

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 799**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2012 PCT/CN2012/073375**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13056535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2012 E 12801798 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2647700**

54 Título: **Método para aumentar la eficiencia de la generación de célula pluripotente inducida**

30 Prioridad:

21.10.2011 CN 201110323779

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

31.07.2017

73 Titular/es:

**GUANGZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICINE AND
HEALTH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES
(100.0%)
190 Kai Yuan Avenue, Science Park
Guangzhou, Guangdong 510530, CN**

72 Inventor/es:

**PEI, DUANQING y
WANG, TAO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 627 799 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).

Método para aumentar la eficiencia de la generación de célula pluripotente inducida**Descripción**

5

CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0001]** La presente invención se refiere a un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, y más particularmente, a un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes mediante la utilización de genes *Jhdm1b* y *Jhdmla* que modifican la histona.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** China es un país poblado del mundo y también tiene el mayor número de pérdidas, daños de órganos, fracasos y trastornos funcionales como consecuencia de un traumatismo, la enfermedad, el envejecimiento y la herencia. Las terapias médicas clásicas basadas en fármacos y cirugías no han logrado satisfacer la tremenda demanda de la medicina clínica. Como resultado, la investigación sobre las células madre y la medicina regenerativa atrae la atención de numerosas entidades de investigación y todos los sectores de la sociedad.

20 **[0003]** La terapia de trasplante de células constituye una importante dirección de investigación de la medicina regenerativa, y los tipos específicos de los trasplantes de células puede usarse para tratar la lesión del corazón, enfermedades degenerativas del sistema nervioso, lesión de la médula, insuficiencia renal, enfermedades del sistema hematológico, y así sucesivamente. Sin embargo, la terapia de trasplante de células se enfrenta a muchos problemas complejos tales como rechazo de aloinjertos y fuentes de células limitadas.

25 **[0004]** La célula madre es un tipo de célula capaz de autorrenovación y puede diferenciarse en diversas células funcionales en ciertas condiciones. Basándose en su etapa de desarrollo, las células madre se dividen en células madre embrionarias y células madre adultas. Basándose en su potencial de desarrollo, las células madre se dividen en tres tipos: células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre unipotentes. La célula madre es un tipo de célula inmadura que no está totalmente diferenciada y tiene una función potencial para regenerar diversos tejidos y órganos y el cuerpo humano, por lo que se llama "célula universal" en el campo de la medicina.

30 **[0005]** Con el fin de resolver los problemas encontrados por la terapia de trasplante de células, la transformación del destino celular atrae la atención de cada vez más científicos. Aunque la determinación de la diferenciación celular y el destino se ha siempre considerado como un proceso irreversible y estable en el proceso de desarrollo, hay cada vez más evidencias *in vitro* que demuestran que este proceso es reversible.

35 **[0006]** El estudio sobre la regulación del destino celular es sólo en un estado de la investigación de laboratorio y está lejos de ensayo clínico. Estas células transformadas obtenidas por sobreexpresión de factores de transcripción todavía tienen muchos problemas de aplicación, por ejemplo, integración de secuencias virales, oncogenicidad potencial, pureza de las células transdiferenciadas resultantes y si pueden compensar células normales que están dañadas en ciertas condiciones y desempeñar sus debidas funciones en el organismo.

40 **[0007]** La célula madre pluripotente inducida (iPS) es un tipo de célula que se asemeja con células madre embrionarias y tiene totipotencia de desarrollo. Adquiere las propiedades de la célula madre induciendo la célula somática a través de la introducción de genes enriquecidos ES específicos. En 2006, el científico japonés Yamanaka introdujo 24 genes candidatos en fibroblastos de ratón utilizando un vector basado en retrovirus, células positivas FBX15 examinadas mediante resistencia G418 para aislar clones iPS similares a células madre embrionarias y finalmente identificadas que 4 factores que incluyen Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 son suficientes para inducir células de ratón FBX15-iPS; En comparación con las células madre embrionarias, estas células son similares con las células madre embrionarias en los aspectos de forma de clon, la capacidad de proliferación y la capacidad de formar teratoma, pero son diferentes de las células madre embrionarias en términos de expresión génica y perfil de metilación genómica y no puede obtener ratones quiméricos vivos. Posteriormente, este grupo y otros dos grupos cambiaron el método de cribado, y usaron Nanog como el estándar y obtuvieron iPSs que son similares a las células madre embrionarias en muchos aspectos y estos iPSs pueden producir descendencia quimérica. Recientemente, los tres grupos de investigación confirmaron de forma independiente, mediante la prueba de complementación tetraploide, que las células iPS de ratón pueden convertirse en un individuo y poseer una totipotencia de desarrollo.

45 **[0008]** Siguiendo el procedimiento de inducción de ratón iPSs, en 2007, cada uno de los dos grupos Yamanaka [8] y Yu Junying [9] las células somáticas humanas reprogramadas con éxito en células iPS, en el que Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 anteriormente transducidas en fibroblastos epidérmicos humanos usando un retrovirus, mientras que el último incorporó Oct3/4, Sox2, Nanog y Lin28 en células de prepuicio usando un lentivirus. Tanto el análisis de perfiles de expresión génica como el análisis sobre la metilación de las regiones promotoras de los genes Oct3/4 y Nanog mostraron que la línea de células iPS humanas es muy similar a la correspondiente línea de células madre embrionarias y todas las células pueden desarrollarse en 3 capas germinales cuando se inyectan en el cuerpo de un ratón desnudo. Además, las células somáticas pueden ser inducidas con éxito en iPSs en rata, cerdo, y mono,

65

además de ratón y humano.

[0009] Las células que pueden ser reprogramadas con éxito no sólo se limitan a fibroblastos, y muchos otros tipos de células adultas pueden también inducirse con éxito en células iPS, incluyendo células de páncreas beta, células madre neurales de adultos, hepatocitos, células gástricas, células B maduras, células hematopoyéticas, meningocitos, células madre derivadas de adiposis, células sanguíneas de cordón, células CD34 positivas de sangre periférica y queratinocitos. Para las células en diferentes etapas de diferenciación, las dificultades en la inducción y reprogramación en iPSs son diferentes. Tomemos como ejemplo las células hematopoyéticas de ratón: La eficacia de reprogramación de las células madre hematopoyéticas y de las células progenitoras hematopoyéticas puede ser de hasta el 28%, que es 300 veces la de las células T diferenciadas terminalmente y las células B.

[0010] En la inducción de iPSs, a menudo es para incorporar un gen exógeno en las células por medio de un retrovirus y un lentivirus, que proporciona eficiencia de transducción de genes muy altos. Sin embargo, la integración de la secuencia viral en el genoma de la célula puede resultar en mutagénesis de inserción génica e incluso carcinogenicidad, por lo que este método de introducción de genes con riesgos potenciales es obviamente desfavorable a la aplicación de la técnica iPS en el campo de la medicina regenerativa. Por lo tanto, un grupo de estudio diferente utilizó vectores no integrantes para inducir iPSs y tuvo éxito. Estos vectores incluyen un vector de adenovirus, un vector de expresión común, un transposón, un vector episómico y un vector de ADN de minicírculo.

[0011] Tanto de la combinación de Sox2, Klf4, Oct3/4 y c-Myc como la combinación de Sox2, Oct3/4, Nanog y Lin28 pueden inducir con éxito la generación de iPSs. Otros estudios encontraron que c-Myc no es esencial para la reprogramación y los tres factores de transcripción incluyendo Sox2, Klf4 y Oct3/4 son suficientes para conducir la reprogramación de humanos y células somáticas de ratones. Las células madre neuronales expresan endógenamente altos niveles de Sox2, Klf4 y c-Myc, por lo que solo necesita incorporar Oct3/4 exógeno para inducir con éxito iPSs. Entre los factores de transcripción utilizados en la reprogramación, Sox2, Klf4 y c-Myc pueden ser reemplazados por otros miembros de la misma familia, por ejemplo, Klf2 y Klf5 pueden reemplazar Klf4; Sox1 y Sox3 pueden reemplazar Sox2; N-Myc y L-Myc pueden sustituir a c-Myc; pero Oct1 y Oct6 no pueden reemplazar Oct4. Esrrb se une directamente a la proteína Oct3/4 para regular la auto-regeneración y totipotencia de las células madre, y en la reprogramación, Esrrb puede reemplazar Klf4 para inducir iPSs en combinación con Sox 2 y Oct3/4. Oct3/4 es un factor de transcripción muy importante en la reprogramación. Estudios recientes encontraron que los receptores nucleares LRH-1 (Nr5a2) y Nr5a1 pueden reemplazar Oct3/4 y pueden inducir células adultas de ratón en iPSs en combinación con Klf4 y Sox2.

[0012] Sin embargo, hasta el momento, hay varias combinaciones diferentes de factores de transcripción capaces de reprogramación, incluyendo Oct4, Klf4, Sox2, y c-Myc; Oct4, Nanog, Lin28, Sox2; Sox2, Klf4 y Lrh1; Oct4 y bml1, así como la reprogramación relacionada con genes como esrrb y tbx3. Para las combinaciones de factores de transcripción requeridas por los métodos de reprogramación existentes, se necesita incorporar hasta 3 o 4 factores de transcripción y la eficiencia de inducción es baja. La forma de reducir el número de factores de transcripción manteniendo una alta eficacia de reprogramación es de gran importancia para reducir la acumulación de mutaciones celulares en la reprogramación y para mejorar la operabilidad de la técnica de reprogramación. Además, la búsqueda de genes que reemplazan a factores de transcripción comunes facilita el estudio del mecanismo de reprogramación y la mejora de la técnica de reprogramación.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Un objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método para reducir el número de factores de transcripción, manteniendo una alta eficiencia de reprogramación, la reducción de la acumulación de mutaciones celulares en la reprogramación, y la mejora de la capacidad de funcionamiento de la técnica de reprogramación.

[0014] Para alcanzar este objetivo, la siguiente solución técnica se adopta para proporcionar un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas:

- a. la transferencia de un factor de transcripción y Jhdm1b en células adultas de mamífero que luego se cultivan en un medio inductor para inducir clones de células madre pluripotentes, en donde el factor de transcripción es Oct4 solo, o una combinación de Oct4, Klf4 y Sox2 o una combinación de Oct4, Klf4, c-Myc y Sox2;
- b. el cultivo y la expansión de los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre.

[0015] Otra solución técnica de la presente invención es proporcionar un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas:

- a. Transferir un factor de transcripción y Jhdm1b a células adultas de mamífero que luego se cultivan en un medio inductor que contiene vitamina C para inducir clones de células madre pluripotentes, en donde el factor de transcripción es Oct4 solo o una combinación de Oct4 y Sox2 o una combinación de Oct4 y Klf4, o una combinación de Oct4, Klf4 y Sox2, o una combinación de Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc;

- b. Cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre.

[0016] Preferiblemente, los pasos anteriores son como sigue:

- a. Transferir un factor de transcripción y Jhdm1b a células adultas de mamífero que luego se cultivan en un medio inductor para inducir clones de células madre pluripotentes, en donde el factor de transcripción es Oct4 solo, o una combinación de Oct4 y Sox2 o una combinación de Oct4 y Klf4 o una combinación de Oct4, Klf4 y Sox2;
- b. Cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre.

[0017] Preferiblemente, el factor de transcripción y Jhdm1b son ARNs codificados o no codificantes, proteínas, o polipéptidos capaces de inducir células madre pluripotentes.

[0018] Preferiblemente, la transferencia de Jhdm1b en células adultas de mamífero se consigue mediante la incorporación de un vector capaz de expresar Jhdm1b en las células.

[0019] Preferiblemente, el vector es un vector viral, un vector plásmido, un vector de satélite externo, o un vector de ARNm, o se sintetiza químicamente directamente.

Preferiblemente, el vector viral es un retrovirus que es un vector pMXs.

[0020] Preferiblemente, el Jhdm1b es un polipéptido para la modificación de la desmetilación, una variante funcional de la misma, y un fragmento funcional de la misma.

Preferiblemente, las células adultas de mamífero son fibroblastos, células neurales, células hematopoyéticas y células neurogliales.

[0021] Preferiblemente, las células adultas de mamífero son fibroblastos embrionarios de ratón.

[0022] Otra solución técnica es proporcionada por la presente invención para proporcionar un método para aumentar la eficiencia de inducción de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas:

- a. transferir un factor de transcripción Jhdm1b y Jhdmla a células adultas de mamífero que luego se cultivan en un medio inductor para inducir clones de células madre pluripotentes, en donde el factor de transcripción es Oct4 solo o una combinación de Oct4 y Sox2 o una combinación de Oct4 y Klf4, o una combinación de Oct4, Klf4 y Sox2;
- b. cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre.

[0023] Preferiblemente, el método anterior comprende las siguientes etapas:

- a. Transferir un factor de transcripción, Jhdm1b y Jhdmla a células adultas de mamífero que luego se cultivan en un medio inductor que contiene vitamina C para inducir clones de células madre pluripotentes, en donde el factor de transcripción es Oct4;
- b. Cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre que contiene vitamina C.

