X. Kits

La presente divulgación proporciona un kit para inducir la pluripotencia en una célula de mamífero no pluripotente que comprende un activador de PDK1 o un compuesto que promueve el metabolismo glucolítico, y uno o más de (a) un receptor de TGF β /inhibidor de ALK5; (b) un inhibidor de MEK; (c) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC); o (d) un polipéptido exógeno seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de PDK1. En algunos aspectos, el activador de PDK1 es un activador de PDK1 alostérico, *por ejemplo*, PS48. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador de la glucólisis, *por ejemplo*, fructosa 2,6-bisfosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un sustrato de la glucólisis, *por ejemplo*, fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un intermedio glucolítico o sus precursores metabólicos, *por ejemplo*, ácido nicotínico, NADH, o fructosa 6-fosfato. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del transportador de captación de glucosa. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un modulador de la respiración mitocondrial. En algunos aspectos, el modulador de la respiración mitocondrial es un inhibidor de la fosforilación oxidativa, *por ejemplo*, 2,4-dinitrofenol, o ácido 2-hidroxiglutarico. En algunos aspectos, el compuesto que promueve el metabolismo glucolítico es un activador del factor inducible por hipoxia, *por ejemplo*, N-oxaloilglicina, o quercetina.

En algunos aspectos, el kit comprende además un receptor de TGF β /inhibidor de ALK5, *por ejemplo*, A-83-01. En algunos aspectos, el kit comprende además un inhibidor de MEK, *por ejemplo*, PD0325901. En algunos aspectos, el kit comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), *por ejemplo*, butirato de sodio (NaB), o ácido valproico (VPA). En algunos aspectos, el kit comprende además un factor de transcripción exógeno, *por ejemplo*, un factor de transcripción exógeno seleccionado entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox. En algunos aspectos, el factor de transcripción exógeno comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

En algunos aspectos, los kits comprenden además células no pluripotentes. Los ejemplos de células no pluripotentes incluyen aquellas descritas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, las células procedentes de un tejido seleccionado entre médula ósea, piel, músculo esquelético, tejido graso y sangre periférica. Los tipos de células ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, fibroblastos, hepatocitos, mioblastos, neuronas, osteoblastos, osteoclastos, linfocitos T, queratinocitos, células de folículos pilosos, células endoteliales de vena umbilical humana (HUEC), células sanguíneas del cordón umbilical, y células progenitoras neurales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Reprogramación de células somáticas primarias humanas mediante OCT4 y compuestos químicos

Los inventores informan aquí de un novedoso cóctel de moléculas pequeñas que permite la reprogramación de células somáticas primarias humanas a iPSC con la expresión exógena solamente de OCT4.

Resultados

Entre los diferentes tipos de células somáticas humanas primarias fácilmente disponibles, los queratinocitos que se pueden aislar fácilmente de piel humana o folículos pilosos representan una fuente celular atractiva para la reprogramación, debido a que expresan endógenamente *KLF4* y *cMYC*, y se ha informado de que se reprogramaban más eficazmente utilizando los cuatro TF o tres TF convencionales (sin MYC) (Aasen, T. et al., Nat Biotechnol 26:1276-1284 (2008); Maherali, N. et al., Cell Stem Cell 3, 340-345(2008)). Más recientemente, los inventores informaron de que la doble inhibición de las rutas de TGF β y MAPK/ERK utilizando moléculas pequeñas (es decir, SB431542 y PD0325901, respectivamente) proporciona una condición drásticamente potenciada para reprogramar los fibroblastos humanos con cuatro TF exógenos (es decir, Oct4, Sox2, Klf4, y c-Myc TF, o "OSKM") (Lin, T. et al., Nat Methods 6:805-808 (2009)). Además, los inventores han mostrado que dicha inhibición de ruta doble podría potenciar también la reprogramación de los queratinocitos humanos mediante dos TF exógenos (es decir, Oct4 y Klf4, u "OK") con dos moléculas pequeñas, Parnato (un inhibidor de la desmetilasa 1 específica de lisina) y CHIR99021 (un inhibidor de GSK3) (Li, W. et al., Stem Cells 27:2992-3000 (2009)). Sin embargo, dicho proceso de

reprogramación de 2-Tf era muy ineficaz y complejo (por ejemplo, implicando dos TF exógenos y cuatro sustancias químicas), y la reprogramación con incluso un TF menos parecía desmoralizadora. En su camino hacia la reprogramación usando solamente OCT4, los inventores desarrollaron una estrategia por etapas en el refinamiento de la condición de reprogramación e identificaron nuevas entidades químicas de reprogramación.

Los inventores intentaron en primer lugar optimizar el proceso de reprogramación con las cuatro o tres condiciones de TF (es decir, OSKM u OSK) en queratinocitos epidérmicos humanos neonatales (NHEK) ensayando diversos inhibidores de las rutas de TGF β y MAPK a diferentes concentraciones utilizando métodos de caracterización de iPSC humanos informados anteriormente (Lin, T. et al., Nat Methods 6:805-808 (2009)). Los inventores encontraron que la combinación de PD0325901 0,5 μ M y A-83-01 0,5 μ M (un inhibidor del receptor TGF β más potente y selectivo) era más eficaz para potenciar la reprogramación de los queratinocitos humanos transducidos con OSKM u OSK (Figura 1a). De forma notable, cuando los inventores redujeron adicionalmente las transducciones víricas a solo dos factores/OK, los inventores generaron además iPSC a partir de NHEK cuando se trataron con PD0325901 0,5 μ M y A-83-01 0,5 μ M, aunque con eficacia reducida. A continuación los inventores comenzaron a seleccionar moléculas pequeñas adicionales a partir de una colección de compuestos bioactivos conocidos a diversas concentraciones como se ha informado anteriormente. Entre docenas de compuestos analizados hasta este momento, los inventores descubrieron, de forma sorprendente que un activador de molécula pequeña de PDK1 (quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido-1), PS48 (5 μ M) que no se ha informado nunca en la reprogramación, puede potenciar significativamente la eficacia de la reprogramación aproximadamente quince veces. De manera interesante, los inventores encontraron también que 0,25 mM de butirato de sodio (NaB, un inhibidor de la histona desacetilasa) resultó ser mucho más fiable y eficaz que los 0,5 mM de VPA anteriormente notificados para la generación de iPSC bajo la condición OK (Figura 1b). Los posteriores estudios de seguimiento demostraron que la combinación de PS48 5 μ M y NaB 0,25 mM potenciarían adicionalmente la eficacia de reprogramación alrededor de veinticinco veces (Figura 1b y Tabla 3).

Con dicha eficacia sin precedentes en la reprogramación de las NHEK con solo dos TF, los inventores exploraron adicionalmente la posibilidad de generar iPSC con OCT4 solo refinando las combinaciones de aquellas moléculas pequeñas durante ventanas de tratamiento diferentes. Las NHEK primarias se transdujeron con OCT4 y se trataron con sustancias químicas (Figura 1c). Entre diversas condiciones, las pequeñas colonias de iPSC se asemejan a hESC (cuatro a seis colonias de 1.000.000 de células sembradas) aparecieron en NHEK infectadas con OCT4 que se trataron con NaB 0,25 mM, PS48 5 μ M y A-83-01 0,5 μ M durante las primeras cuatro semanas, seguido por el tratamiento con NaB 0,25 μ M, PS48 5 mM, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M durante otras cuatro semanas (Figura 1c). Dichas colonias de iPSC positivas para TRA-1-81 (Figura 1d) crecieron más con el medio de cultivo hESC convencional y se pudo pasar en serie para dar como resultado clones de iPSC estables que se caracterizaron adicionalmente (Figura 1e y 2). Además, también se pudieron generar iPSC solamente con OCT4 a partir de queratinocitos adultos humanos mediante la adición de Parnato 2 μ M y CHIR99021 3 μ M (que habían mostrado mejorar la reprogramación de NHEK bajo la condición OK) a este cóctel químico. Tras la reprogramación fiable de los queratinocitos primarios a iPSC mediante OCT4 y moléculas pequeñas, los inventores aplicaron adicionalmente las condiciones a otros tipos de células primarias humanas, incluyendo HUVEC (células mesodérmicas diferenciadas) y AFDC (células derivadas de fluido amniótico). De un modo similar, colonias de iPSC positivas para TRA-1-81 aparecieron en HUVEC infectadas con OCT4 y AFDC que se trataron con sustancias químicas. De forma notable, pareció que la reprogramación de HUVEC y AFDC fue más eficaz y más rápida que la reprogramación de NHEK bajo condiciones de OCT4 y moléculas pequeñas (Tabla 3). Dos clones de iPSC procedentes de cada tipo de célula se expandieron a largo plazo durante 20 pases en condiciones de cultivo de hESC convencionales y se caracterizaron adicionalmente (Tabla 4).

Estas células hiPSC-OK e hiPSC-O expandidas de forma estable son morfológicamente indistinguibles de hESC, y se pudieron cultivar en una superficie revestida con ECM en condiciones exentas de alimentador y definidas químicamente (Figura 1e y Figura 6). Se dieron un resultado positivo en la tinción para la fosfatasa alcalina (ALP) y expresaron marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-81 y SSEA4, detectado mediante inmunocitoquímica/ICC (Figura 1e, 3b, Figuras 4-5). Además, el análisis de RT-PCR confirmó la expresión de los genes *OCT4* humanos endógenos, *SOX2*, *NANOG*, *REX1*, *UTF1*, *TDGF2*, *FGF4*, y el silenciamiento de *OCT4* y *KLF4* exógenos (Figura 2a y 3c). Además, el análisis de secuenciación con bisulfito desveló que los promotores *OCT4* y *NANOG* de las células hiPSC-OK e hiPSC-O se desmetilaron ampliamente (Figura 2b y 3d). Este resultado proporciona una evidencia adicional para la reactivación del programa de transcripción de la pluripotencia en las células hiPSC-OK e hiPSC-O. El análisis de expresión génica global de las células hiPSC-O, NHEK y hESC mostró que las células hiPSC-O son distintas de NHEK (valor de correlación de Pearson: 0,87) y más similares a las hESC (valor de correlación de Pearson: 0,98) (Figura 2c). El análisis de genotipación mostró que las células hiPSC-O contenían solo el transgén *OCT4* sin la contaminación del transgén *KLF4* o *SOX2* (Figura 8). El análisis de la transferencia Southern mostró que existían múltiples sitios de integración diferentes del transgén *OCT4* (Figura 9) entre diferentes clones. Además, el resultado de la cariotipación demostró que hiPSC-O mantuvo el cariotipo normal durante la reprogramación completa y el proceso de expansión (Figura 10). Además, el ensayo de la huella del ADN excluyó la posibilidad de que estos hiPSC aparecieran a partir de la contaminación de las hESC en el laboratorio (Tabla 5).

Para examinar el potencial desarrollo de estas células hiPSC, se diferenciaron *in vitro* mediante el método de

diferenciación del cuerpo embrioideo normalizado (EB). Los análisis ICC demostraron que pudieron diferenciarse eficazmente en las células neuronales características β III-tubulina⁺ (ectodermo), células mesodérmicas SMA⁺, y células endodérmicas AFP⁺ (Figura 2d y 3e). Los análisis mediante PCR cuantitativa confirmaron adicionalmente la expresión de los genes marcadores específicos de estos linajes y de linajes adicionales, incluyendo células ectodérmicas (β III-tubulina y *NESTIN*), células mesodérmicas (*MSX1* y *MLC2a*), y células endodérmicas (*FOXA2* y *AFP*) (Figura 2e). Siguiendo el protocolo EB, estas células hiPSC-OK e hiPSC-O también pueden dar lugar a cardiomiocitos que laten rítmicamente. Para ensayar su pluripotencia *in vivo*, se trasplantaron a ratones *SCID*. De cuatro a seis semanas después, estas células hiPSC-O generaron eficazmente teratomas típicos que contenían derivados de las tres capas germinales (Figura 2f y 3f). En conjunto, estas caracterizaciones *in vitro* e *in vivo* demostraron que un único factor de transcripción, OCT4, combinado con un cóctel de moléculas pequeñas definido es suficiente para reprogramar algunas células somáticas primarias humanas a iPSC que son morfológica, molecular y funcionalmente similares a hESC pluripotentes.