[0024] Los efectos beneficiosos de la presente invención son como sigue: mediante la utilización de polipéptidos Jhdm1b y Jhdmla que modifican la histona, y un factor de inducción de célula madre, la presente invención aumenta la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes y aumenta la calidad de células madre pluripotentes inducidas. El presente método logra mejores efectos utilizando menos tipos de factores de inducción de células madre en comparación con los métodos existentes de inducción de células madre pluripotentes. Preferiblemente, el método de la presente invención utiliza Oct4, Klf4 y Sox2, Oct4 y Klf4, Oct4 y Sox2, o Oct4 solo. El método de la presente invención comprende además la exposición de las células a vitamina C, lo que aumenta adicionalmente la eficacia de la inducción de células madre pluripotentes en comparación con el caso en el que no se utiliza vitamina C. Mediante el uso de menos factores reductores de células madre, el método de la presente invención reduce la potencial carcinogenicidad, obtiene una alta eficiencia inductora y proporciona células madre pluripotentes inducidas de alta calidad capaces de transmitir la línea germinal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025]

FIG. 1 muestra datos que indican que Jhdm1a o Jhdm1b aumentan la eficacia de la inducción de células madre pluripotentes como mediadas por SKO, en donde el control es un vector vacío pMXs-FLAG donde no se inserta

secuencia génica;

FIG. 2 muestra datos que indican que Jhdmla o Jhdmlb promueven la eficacia de la reprogramación mediada por SKOM;

FIG. 3 muestra que en presencia de vitamina C, Jhdmla y Jhdmlb actúan conjuntamente para permitir la reprogramación sólo utilizando SO, KO y Oct4;

En la FIG. 4, a y d son microfotografías de las células madre pluripotentes inducidas que finalmente se forman usando Oct4 + Jhdmlb (informados como OB); b y e son fotografías de descendientes quiméricos que se desarrollan después de que las células madre pluripotentes inducidas finalmente formadas usando OB se inyectan en la blástula; y c y f son fotografías de la descendencia que se generan después de las quimeras acopladas con ratones de tipo salvaje, en donde las quimeras se desarrollan después de que las células madre pluripotentes inducidas finalmente formadas usando OB se inyectan en la blástula;

FIG. 5 muestra los resultados de la amplificación por PCR de los ADN genómicos de los clones de células madre pluripotentes, indicando que en los genomas de los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB, C4, C14, C15 y C16, sólo se integran Oct4 y Jhdmlb, en los que el control es ADN genómicos de células infectadas con Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc y Jhdmlb, y MEF indica ADN genómicos extraídos de fibroblastos embrionarios de ratón;

FIG. 6 muestra los resultados de la PCR cuantitativa, indicando que los genes exógenos de los clones de células madre pluripotentes inducidos por OB C4, C14, C15 y C16 se expresan en silencio, en donde el control de OB D4 es un molde de ADNc obtenido por transcripción inversa de ARNm extraídos de las células que han sido infectadas con Oct4 y Jhdmlb y cultivadas durante 4 días, y MEF es el fibroblasto embrionario de ratón;

FIG. 7 muestra los resultados de PCR cuantitativa en tiempo real, indicando que los clones de células madre pluripotentes inducidos por OB, C4, C14, C15 y C16 expresan genes específicos de células madre embrionarias, en donde R1 es la línea de células madre embrionarias de ratón, y MEF es el fibroblasto embrionario de ratón;

FIG. 8 muestra los resultados de inmunofluorescencia, lo que indica que el clon C14 de células madre pluripotentes inducido por OB expresa el gen específico de células madre embrionarias Rex1 y el marcador de superficie específico de células madre embrionarias SSEA-1, en el que el Marcador representa una molécula de marcador específico de células madre SSEA-1);

FIG. 9 muestra los resultados del análisis de metilación medida de CpGs en una región de Oct4 adyacente al promotor en fibroblastos embrionarios de ratón y células madre pluripotentes inducidas;

FIG. 10 muestra los resultados del análisis de metilación medida de CpGs en una región de Nanog adyacente al promotor en fibroblastos embrionarios de ratón y células madre pluripotentes inducidas;

FIG. 11 muestra los cariogramas de las células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdmlb;

FIG. 12 muestra las eficacias de inducción de células madre pluripotentes por los diversos mutantes de Jhdmlb. La mutación Jmjc implica mutación de histidina en la posición 221, isoleucina en la posición 222, y ácido aspártico en la posición 223 en alanina; la mutación CxxC implica mutación de la cisteína en las posiciones 586, 589 y 592 en alanina;

FIG. 13 muestra el espectro del plásmido pMXs-FLAG.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0026] Todos los términos técnicos usados en este documento tienen los mismos significados tal como se entiende por aquellos de habilidades ordinarias en la técnica. Para las definiciones y términos de la técnica, un muerto puede referirse, por ejemplo, a Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel, et al., John Wiley & Sons, 2009. Las abreviaturas de residuos de aminoácidos son los códigos estándar de 3 letras y/o de 1 letra que se usan en la técnica para representar uno de los 20 L-aminoácidos comunes.

[0027] A pesar de los intervalos numéricos y aproximaciones de los parámetros que se muestran en el amplio alcance de la presente invención, los valores mostrados en las realizaciones específicas se registrarán lo más precisamente posible. Sin embargo, cualquier valor debe contener inevitablemente cierto error, que es atribuible a sus desviaciones estándar presentes en sus respectivas mediciones. Además, todos los intervalos descritos en el presente documento se entenderán que abarcan cualquiera y todos los subgrupos de los mismos.

[0028] Los términos "polipéptido" y "proteína" que se usan en el presente documento pueden usarse de forma intercambiable para indicar una cadena de al menos dos residuos de aminoácidos que están interconectados uno con otro a través del enlace covalente (por ejemplo, enlace peptídico), que pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos. Particularmente, los polipéptidos descritos en la presente invención son polipéptidos humanos y/o de ratón.

[0029] Los términos "variante", "variante de polipéptido" o "análogo" utilizados aquí indican un polipéptido que es diferente del polipéptido original en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, deleciones, inserciones, fusiones, truncamientos o cualquier combinación de los mismos. El polipéptido variante puede ser totalmente funcional o puede carecer de una o más funciones activas. El término "variante funcional" utilizado en la presente memoria sólo contiene, por ejemplo, cambios conservativos o los cambios en residuos no críticos o regiones no críticas, y retiene las funciones del polipéptido original. La variante funcional puede contener además la sustitución de aminoácidos similares, lo que resulta en funciones inalteradas o cambios de función insignificantes. Los aminoácidos que son importantes para las funciones pueden identificarse por métodos conocidos en la técnica,

por ejemplo, mutagénesis dirigida a un sitio o mutagénesis de escaneo con glicina (Cunningham, B. y Wells, J., Science, 244: 1081-1085, 1989). Los sitios que son cruciales para la actividad del polipéptido se pueden determinar, por ejemplo, mediante análisis estructurales tales como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje de fotoafinidad (Smith, L. et al., J. Mol. Biol., 224: 899 - 904, 1992, de Vos, A. et al., Science, 255: 306 - 312, 1992).

[0030] En algunas realizaciones de la presente invención, las variantes de Jhdmla se seleccionan de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% (preferiblemente 80%, 90%, 95%, 98% y 99%) homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, las variantes de Jhdm1b se seleccionan de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% (preferiblemente 80%, 90%, 95%, 98% y 99%) homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos codificada por Jhdmla es SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos codificada por Jhdm1b es SEQ ID NO: 8.

[0031] El término "fragmento" utilizado aquí se refiere a una molécula que es sólo una parte de una secuencia de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento de polipéptido Jhdm1b es Jhdm1b truncado. Los fragmentos pueden contener una secuencia de cualquier extremo de la secuencia de longitud completa o una secuencia de la mitad de la secuencia de longitud completa. El fragmento puede ser un "fragmento funcional", por ejemplo, un fragmento que retiene una o más funciones del polipéptido de longitud completa. El término "fragmento funcional" utilizado en la presente memoria indica que dicho fragmento retiene las funciones del polipéptido de longitud completa, por ejemplo, induciendo células madre pluripotenciales o aumentando la eficacia de la inducción de células madre pluripotentes.

[0032] A menos que se indique lo contrario, cuando se mencionan en el presente documento polipéptidos, ácidos nucleicos, u otras moléculas, que incluyen variantes funcionales y fragmentos funcionales. Por ejemplo, Jhdm1b y Jhdmla indican además las variantes funcionales y los fragmentos funcionales de Jhdm1b natural y Jhdm1a, respectivamente.

[0033] El término "Jhdm1b" usado en este documento puede indicar un miembro de la familia de demetilasa de histona que contiene dominio JmjC (JHDM) que es conservado evolutivamente y ampliamente expresado. También se llama Fbx110. En particular, dicho polipéptido es un polipéptido humano y/o de ratón.

[0034] El término "Jhdmla" usado en el presente documento puede indicar otro miembro de la familia de desmetilasa de histona que contiene dominio JmjC (JHDM). También se llama Fbx111. En particular, dicho polipéptido es un polipéptido humano y/o de ratón.

[0035] El término "células madre pluripotentes inducidas" o "iPSs" usado en este documento se puede usar de forma intercambiable para indicar células madre pluripotentes obtenidas por inducir artificialmente las células no pluripotentes (tales como las células somáticas). Dicha inducción se consigue generalmente por expresión forzada de un gen específico, y este proceso se denomina también "induciendo células en células madre pluripotentes" en la presente memoria.

[0036] El término usado en el presente documento "factor inductor de células madre" indica un factor que es capaz de inducir células en células madre pluripotentes por sí solo o en combinación con otros factores, tales como proteínas, polipéptidos y ARN codificados o no codificantes. Preferiblemente, el factor inductor de células madre es un factor de transcripción, incluyendo Oct-3/4, los miembros de la familia Sox, los miembros de la familia Klf, los miembros de la familia Myc, Nanog, LIN28 y similares. Preferiblemente, el factor inductor de células madre se selecciona de uno o más de Oct4, Klf4, Sox2 y c-myc. Más preferiblemente, el factor inductor de células madre incluye al menos Oct4. En particular, el polipéptido es un polipéptido humano y/o de ratón.

[0037] El término "Oct4" utilizado aquí indica un miembro de la familia de factores de transcripción de octámero. Juega un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia de las células. En las literaturas, Oct4 también se llamó Oct3.

[0038] El término "Klf4" utilizado en la presente memoria indica un miembro de la familia de factores de transcripción de tipo Krüppel.

[0039] El término "Sox2" usado aquí indica un miembro de la familia de factores de transcripción de Sox.

[0040] El término "c-myc" utilizado aquí indica un factor de transcripción que es bien conocido por los expertos en la técnica. Regula la expresión de muchos genes y recluta transacetilasa de histona. Sus mutaciones están relacionadas con muchos cánceres.

[0041] El término "modificación de las histonas" que se utiliza en el presente documento indica una variedad de modificaciones a la histona, tales como acetilación, metilación, desmetilación, fosforilación, adenilación, ubiquitinación y ribosilación de ADP. En particular, la modificación de histonas incluye la desmetilación de histona.

[0042] El término "objeto" utilizado aquí se refiere a mamíferos, tales como seres humanos. También pueden incluirse otros animales, por ejemplo animales domésticos (por ejemplo, perro y gato), aves de corral (tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos y caballos), o animales de laboratorio (como mono, rata, ratón, conejo y conejillo de indias).

[0043] El término "consistencia", "por ciento de consistencia", "homología" o "identidad" usado aquí se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos. El porcentaje de consistencia puede determinarse por la alineación de dos secuencias, y se refiere al número de residuos idénticos (es decir, aminoácidos o nucleótidos) en posiciones comunes a las secuencias comparadas. La alineación y comparación de secuencias pueden llevarse a cabo mediante los algoritmos estándar de la técnica (por ejemplo, Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482, Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443, Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 85: 2444) o una versión computarizada de estos algoritmos (Wisconsin Genetics Software Package Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI). La versión computarizada está disponible públicamente como BLAST y FASTA. Además, el ENTREZ disponible en el Instituto Nacional de Salud (Bethesda MD) se puede utilizar para la comparación de secuencias. Cuando se usan programas BLAST y BLAST con espacios, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (como BLASTN, que está disponible en el sitio del Centro Nacional de Información Biotecnológica). En una realización, se puede usar GCG con un peso de separación de 1 para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias, de tal manera que cada intervalo de aminoácidos se da un peso como si fuera un desajuste de aminoácido único entre las dos secuencias. Alternativamente, puede utilizarse el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG (AccelryS, San Diego, CA).

[0044] El término "vector" usado aquí se utiliza en el significado bien conocido por los expertos en la técnica y pueden ser un vector de expresión. El vector puede incluir virus (tales como poxvirus, adenovirus y baculovirus); vectores de levadura, bacteriófagos, cromosomas, cromosomas artificiales, plásmidos, cósmidos, vectores de episoma y vectores de ARNm, o pueden ser sintetizados químicamente directamente. Preferiblemente, el vector de virus es un vector retrovirus y/o lentivirus. Más preferentemente, el retrovirus es un vector pMXs.

[0045] El término "excesivo" utilizado aquí indica ser significativamente mayor que el nivel normal, y en particular indica que la expresión de un polipéptido es estadísticamente significativamente mayor que en las células normales. Preferiblemente, es mayor en un 20%, 50%, 100%, 200%, o incluso 5, 10, o 100 veces.

[0046] El término "sobreexpresión" usado aquí indica que el nivel de expresión es significativamente mayor que el nivel normal, y en particular indica que la expresión de un polipéptido es estadísticamente significativamente mayor que en las células normales. Preferiblemente, es mayor en un 20%, 50%, 100%, 200%, o incluso 5, 10, o 100 veces.

[0047] El término "incorporación" utilizado aquí indica un proceso para introducir sustancias exógenas (tales como ácidos nucleicos o proteínas) en las células mediante, por ejemplo, transfección con fosfato cálcico, infección por el virus, la transfección de liposomas, electroporación, pistola de genes o similares.

[0048] En este documento, la administración de un polipéptido exógeno en células pueden llevarse a cabo por diversos métodos, por ejemplo, por los transportistas o los factores de transporte, y preferiblemente, por liposoma, fragmentos de polipéptidos bacterianos o similar (véase WO2002/079417, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia).

[0049] Las células que pueden utilizarse en el método de la presente invención son preferiblemente células de mamífero, y más preferiblemente células humanas y de ratón. En particular, las células son células somáticas, tales como células epiteliales, células neurales, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células hematopoyéticas, inmunocitos y linfocitos. Más particularmente, las células son células beta pancreáticas, células madre neurales adultas, hepatocitos, células gástricas, células B maduras, células hematopoyéticas, meningocitos, células madre derivadas de tejido adiposo, células sanguíneas de cordón, células CD34 positivas de sangre periférica y queratinocitos.

Ejemplo 1

1. Construcción de vectores que comprenden regiones de codificación Jhdm1a y Jhdm1b:

a. Diseño de cebadores para la clonación

[0050] Los datos de la secuencia de ADNc de Jhdmla y Jhdm1b se obtuvieron de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, donde la secuencia de la región de clonación del ADNc Jhdmla es la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de la región de clonación del ADNc de Jhdm1b es SEQ ID NO: 2. Las secuencias codificantes de Jhdmla y Jhdm1b se amplificaron diseñando cebadores específicos.