Discusión

Los estudios presentados anteriormente tienen numerosas implicaciones importantes: En primer lugar, aunque se mostró que los NSC fetales se reprogramaban a iPSC mediante la expresión ectópica solo de OCT4, ha habido un significativo escepticismo acerca de si un único gen OCT4 exógeno sería suficiente para reprogramar otras células somáticas humanas más prácticas que no expresan endógenamente SOX2 (uno de los dos genes de pluripotencia maestros en la reprogramación), están en las últimas etapas de desarrollo (por ejemplo, comparación embrión temprano/feto frente a recién nacido/adulto) y se pueden obtener sin daños significativos para el individuo. Según el conocimiento de los inventores, el estudio de los inventores es la primera demostración de que los iPSC pueden derivarse prácticamente de células somáticas humanas primarias fácilmente disponibles (por ejemplo, queratinocitos) transducidos con un único gen de reprogramación exógeno, OCT4. En contraste con los neurocitoblastos procedentes del cerebro, los queratinocitos son más accesibles y se pueden obtener fácilmente a partir de individuos nacidos con menos procedimientos invasivos. Esto refuerza aún más la estrategia de aprovechar diversas células somáticas humanas prácticamente accesibles para la generación de iPSC con soluciones más seguras y/o mejores calidades. Por lo tanto, este nuevo método y su desarrollo adicional facilitaría significativamente la producción de citoblastos pluripotentes específicos del paciente para diversas aplicaciones.

En segundo lugar, aunque se han identificado moléculas pequeñas y sus combinaciones para sustituir solo una o dos reprogramaciones de los TF, resulta ser un desafío exponencial para generar iPSC cuando se omiten conjuntamente más reprogramaciones exógenas de los TF. La identificación de este nuevo cóctel de moléculas pequeñas, que sustituye funcionalmente tres factores de transcripción maestros conjuntamente (es decir, SOX2, KLF4 y MYC) permitiendo la generación de iPSC solo con OCT4, representa otra etapa principal hacia la reprogramación en última instancia solo con moléculas pequeñas, y demostró y reforzó adicionalmente el enfoque químico para los iPSC.

En tercer lugar, esto demostró que una única condición génica tiene también una implicación significativa para la tecnología de citoblastos pluripotentes inducido por proteínas (piPSC). Un desafío práctico para la tecnología de piPSC es una producción fiable y a gran escala de las cuatro proteínas de reprogramación transducibles, cada una de las cuales se comporta de forma diferente en la fabricación (por ejemplo, su expresión, plegado, estabilidad, etc.). Claramente, combinar este cóctel de moléculas pequeñas con una única proteína transducible significaría simplificar significativamente la tecnología de piPSC y facilitaría sus aplicaciones.

En cuarto lugar, los inventores identificaron una nueva molécula pequeña, PS48, con un nuevo mecanismo/diana para potenciar la reprogramación. PS48 es un activador alostérico de molécula pequeña de PDK1 (H indie, V. et al., *Nat Chem Biol* 4:758-764 (2009)). Un mecanismo mediante el cual PS48 potencia la reprogramación parece ser facilitar la reprogramación metabólica de la oxidación mitocondrial utilizada principalmente por células somáticas adultas para la glucólisis utilizada principalmente por ESC (que se conoce también como el efecto Warbur) (Manning, B. D. y Cantley, *Cell* 129:1261-1274 (2007); Kondoh, H. et al., *Antioxid Redox Signal* 9:293-299 (2007); Heiden, M. G. V. et al., *Science* 324:1029-1033 (2009)). Dicho uso diferencial del metabolismo glucolítico sobre la respiración mitocondrial por los citoblastos pluripotentes favorecería la pluripotencia promoviendo la proliferación/transición del ciclo celular con menos estrés oxidativo. Para las células muy proliferantes, la fosforilación oxidativa no sería capaz de cumplir la demanda de proporcionar precursores macromoleculares para la replicación celular, sino que genera también una cantidad significativa de especies de oxígeno reactivas en las mitocondrias que podrían inducir daños oxidativos excesivos. Por otra parte, el metabolismo glucolítico generaría más eficazmente precursores macromoleculares, tales como intermedios glucolíticos para aminoácidos no esenciales y acetil-CoA para ácidos grasos, a la vez que proporciona suficientes energías para satisfacer las necesidades de las células proliferantes (Kondoh, H. et al., *Antioxid Redox Signal* 9:293-299 (2007); Heiden, M. G. V. et al., *Science* 324:1029-1033 (2009)). De manera interesante, la condición hipóxica y la activación de su efector HIF-1 α no solo se han vinculado estrechamente con el estímulo del metabolismo glucolíticos, sino que también mostró potenciar la reprogramación de ratones y seres humanos (Yoshida, Y. et al., *Cell Stem Cell* 5:237-241 (2009)). Desde el punto de vista mecanicista, las rutas de señalización del factor de crecimiento, la condición hipóxica/HIF-1 α y la reprogramación del factor Myc parecen regular los aspectos complementarios del metabolismo celular, incluyendo la regulación en exceso de los transportadores de glucosa y las enzimas metabólicas de la

glucolisis, tales como GLUT1, HK2 y PFK1 (Gordan, J. D. et al., Cancer Cell 12:108-113 (2007); DeBerardinis, R. J. et al., Cell Metabolism 7:11-20 (2008)). Esos estudios sugieren que un mecanismo potencial conservado de Myc, la condición hipóxica/HIF-1 α , y la activación de la ruta de los factores de crecimiento/Akt en la potenciación de la reprogramación convergen en sus papeles esenciales en la regulación del metabolismo glucolítico. Respaldo esta noción, los inventores descubrieron que el tratamiento con PS48 activó posteriormente Akt/PKB (Figura 11a), y reguló en exceso la expresión de algunos genes glucolíticos clave (Figura 11d), facilitando el cambio metabólico hacia la glucolisis (Figura 11c). A la inversa, los inventores descubrieron que la inactivación de la actividad de PDK1 mediante UCN-01 (un inhibidor de PDK1) o la inhibición de la glucolisis mediante la 2-desoxi-D-glucosa (un inhibidor de la glucolisis) no solo atenuó la glucolisis (Figura 11c) sino que también bloqueó el proceso de la reprogramación (Figura 11b). Además, algunas moléculas pequeñas conocidas que se han usado ampliamente para modular la respiración mitocondrial (2,4-dinitrofenol), el metabolismo glucolítico (fructosa 2,6-bisfosfato y oxalato) o, más específicamente, la activación de la ruta HIF (N-oxaloilglicina y Quercetina) mostraron también efectos consistentes correspondientes sobre la reprogramación: es decir, los compuestos que facilitan el metabolismo glucolítico potencian la reprogramación (tales como 2,4-dinitrofenol y N-oxaloilglicina), aunque los compuestos que bloquean el metabolismo glucolítico inhiben la reprogramación (tales como oxalato) (Figura 11e) (Hewitson, K. S. y Schofield, C. J., Drug Discov Today 9:704-711 (2004); Pelicano, H. et al., Oncogene 25:4633-4646 (2006)). En conclusión, estos resultados indicaron que un cambio metabólico a una glucolisis anaerobia es crítica y facilita la reprogramación de las células somáticas a citoblastos pluripotentes.

Finalmente, este nuevo y poderoso cóctel de moléculas pequeñas para la reprogramación validó la optimización química por etapas y la estrategia de selección presentada aquí como enfoque productivo hacia los citoblastos pluripotentes inducidos por sustancias puramente químicas en última instancia. Además, los inventores descubrieron que diferentes moléculas pequeñas modulando el mismo mecanismo diana podrían tener diferentes efectos significativos sobre la reprogramación en un contexto diferente, ilustrado por una mejora en las actividades de reprogramación de A-83-01 y NaB en queratinocitos humanos, lo que sugiere la importancia de la optimización y el tratamiento "individualizados" con diferentes regímenes para un contexto de reprogramación específica.

Métodos

Cultivo celular

Queratinocitos epidérmicos humanos normales (Lonza) se mantuvieron en medio de cultivo de queratinocitos (KCM, Lonza). células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, Millipore) se mantuvieron en medio completo EndoGRO-VEGF (HCM, CHEMICON). Los ESC e hiPSC humanos se cultivaron en células alimentadoras MEF en medio de cultivo ESC humano convencional (hESCM: DMEM/F12, sustitución del 15% de suero desactivado, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptomina, β -mercaptoetanol 0,1 mM y 10 ng/ml de bFGF). Todos los productos de cultivos celulares eran de Invitrogen/Gibco BRL a excepción de cuando se mencionan.

Producción de lentivirus

Se produjeron sobrenadantes de lentivirus y se recogieron como se ha descrito anteriormente (Yu, J. et al., Science 318:1917-1920 (2007)). Los plásmidos utilizados para la producción de lentivirus incluyen pSin-EF2-Puro-hOCT4, pSin2-EF2-Puro- hSOX2, pLove-mKlf4, pLove-mMyc, el plásmido psPAX2 empaquetado y el plásmido pMD2.G de codificación de la envoltura (Yu, J. et al., Science 318:1917-1920 (2007) and Li, W. et al., Stem Cells 27:2992-3000 (2009)).

Reprogramación de los NHEK

Se cultivaron los NHEK en una placa de cultivo de tejido de 100 mm y se transdujeron 3 veces (3-4 horas de cada transducción) con sobrenadantes de lentivirus producidos recientemente. Se sembraron 1.000.00 de NHEK transducidos sobre las células alimentadoras CF1 MEF inactivadas irradiadas con rayos x en una placa de 100 mm y se cultivaron en KCM y se trataron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM (Stemgent) y A-83-01 0,5 μ M (Stemgent) durante 2 semanas, seguido por el cambio de la mitad del volumen del medio para los hESCM y suplementación con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM y A-83-01 0,5 μ M durante otras 2 semanas. A continuación, los medios de cultivo celular se cambiaron para los hESCM y se suplementaron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M (Stemgent) durante cuatro semanas adicionales. Los mismos queratinocitos infectados con OCT4 cultivados en medio sin sustancias químicas se usaron como control. El cultivo se dividió mediante Accutase (Millipore) y se trató con Tiazovivina 1 μ M (Stemgent) en el primer día tras la división. Las colonias de iPSC que dieron un resultado positivo en la tinción con el anticuerpo de ratón dirigido contra TRA-1-81 humano conjugado con Alexa Fluor 555 (BD Pharmingen) se replicaron para la expansión en células alimentadoras en hESCM y se cultivaron de forma rutinaria.

Reprogramación de HUVEC

Se cultivaron las HUVEC en una placa de cultivo de tejido de 100 mm y se transdujeron 2 veces (4-6 horas cada transducción) con sobrenadantes de lentivirus producidos de forma reciente. 200.000 HUVEC transducidas se

sembraron sobre una placa de 100 mm revestida con gelatina, se cultivaron en HCM, y se trataron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM y A-83-01 0,5 μ M durante 2 semanas, seguido por el cambio de la mitad del volumen del medio para los hESCM y suplementación con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM y A-83-01 0,5 μ M durante otras 2 semanas. A continuación, los medios de cultivo celular se cambiaron para los hESCM y se suplementaron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M durante 1-2 semanas más. Las colonias de iPSC que dieron un resultado positivo en la tinción con el anticuerpo de ratón dirigido contra TRA-1-81 humano conjugado con Alexa Fluor 555 se replicaron para la expansión en células alimentadores en hESCM y se cultivaron de forma rutinaria. El cultivo se dividió mediante Accutase y se trató con Tiazovivina 1 μ M en el primer día tras la división.

10 Reprogramación de HUVEC utilizando diversos compuestos moduladores del metabolismo

Se cultivaron HUVEC en una placa de cultivo de tejido de 100 mm y se transdujeron 2 veces (4-6 horas cada transducción) con sobrenadantes de lentivirus producidos de forma reciente que contenían cuatro factores de reprogramación (Klf, Sox, Myc, y Oct). Aproximadamente 20.000 HUVEC transducidas se sembraron sobre una placa de 6 pocillos revestida con gelatina, se cultivaron en HCM y se trataron con un compuesto modulador del metabolismo durante 2 semanas. A continuación, los medios de cultivo celulares se cambiaron para hESCM y se suplementaron con un compuesto modulador del metabolismo durante 1-2 semanas más. Se contaron el número de colonias de iPSC con un resultado positivo para la tinción mediante anticuerpo de ratón dirigido contra TRA-1-81 humano conjugado con Alexa Fluor 555. Se sometieron a ensayo diversos compuestos moduladores del metabolismo, incluyendo Fructosa 2,6-bisfosfato (F2,6P) 10 mM, Fructosa 6-fosfato (F6P) 10 mM, 6-aminonicotinamida (6-AN) 10 mM, oxalato (OA) 10 mM, 2,4-dinitrofenol (DNP) 1 μ M, N-oxaloilglicina (NOG) 1 μ M, Quercetina (QC) 1 μ M, ácido 2-hidroxi-glutámico (2-HA) 10 μ M, o ácido nicotínico (NA) 10 μ M.

Diferenciación *in vitro*

La diferenciación *in vitro* de hiPSC se llevó a cabo mediante el método del cuerpo embrioideo normalizado (EB). En resumen, los hiPSC se disociaron mediante Accutase (Millipore), se cultivaron en una placa de 6 pocillos de unión ultrabaja durante ocho días y a continuación se transfirieron a una placa de 6 pocillos revestida con Matrigel en medio de diferenciación. Se fijaron las células para el análisis inmunocitoquímico o se recogieron para los ensayos de RT-PCR ocho días después. Medio de diferenciación: DMEM/F12, 10% de FBS, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptomicina, β -mercaptoetanol 0,1 mM.

Tinción de fosfatasa alcalina y ensayo de inmunocitoquímica

Se llevó a cabo la tinción con fosfatasa alcalina de acuerdo con el protocolo del fabricante usando el Kit de detección de la fosfatasa alcalina (Stemgent). Se llevó a cabo el ensayo de inmunocitoquímica normalizado como se ha informado anteriormente (Li, W. et al., Stem Cells 27:2992-3000 (2009)). En la Tabla 2 se pueden encontrar los anticuerpos primarios utilizados. Los anticuerpos secundarios fueron IgG de mono dirigida contra IgG de ratón o IgG de mono dirigida contra IgG de conejo conjugadas con Alexa Fluor 488 (1:1000) (Invitrogen). Se visualizaron los núcleos mediante tinción DAPI (Sigma-Aldrich). Se capturaron las imágenes utilizando un microscopio Eclipse TE2000-U de Nikon.

Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y qRT-PCR

Para el análisis mediante RT-PCR y qRT-PCR, se extrajo el ARN total de los iPSC humanos utilizando el RNeasy Plus Mini Kit junto con QIAshredder (Qiagen). Se llevó a cabo la transcripción inversa de la primera hebra con 2 μ g de ARN utilizando el Kit de síntesis del ADNc iScript™ (BioRad). Se analizó la expresión de los marcadores de pluripotencia mediante RT-PCR utilizando Platinum PCR SuperMix (Invitrogen). Se analizó la expresión de los marcadores específicos de linaje tras la diferenciación mediante qRT-PCR utilizando iQ SYBR Green Supermix (BioRad). En la Tabla 1 se pueden encontrar los cebadores.

Análisis de micromatriz

Se utilizó el Ref-8_v3 expression Beadchip humano (Illumina, CA, EE.UU.) para las hibridaciones de la micromatriz para examinar la expresión génica global de las células NHEK, hiPSC y hES. Se sintetizó el ARNc marcado con Biotina-16-UTP a partir de 500 ng de ARN total con el kit de amplificación del ARN TotalPrep de Illumina (Ambion AMIL1791, Foster City, CA, EE.UU.). La mezcla de hibridación que contenía 750 ng de ARNc amplificado marcado se preparó de acuerdo con el manual del sistema Illumina BeadStation 500x (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) utilizando los reactivos suministrados y la solución de tinción Streptavidin-Cy3 de GE Healthcare. La hibridación con el Illumina Human Ref-8_v3 expression Beadchip se realizó durante 18 h a 55 °C en un BeadChip Hyb Wheel. La matriz se escaneó utilizando el Illumina BeadArray Reader. Todas las muestras se prepararon en dos réplicas biológicas. El procesamiento y el análisis de los datos de la micromatriz se llevaron a cabo con el programa informático Illumina BeadStudio. El valor del fondo se restó de los datos, que se normalizaron usando la opción de rango invariante.

Secuenciación genómica con bisulfato

Se aislaron ADN genómicos utilizando el Kit de aislamiento del ADN no orgánico (Millipore) y a continuación se trataron con el Kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research Corp., Orange, CA). Los ADN tratados se usaron a continuación como moldes para amplificar las secuencias de interés. En la Tabla 1 se indican los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos promotores OCT4 y NANOG. Los fragmentos resultantes se clonaron utilizando el Kit de clonación TOPO TA para secuenciación (Invitrogen) y se secuenciaron.

Genotipación de hiPSC

Se llevó a cabo la genotipación de líneas hiPSC utilizando la RT-PCR del ADN genómico con cebadores específicos (Tabla 1; Yu, J. et al., Science 318:1917-1920 (2007) and Li, W. et al., Stem Cells 27:2992-3000 (2009)).

Formación del teratoma

Se recogieron las líneas de hiPSC utilizando Tripsina-EDTA al 0,05%. Se inyectaron cinco millones de células bajo la cápsula renal de ratones *SCID* (n=3). Después de 4-6 semanas, se recogieron los teratomas bien desarrollados, se fijaron y, a continuación, se analizaron histológicamente en una instalación de núcleos histológicos TSRI.

Tabla 1. Cebadores utilizados

Gen	Directo	Inverso
Para RT-PCR		
Endo-OCT4	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTTCCTCCAACC
Endo-SOX2	CAAAAATGGCCATGCAGGTT	AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT
Endo-NANOG	TTTGGAAGCTGCTGGGGAAG	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA
Endo-KLF4	ACGATCGTGGCCCCGGAAAAGGACC	GATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC
Endo-cMYC	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG
REX1	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
UTF1	CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG	CGCGCTGCCCAGAATGAAGCCAC
TDGF2	CTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTGC	GCCACGAGGTGCTCATCCATCACAAGG
FGF4	CTACAACGCCTACGAGTCCTACA	GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG
Exo-OCT4	TGTCTCCGTCACCACTCTGG	ATGCATGCGGATCCTTCG
PAX6	TGTCCAACGGATGTGAGT	TTTCCAAGCAAAGATGGAC
TUBULINA βII	CAACAGCACGGCCATCCAGG	CTTGGGGCCCTGGGCCTCCGA
FOXF1	AAAGGAGCCACGAAGCAAGC	AGGCTGAAGCGAAGGAAGAGG
HAND1	TCCCTTTTCCGCTTGCTCTC	CATCGCCTACCTGATGGACG
AFP	AGCAGCTTGGTGGTGGATGA	CCTGAGCTTGGCACAGATCCT
GATA6	TGTGCGTTCATGGAGAAGATCA	TTTGATAAGAGACCTCATGAACCGACT
GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
Para la secuenciación con bisulfato		
OCT4-1	TTAGGAAAATGGGTAGTAGGGATTT	TACCCAAAAACAAATAAATTATAAACCT
OCT4-2	GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG	CCTAAACTCCCCTTCAAAATCTATT
NANOG	GAGTTAAAGAGTTTTGTTTTTAAAAATTAT	TCCCAAATCTAATAATTTATCATATCTTTC
Para la genotipación		
OCT4-Int	CAGTGCCCCGAAACCCACAC	AGAGGAACTGCTTCCTTCACGACA
SOX2-Int	TACCTCTTCCTCCCACTCCA	AGAGGAACTGCTTCCTTCACGACA
KLF4-Int	CACCTTGCCCTACACATGAAGAGG	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGA

Tabla 2. Anticuerpos primarios aplicados

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Anti-OCT4 (1)	Ratón	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-OCT4 (2)	Conejo	1:500	Stemgent
Anti-SOX2	Conejo	1:1000	Chemicon
Anti-NANOG	Conejo	1:500	Abcam
Anti-SSEA4	Ratón	1:500	Stemgent
Anti-TRA-1-81	Ratón	1:500	Stemgent
TUJ1 (anti-TUBULINA β III)	Ratón	1:3000	Covance Research Products
Anti-SMA	Ratón	1:500	Sigma
Anti-AFP	Ratón	1:500	Sigma

Tabla 3. Sumario de los experimentos de reprogramación

Células donantes	Factores de inducción	Sustancias químicas	Experimentos	Colonias positivas para TRA-1-81
	OCT4+KLF4+SOX2+MYC	DMSO	n.º 1	17
			n.º 2	20
			n.º 3	23
		A83+PD	n.º 1	72
			n.º 2	104
			n.º 3	91
NHEK (número de lote: 0000087940)	OCT4+KLF4+SOX2	DMSO	n.º 1	2
			n.º 2	3
			n.º 3	8
		A83+PD	n.º 1	26
			n.º 2	35
			n.º 3	44
	OCT4+KLF4	A83+PD	n.º 1	1
			n.º 2	2
			n.º 3	0
		A83+PS48+PD	n.º 1	15
			n.º 2	18
			n.º 3	5
		A83+VPA+PD	n.º 1	6
			n.º 2	0
			n.º 3	3
		A83+NaB+PD	n.º 1	20
			n.º 2	17
			n.º 3	18
		A83+PS48+NaB+PD	n.º 1	21

Células donantes	Factores de inducción	Sustancias químicas	Experimentos	Colonias positivas para TRA-1-81
	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 2	30
			n.º 3	27
			n.º 1	4
			n.º 2	0
			n.º 3	3
NHEK (número de lote: 2F0661)	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 1	2
			n.º 2	3
			n.º 3	0
AHEK	OCT4	A83+PS48+NaB+PD+Par+CHIR	n.º 1	3
			n.º 2	2
HUVEC	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 1	4
			n.º 2	7
			n.º 3	4
HUVEC	OCT4	A83+PS48+NaB+PD+Par+CHIR	n.º 1	23
			n.º 2	17
AFDC	OCT4	A83+PS48+NaB+PD+Par+CHIR	n.º 1	5
			n.º 2	11

NHEK, Queratinocitos epidérmicos humanos neonatales; HUVEC, Células endoteliales de la vena umbilical humana; AHEK, Queratinocitos epidérmicos humanos adultos; AFDC, Células derivadas de fluido amniótico. Concentración química utilizada: PD, PD0325901 0,5 µM; A83, A-83-01 0,5 µM; PS48, PS48 5 µM; VPA, Ácido valproico 0,5 mM; NaB, Butirato de sodio 0,25 mM; Par, Parnato 2 µM; CHIR, CHIR99021 3 µM. Para la reprogramación inducida por cuatro factores o tres factores, se sembraron NHEK a una densidad de 100.000 células transducidas por placa de 10 cm y se contaron las colonias positivas cuatro semanas después; Para la reprogramación inducida por dos factores, se sembraron NHEK a una densidad de 100.000 células transducidas por placa de 10 cm y se contaron las colonias positivas seis semanas después; y para la reprogramación inducida por un factor, se sembraron NHEK y AHEK a una densidad de 1.000.000 de células transducidas por placa de 10 cm y se contaron las colonias positivas ocho semanas después. Se sembraron HUVEC y AFDC a una densidad de 200.000 células transducidas por placa de 10 cm y se contaron las colonias positivas seis semanas después.