La secuencia de bases de cebador Jhdm1a aguas arriba se muestra como SEQ ID NO: 3;

La secuencia de bases del cebador Jhdm1a aguas abajo se muestra como SEQ ID NO: 4;

La secuencia de bases del cebador Jhdm1b aguas arriba se muestra como SEQ ID NO: 5;

La secuencia de bases del cebador Jhdm1b aguas abajo se muestra como SEQ ID NO: 6;

b. Amplificación de secuencias de codificación por RT-PCR

5 **[0051]** ARNm totales se extrajeron a partir de fibroblastos de embriones de ratón aislados ICR (MEFs) y células madre embrionarias H1 humanas de acuerdo con el siguiente método: un medio de cultivo fue retirado de una bandeja de cultivo, las células se lavaron con 3-5 ml de solución salina normal (PBS) (Gibco), y la solución de enjuague se desecha. A continuación, se añadió 1 ml de lisado celular Trizol (Takara) a la bandeja de cultivo y se utilizó una pipeta para extraer la solución de mezcla resultante y soplar suavemente las células de modo que se disolvieran completamente en el lisado. A continuación, se transfirieron a un tubo de centrifuga de 1,5 ml claro para almacenarse a -80°C o se sometieron inmediatamente a la siguiente etapa de extracción. Después, se añadieron 200 µl de triclorometano a la misma, y la mezcla se mezclaron bien girando el tubo hacia arriba y abajo durante aproximadamente 30 segundos y luego se centrifugó a 4°C a 12.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se transfirió a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y luego se le añadió un volumen igual de isopropanol. Se mezclaron bien, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se centrifugaron a 4°C a 12.000 rpm durante 5 minutos, momento en el que se encontró un pequeño precipitado blanco en la parte inferior del tubo. El sobrenadante fue descartado cuidadosamente, y, a continuación, se añadieron 500 µl de una solución de etanol al 80% en el tubo para enjuagar isopropanol residual. El tubo se centrifugó a 12.000 rpm para eliminar la solución de etanol. El centrifugado se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, de modo que los ARNm totales blancos en la parte inferior del tubo se secaron completamente. A continuación, se añadió 30-50 µl de agua doblemente destilada en el tubo de centrifuga para incubarse a 55°C durante 30 minutos. Posteriormente, se extrajo el tubo y se midió la concentración de ARNms totales mediante un espectrofotómetro. Los ARNm totales extraídos se almacenaron a -80°C o se utilizaron directamente para preparar ADNc mediante transcripción inversa para uso posterior.

25 **[0052]** El proceso y el método de transcripción inversa específicos son como sigue. En general, se tomaron 1 µg de ARNm totales para la transcripción inversa, a la que se añadió oligodT (Takara), dNTP (Takara), RTace (Toyobo), tampón RT y RRI (inhibidor de AARNsa, Takara), y agua libre de ARNsa/DNasa adicional. La mezcla se hace reaccionar en un instrumento de PCR a 42°C durante 60 minutos, se incubó a 98°C durante 5 minutos, y luego se enfrió a la temperatura ambiente. Después de tener éxito la transcripción inversa, 0,5 µl de la reacción se sacó para actuar como molde para amplificar el gen diana por PCR utilizando los cebadores diseñados por el método anterior. Los reactivos utilizados incluyen de alta fidelidad de la polimerasa KOD y su tampón (Toyobo), dNTPs (Takara), y cebadores. El siguiente proceso se llevó a cabo en el instrumento PCR: desnaturalización a 96°C durante 5 minutos, a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 25 segundos, y elongación a 68°C durante 3,5 minutos; los 2-4 pasos se repitieron durante 32 veces.

c. Construcción de plásmidos

40 **[0053]** Por favor refiérase a la FIG. 13. Después de que se completó la amplificación, el producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de PCR se extrajeron usando un kit de extracción de gel (Tiangen, DP214-03). Se utilizó el vector pMXS (adquirido de Addgene, y se inserta con múltiples sitios de clonación y secuencias de etiquetado FLAG). El vector pMXS modificado se llama pMXS-FLAG, la presentación plásmido del cual se muestra en la FIG. 13. El vector se escindió con Pmel y se desfosforiló con fosfatasa de alcalina intestinal de ternero (CIAP) para evitar su auto-ligación. El vector tratado se recuperó utilizando el kit de extracción de gel (Tiangen, DP214-03) para su uso posterior. El vector pMX-FLAG y los fragmentos génicos de Jhdm1a/Jhdm1b se ligaron por un kit de ligación (Takara, ADN Ligation Kit), y después el producto de ligadura se utilizó para transformar E. coli competente. Se seleccionaron los clones positivos, los plásmidos se extrajeron y se secuenciaron, y, finalmente, los plásmidos se prepararon de una gran escala.

50 2. La introducción de las secuencias codificantes de Jhdm1a/Jhdm1b y el factor (factor de transcripción) inductor de células madre pluripotentes en fibroblastos embrionarios de ratón

[0054] A menos que se indique específicamente, la reprogramación de células somáticas basadas en ratón se llevó a cabo mediante la siguiente manera en todos los casos.

55 Medio de cultivo

[0055] El medio de cultivo para células de capa de alimentación, células MEF, y células de la placa se compone de: medio basal de glucosa alta DMEM (Gibco), más 10% de suero bovino fetal (FBS, PAA).

60 **[0056]** Medio inductor: la presente invención utiliza un medio inductor que es convencional en el laboratorio, y la composición de un medio inductor preferido que incluye medio DMEM de alta glucosa (Gibco), 15% de suero bovino fetal (FBS, Gibco), 0,1 mM de aminoácido no esencial (NEAA, Gibco), 2 mM de glutamina (Glutamax, Gibco), 1 mM de piruvato sódico (Gibco), 55 µM -mercaptoetanol (-ME, Gibco), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml), factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml (LIF, Millipore), y según sea necesario, 50 µg/ml de vitamina C (Sigma).

[0057] Medio de cultivo de células madre: la presente invención utiliza un medio de cultivo de células madre que es convencional en el laboratorio, y preferiblemente el medio de cultivo celular mES, la composición de los cuales consta de: medio DMEM de alta glucosa (Gibco) suplementado con 15 % de suero bovino fetal, 0,1 mM de aminoácido no esencial (NEAA, Gibco), 2 mM L-glutamina (Glutamax, Gibco), 1 mM de piruvato sódico (Gibco), 55 μm -mercaptoetanol (Gibco), penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y factor inhibidor de 1000 U/ml de leucemia (LIF, Millipore). 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitamina C (Sigma) se incorporan como sea necesario.

[0058] Medio de cultivo KSR libre de suero: KSR, la abreviatura de reemplazo de suero knockout, es un aditivo de cultivo de células madre de reemplazo de suero comercializado y se usa como un medio completo libre de suero KSR para el cultivo de células madre o clones iPS, la composición de los cuales consta de: KNOCKOUT DMED (un medio basal con presión osmótica optimizada que es adecuado para el cultivo de células madre), un aditivo de KSR al 15%, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco), L-glutamina 2 mM (Glutamax, Gibco), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco), 55 μm -mercaptoetanol (-ME, Gibco), penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), factor inhibidor de la leucemia 1000 U/ml (LIF, Millipore). Todos los procesos iPS y clonación de los medios de cultivo se complementan con factor de leucemia de ratón inhibitorio (LIF, Millipore, nombre comercial: ESGRO, un factor de crecimiento que inhibe la diferenciación de las células madre de ratón) a una concentración final de 1000 U/ml.

3. Células para reprogramación

[0059] Todas las células somáticas para la reprogramación son fibroblastos embrionarios de ratón OG2 (caseros), el número de pases de los cuales no exceda de tres. Una propiedad del ratón OG2 es que no es una proteína de fluorescencia verde (GFP) bajo el control del promotor de Oct4 que se expresa específicamente por las células madre. En reprogramación, cuando se activa el Oct4 endógeno de los fibroblastos de embriones de OG2 de ratón, la proteína de fluorescencia verde se expresa de forma concomitante. Como se observa a través de un microscopio de fluorescencia, las células reprogramadas con éxito o agregados de células clonadas son de color verde, y es fácil de comparar las eficiencias de reprogramación en diferentes condiciones mediante la adición directamente hasta el número de clones reprogramados, es decir, el número de clones de fluorescencia verde, o mediante el análisis de la proporción de células de fluorescencia verde a través de un citómetro de flujo.

[0060] Las células reprogramadas se prepararon del siguiente modo. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (Corning) a una densidad de 20.000 células por pocillo, y después de 6-18 horas, se infectaron con los virus con el factor de reprogramación de ratón basado en la densidad y el estado de las células.

4. Preparación de virus

[0061] Los factores de transcripción para la reprogramación incluyen el vector de retrovirus pMXS para el ADNc de ratón Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (de Addgene, plásmido numerado 13366, plásmido 13367, plásmido 13370, y plásmido 13375 respectivamente); Oct4, NCBI número de acceso: NM_013663; Sox2, NCBI número de acceso: NM_011443; Klf4, NCBI número de acceso: 010637; y c-Myc, número de acceso NCBI: NM_001177353. Los plásmidos del factor de reprogramación en el vector pMX se transflectaron en las células de empaquetamiento virales (plato) mediante el uso de un reactivo de transfección con fosfato de calcio casero, y el proceso específico es: células 7500000 PlatE se sembraron en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro (Corning), y 12 horas más tarde, el medio de cultivo viejo se sustituyó por 7,5 ml de un medio de cultivo libre de penicilina/estreptomina, y luego las células se colocaron en una incubadora. A continuación, la mezcla de transfección se preparó: 25 μg de los plásmidos se tomaron y se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 ml, y a la mezcla 156,25 μl de 2 M de una solución de cloruro de calcio se añadió secuencialmente y una cantidad apropiada de agua se añadió, además, por lo que el volumen total de la misma era de 1,25 ml; que se mezclaron bien, y se añadieron 1,25 ml de una solución de HBS a la misma; la mezcla resultante se mezcló bien inmediatamente, se dejó parada durante 2 minutos, y después se añadió gota a gota en una bandeja de cultivo en placa y se mezcló bien. 9-12 horas después de la transfección, el medio de cultivo viejo se reemplazó por 10 ml de una solución de cultivo fresco; 48 horas después de la transfección, se recogió la solución de cultivo y se filtró con 0,45 μm de membrana de filtro para usarse como solución viral para primera infección; a la misma una solución de cultivo fresco se añadió 24 horas después, y se volvió a recoger la solución de cultivo de esta manera para emplearse como solución viral para la segunda infección.

5. Infección de células MEF con el virus

[0062] La infección se llevó a cabo en dos rondas, en la que los factores inductores utilizados infectaron las células de forma simultánea, cada pocillo de las placas de 12 pocillos fue infectado con 1 ml del virus, la segunda ronda de la infección se llevó a cabo 24 horas después de la primera ronda de infección, y la solución viral fue reemplazada con el medio de MES de cultivo (como se describió anteriormente) 24 horas después de la segunda ronda de infección. El día de la sustitución de la solución se registró como día 0 (DO); en diferentes puntos temporales después de la infección, en los pocillos originales, se contó el número de clones de fluorescencia de GFP o se analizó la proporción de células de fluorescencia GFP usando un citómetro de flujo como se requiere por el experimento.

6. Cultivo de las células infectadas hasta la formación de clones de células madre

5 **[0063]** Monoclonos de tipo células madre embrionarias con una forma hinchada y bordes claros fueron recogidos utilizando agujas de vidrio y transferidos directamente en placas de cultivo (Corning) establecidos con células de la capa de alimentación (las células de la capa del alimentador son fibroblastos de ratón ICR tratados con mitamicina) en avance para cultivarse con el medio de cultivo KSR. En el día 2 después de la infección, el sistema de cultivo se reemplazó con un medio de inducción fresco, y después, el medio inductor fue reemplazado todos los días hasta que se completó el experimento.

10 **[0064]** En base al método anterior para la producción de clones de células madre, los experimentos se llevaron a cabo utilizando diferentes combinaciones de factores inductores de células madre pluripotentes.

[0065] Las combinaciones de factores inductores de células madre pluripotentes se describen del siguiente modo:

- 15 La combinación de Klf4, Sox2, c-Myc, y Oct4 se abrevia como SKOM.
 La combinación de Klf4, Sox2, y Oct4 se abrevia como SKO.
 La combinación de Klf4 y Oct4 se abrevia como KO.
 La combinación de Sox2 y Oct4 se abrevia como SO.
 La combinación de Oct4 y Jhdm1b se abrevia como OB.

20 **[0066]** C4, C14, C15, y C16 son los cuatro clones recogidos hacia fuera de las células reprogramadas inducidas por OB.

25 **[0067]** Los resultados de los experimentos usando las combinaciones de factores inductores de células madre son los siguientes:

Haciendo referencia a la FIG. 1, no importa si la vitamina C está presente o no, Jhdm1a o Jhdm1b obviamente mejoraron la eficiencia de reprogramación, y en presencia de la vitamina C, la mejora era más significativa. FIG. 1 muestra los datos que Jhdm1a o Jhdm1b mejoraron la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes como se ha mediado por SKO, en el que el control es un vector vacío pMXs-FLAG con ninguna secuencia del gen insertado en el mismo;

30 Haciendo referencia a la FIG. 2, no importa si la vitamina C está presente o no, Jhdm1a o Jhdm1b obviamente mejoraron la eficiencia de reprogramación, y en presencia de la vitamina C, la mejora era más significativa. FIG. 2 muestra los datos que Jhdm1a o Jhdm1b mejoraron la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes como se ha mediado por SKOM, en el que el control es un vector vacío pMXS-FLAG con ninguna secuencia del gen insertado en el mismo;

35 Haciendo referencia a la FIG. 3, en la presencia de vitamina C, Jhdm1a y Jhdm1b actuaron juntos para permitir la inducción de células madre pluripotentes sólo en la disponibilidad de SO, KO, o Oct4, en el que mESC + Vc indica que el medio de cultivo utilizado en la inducción es medio de cultivo de células madre MES suplementado con 50 µg/ml de vitamina C, y el control es un vector vacío pMXS-FLAG.