Tabla 4. Caracterización de las líneas de células iPSC humanas establecidas

clon hiPSC	Factores de inducción	Fuente celular	Expresión del marcador	Ensayo RT-PCR	Diferenciación de EB	Ensayo del teratoma
hiPSC-OK#1	OCT4+KLF4	NHEK	√	√	√	√
hiPSC-OK#3			√	√	√	
hiPSC-O#1			√	√	√	√
hiPSC-O#3			√	√	√	
hiPSC-O#4	OCT4	NHEK	√			
hiPSC-O#5			√			
2 líneas más						
hiPSC-O#21			√	√	√	√
hiPSC-O#22			√			
hiPSC-O#26	OCT4	HUVEC	√	√	√	

clon hiPSC	Factores de inducción	Fuente celular	Expresión del marcador	Ensayo RT-PCR	Diferenciación de EB	Ensayo del teratoma
hiPSC-O#31			√	√	√	√
7 líneas más						
hiPSC-O#52	OCT4	AHEK	√		√	
hiPSC-O#57			√			
hiPSC-O#63	OCT4	AFDC	√		√	
hiPSC-O#65			√			

Aquellas líneas de células caracterizadas se expandieron a largo plazo durante 20 pases en condiciones de cultivo de hESC convencionales y se caracterizaron adicionalmente para determinar la expresión del marcador y la pluripotencia; mientras que otras líneas de células establecidas se almacenaron en el pase 5 o 6. Las entradas en blanco indican "no determinado".

Tabla 5. Análisis de la huella de ADN sobre iPSC inducidas por OCT4 y líneas parentales celulares

Loci genómicos	NHEK (combinados)	hiPSC-O#1	HUVEC	hiPSC-O#21
Amelogenina	X, S	X, S	X	X
vWA	11, 15, 17, 18, 19	15, 18	15; 16	15; 16
D8S1179	10, 13, 16	13,	10; 13	10; 13
TPOX	8,9,11,12	8	8	8
FGA	19,22,23,24	19,22	24; 27	24; 27
D3S1358	13,14,15,17	17	14; 16	14; 16
THO1	6, 7, 9, 9,3	7, 9	6	6
D21S11	24.2, 29, 30.2, 35	24,2, 29	28; 30,2	28; 30,2
D18S51	13, 14, 16, 17, 18, 19	13, 17	13;18	13; 18
Penta E	5,8,13,14,19	13, 19	12	12
D5S818	8,11,12,13	11, 13	12; 13	12; 13
D13S317	8,9,11,12,13	9, 12	11; 14	11; 14
D7S820	8,9,10,11	9, 10	11	11
D16S539	9, 10, 11, 12, 13	9, 13	9; 11	9; 11
CSF1PO	10,11,12	11, 12	11; 12	11; 12
Penta D	2,2, 10, 12	10	12; 13	12; 13

Se investigaron los loci de ADN de 15 repeticiones en tándem corto polimórficas (STR) y el marcador de cromosomas sexuales de la amelogenina.

Ejemplo 2: Reprogramación de células endoteliales de la vena umbilical humana

Los inventores probaron los efectos de la combinación de un inhibidor de HDAC, un activador de PDK1, un inhibidor del receptor de TGFβ, y un inhibidor de MEK en HUVEC que se transdujeron lentivíricamente solo con *Oct4* para determinar sus efectos sobre la cinética y la eficacia de la reprogramación.

Métodos

Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, Millipore) se mantuvieron en medio completo EndoGRO-VEGF (HCM, CHEMICON). Se cultivaron HUVEC en una placa de cultivo de tejido de 100 mm y se transdujeron 2 veces (4-6 horas/tiempo) con sobrenadantes de lentivirus producidos de forma reciente. A continuación se sembraron 200.000 HUVEC transducidas sobre una placa de 100 mm revestida de gelatina y se cultivaron en HCM y se trataron con el activador de PDK1 PS48 (5 μM), el inhibidor de HDAC NaB (0,25 mM) y el inhibidor del receptor

de TGF β A-83-01(0,5 μ M) durante 2 semanas, seguido por el cambio de la mitad del volumen de los medios para hESCM y la suplementación con el activador de PDK1 PS48 (5 μ M), el inhibidor de HDAC NaB (0,25 mM) y el inhibidor del receptor de TGF β A-83-01(0,5 μ M) durante otras 2 semanas. A continuación, los medios de cultivo celular se cambiaron para los hESCM y se suplementaron con el activador de PDK1, PS48 (5 μ M), el inhibidor de HDAC, NaB (0,25 mM), y el inhibidor del receptor de TGF β , A-83-01(0,5 μ M) y el inhibidor de MEK, PD0325901 (0,5 μ M) durante 2 semanas más. Las colonias de iPSC con un resultado positivo en la tinción con anticuerpo de ratón dirigido contra TRA-1-81 humano conjugado con Alexa Fluor 555 (BD Pharmingen). hESCM: DMEM/F12, sustitución del 15% de suero desactivado, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptomicina, β -mercaptoetanol 0,1 mM y 10 ng/ml de bFGF.

Resultados

Para las HUVEC transducidas solo con *Oct4*, los inventores probaron los efectos de la combinación de un inhibidor de HDAC, un activador de PDK1, un inhibidor del receptor de TGF β , un inhibidor de MEK sobre la eficacia de la reprogramación. Los inventores descubrieron que el tratamiento con la combinación de PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M dio como resultado una eficacia de reprogramación de $\square$ 0,0015%.

Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar la invención pero no para limitar su alcance. Otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para una persona normalmente experta en la materia y están abarcadas por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Zhu, Saiyong Ding, Sheng The Scripps Research Institute

<120> Células en reprogramación

<130> 14740-40-1PC

<140> WO PCT/US11/30598

<141> 30/03/2011

<150> US 61/319.494

<151> 31/03/2010

<150> US 61/393.724

<151> 15/10/2010

<150> US 61/406.392

<151> 26/10/2010

<160> 57

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica del transportador que potencia la administración sintética de 5-25 argininas contiguas

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)...(25)

<223> Arg puede estar presente o ausente

<400> 1

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
1				5					10							15	
Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg								
				20					25								

- 5 <210> 2
<211> 61
<212> PRT
<213> Virus del herpes simple
- 10 <220>
<223> Secuencia del polipéptido VP22 de la proteína estructural que potencia el transporte a través de las membranas
<400> 2
- ```

 Gly Ser Pro Pro Thr Ala Pro Thr Arg Ser Lys Thr Pro Ala Gln Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Lys Leu His Phe Ser Thr Ala Pro Pro Asn Pro Asp Ala
 20 25 30
 Pro Trp Thr Pro Arg Val Ala Gly Phe Asn Lys Arg Val Phe Arg Phe
 35 40 45
 Ser Pro Gln Thr Ala Arg Arg Ala Thr Thr Thr Arg Ile

 50 55 60

```
- 15 <210> 3  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Secuencia del polipéptido señal sintético FGF (kFGF) de Kaposi que potencia el transporte a través de las membranas  
<400> 3
- ```

      Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu
      1          5          10          15
      Ala Leu Leu Ala Pro Gly Gly Glu Phe Ala
      20          25
  
```
- 25
- 30 <210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Secuencia del polipéptido del dominio 4 (PTD4) de transducción de la proteína sintética que potencia el transporte a través de las membranas
<400> 4
- ```

 Ala Gly Ser Gly Gly Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Phe Ala
 20

```
- 40 <210> 5  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> Secuencia del polipéptido sintético penetratina que potencia el transporte a través de las membranas  
<400> 5

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Gly Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15  
 <210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana 1  
 <220>  
 <223> Secuencia del polipéptido TAT de la proteína activadora de la transcripción de VIH-1 que potencia el  
 10 transporte a través de membranas  
 <400> 6  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10  
 <210> 7  
 15 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Secuencia del polipéptido sintético M918 que potencia el transporte a través de membranas  
 <400> 7  
 Met Val Thr Val Leu Phe Arg Arg Leu Arg Ile Arg Arg Ala Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Arg Val Arg Val  
 20  
 25 <210> 8 <211> 21 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> secuencia del polipéptido sintético transportan 10 que potencia el transporte a través de las membranas  
 <400> 8  
 Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Gly Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Lys Lys Ile Leu  
 20  
 35 <210> 9  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia del péptido sintético 8-arginina que potencia el transporte a través de membranas  
 <400> 9  
 45 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 10  
 <211> 11  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia del péptido sintético con 11 argininas contiguas que potencia el transporte a través de membranas  
 <400> 10  
  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5 10  
  
 10 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia del péptido sintético que comprende 11 argininas contiguas que potencian el transporte a través de membranas  
 <400> 11  
  
 20 Glu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Arg Arg  
 20  
  
 25 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético Endo-OCT4  
 <400> 12  
 agtttggtgcc agggttttg 20  
  
 35 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético Endo-OCT4  
 <400> 13  
 acttcacctt ccctccaacc 20  
  
 45 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético Endo-SOX2  
 <400> 14  
 caaaaatggc catgcaggtt 20  
  
 55 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético Endo-SOX2  
 5     <400> 15  
       agttgggatc gaacaaaagc tatt 24  
  
 <210> 16  
 <211> 20  
 10    <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo de la RTPCR sintético Endo-NANOG  
 15     <400> 16  
       tttgaagct gctgggaag 20  
  
 <210> 17  
 <211> 20  
 20    <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de la RTPCR sintético Endo-NANOG  
 25     <400> 17  
       gatgggagga ggggagagga 20  
  
 <210> 18  
 <211> 25  
 30    <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético Endo-KLF4  
 35     <400> 18  
       acgatcgtgg ccccgaaaa ggacc 25  
 40     <210> 19  
       <211> 27  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 45     <220>  
       <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético Endo-KLF4  
  
 <400> 19  
 50     gattgtagtg cttctggct gggctcc 27  
  
 <210> 20  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 55    <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético Endo-cMYC  
 60     <400> 20  
       gcgtcctggg aaggagatc cggagc 26  
  
 <210> 21  
 <211> 26  
 65    <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético Endo-cMYC

5 <400> 21  
ttgaggggca tcgtcgcggg aggctg 26

<210> 22  
<211> 24  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintético REX1

15 <400> 22  
cagatcctaa acagctcgca gaat 24

<210> 23  
<211> 23  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético REX1

25 <400> 23  
gcgtacgcaa attaaagtcc aga 23

<210> 24  
<211> 24  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintético UTF1

<400> 24  
ccgtcgtga acaccgcct gctg 24

40 <210> 25  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético UTF1

<400> 25  
50 cgcgctgccc agaatgaagc ccac 24

<210> 26  
<211> 25  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintético TDGF2

60 <400> 26  
ctgctgcctg aatgggggaa cctgc 25

<210> 27  
<211> 27  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético TDGF2

5     <400> 27  
       gccacgaggt gctcatccat cacaagg 27

10    <210> 28  
       <211> 23  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

15    <220>  
       <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético FGF4

      <400> 28  
       ctacaacgcc tacgagtcct aca 23

20    <210> 29  
       <211> 24  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

25    <220>  
       <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético FGF4

      <400> 29  
       gttgacaccag aaaagtcaga gttg 24

30    <210> 30  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

35    <220>  
       <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético Exo-OCT4

      <400> 30  
       tgtctccgtc accactctgg 20

40    <210> 31  
       <211> 18  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

45    <220>  
       <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético Exo-OCT4

      <400> 31  
       tgcacgcgg atccttcg 18

50    <210> 32  
       <211> 18  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

55    <220>  
       <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético PAX6

60    <400> 32  
       tgtccaacgg atgtgagt 18

65    <210> 33  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético PAX6

5 <400> 33  
ttcccaagc aaagatggac 20

<210> 34  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador directo de la RT-PCR sintético betaIII TUBULIN

15 <400> 34  
caacagcacg gccatccagg 20

<210> 35  
<211> 21  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético de la TUBILINA betaIII

25 <400> 35  
cttggggccc tggcctccg a 21

30 <210> 36  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintético FOXF1

<400> 36  
aaaggagcca cgaagcaagc 20

40 <210> 37  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético FOXF1

<400> 37  
aggctgaagc gaaggaagag g 21

50 <210> 38  
<211> 20  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintético HAND1

60 <400> 38  
tccttttcc gcttgctctc 20

<210> 39  
<211> 20  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético HAND1  
 5      <400> 39  
         catcgctac ctgatggacg 20  
  
 <210> 40  
 <211> 20  
 10      <212> ADN  
         <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético AFP  
 15      <400> 40  
         agcagcttgg tggatgatga 20  
  
 <210> 41  
 <211> 21  
 20      <212> ADN  
         <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético AFP  
 25      <400> 41  
         cctgagcttg gcacagatcc t 21  
  
 <210> 42  
 <211> 22  
 30      <212> ADN  
         <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético GATA6  
 35      <400> 42  
         tgtgcgttca tggagaagat ca 22  
 40      <210> 43  
         <211> 27  
         <212> ADN  
         <213> Secuencia artificial  
 45      <220>  
         <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético GATA6  
  
 <400> 43  
 50      ttgataaga gacctcatga accgact 27  
  
 <210> 44  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55      <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de la RT-PCR sintético GAPDH  
 60      <400> 44  
         gtggacctga cctgccgtct 20  
  
 <210> 45  
 <211> 20  
 65      <212> ADN  
         <213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> Cebador inverso de la RT-PCR sintético GAPDH  
 5      <400> 45  
          ggaggagtgg gtgtcgctgt 20  
          <210> 46  
          <211> 25  
 10      <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial  
          <220>  
          <223> cebador directo de secuenciación con bisulfito sintético OCT4-1  
 15      <400> 46  
          ttaggaaaat gggtagtagg gattt 25  
          <210> 47  
          <211> 30  
 20      <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial  
          <220>  
 25      <223> cebador inverso de secuenciación con bisulfito sintético OCT4-1  
          <400> 47  
          tacccaaaaa acaaataaat tataaaacct 30  
 30      <210> 48  
          <211> 27  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial  
 35      <220>  
          <223> cebador directo de secuenciación con bisulfito sintético OCT4-2  
          <400> 48  
          ggatgttatt aagatgaaga tagttgg 27  
 40      <210> 49  
          <211> 25  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial  
 45      <220>  
          <223> cebador inverso de secuenciación con bisulfito sintético OCT4-2  
          <400> 49  
 50      cctaaactcc cctcaaaat ctatt 25  
          <210> 50  
          <211> 30  
          <212> ADN  
 55      <213> Secuencia artificial  
          <220>  
          <223> Cebador directo de secuenciación con bisulfito sintético NANOG  
 60      <400> 50  
          gagttaaaga gtttgtttt taaaaattat 30  
          <210> 51  
          <211> 30  
 65      <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de secuenciación con bisulfito sintético NANOG

5      <400> 51  
 tcccaaactct aataatttat catactcttc 30

10      <210> 52  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15      <220>  
 <223> Cebador directo de genotipación sintético OCT4 Int

20      <400> 52  
 cagtgcccga aaccacac 19

25      <210> 53  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30      <220>  
 <223> Cebador inverso de genotipación sintético OCT4 Int

35      <400> 53  
 agaggaactg ctccttcac gaca 24

40      <210> 54  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45      <220>  
 <223> Cebador directo de genotipación sintético SOX2 Int

50      <400> 54  
 tacctcttc tccactcca 20

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

60      <220>  
 <223> Cebador inverso de genotipación sintético SOX2 Int

65      <400> 55  
 agaggaactg ctccttcac gaca 24

70      <210> 56  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75      <220>  
 <223> Cebador directo de genotipación sintético KLF4 Int

80      <400> 56  
 caccttgct tacacatgaa gagg 24

85      <210> 57  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de genotipación sintético KLF4 Int

5

<400> 57

cgtagaatcg agaccgagga ga 22

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para inducir una célula humana no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido, comprendiendo el método:

(I)

(a) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Oct4 o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; y

(b) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un receptor de TGF $\beta$  /inhibidor de ALK5 de molécula pequeña, un inhibidor de MEK de molécula pequeña, un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) de molécula pequeña, y un activador alostérico de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) de molécula pequeña en condiciones suficientes para inducir que la célula humana no pluripotente se convierta en un citoblasto pluripotente, induciendo de esta forma la célula humana no pluripotente en un citoblasto pluripotente inducido; o

(II)

(a) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Oct4 y un polipéptido Klf4 o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4 y un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf4; y

(b) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un receptor de TGF $\beta$  /inhibidor de ALK5 de molécula pequeña, un inhibidor de MEK de molécula pequeña, y un activador alostérico de quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítido 1 (PDK1) de molécula pequeña en condiciones suficientes para inducir que la célula humana no pluripotente se convierta en un citoblasto pluripotente, induciendo de esta forma la célula humana no pluripotente en un citoblasto pluripotente.

2. El método de reivindicación 1, en el que el activador alostérico de PDK1 de molécula pequeña es: ácido (Z)-5-(4-clorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS48"), ácido (Z)-5-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS08"), ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-fenilpropil)acético, ácido (Z)-5-(naftalen-2-il)-3-fenilpent-2-enoico ("12Z"), o ácido (Z)-5-(1H-Indol-3-il)-3-fenilpent-2-enoico ("13Z").

3. El método de la reivindicación 1 (II), que comprende además poner en contacto la célula no pluripotente con un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) de molécula pequeña.

4. El método de reivindicación 1, en el que:

a) el receptor de TGF $\beta$ /inhibidor de ALK5 de molécula pequeña es SB431542 o A-83-01;

b) el inhibidor de MEK de molécula pequeña es PD0325901; o

c) el inhibidor de HDAC de molécula pequeña es ácido valproico (VPA) o butirato de sodio (NaB).

5. El método de la reivindicación 1(I), que comprende además uno o más de:

(a) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Klf o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf;

(b) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Sox o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Sox; o

(c) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Myc o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Myc.

6. El método de la reivindicación 1 (II), que comprende además uno o más de:

(a) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Sox o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Sox; o

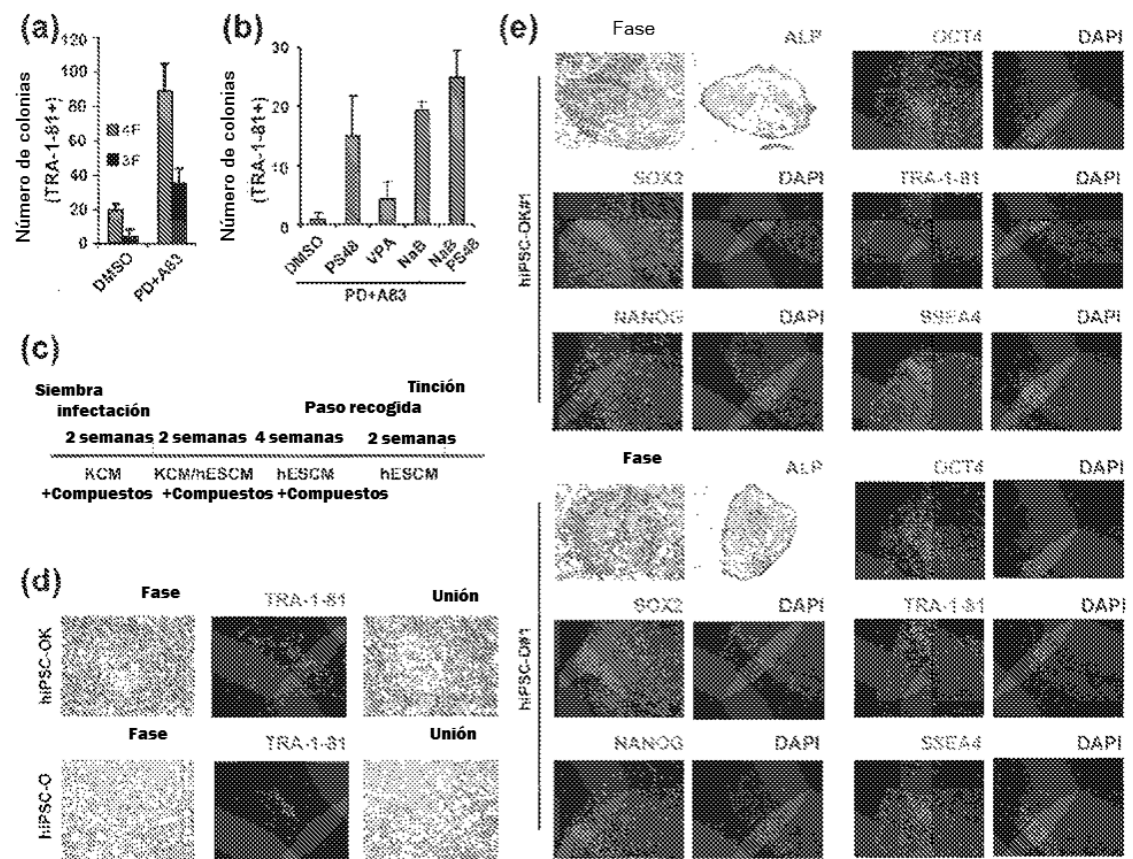
(b) poner en contacto la célula humana no pluripotente con un polipéptido Myc o introducir en la célula humana no pluripotente un polinucleótido que codifica un polipéptido Myc.