40

45 **[0068]** Por lo tanto, la presente invención llega a una conclusión que Jhdm1a y Jhdm1b pueden mejorar significativamente la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, reducen en gran medida los tipos de factores de transcripción necesarios para incorporarse mientras se mantiene una alta eficiencia de reprogramación, que proporciona grandes ventajas para la reducción de la acumulación de mutaciones en las células reprogramadas y la reducción de su carcinogenicidad. Además, el método de la presente invención también mejora la operatividad de la técnica de reprogramación, reduce la dificultad operativa, y facilita aplicaciones médicas posteriores.

50 Ejemplo 2

La identificación de las células madre pluripotentes inducidas desde el Ejemplo 1:

55 **[0069]** Como se muestra en la FIG. 3 y la FIG. 6 a la FIG. 10, una serie de experimentos de identificación se llevaron a cabo en clones de células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdm1b para verificar si son células iPS (células madre pluripotentes inducidas). Los experimentos de identificación incluyen: PCR cuantitativa, el ensayo de inmunofluorescencia de sus marcadores de superficie, el análisis de grado de metilación promotora, la identificación de cariotipos, formación de quimeras, y así sucesivamente.

Experimentos de PCR cuantitativos:

60 **[0070]** Todos los experimentos de PCR cuantitativos se realizaron en un aparato de PCR cuantitativo de tipo CFX-96 de Biorad usando un kit de Takara, y las condiciones de reacción fueron 95°C, 2 minutos, 95°C, 10 segundos, 60°C, 30 segundos, leyendo el valor de fluorescencia, repitiéndose durante 40 ciclos.

65 Análisis de metilación de la región promotora

[0071] El análisis se llevó a cabo por secuenciación de bisulfito de sodio. Se extrajeron los ADN genómicos en las células diana (Promega, Asistente® Genomic DNA Purification Kit), se midió la concentración, aproximadamente 2 µg de ADN se colocaron en un tubo EP de 1,5 ml donde se diluyeron con ddH₂O a 50 µl, 5,5 µl de 3 M NaOH recién preparada se añadió, y la solución resultante se trató en un baño de agua a 42°C durante 30 minutos; a continuación, la solución se llevó a cabo, 30 µl de 10 mM hidioquinona (sigma) se añadió en la solución de la mezcla después del tratamiento de baño de agua, y después 520 µl de 3,6 M de bisulfito de sodio (Sigma, S9000) se añadió adicionalmente en la solución después del tratamiento de baño de agua; el tubo de EP se envolvió con papel de aluminio para evitar la luz, y la solución se mezcló bien mediante la rotación suave del tubo EP hacia arriba y hacia abajo; 200 µl de aceite de parafina se añadió al mismo a fin de evitar la evaporación del agua y la oxidación, y la solución se trató en un baño de agua a 50°C en la oscuridad durante 16 horas.

[0072] A continuación, la punta de una pipeta se puso debajo de la capa de aceite de parafina para dibujar la solución de la mezcla en un tubo de 1,5 ml de centrífuga clara, y los ADN modificados se recuperaron utilizando un sistema de retracción y purificación de ADN Promega Wizard Cleanup (Promega, A7280) y, a continuación, se almacena a -20°C o se somete a un experimento adicional. 50 ng de ADN anteriormente extraídos se tomaron como el molde para llevar a cabo la reacción de PCR. Después, el producto de PCR se recuperó por extracción en gel (Tiangen, DP214-03), y el producto de PCR y un vector T (Takara), entonces se ligaron y se transformaron. Se seleccionaron los clones positivos y se enviaron a una empresa de secuenciación para la secuenciación, y los resultados se compararon con el análisis estadístico de la metilación de las islas CpG.

Identificación de cariotipo de las células iPS

[0073] La identificación de cariotipo de las células iPS se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente método: 2-3 horas antes de la recogida, a las células para analizarse para cariotipo, 0,1 ml de 5 µg/ml de colchicina (disponible comercialmente, con una concentración final de 0,1 µg/ml) se añadió. Se mezclaron bien, se cultivaron adicionalmente durante 2-3 horas, se transfirieron a un tubo de centrífuga de 10 ml, y después se centrifugó a 1500 a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó, y se añadió un 8 ml de una solución hipotónica (0,075 M KCl, precalentado a 37°C) al tubo. El precipitado de células se sopló homogéneamente y se colocó en una incubadora a 37°C durante media hora. Se añadió 1 ml de un líquido estacionario recién preparado (una mezcla de metanol y ácido acético glacial en una relación en volumen de 3:1, disponible comercialmente). La mezcla resultante se mezcló suavemente y se centrifugó a la misma velocidad de rotación para el mismo período de tiempo que la anterior. El sobrenadante se extrajo. Se añadieron 8 ml de líquido estacionario al mismo. Las células se mezclaron adecuadamente, se fijaron a temperatura ambiente durante al menos media hora, y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se descartó, y se añadió un líquido estacionario fresco para fijar adicionalmente las células durante al menos media hora (deseablemente durante la noche). Al precipitado celular obtenido después de la centrifugación y eliminación del sobrenadante, se añadió aproximadamente 0,2 ml de un líquido estacionario fresco, y la mezcla resultante se mezcló bien. La suspensión de células resultante se dejó caer sobre portaobjetos pre-enfriados (es aconsejable añadir 3 gotas de la suspensión de células en cada portaobjetos) que luego se cuecen en una lámpara de alcohol. Las células después se enfriaron y se agruparon.

Prueba de blástula quimera

[0074] En la prueba de blástula quimera, se inyectaron células iPS en el blastocite de ratones donantes, y luego las blástulas inyectadas se transplantaron a los úteros de ratones hembra pseudopreñados para hacer ratones quiméricos. Si los ratones nacidos producen quimera se determinó en base al color de su pelaje.

[0075] Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el método anterior, y se analizan los resultados del siguiente modo:

Haciendo referencia a la FIG. 5, los resultados de la amplificación de PCR de los ADN genómicos de clones de células madre pluripotentes muestran que, en los genomas de clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15, y C16, solamente Oct4 está integrado con Jhdm1b, en el que el control es ADN genómico extraído de células infectadas con Sox2, Klf4, Oct4, cMyc, y Jhdm1b, y MEF indica ADNs genómicos extraídos de fibroblastos embrionarios de ratón;

Haciendo referencia a la FIG. 6, los resultados de la PCR cuantitativa muestran que los genes exógenos de los clones C4 de células madre pluripotentes inducidas OB, C14, C15, y C16 se expresaron en silencio, en los que el control de OB D4 es un molde de ADNc obtenido mediante transcripción inversa de ARNm extraído de células que han sido infectadas con Oct4 y Jhdm1b y se cultivaron durante 4 días, y MEF es fibroblasto embrionario de ratón;

Consulte la FIG. 7. Como se muestra en la FIG. 7, los resultados de PCR en tiempo real cuantitativo muestran que los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15, y C16 expresan genes específicos de células madre embrionarias, en los que R1 es la línea de células madre embrionarias de ratón, y MEF es fibroblastos embrionarios de ratón; el nivel de expresión de factores de transcripción de células madre endógenas embrionarias en las células madre obtenidas mediante el uso de la combinación de Oct4 con Jhdm1b era sustancialmente consistente con el en las células madre embrionarias. Esto indica que los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15, y C16 expresan genes específicos de células madre

embrionarias, y por lo tanto indica que las células madre pluripotentes inducidas por el método de la presente invención tienen las características de las células madre pluripotentes.

[0076] Véase FIG. 8. Como se muestra en la FIG. 8, los resultados de inmunofluorescencia muestran que las células madre pluripotentes obtenidas a través de OB expresaron SSEA-1 en la superficie y también expresaron Rex1.

[0077] Véase FIG. 9 que muestra el análisis de metilación de las islas CpG en la región promotora Oct4, en la que se metilaron las islas CpG de las células del donante, mientras que se desmetilaron significativamente las islas de CpG en las posiciones correspondientes de las células madre pluripotentes inducidas.

[0078] Véase FIG. 10, que muestra el análisis de metilación de las islas CpG en la región promotora Nanog, en la que OB-C14, OB-C15, y OB-C16 son tres células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdm1b. Las partes negras indican la metilación, y las partes blancas indican ausencia de metilación. Las islas de CpG de las células del donante se metilaron, mientras que las islas de CpG en las posiciones correspondientes de las células madre pluripotentes inducidas se desmetilaron significativamente; Nanog y Oct4 son genes que son expresados específicamente por las células madre embrionarias y sus estados de expresión están estrechamente relacionados con el destino de la célula. Estos resultados muestran que las células obtenidas mediante el uso del grupo OB habían cambiado el destino, es decir, que se indujeron en células madre pluripotentes.

[0079] Véase FIG. 11 que muestra que las células madre obtenidas por el método de la presente invención tenían cariotipos normales, en los que OB-14, OB-C15, y OB-C16 son tres células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdm1b y tienen cariotipos normales.

[0080] Véase FIG. 4. Como se muestra en la FIG. 4, a y d son las microfotografías de las células madre pluripotentes inducidas finalmente formadas por Oct4 + Jhdm1b (abreviados como OB); b y e son las fotografías de la descendencia quimérica que se desarrollan después de las células madre pluripotentes inducidas finalmente formadas por OB se inyectan en la blástula; c y f son fotografías de la descendencia que se generan después de que las quimeras se aparearon con ratones de tipo salvaje, en los que las quimeras se desarrollan después de las células madre pluripotentes inducidas finalmente formadas mediante el uso de OB se inyectan en la blástula. Esto demuestra que las células madre obtenidas por el método de la presente invención pueden formar quimera, en la que las células del donante son células madre pluripotentes inducidas originadas a partir de células OG2/129, mientras que los ratones pseudoembarazados son ratones ICR alimentados en el laboratorio. Las quimeras fueron capaces de transmitir las células donantes originales a la descendencia a través de la línea germinal, lo que indica que dichas células madre tienen buena calidad.

[0081] Determinación de las funcionalidades de variantes Jhdm1b:

Consulte la FIG. 12. Como se muestra en la FIG. 12, las variantes Jhdm1b que están mutadas no tienen la actividad de mejorar la eficiencia de reprogramación, por lo que el dominio de unión de ADN(CXXC) y el dominio catalítico (JM1C) de Jhdm1b son necesarios para la reprogramación y una falta de cualquiera de ellos dejará de promover el proceso de reprogramación. Es más, la combinación de Oct4 con Jhdm1b puede completar reprogramación en un medio de cultivo común, y logra efectos más significativos en presencia de vitamina C.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0082]

<110> Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences

<120> Method for increasing the efficiency of inducing pluripotent stem cells

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

ES 2 627 799 T3

<210> 1

<211> 3486

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 1

10 atggaacctg aagaagaaag gattcgggtac agccagagat tgcgtggtac catgctcgt 60

15 cgctatgaag atgatggcat ttcagatgat gaaattgaag ggaaaagaac tttgacttg 120

gaagagaagc tccaaaccaa caaatataat gccaattttg ttacttttat ggagggaaaa 180

20 gattttaatg tagagtatat ccagcggggg ggcttgagag accctctcat ttcaagaat 240

ictgatggac ttggaataaa gatgccggat ccagacttca cagtgaatga tgcataaatg 300

25 tgtgtgggga gtcgtcggat ggtggatgtc atggatgtga acacacagaa ggggattgaa 360

atgaccatgg cacaatggac acgatactat gagactccag aggaagagcg agaaaaactc 420

30 tataatgta tcagcctaga gtttagccac accaggcttg agaatatggt gcagcggcct 480

35 tccacgggtg attcattga ctgggtagat aacatgtggc caaggcactt gaaagaaagt 540

cagacagaat caacaaatgc catcttagag atgcagtacc ctaaagtgca aaagtactgt 600

40 ctaatgagtg ttcgaggctg ctatactgac ttccatgtgg attttggagg tacttctgtt 660

tggtatcaca tccaccaagg tggaaaggtc ttctggctca tccccctac agcccacaac 720

45 ctggagctgt acgagaattg gctgctatca gggaaacagg gagacatctt tctgggtgac 780

cgggtgtcag attgccaacg aattgagctc aagcagggtc ataccttctg tattectca 840

50 ggttggatc atgctgtgta tactcctaca gacacattag tgtttggagg caatTTTTT 900

55 catagcttca acatccccat gcaattaaag atatacagca ttgaagatcg aacacggggt 960

60

65

ccaataaaf tccgtlaacc aittlaacta gaaatgtgtt ggtatgtgtt ggagcgctat	1020
gtatactgca taaccaaccg atcccaccta actaaggatt ttcagaaaga atcccitagg	1080
atggatatgg agttaaatga gttggagtct ggaastggtg atgaggaagg ggtggacaga	1140
gaagcccgcac gcafgaaca taagcgatct gtgcttacca gooctgttgc taatggagtg	1200
aaactggatt acgatggact tggcaaagcc tgcggaagtc ttccaagtct gaagaaaact	1260
ttgtctggag actcactctc agactctacc cggggatccc acaatggcca agtttggat	1320
cccgaatga gcoctaaaaa ggataggcaa gtgcactca cccatttga actigaaggt	1380
cttcgatgc tttagataa gttagagta ctgcactgc acaagaagtg tgtcccaca	1440
ggaatagaag acgaagatgc tctgattct gatgtaaaga tttgtctgga agaactgcc	1500
agtgcgac ccaagttagc cctcactgga gtccctatag tacagtggcc aaaaagggat	1560
aaactaaat tccctaccag gccaaagggt agggttccta caatcccat cacaagcct	1620
cacaccatga agccagctcc acgcttaaca cctgtaagcc ctgctgcagc ctcccact	1680
gtgtcaggag ccaggccggag aagagtggcg tgcaggaaat gcaagcttg tgtcaagga	1740
gaatgtggag tctgccacta ctgcaggac atgaagaat ttggtggacc tggacgatg	1800
aaacatcct gtgtccctcc acagtgttta gcaccagac tgcctcattc agttaagtgt	1860
tctctctgtg gagaagtga tcagaatga gagaccagg actttgaaaa gaaactcatg	1920
gaatgtgca tctgcaacga gatagttcat cctgctgccc tccagatgga tggagagggg	1980
ttgtgaacg aggaattgcc aaattgctgg gagtgtccaa agtgttacca ggaagacagc	2040
tggacaaag ccagangcg gaaaataga gagagtgatg aagaagctgt acaagocaaa	2100
gtcttaccgc cctgaggag ctgcgaggag cctctcacc ccccgctca ctacctact	2160
tccatgtgc agctcacc caacccggtt tctcccggg gtatggtagc tggctcacc	2220
cttggggctg gccccagcga ccaccacagt gccagccgtg atgaacgctt caaacggcgg	2280
cagtgtctgc gctacaagc caccgagcgc accatggtac gggnaangga gaacaatcc	2340
agcggcaaaa aggagctgtc tgaagttgag aaagccaaga tccggggatc gtacctact	2400
gtcactctac agagcccac caagagctc cacgggacat ccattgtgcc caagetgcag	2460