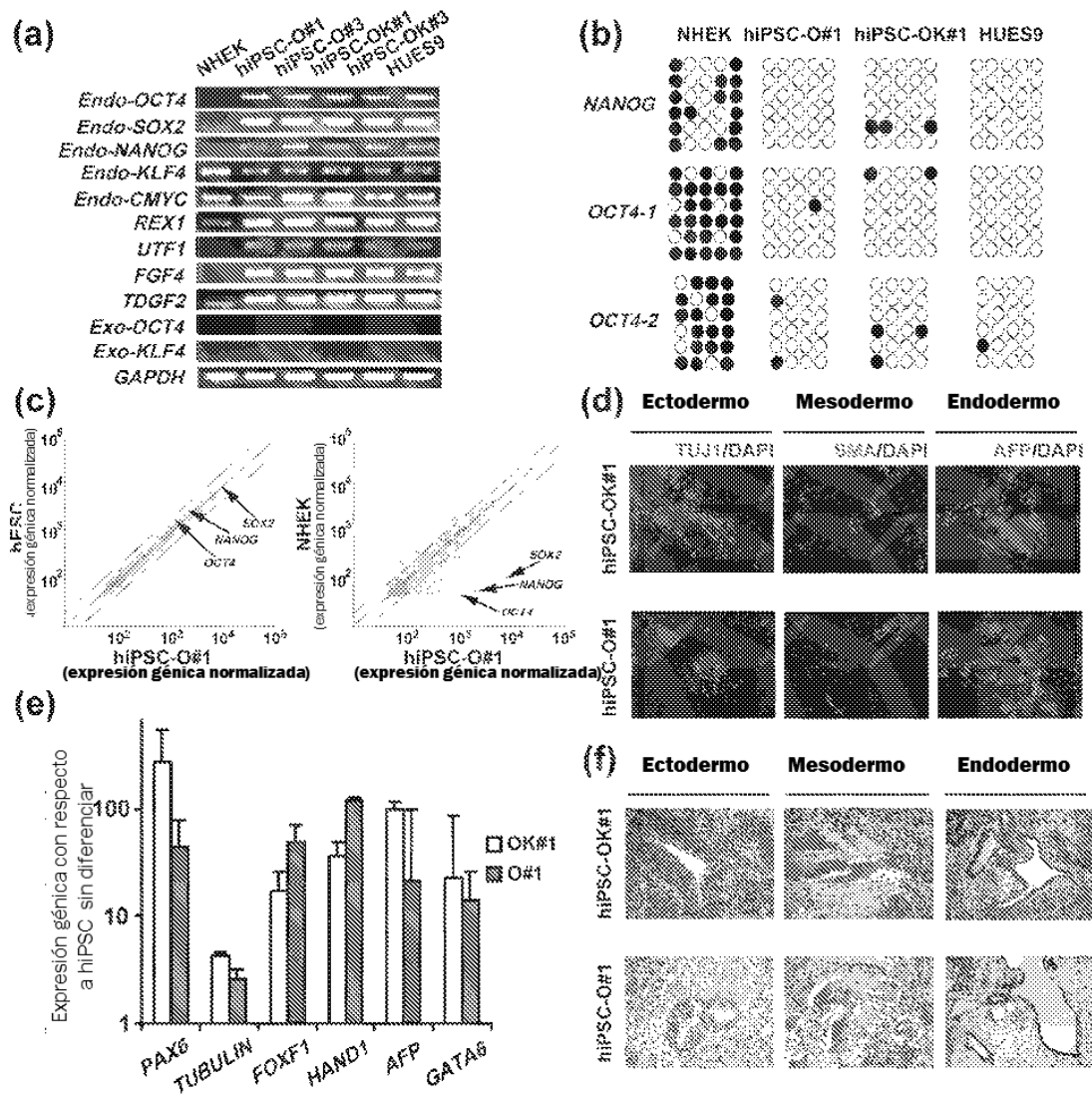
7. El método de reivindicación 1, en el que el polipéptido Oct4 puesto en contacto con la célula humana no pluripotente comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

8. El método de reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que uno o más del polipéptido Oct4, el polipéptido Klf, el polipéptido Sox, o el polipéptido Myc puesto en contacto con la célula humana no pluripotente comprende una secuencia de aminoácidos que potencia el transporte a través de las membranas celulares.

9. Una mezcla que comprende:

- (I) (a) células de mamífero, que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4 exógeno; (b) un activador de PDK1 de molécula pequeña; (c) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; (d) un inhibidor de MEK de molécula pequeña; y (e) un inhibidor de HDAC de molécula pequeña; o
- 5 (II) (a) células de mamífero; (b) un polipéptido Oct4 exógeno; (c) un activador de PDK1 de molécula pequeña alostérico; (d) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; (e) un inhibidor de MEK de molécula pequeña; y (f) un inhibidor de HDAC de molécula pequeña; o
- (III) (a) células de mamífero, que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4 exógeno y un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf4 exógeno; (b) un activador de PDK1 de molécula pequeña; (c) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; y (d) un inhibidor de MEK de molécula pequeña; o
- 10 (IV) (a) células de mamífero; (b) un polipéptido Oct4 exógeno y un polipéptido Klf4 exógeno; (c) un activador de PDK1 de molécula pequeña alostérico; (d) un receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña; y (e) un inhibidor de MEK de molécula pequeña.
10. La mezcla de la reivindicación 9(III) o la reivindicación 9(IV), en la que la mezcla comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) de molécula pequeña.
- 15 11. La mezcla de la reivindicación 9(III) o la reivindicación 9(IV) o la reivindicación 10, en la que:
- a) el receptor de TGFβ/inhibidor de ALK5 de molécula pequeña es SB431542 o A-83-01;
- 20 b) el inhibidor de MEK de molécula pequeña es PD0325901; o
- c) el inhibidor de HDAC de molécula pequeña es ácido valproico (VPA) o butirato de sodio (NaB).
12. La mezcla de la reivindicación 9(I) o la reivindicación 9(II), en la que la mezcla comprende además al menos un polipéptido exógeno seleccionado entre el grupo que consiste en: un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox; o en la que las células de mamífero en la mezcla comprenden además al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido exógeno seleccionado entre el grupo que consiste en: un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox.
- 25 13. La mezcla de la reivindicación 9(III) o la reivindicación 9(IV), en la que la mezcla comprende además al menos un polipéptido exógeno seleccionado entre el grupo que consiste en: un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox; o en la que las células de mamífero en la mezcla comprenden además un polinucleótido que codifica un polipéptido exógeno seleccionado entre el grupo que consiste en: un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox.
- 30 14. La mezcla de la reivindicación 9, en la que al menos un 99% de las células son células no pluripotentes.
- 35 15. La mezcla de la reivindicación 9, en la que las células son células humanas.
16. La mezcla de la reivindicación 9, en la que el activador de PDK1 de molécula pequeña alostérico es: ácido (Z)-5-(4-clorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS48"), ácido (Z)-5-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-fenilpent-2-enoico ("PS08"), ácido 2-(3-(4-clorofenil)-3-oxo-1-fenilpropiltio)acético, ácido (Z)-5-(naftalen-2-il)-3-fenilpent-2-enoico ("12Z"), o ácido (Z)-5-(1H-Indol-3-il)-3-fenilpent-2-enoico ("13Z").
- 40

*Fig. 1*



**Fig. 2**

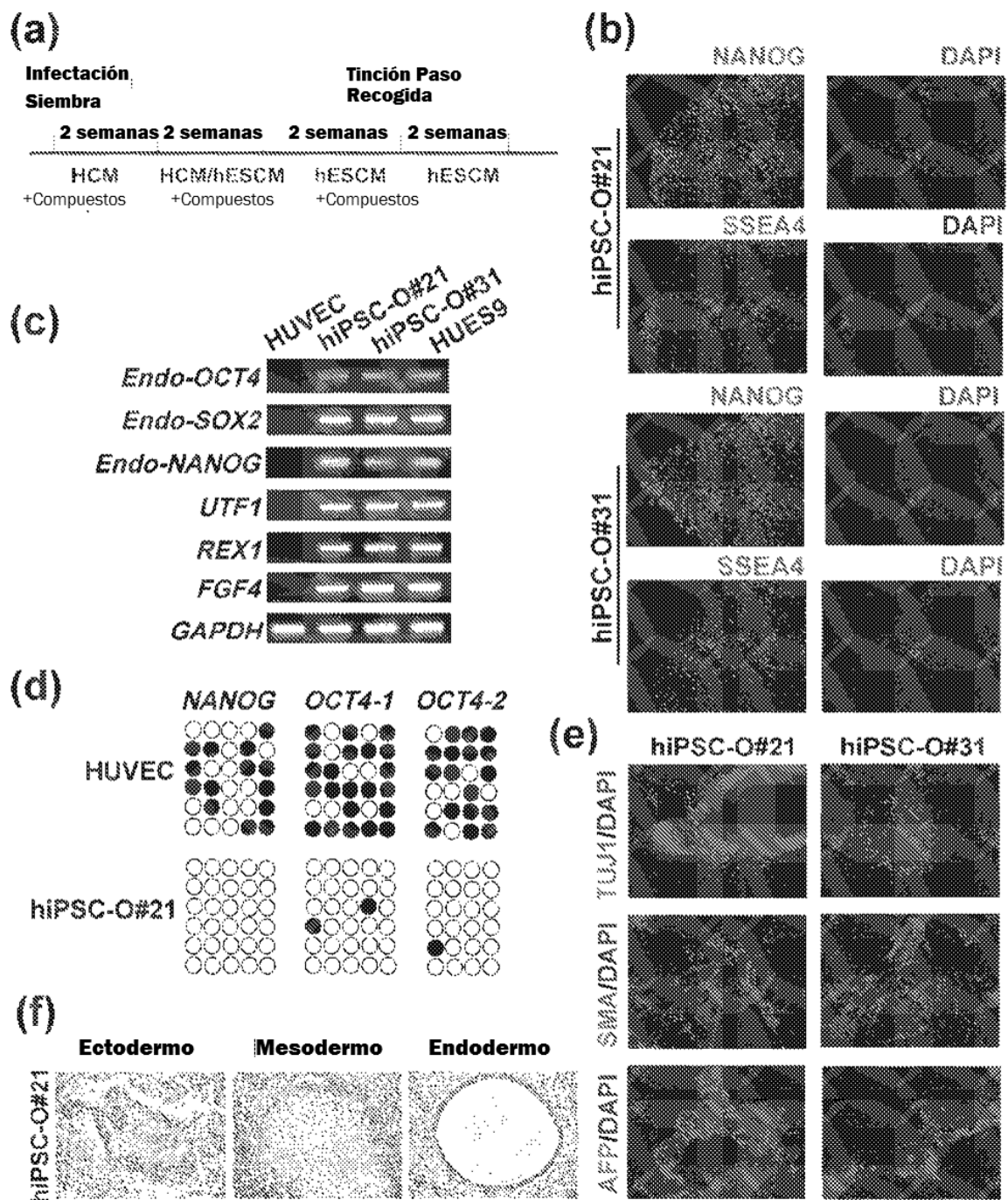
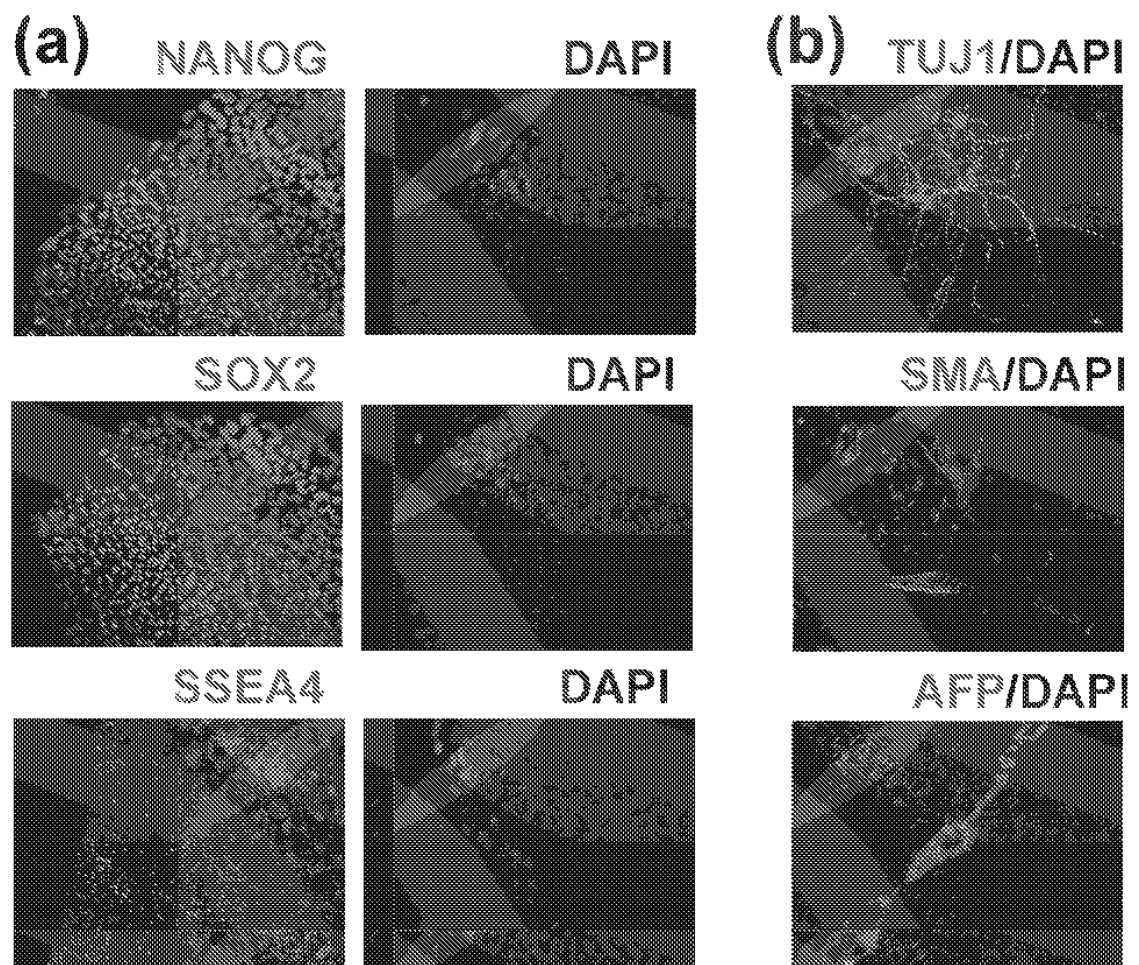
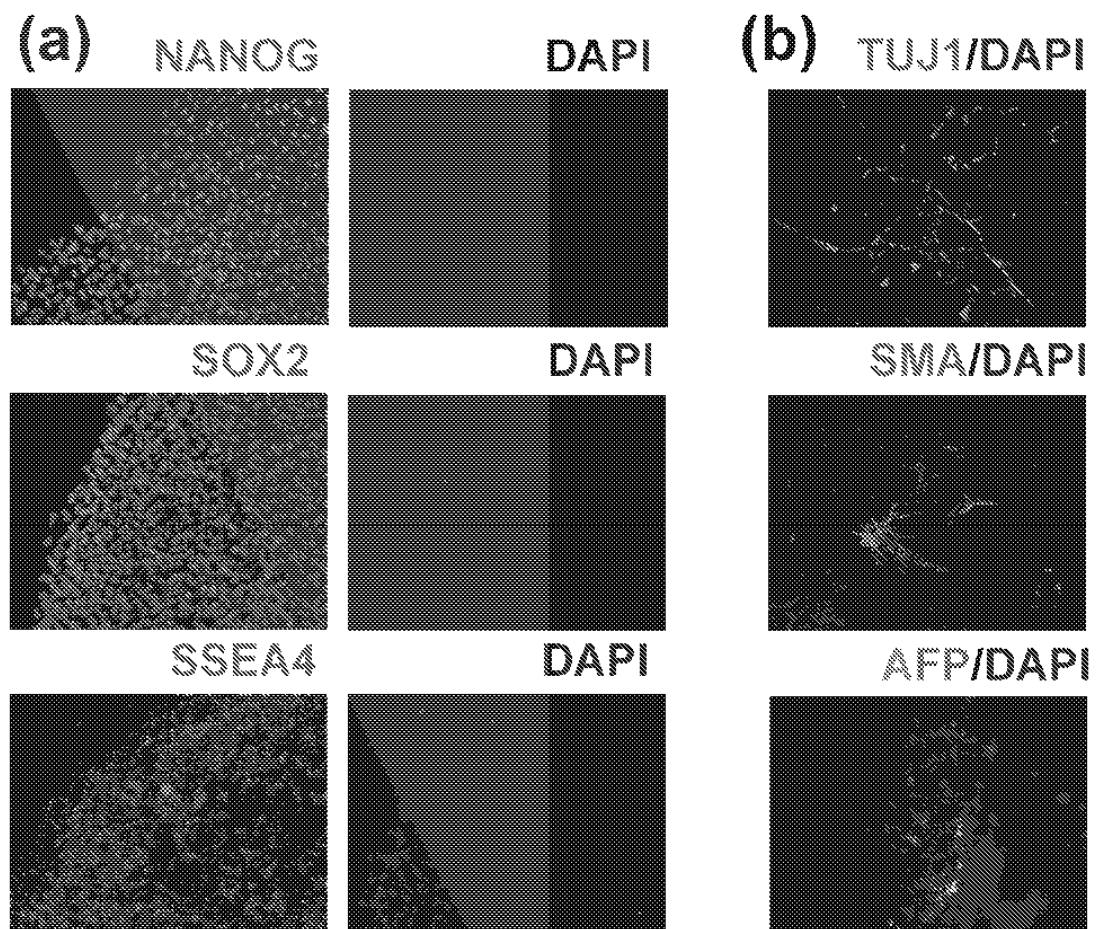


Fig. 3

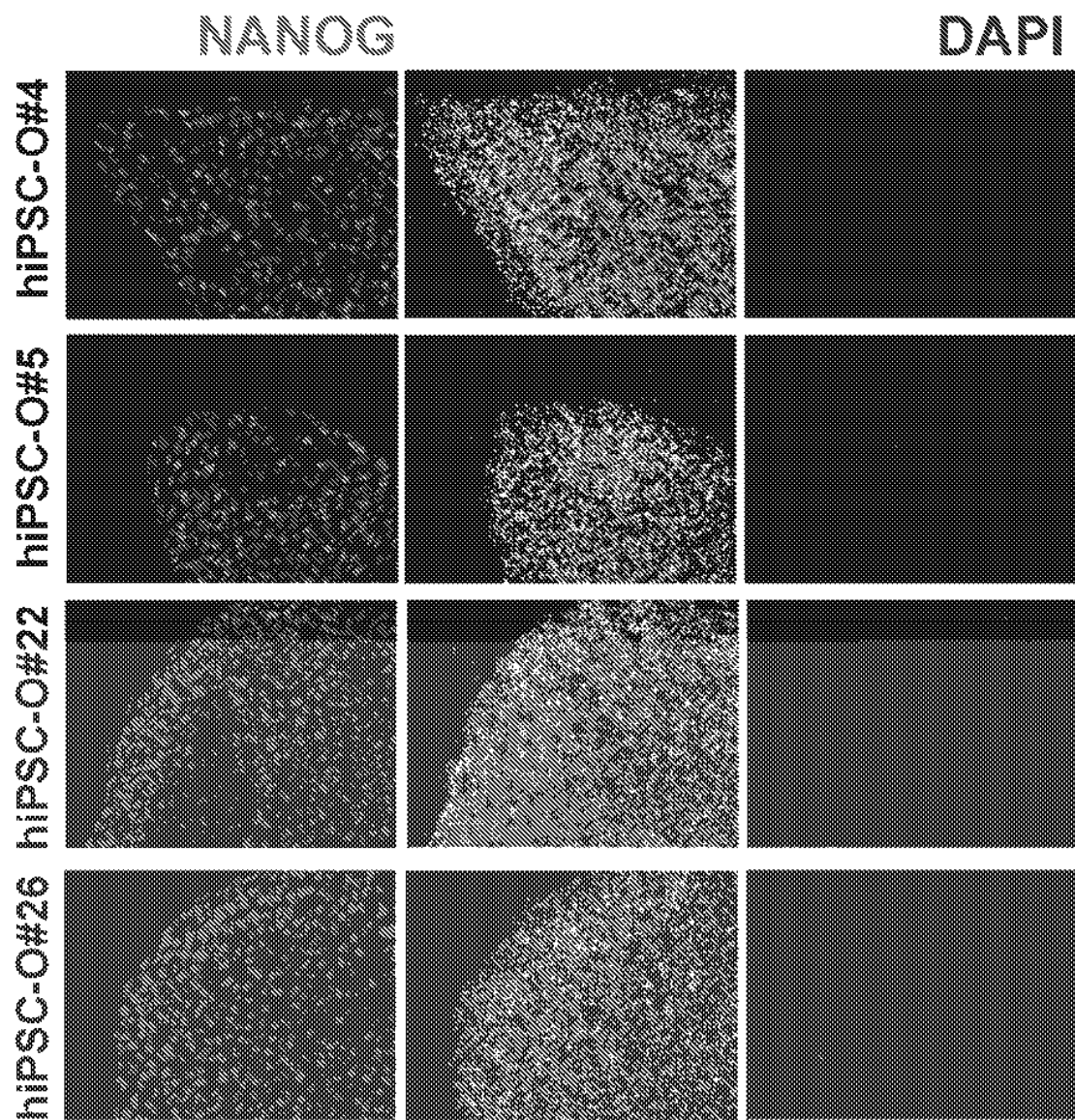




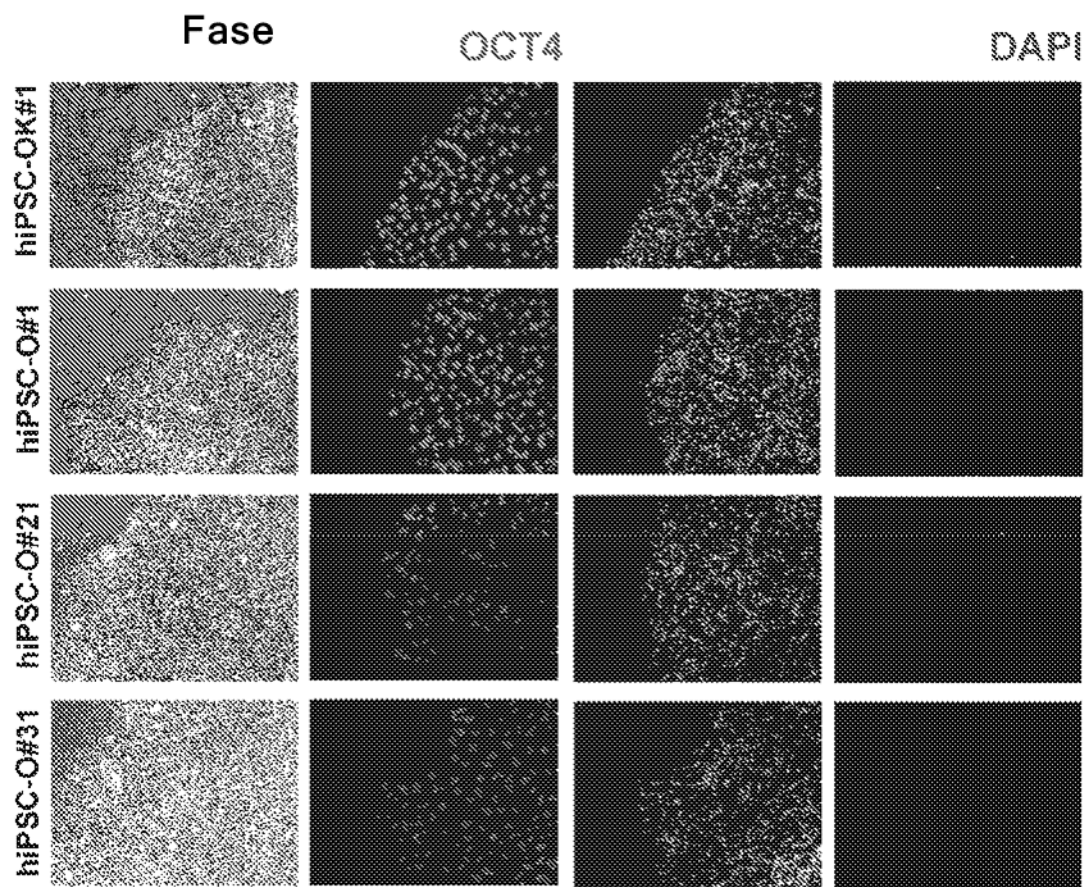
*Fig. 4*



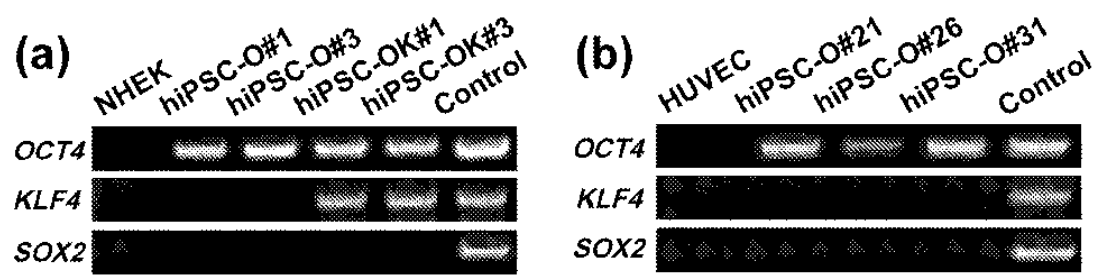
*Fig. 5*