gcaatcaagg cctcctctgc caacctctgc cctaaccccc gcgtgctaat gcagcaactgc 2520
 5 ccagocccgaa acccccagca tggggatgag ggggggcttg gggggagagga ggagggaagag 2580
 gggggggagg aggaagatga cagtgcagag ggggggggtg cagccaggct gaatggccgg 2640
 10 ggcaatggg ctcaggatgg agaccgaaagc tggatgcagc gggaggctc gatgctcgc 2700
 ttccgtacc tcagocgcaa agaacttigi gaatgtatgc gagtgtgcaa gacatggtat 2760
 15 aaatgggtct gtgataaacg actttggaca aaaatgact tgagttagtg taaggccatc 2820
 gtaaccacaag ctcicagtgg tateatcaag oggcagccag taagccctga cctcagctgg 2880
 20 actaacatct ccaaaaagca gctgacatgg ctggtcaata ggctgccagg attaaaagac 2940
 ctcctctag caggtcttc ctggtctgca gtatctgccc tcagcaette cagctgcccg 3000
 25 ctctcagga ccttgaact tgggtgggca gtaggaatta aagaacctca aattcgggac 3060
 ttgtgactc caccacaga taagccaggc caagacaatc gaagcaaac cgggaacatg 3120
 30 actgacttc ggctggcagg cctgacatc acagatgcta ctcctcgact caicatctgc 3180
 cacatgccc tttgtctctg acttgacctc agtactgca gtcacctac agatcagtc 3240
 35 tcaacctac taactctgt egggtcttc actcgatact ccttacaga gctcaatag 3300
 gcaggltgca ataaatgac agaccagacc ctgtctctc taaggcgaat tctaatgtc 3360
 40 acctgatig accttcagg atgcaaacg atcagagaa aagcctgiga gcacttcac 3420
 tcagactgt ccaatcaacg cctctactgc ctgtctgat gaaaactgat acagaagatt 3480
 45 agctaa
 3486
 <210> 2
 50 <211> 3930
 <212> DNA
 <213> | Secuencia Artificial
 55 <400> 2
 atggaggcag agaaagactc tggagaaga ttgcgtgcca ttgaccgcca gagatcagac 60
 60 gagaacgaag actgtcggc cgtggaggaa attgtcagcg tccgtggctt cagcctggag 120
 gagaagctac gtgcccatt ataccagggg gacttcgtgc atgctatgga aggcaagat 180

ttaactatg agtacgtaca gagagaagct cacagggtcc cccgtggttt tggggacaag 240
 gatggactag ggalcaaat gccagacct gatftacag tccgagact caaactcctg 300
 gggggagacc gccgtttggt ggatgtcatg gaggtaaca cccagaaggg taccgagatg 360
 agcatgtccc agttgtgcg ctactacgag acaccagagg cacagcggga taaactgtac 420
 aacgtcaaa gccctgagtt cagccaaag aagctggagc atctggtaaa gcgtccact 480
 ggggtggacc tggtcactg ggtggacaac atggggcctc agcatctaaa ggaaaagcag 540
 acagaagcca ccaatgacct tgcagagatg aagtaacca aagtgaanaa gtactgtctg 600
 atgagcgtga agggctgttt cactgactc cacatgaet ttggaggcac ctccgtgtg 660
 taccatgtgt tccgtggtag caagatcttt tggctgctcc ctccaaacct gcacaactg 720
 gctttgacg aggagtggtt gctgctggc aaacagagcg acactctct gggagaccgc 780
 ggggaacct gccaaagaat tgagctgaag caaggctaca ccttttcat ccttccggt 840
 tggatccatg cggttatac gcctgtggac tctctggtgt tggcgggaa catctgcat 900
 agctcaacg tgcocatga gctggggatc tacgagatc agzacaggac ccgggttcag 960
 cccaagttc gtaacccctt ctactatgag atgtctgtt atgtcttggg gagatgtg 1020
 tactgttga cccagcctc ctactact caggaatacc agagagaatt atgtctat 1080
 gatgcccaaa gaaaaaccag tglagacggc ttftatccg actctggct ggacatggag 1140
 gaggagctt gcgagcagca gccacaggag gaagaggagg aggaggagga caaggaggag 1200
 gaaggagatg gtgcagtaa aacacccaag ccaccaccg atgacccac ctaccacc 1260
 agcaccacc ccgaagacca ggacagcaca gggagaagc ctatagccc tgcatacgg 1320
 ttcccaaga ggacgtgtc caatgagca gaggaaagt tcaagtcac ctggtccc 1380
 accgacgac ccaagacgc cacggctcc ccggccacc aggtttctac caagtggact 1440
 cactttacc aattgaact gaaggcttg aaagccctgg ttgaaaagt agagtccct 1500
 ccggagaata agaatgtgt cccgagggg atcgaggacc cccagacct cctggaagt 1560
 gtaagaatg tactgaaga gcactggat gacgaccca cctggccat caccggggtc 1620
 cctgtggta gcggccaaa gaaactgca aagaaccgg tgggggtc gcctaaggg 1680

aagtggggcc cggccctcagc ggtgaagttg gctgccaaac gaacacacagc aggagctcgc	1740
aggcggccgga cgggatgocg caagtgcgag gcctgcctgc ggacggagtg tggagagigc	1800
cacttttgca aggacatgaa gaagtttggg ggtcctggggc gcatgaagca gagctgcac	1860
atggggcaat gcctcggcc agtgcctgcc cacaccggcg tctgccttgt gtgtggcgag	1920
gcagggaaag aggacacagt ggaagaggaa gaaggcaatg ttaacctcat gctcatggaa	1980
tctccatct gcaacgagat cacacacct ggaigccita agatgaagga atcggagggt	2040
gtggtaacg atgagcttcc caactgcctg gagtgtccga agtgiaacca tgcgggcaag	2100
accgggaaac aaaagcgtgg ccctggcttt aagtatgoc tcaacctgoc tggctccttg	2160
cicaaggagc agaagatgaa ccgggacaac aaggaaagggc aagagcctgc caagcggaga	2220
agtgagtggt aagaggctcc ccgtcggagg tcagacgggc accccaaaaa ggtgcctgca	2280
gatggcacc ccggccgaaa gctgatgat gtgcacctga ggaggaaagc gaaatcagag	2340
aaqccccaa agctgagtgg acgcaagcga gcctcggcgc tcaaaagtc cccgggttcc	2400
tcctctacc tctcggcgag gcccctctca ggacgcagtc tcagcccttg gtggagatcc	2460
agctcaact acttccagca gcagctaaaa ccctggcaag aagataagct ttccaggaaa	2520
aagcggcggt ccctggaaag cgtgaggat cgtctgtcac tggccaaaa gccccttgg	2580
cgcttaagc aggaaccgga ggacgaltg cctgaggcac ctctaaagac ccgggagagt	2640
gatcagtcac gttccagctc acccactgct ggltccagca ctgagggggc tgaaggocca	2700
gaagagaaga aaaaggtgaa gatgcggcgg aagcggcgac ttgttaaaa ggaactgagc	2760
aaagactaa gcaaggaget caacctgag atccaaaaga cggagagcac ccctggctac	2820
gagagccagc agcccataa gtcagagctt gagagcgaga accagcagcc caagaggccc	2880
ttaagccact gcgagcgccc ccaccgctc agcaaaagggc tcaacggcac acctcgggag	2940
ctggggcaat cgttgggacc tggcctgctt agtccacctc gtgttatgtc ccggcccccg	3000
ccctctcat ccccaccaa gtgcacctag atggagcgtc acgtgatccg gccaccgccc	3060
atcagcccc caactgactc gctgcacctg gatgatggag cagccccagt catgcatagg	3120
gaggtgtgga tggcngctt cagctacctc agccaccgag acctgtgtgt ctgcatggg	3180

	gictgcagga cctggaaccg ctggtgctgc gataageggt tctggaccg catcgacctg	3240
5	aacctctgca agtccatcac accctgatg ctgagcggta tcatccggcg acagcctgtc	3300
	tcccttgacc tcagttggac caacatctcc aagaagcagc tgagttggct catesaccgg	3360
10	tggctgggc tccgagactt ggtgctgca ggctgctcat ggaicgctgt ctacgcccic	3420
	tgtagctcca gttgtcaat gctccggacc ctggatgtcc agtgggtaga aggactaaag	3480
15	gatgccaga tgagggaict cctgtctcca cccacagaca acaggccagg tcagatggac	3540
	aatcggagca agctccggaa caitgtagag ctgcgcctag ctggcctgga cctcacagat	3600
20	gctcccctgc ggctcaattat tggcctatg cccctgctct cgaagctcca actcagttac	3660
	tgtaacaca tcaatgacca gtcacatcac ctgctactg ccgtcggcac caccaccga	3720
25	gactcctga cagaggcca cctatcagc tctaataagg taactgaact gtcctctcc	3780
	tcttcaaac gctgtggaaa tactgtcat attgacctga ggtactgcaa gcaagtcacc	3840
30	aaggaggct gtagcaatt calagctgaa atgctctga gtttccaatt tgggcaagtg	3900
35	gaagagaaac tctgcnaaa actaagttag	3930

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

40

<400> 3
atggaggcag agaaagactc t 21

45

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

50

<400> 4

55

tct 23
<210> 5
<211> 25
<212> DNA

ES 2 627 799 T3

<213> Secuencia Artificial

<400> 5

atggaacctg aagaagaaag gattc 25

5

<210> 6

<211> 25

<212> DIVA

10

<400> 6

ttagctaadc ttctgtatca gttc 25

<210> 7

<211> 1162

15

<212> PRT

<213> Ser humano

<400> 7

20

Met Glu Pro Glu Glu Glu Arg Ile Arg Tyr Ser Gln Arg Leu Arg Gly
1 5 10 15

25

Thr Met Arg Arg Arg Tyr Glu Asp Asp Gly Ile Ser Asp Asp Glu Ile
20 25 30

30

Glu Gly Lys Arg Thr Phe Asp Leu Glu Glu Lys Leu His Thr Asn Lys
35 40 45

35

Tyr Asn Ala Asn Phe Val Thr Phe Met Glu Gly Lys Asp Phe Asn Val
50 55 60

40

Glu Tyr Ile Gln Arg Gly Gly Leu Arg Asp Pro Leu Ile Phe Lys Asn
65 70 75 80

45

Ser Asp Gly Leu Gly Ile Lys Met Pro Asp Pro Asp Phe Thr Val Asn
85 90 95

50

Asp Val Lys Met Cys Val Gly Ser Arg Arg Met Val Asp Val Met Asp
100 105 110

55

Val Asn Thr Gln Lys Gly Ile Glu Met Thr Met Ala Gln Trp Thr Arg

60

65

ES 2 627 799 T3

115	120	125	
Tyr Tyr Glu Thr Pro Glu Glu Glu Arg Glu Lys Leu Tyr Asn Val Ile			
130	135	140	
Ser Leu Glu Phe Ser His Thr Arg Leu Glu Asn Met Val Gln Arg Pro			
145	150	155	160
Ser Thr Val Asp Phe Ile Asp Trp Val Asp Asn Met Trp Pro Arg His			
	165	170	175
Leu Lys Glu Ser Gln Thr Glu Ser Thr Asn Ala Ile Leu Glu Met Gln			
	180	185	190
Tyr Pro Lys Val Gln Lys Tyr Cys Leu Met Ser Val Arg Gly Cys Tyr			
195	200	205	
Thr Asp Phe His Val Asp Phe Gly Gly Thr Ser Val Trp Tyr His Ile			
210	215	220	
His Gln Gly Gly Lys Val Phe Trp Leu Ile Pro Pro Thr Ala His Asn			
225	230	235	240
Leu Glu Leu Tyr Glu Asn Trp Leu Leu Ser Gly Lys Gln Gly Asp Ile			
	245	250	255
Phe Leu Gly Asp Arg Val Ser Asp Cys Gln Arg Ile Glu Leu Lys Gln			
	260	265	270
Gly Tyr Thr Phe Val Ile Pro Ser Gly Trp Ile His Ala Val Tyr Thr			
275	280	285	
Pro Thr Asp Thr Leu Val Phe Gly Gly Asn Phe Leu His Ser Phe Asn			
290	295	300	
Ile Pro Met Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Ile Glu Asp Arg Thr Arg Val			
305	310	315	320

Pro Asn Lys Phe Arg Tyr Pro Phe Tyr Tyr Glu Met Cys Trp Tyr Val
 325 330 335

Leu Glu Arg Tyr Val Tyr Cys Ile Thr Asn Arg Ser His Leu Thr Lys
 340 345 350

Glu Phe Gln Lys Glu Ser Leu Ser Met Asp Leu Glu Leu Asn Gly Leu
 355 360 365

Glu Ser Gly Asn Gly Asp Glu Glu Ala Val Asp Arg Glu Pro Arg Arg
 370 375 380

Leu Ser Ser Arg Arg Ser Val Leu Thr Ser Pro Val Ala Asn Gly Val
 385 390 395 400

Asn Leu Asp Tyr Asp Gly Leu Gly Lys Thr Cys Arg Ser Leu Pro Ser
 405 410 415

Leu Lys Lys Thr Leu Ala Gly Asp Ser Ser Ser Asp Cys Ser Arg Gly
 420 425 430

Ser His Asn Gly Gln Val Trp Asp Pro Gln Cys Ala Pro Arg Lys Asp
 435 440 445

Arg Gln Val His Leu Thr His Phe Glu Leu Glu Gly Leu Arg Cys Leu
 450 455 460

Val Asp Lys Leu Glu Ser Leu Pro Leu His Lys Lys Cys Val Pro Thr
 465 470 475 480

Gly Ile Glu Asp Glu Asp Ala Leu Ile Ala Asp Val Lys Ile Leu Leu
 485 490 495

Glu Glu Leu Ala Asn Ser Asp Pro Lys Leu Ala Leu Thr Gly Val Pro
 500 505 510

Ile Val Gln Trp Pro Lys Arg Asp Lys Leu Lys Phe Pro Thr Arg Pro

ES 2 627 799 T3

Ser Met Leu Gln Leu Ile His Asp Pro Val Ser Pro Arg Gly Met Val
 725 730 735

Thr Arg Ser Ser Pro Gly Ala Gly Pro Ser Asp His His Ser Ala Ser
 740 745 750

Arg Asp Glu Arg Phe Lys Arg Arg Gln Leu Leu Arg Leu Gln Ala Thr
 755 760 765

Glu Arg Thr Met Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Pro Ser Gly Lys Lys
 770 775 780

Glu Leu Ser Glu Val Glu Lys Ala Lys Ile Arg Gly Ser Tyr Leu Thr
 785 790 795 800

Val Thr Leu Gln Arg Pro Thr Lys Glu Leu His Gly Thr Ser Ile Val
 805 810 815

Pro Lys Leu Gln Ala Ile Thr Ala Ser Ser Ala Asn Leu Arg His Ser
 820 825 830

Pro Arg Val Leu Val Gln His Cys Pro Ala Arg Thr Pro Gln Arg Gly
 835 840 845

Asp Glu Glu Gly Leu Gly Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 850 855 860

Glu Glu Asp Asp Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ala Ala Arg Leu Asn Gly
 865 870 875 880

Arg Gly Ser Trp Ala Gln Asp Gly Asp Glu Ser Trp Met Gln Arg Glu
 885 890 895

Val Trp Met Ser Val Phe Arg Tyr Leu Ser Arg Arg Glu Leu Cys Glu
 900 905 910

Cys Met Arg Val Cys Lys Thr Trp Tyr Lys Trp Cys Cys Asp Lys Arg

915	920	925	
Leu Trp Thr Lys Ile Asp	Leu Ser Arg Cys Lys Ala Ile Val Pro Gln		
930	935	940	
Ala Leu Ser Gly Ile Ile Lys Arg Gln Pro Val Ser Leu Asp Leu Ser			960
945	950	955	
Trp Thr Asn Ile Ser Lys Lys Gln Leu Thr Trp Leu Val Asn Arg Leu			975
965	970		
Pro Gly Leu Lys Asp Leu Leu Leu Ala Gly Cys Ser Trp Ser Ala Val			
980	985	990	
Ser Ala Leu Ser Thr Ser Ser Cys	Pro Leu Leu Arg Thr	Leu Asp Leu	
995	1000	1005	
Arg Trp	Ala Val Gly Ile Lys	Asp Pro Gln Ile Arg	Asp Leu Leu
1010	1015	1020	
Thr Pro	Pro Ala Asp Lys Pro	Gly Gln Asp Asn Arg	Ser Lys Leu
1025	1030	1035	
Arg Asn	Met Thr Asp Phe Arg	Leu Ala Gly Leu Asp	Ile Thr Asp
1040	1045	1050	
Ala Thr	Leu Arg Leu Ile Ile	Arg His Met Pro Leu	Leu Ser Arg
1055	1060	1065	
Leu Asp	Leu Ser His Cys Ser	His Leu Thr Asp Gln	Ser Ser Asn
1070	1075	1080	
Leu Leu	Thr Ala Val Gly Ser	Ser Thr Arg Tyr Ser	Leu Thr Glu
1085	1090	1095	
Leu Asn	Met Ala Gly Cys Asn	Lys Leu Thr Asp Gln	Thr Leu Ile
1100	1105	1110	

5 Tyr Leu Arg Arg Ile Ala Asn Val Thr Leu Ile Asp Leu Arg Gly
1115 1120 1125

10 Cys Lys Gln Ile Thr Arg Lys Ala Cys Glu His Phe Ile Ser Asp
1130 1135 1140

15 Leu Ser Ile Asn Ser Leu Tyr Cys Leu Ser Asp Glu Lys Leu Ile
1145 1150 1155

20 Gln Lys Ile Ser
1160

25 <210> 8
<211> 1309
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 8

30 Met Glu Ala Glu Lys Asp Ser Gly Arg Arg Leu Arg Ala Ile Asp Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Asp Glu Asn Glu Asp Leu Ser Asp Val Glu Glu Ile Val
20 25 30

35 Ser Val Arg Gly Phe Ser Leu Glu Glu Lys Leu Arg Ser Gln Leu Tyr
35 40 45

Gln Gly Asp Phe Val His Ala Met Glu Gly Lys Asp Phe Asn Tyr Glu
50 55 60

40 Tyr Val Gln Arg Glu Ala Leu Arg Val Pro Leu Val Phe Arg Asp Lys
65 70 75 80

Asp Gly Leu Gly Ile Lys Met Pro Asp Pro Asp Phe Thr Val Arg Asp
85 90 95

45 Val Lys Leu Leu Val Gly Ser Arg Arg Leu Val Asp Val Met Asp Val
100 105 110

Asn Thr Gln Lys Gly Thr Glu Met Ser Met Ser Gln Phe Val Arg Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Thr Pro Glu Ala Gln Arg Asp Lys Leu Tyr Asn Val Ile Ser
 130 135 140

Leu Glu Phe Ser His Thr Lys Leu Glu His Leu Val Lys Arg Pro Thr
 145 150 155 160

Val Val Asp Leu Val Asp Trp Val Asp Asn Met Trp Pro Gln His Leu
 165 170 175

Lys Glu Lys Gln Thr Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ala Glu Met Lys Tyr
 180 185 190

Pro Lys Val Lys Lys Tyr Cys Leu Met Ser Val Lys Gly Cys Phe Thr
 195 200 205

Asp Phe His Ile Asp Phe Gly Gly Thr Ser Val Trp Tyr His Val Phe
 210 215 220

Arg Gly Gly Lys Ile Phe Trp Leu Ile Pro Pro Thr Leu His Asn Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Tyr Glu Glu Trp Val Leu Ser Gly Lys Gln Ser Asp Ile Phe
 245 250 255

Leu Gly Asp Arg Val Glu Arg Cys Gln Arg Ile Glu Leu Lys Gln Gly
 260 265 270

Tyr Thr Phe Phe Ile Pro Ser Gly Trp Ile His Ala Val Tyr Thr Pro
 275 280 285

Val Asp Ser Leu Val Phe Gly Gly Asn Ile Leu His Ser Phe Asn Val
 290 295 300

ES 2 627 799 T3

Pro Met Gln Leu Arg Ile Tyr Glu Ile Glu Asp Arg Thr Arg Val Gln 320
 305 310 315

Pro Lys Phe Arg Tyr Pro Phe Tyr Tyr Glu Met Cys Trp Tyr Val Leu 335
 325 330

Glu Arg Tyr Val Tyr Cys Val Thr Gln Arg Ser Tyr Leu Thr Gln Glu 350
 340 345

Tyr Gln Arg Glu Leu Met Leu Ile Asp Ala Pro Arg Lys Thr Ser Val 365
 355 360

Asp Gly Phe Ser Ser Asp Ser Trp Leu Asp Met Glu Glu Glu Ser Cys 380
 370 375

Glu Gln Gln Pro Gln Glu Glu Glu Glu Glu Asp Lys Glu Glu 400
 385 390 395

Glu Gly Asp Gly Ala Asp Lys Thr Pro Lys Pro Pro Thr Asp Asp Pro 415
 405 410

Thr Ser Pro Thr Ser Thr Pro Pro Glu Asp Gln Asp Ser Thr Gly Lys 430
 420 425

Lys Pro Lys Ala Pro Ala Ile Arg Phe Leu Lys Arg Thr Leu Ser Asn 445
 435 440

Glu Ser Glu Glu Ser Val Lys Ser Thr Ser Met Pro Thr Asp Asp Pro 460
 450 455

Lys Thr Pro Thr Gly Ser Pro Ala Thr Glu Val Ser Thr Lys Trp Thr 480
 465 470 475

His Leu Thr Glu Phe Glu Leu Lys Gly Leu Lys Ala Leu Val Glu Lys 495
 485 490

Leu Glu Ser Leu Pro Glu Asn Lys Lys Cys Val Pro Glu Gly Ile Glu 510
 500 505

ES 2 627 799 T3

Asp Pro Gln Ala Leu Leu Glu Gly Val Lys Asn Val Leu Lys Glu His
 515 520 525

Val Asp Asp Asp Pro Thr Leu Ala Ile Thr Gly Val Pro Val Val Ser
 530 535 540

Trp Pro Lys Lys Thr Ala Lys Asn Arg Val Val Gly Arg Pro Lys Gly
 545 550 555 560

Lys Leu Gly Pro Ala Ser Ala Val Lys Leu Ala Ala Asn Arg Thr Thr
 565 570 575

Ala Gly Ala Arg Arg Arg Arg Thr Arg Cys Arg Lys Cys Glu Ala Cys
 580 585 590

Leu Arg Thr Glu Cys Gly Glu Cys His Phe Cys Lys Asp Met Lys Lys
 595 600 605

Phe Gly Gly Pro Gly Arg Met Lys Gln Ser Cys Ile Met Arg Gln Cys
 610 615 620

Ile Ala Pro Val Leu Pro His Thr Ala Val Cys Leu Val Cys Gly Glu
 625 630 635 640

Ala Gly Lys Glu Asp Thr Val Glu Glu Glu Glu Gly Lys Phe Asn Leu
 645 650 655

Met Leu Met Glu Cys Ser Ile Cys Asn Glu Ile Ile His Pro Gly Cys
 660 665 670

Leu Lys Ile Lys Glu Ser Glu Gly Val Val Asn Asp Glu Leu Pro Asn
 675 680 685

Cys Trp Glu Cys Pro Lys Cys Asn His Ala Gly Lys Thr Gly Lys Gln
 690 695 700

ES 2 627 799 T3

Lys Arg Gly Pro Gly Phe Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Pro Gly Ser Leu
705 710 715 720

Leu Lys Glu Gln Lys Met Asn Arg Asp Asn Lys Glu Gly Gln Glu Pro
725 730 735

Ala Lys Arg Arg Ser Glu Cys Glu Glu Ala Pro Arg Arg Arg Ser Asp
740 745 750

Glu His Pro Lys Lys Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu Arg Arg Lys Ser
755 760 765