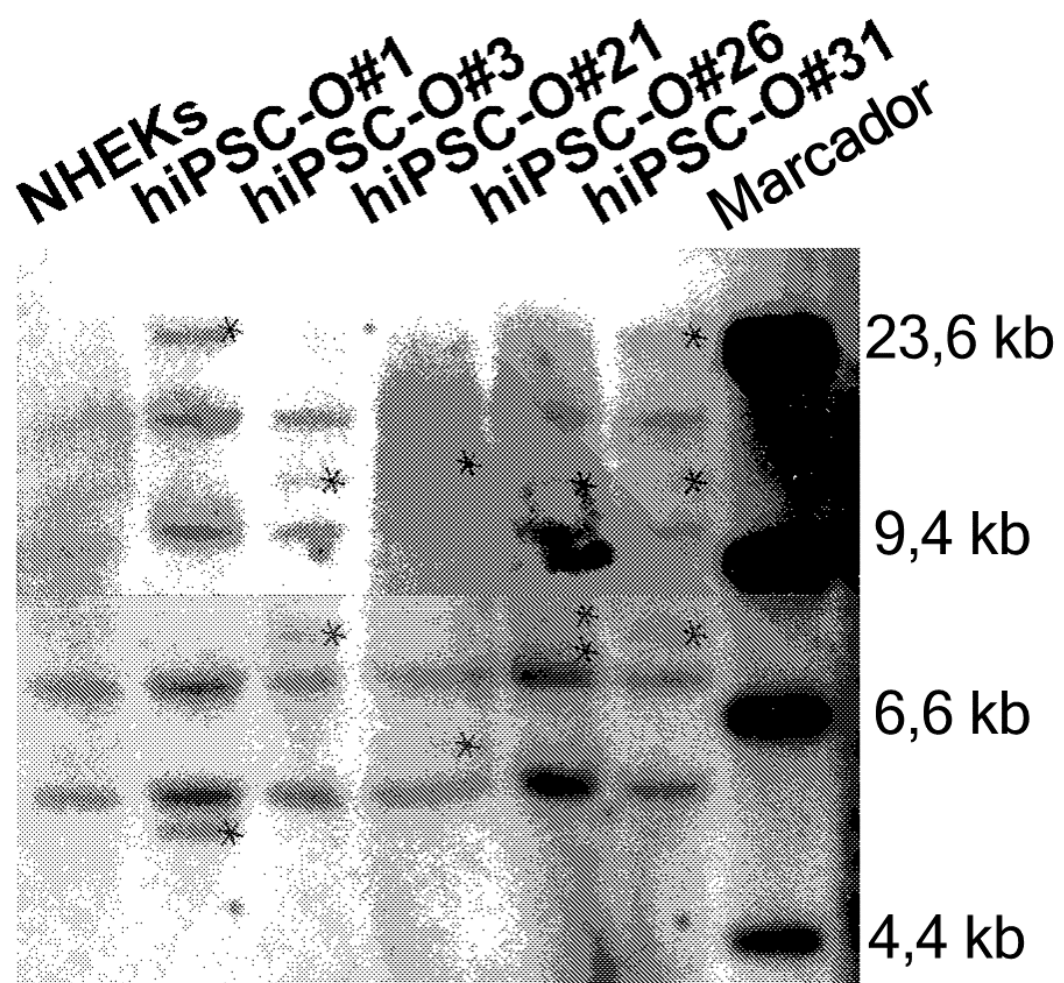
*Fig. 6*



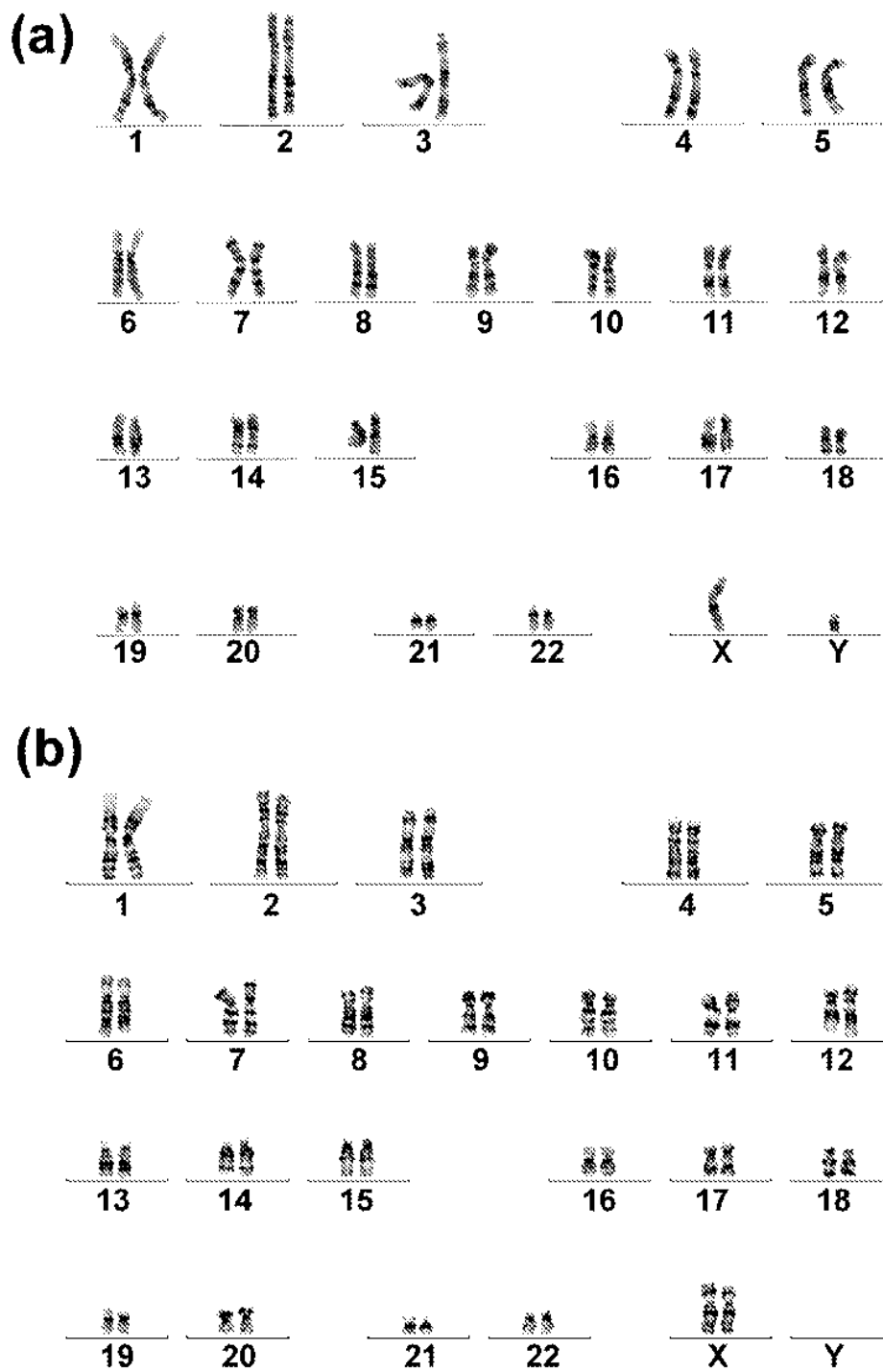
*Fig. 7*



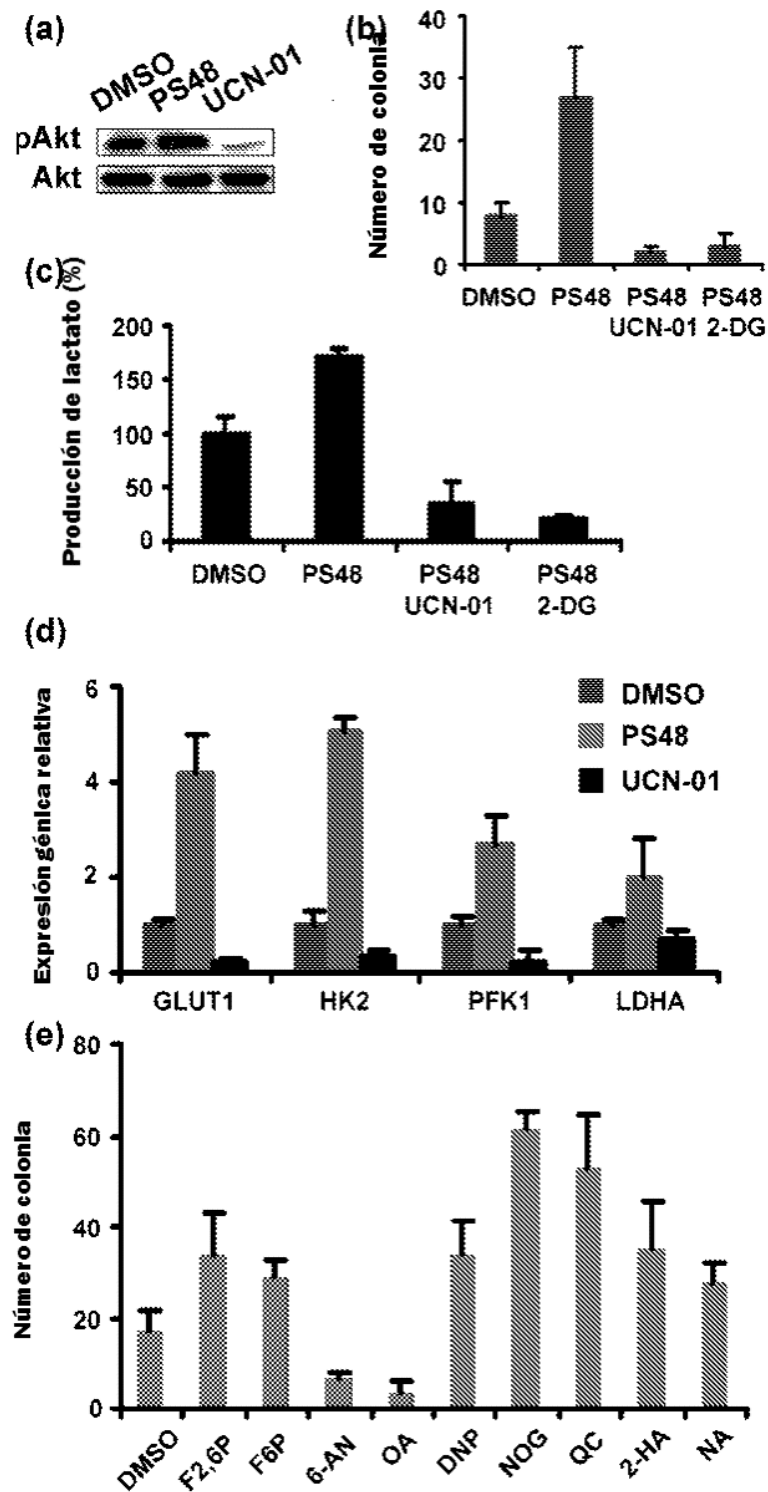
*Fig. 8*



**Fig. 9**



*Fig. 10*



*Fig. 11*