Asp Asp Val His Leu Arg Arg Lys Arg Lys Tyr Glu Lys Pro Gln Glu
770 775 780

Leu Ser Gly Arg Lys Arg Ala Ser Ser Leu Gln Thr Ser Pro Gly Ser
785 790 795 800

Ser Ser His Leu Ser Pro Arg Pro Pro Leu Gly Ser Ser Leu Ser Pro
805 810 815

Trp Trp Arg Ser Ser Leu Thr Tyr Phe Gln Gln Gln Leu Lys Pro Gly
820 825 830

Lys Glu Asp Lys Leu Phe Arg Lys Lys Arg Arg Ser Trp Lys Asn Ala
835 840 845

Glu Asp Arg Leu Ser Leu Ala Asn Lys Pro Leu Arg Arg Phe Lys Gln
850 855 860

Glu Pro Glu Asp Asp Leu Pro Glu Ala Pro Pro Lys Thr Arg Glu Ser
865 870 875 880

Asp Gln Ser Arg Ser Ser Ser Pro Thr Ala Gly Pro Ser Thr Glu Gly
885 890 895

Ala Glu Gly Pro Glu Glu Lys Lys Lys Val Lys Met Arg Arg Lys Arg
900 905 910

Arg Leu Val Asn Lys Glu Leu Ser Lys Glu Leu Ser Lys Glu Leu Asn
 915 920 925

His Glu Ile Gln Lys Thr Glu Ser Thr Leu Ala His Glu Ser Gln Gln
 930 935 940

Pro Ile Lys Ser Glu Pro Glu Ser Glu Asn Asp Glu Pro Lys Arg Pro 96
 945 950 955

Leu Ser His Cys Glu Arg Pro His Arg Phe Ser Lys Gly Leu Asn Gly 975
 965 970

Thr Pro Arg Glu Leu Arg His Ser Leu Gly Pro Gly Leu Arg Ser Pro
 980 985 990

Pro Arg Val Met Ser Arg Pro Pro Pro Ser Ala Ser Pro Pro Lys Cys
 995 1000 1005

Ile Gln Met Glu Arg His Val Ile Arg Pro Pro Pro Ile Ser Pro
 1010 1015 1020

Pro Pro Asp Ser Leu Pro Leu Asp Asp Gly Ala Ala His Val Met
 1025 1030 1035

His Arg Glu Val Trp Met Ala Val Phe Ser Tyr Leu Ser His Arg
 1040 1045 1050

Asp Leu Cys Val Cys Met Arg Val Cys Arg Thr Trp Asn Arg Trp
 1055 1060 1065

Cys Cys Asp Lys Arg Leu Trp Thr Arg Ile Asp Leu Asn Arg Cys
 1070 1075 1080

Pro Val Ser Leu Asp Leu Ser Trp Thr Asn Ile Ser Lys Lys Gln
 1100 1105 1110

Leu Ser Trp Leu Ile Asn Arg Leu Pro Gly Leu Arg Asp Leu Val
 1115 1120 1125

Leu Ser Gly Cys Ser Trp Ile Ala Val Ser Ala Leu Cys Ser Ser
 1130 1135 1140

Ser Cys Pro Leu Leu Arg Thr Leu Asp Val Gln Trp Val Glu Gly
 1145 1150 1155

Leu Lys Asp Ala Gln Met Arg Asp Leu Leu Ser Pro Pro Thr Asp
 1160 1165 1170

Asn Arg Pro Gly Gln Met Asp Asn Arg Ser Lys Leu Arg Asn Ile
 1175 1180 1185

Val Glu Leu Arg Leu Ala Gly Leu Asp Ile Thr Asp Val Ser Leu
 1190 1195 1200

Arg Leu Ile Ile Arg His Met Pro Leu Leu Ser Lys Leu Gln Leu
 1205 1210 1215

Ser Tyr Cys Asn His Ile Asn Asp Gln Ser Ile Asn Leu Leu Thr
 1220 1225 1230

Ala Val Gly Thr Thr Thr Arg Asp Ser Leu Thr Glu Val Asn Leu
 1235 1240 1245

Ser Asp Cys Asn Lys Val Thr Asp Leu Cys Leu Ser Phe Phe Lys
 1250 1255 1260

Arg Cys Gly Asn Ile Cys His Ile Asp Leu Arg Tyr Cys Lys Gln
 1265 1270 1275

Val Thr Lys Glu Gly Cys Glu Gln Phe Ile Ala Glu Met Ser Val
 1280 1285 1290

Ser Val Gln Phe Gly Gln Val Glu Glu Lys Leu Leu Gln Lys Leu
1295 1300 1305

Ser

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a. la transferencia de un factor de transcripción y Jhdm1b en células adultas de mamífero que son luego cultivadas en un medio inductor a inducir clones de células madre pluripotentes, en el que el factor de transcripción es Oct4 solo, o una combinación de Oct4, Klf4, y Sox2, o una combinación de Oct4, Klf4, c-Myc, y Sox2;
- b. el cultivo y la expansión de los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre.
- 15 2. Un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas:
- 20 a. la transferencia de un factor de transcripción y Jhdm1b en células adultas de mamífero que son luego cultivadas en un medio inductor que contiene vitamina C para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que el factor de transcripción es Oct4 solo, o una combinación de Oct4 y Sox2, o una combinación de Oct4 y Klf4, o una combinación de Oct4, Klf4, y Sox2;
- b. el cultivo y la expansión de los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre.
- 25 3. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 2, que comprende los pasos siguientes:
- 30 a. la transferencia de un factor de transcripción y Jhdm1b en células adultas de mamífero que son luego cultivadas en un medio inductor que contiene vitamina C para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que el factor de transcripción es Oct4 solo, o una combinación de Oct4 y Sox2, o una combinación de Oct4 y Klf4, o una combinación de Oct4, Klf4, y Sox2;
- b. el cultivo y la expansión de los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre que contiene vitamina C.
- 35 4. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 2, **caracterizado porque** el factor de transcripción y Jhdm1b se codifican o no codificante ARN, proteínas o polipéptidos capaces de inducir células madre pluripotentes.
- 40 5. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de una cualquiera de la reivindicación 3 o 4, **caracterizado porque** la transferencia de Jhdm1b en células adultas de mamífero se consigue mediante la incorporación de un vector capaz de expresar Jhdm1b en las células.
- 45 6. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 5, **caracterizado porque** el vector es un vector viral, un vector plásmido, un vector episomal, o un vector de ARNm, o se sintetiza químicamente directamente.
7. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 5, **caracterizado porque** el vector viral es un retrovirus que es un vector pMXS.
- 50 8. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 1, **caracterizado porque** el Jhdm1b es un polipéptido para la modificación de desmetilación.
9. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 1, **caracterizado porque** las células adultas de mamífero son fibroblastos, células neuronales, células hematopoyéticas y células neurogliales.
- 55 10. El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 1, **caracterizado porque** las células adultas de mamífero son fibroblastos embrionarios de ratón.
- 60 11. Un método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas:
- 65 a. la transferencia de un factor de transcripción, Jhdmlb, y Jhdmla en células adultas de mamífero que son luego cultivadas en un medio inductor a inducir clones de células madre pluripotentes, en el que el factor de transcripción es Oct4 solo, o una combinación de Oct4 y Sox2, o una combinación de Oct4 y Klf4, o una combinación de Oct4, Klf4, y Sox2;

b. el cultivo y la expansión de los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre.

5 **12.** El método para aumentar la eficiencia de la inducción de células madre pluripotentes de la reivindicación 11, comprendiendo las siguientes etapas:

a. la transferencia de un factor de transcripción, Jhdmlb, y Jhdmla en células adultas de mamífero que son luego cultivadas en un medio inductor que contiene vitamina C para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que el factor de transcripción es Oct4;

10 b. el cultivo y la expansión de los clones de células madre pluripotentes inducidos en un medio de cultivo de células madre que contiene vitamina C.

15

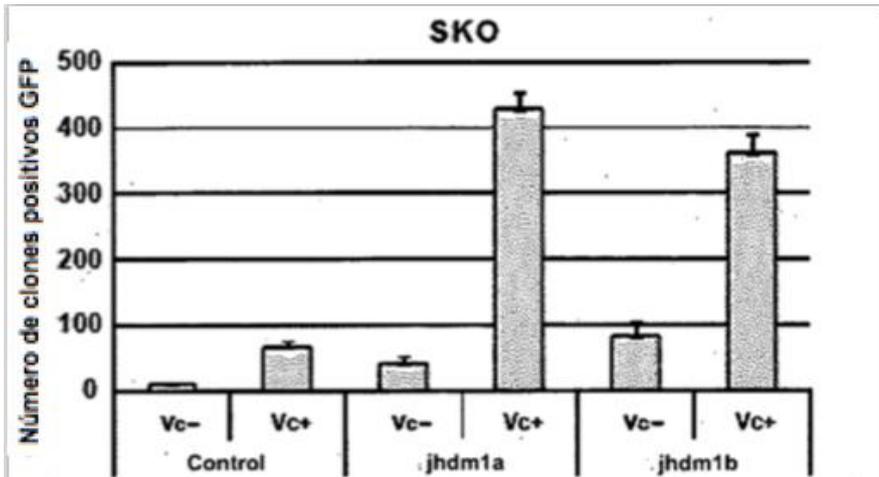


Fig. 1

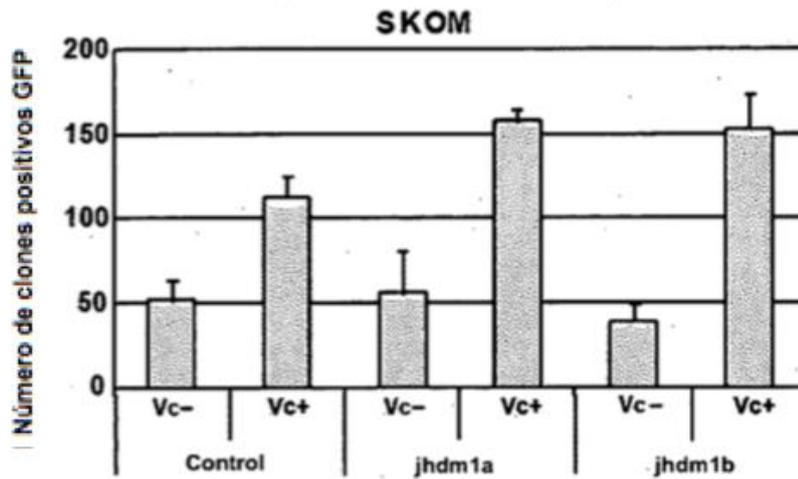


Fig. 2

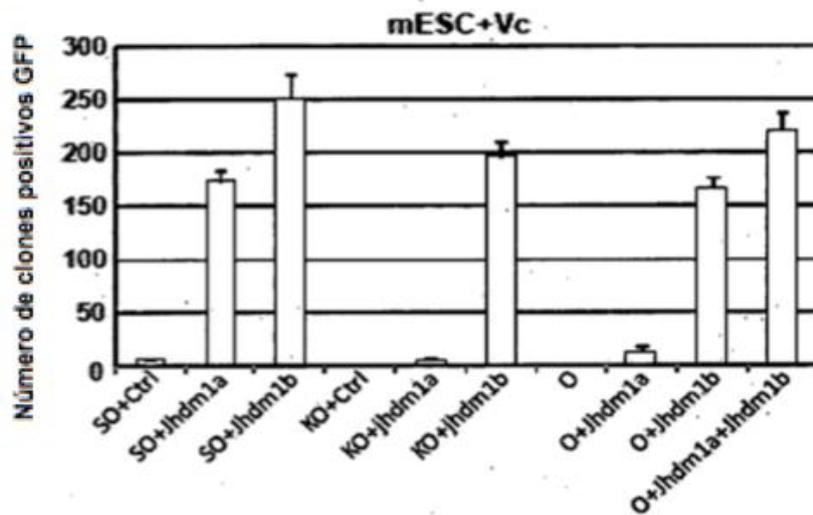


Fig. 3

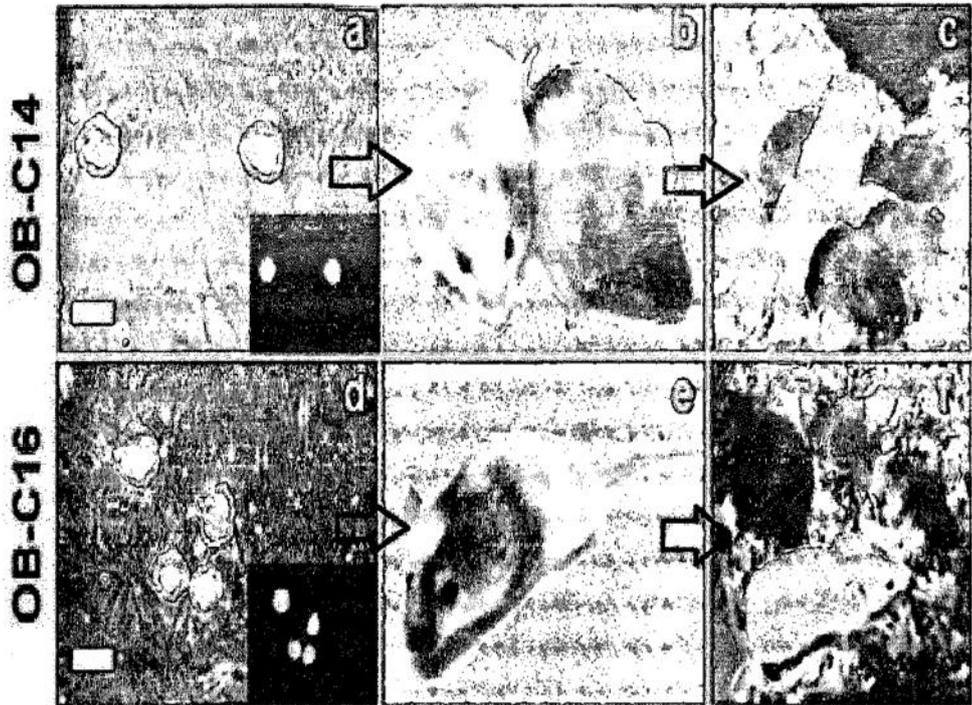


Fig. 4

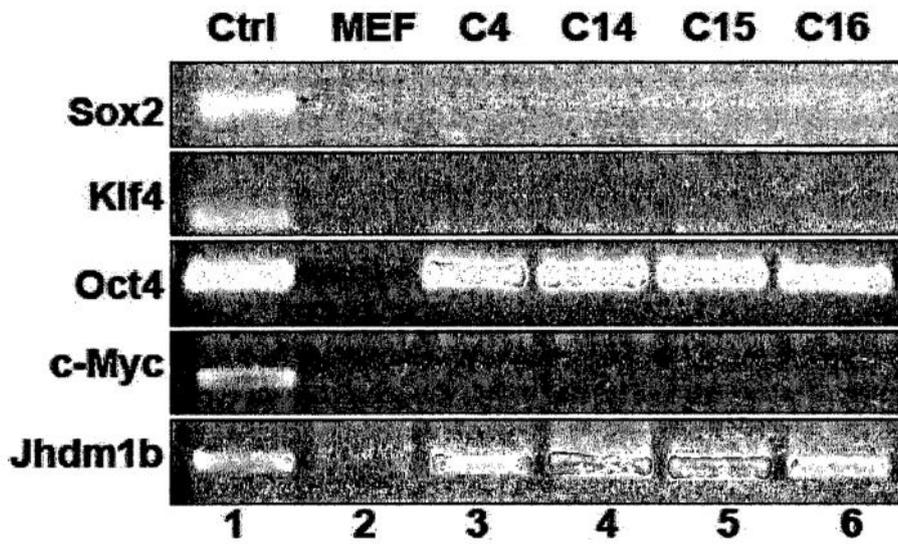


Fig. 5

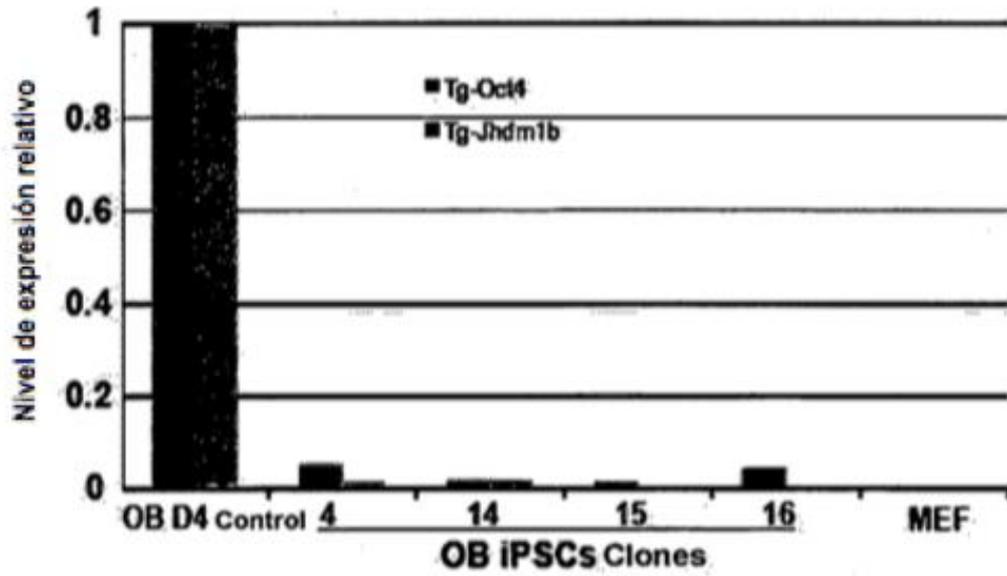


Fig. 6

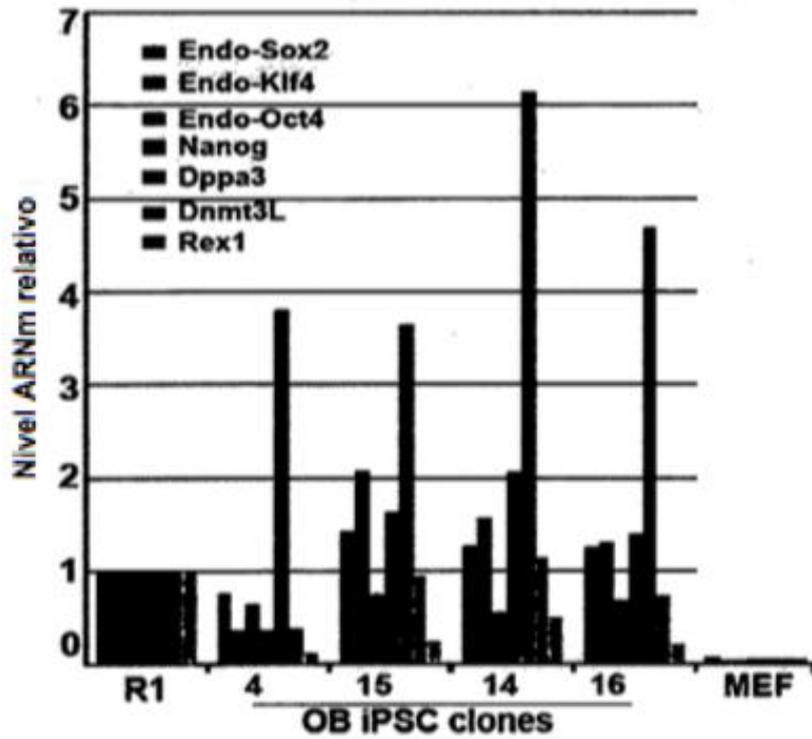


Fig. 7

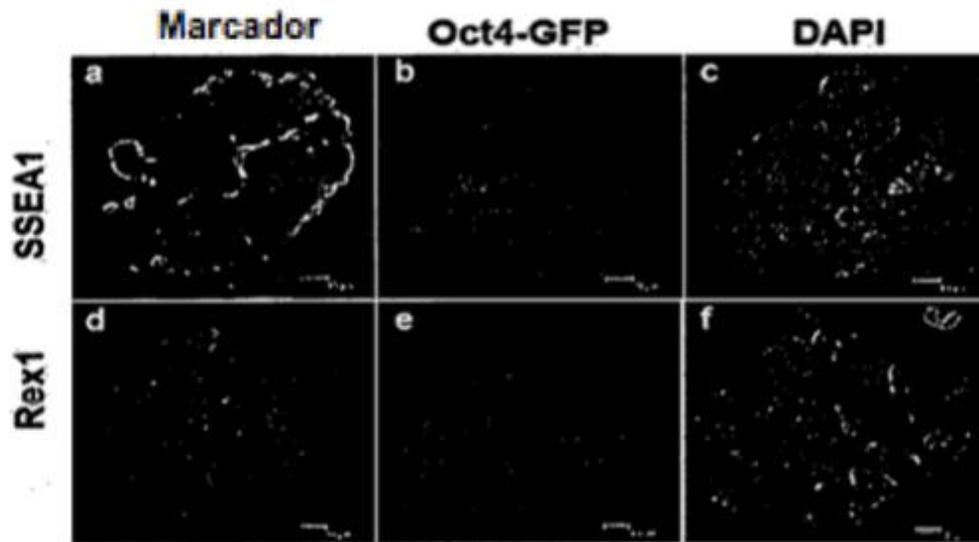


Fig. 8

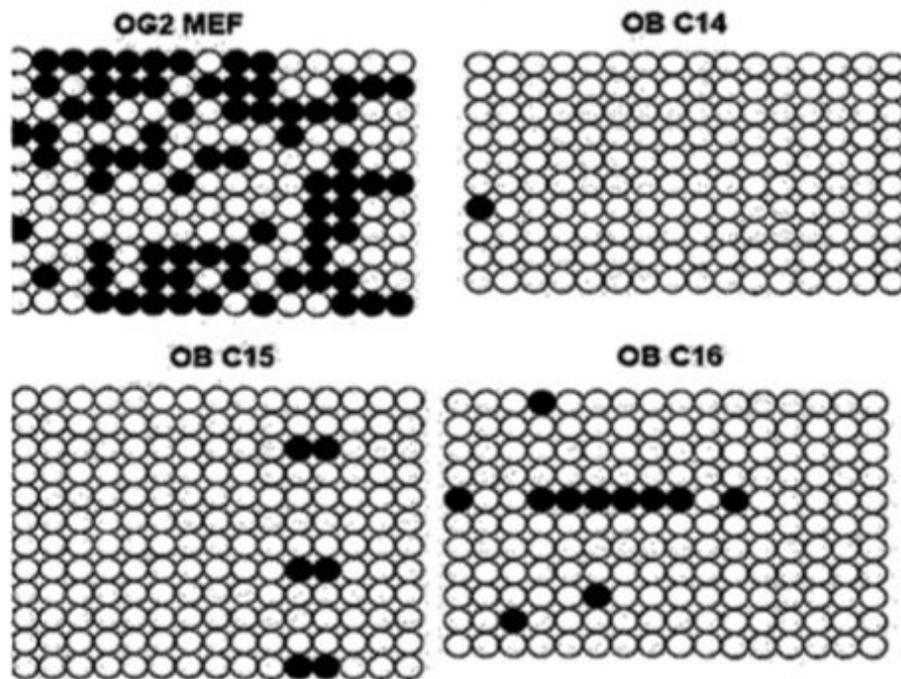


Fig. 9

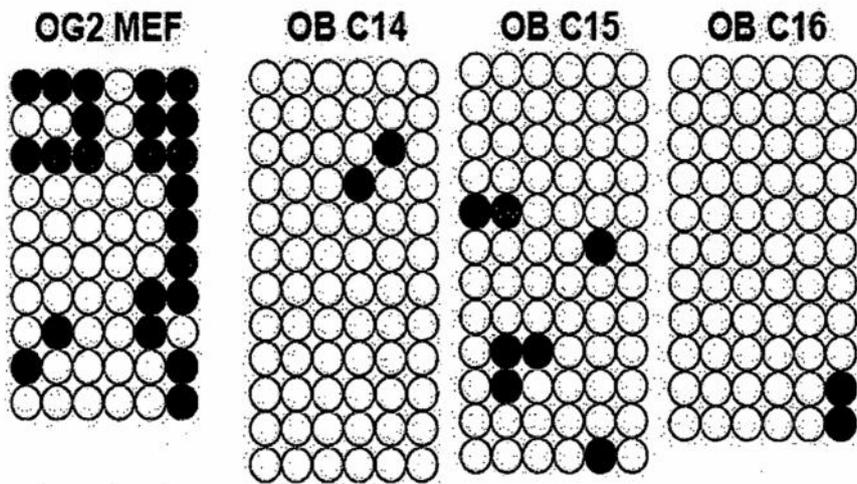


Fig. 10

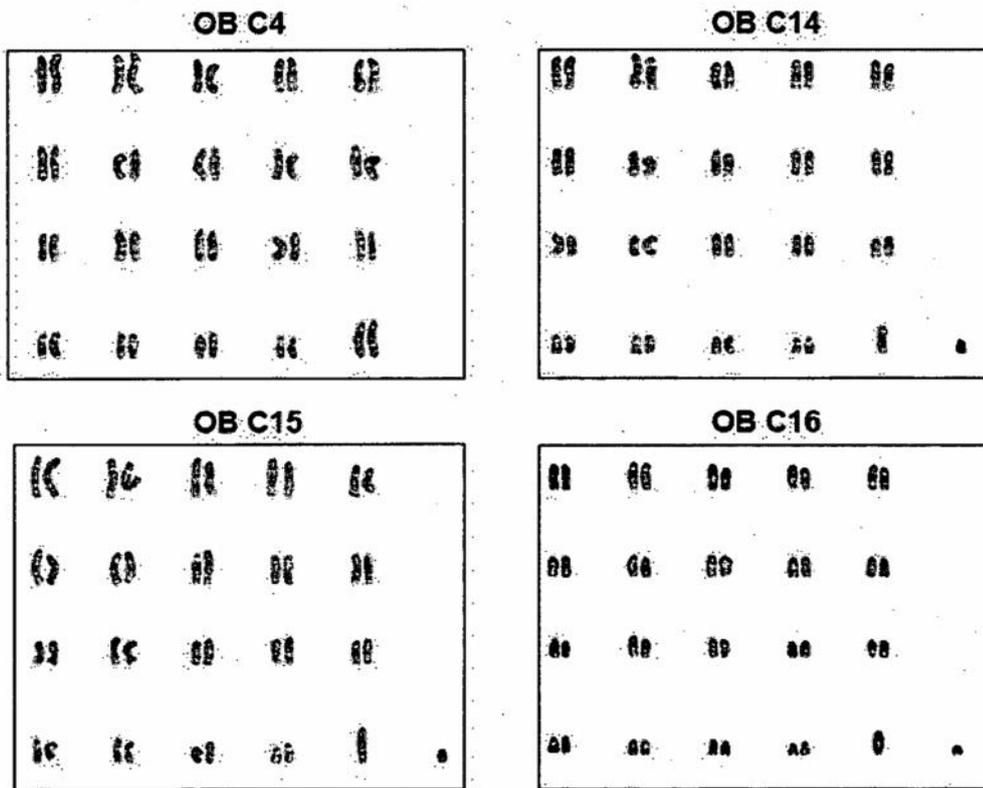


Fig. 11

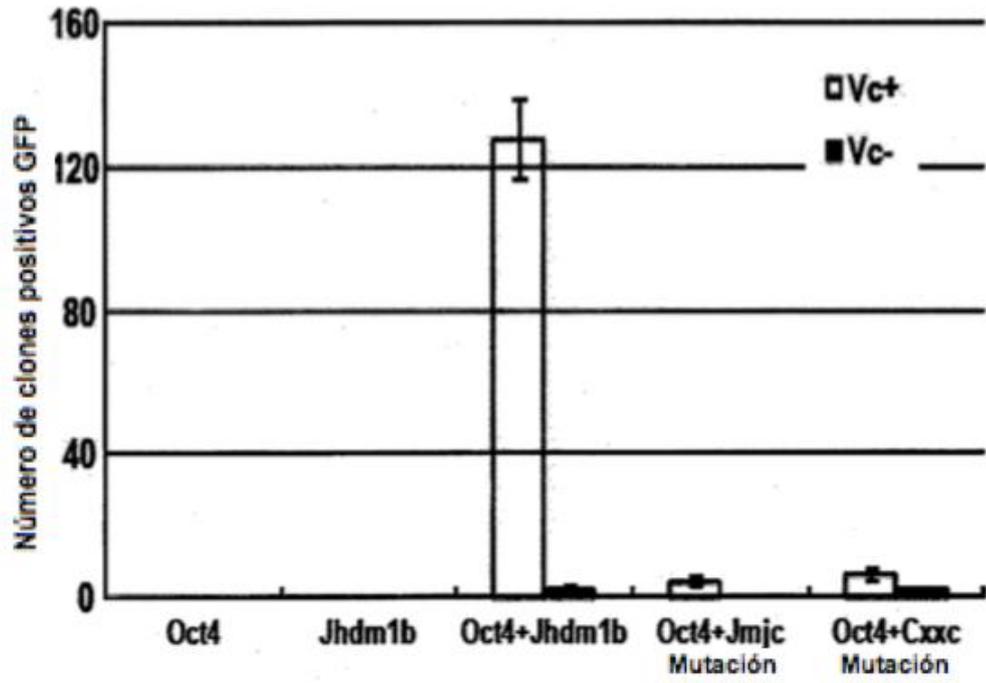


Fig. 12

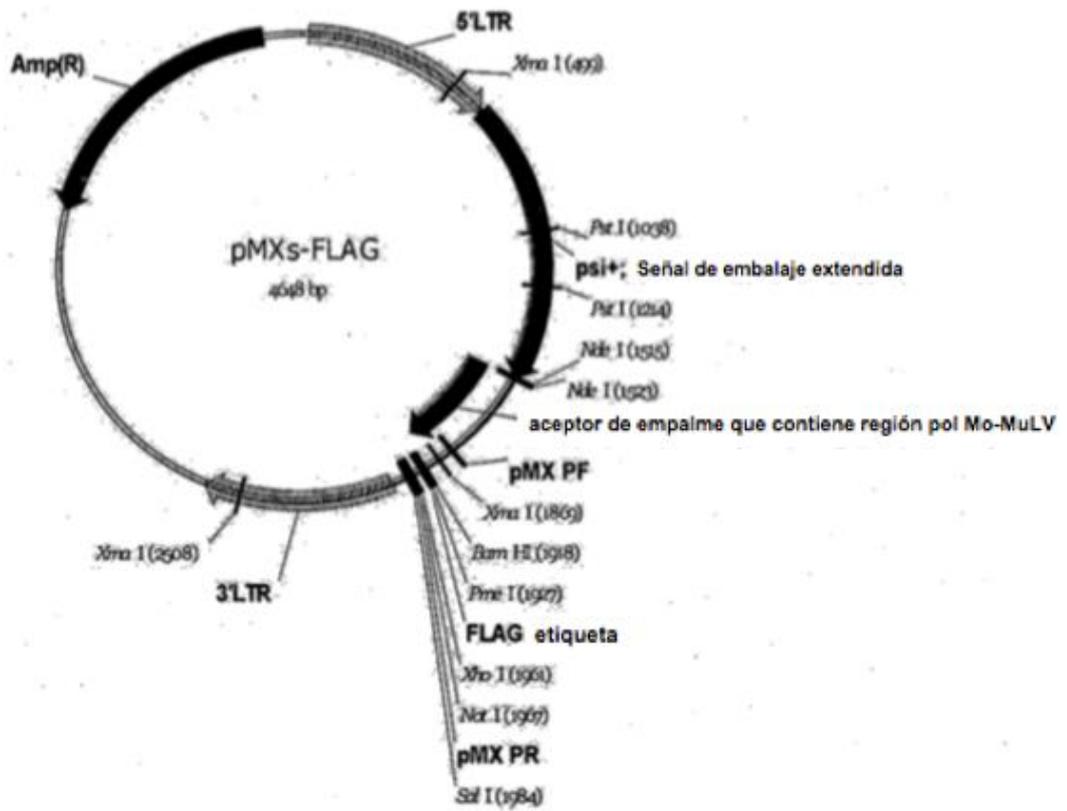


Fig. 13