

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 912**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2012 E 13167122 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2778222**

54 Título: **Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

21.10.2011 CN 201110323779

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

04.08.2017

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:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 628 912 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

Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes, y más particularmente, a un método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes utilizando genes *Jhdm1a* que modifican histona.

Antecedentes de la invención

10 China es un país populoso en el mundo y también tiene el mayor número de pérdidas, daños, insuficiencias y trastornos funcionales de órganos como resultado de traumatismo, enfermedad, envejecimiento y herencia. Las terapias médicas clásicas basadas en fármacos y cirugías no han satisfecho la tremenda demanda de medicina clínica. Como resultado, la terapia de trasplante de células madre y la medicina regenerativa atrae la atención de numerosas entidades de investigación y todos los sectores de la sociedad.

15 La terapia de trasplante de células constituye una importante dirección de investigación de la medicina regenerativa, y pueden usarse tipos específicos de trasplantes de células para tratar lesión cardíaca, enfermedades degenerativas del sistema nervioso, lesión de la columna vertebral, insuficiencia renal, enfermedades del sistema hematológico, etc. Sin embargo, la terapia de trasplante de células se enfrenta a muchos problemas intrincados tales como rechazo de injerto y fuentes limitadas de células.

20 La célula madre es un tipo de célula que puede renovarse por sí misma y que puede diferenciarse en diversas células funcionales en determinadas condiciones. Basándose en su fase 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 se diferencia completamente y tiene una función potencial para regenerarse en diversos tejidos y órganos en el cuerpo humano, por lo que se denomina "célula universal" en el campo de la medicina.

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

30 El estudio sobre la regulación del destino celular sólo está en estado de investigación de laboratorio y está lejos del ensayo clínico. Estas células transformadas obtenidas a través de la sobreexpresión de factores de transcripción todavía tienen muchos problemas de aplicación, por ejemplo, integración de secuencias virales, oncogenicidad potencial, la pureza de las células transdiferenciadas resultantes, y si pueden reponer células normales que resultan dañadas en determinadas condiciones y desempeñar sus papeles adecuados en el organismo.

35 La célula madre pluripotente inducida (iPS) es un tipo de célula que se asemeja a la célula madre embrionaria y tiene totipotencia de desarrollo. Adquiere las propiedades de la célula madre induciendo a la célula somática a través de inducir genes enriquecidos en ES específicos. En 2006, el científico japonés Yamanaka introdujo 24 genes candidatos en fibroblastos de ratón usando un vector basado en retrovirus, examinó las células positivas para *FBX15* por medio de determinar la resistencia de G418 a clones de iPS aislados similares a las células madre embrionarias, y finalmente identificó que 4 factores incluyendo *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* son suficientes para inducir células *FBX15*-iPS de ratón; en comparación con las células madre embrionarias, estas células son similares a las células madre embrionarias en los aspectos de forma del clon, capacidad de proliferación y capacidad para formar un teratoma, pero son diferentes de las células madre embrionarias en lo que se refiere a la expresión génica y al perfil de metilación genómica y no pueden obtener ratones quiméricos vivos. Después, este grupo y otros dos grupos cambiaron el método de examen, y usaron *Nanog* como patrón y obtuvieron iPS que son similares a las células madre embrionarias en muchos aspectos y estas iPS pueden producir descendencia quimérica. Recientemente, los dos grupos de investigación confirmaron independientemente, mediante una prueba de complementación tetraploide, que las células iPS de ratón pueden desarrollarse en un individuo y poseen totipotencia de desarrollo.

50 Siguiendo el método de inducir iPS de ratón, en 2007, cada uno de los dos grupos, Yamanaka [8] y Yu Junying [9], reprogramaron satisfactoriamente células somáticas humanas para dar células iPS, en las que los primeros transdujeron *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* en fibroblastos epidérmicos humanos usando un retrovirus, mientras que los segundos incorporaron *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* en células de prepuccio usando un lentivirus. Tanto el análisis del perfil de expresión génica como el análisis sobre la metilación de las regiones promotoras de los genes *Oct3/4* y *Nanog* mostraron que la línea celular iPS humana es muy similar a la línea de células madre embrionaria correspondiente, y todas las células pueden desarrollarse dando 3 capas germinales cuando se inyectan en el organismo de un ratón atómico. Además, las células somáticas pueden inducirse satisfactoriamente para dar iPS en rata, cerdo y mono, además de en ratón y ser humano.

Las células que pueden reprogramarse satisfactoriamente no sólo se limitan a fibroblastos, y también pueden inducirse satisfactoriamente muchos otros tipos de células adultas para dar células iPS, incluyendo células beta del páncreas, células madre neuronales adultas, hepatocitos, células gástricas, células B maduras, células hematopoyéticas, meningocitos, células madre derivadas de tejido adiposo, células de sangre del cordón umbilical, células positivas para CD34 de sangre periférica y queratinocitos. Para las células en diferentes fases de diferenciación, las dificultades para inducir las y reprogramarlas para dar IPS son diferentes. Pongamos las células hematopoyéticas de ratón como ejemplo: la eficacia de reprogramación de las células madre hematopoyéticas y de las células progenitoras hematopoyéticas puede ser de hasta 28 que es 300 veces la de las células T y las células B diferenciadas de manera terminal.

En la inducción de IPS, a menudo incorporar un gen exógeno en las células por medio de un retrovirus y un lentivirus es lo que proporciona una eficacia de transducción génica muy alta. Sin embargo, la integración de la secuencia viral en el genoma de la célula puede dar como resultado mutagénesis por inserción génica e incluso carcinogénesis, por lo que este método de introducción de genes que tiene riesgos potenciales es obviamente desfavorable para su aplicación en la técnica de iPS en el campo de la medicina regenerativa. Por tanto, un grupo de estudio diferente usó vectores de no integración para inducir IPS y tuvieron éxito. Estos factores incluyen un vector de adenovirus, un vector de expresión común, un transposón, un vector de episoma y un vector de ADN de ADN minicircular.

Tanto la combinación de Sox2, Klf4, Oct3/4 y c-Myc como la combinación de Sox2, Oct3/4, Nanog y Lin28 pueden inducir satisfactoriamente la generación de IPS. Estudios adicionales encontraron que c-Myc no es esencial para reprogramación y los tres factores de transcripción incluyendo Sox2, Klf4 y Oct3/4 son suficientes para accionar la reprogramación de células somáticas humanas y de ratón. Las células madre neurales expresan endógenamente altos niveles de Sox2, Klf4 y c-Myc, por lo que sólo es necesario incorporar Oct3/4 exógeno con el fin de inducir satisfactoriamente IPS. Entre los factores de transcripción usados en la reprogramación, Sox2, Klf4 y c-Myc pueden sustituirse todos ellos por otros miembros de la misma familia, por ejemplo, Klf2 y Klf5 pueden sustituir a Klf4; Sox1 y Sox3 pueden sustituir a Sox2; N-Myc y L-Myc pueden sustituir a c-Myc; pero Oct1 y Oct6 no pueden sustituir a Oct4. Esrrb se une directamente a la proteína Oct3/4 para regular la auto-regeneración y la totipotencia de las células madre, y en la reprogramación, Esrrb puede sustituir a Klf4 para inducir IPS en combinación con Sox 2 y Oct3/4. Oct3/4 es un factor de factor de transcripción muy importante en la reprogramación. Estudios recientes encontraron que los receptores nucleares LRH-1 (Nr5a2) y Nr5a1 pueden sustituir a Oct3/4 y pueden inducir células adultas de ratón para dar IPS en combinación con Klf4 y Sox2.

Sin embargo, hasta ahora, hay varias combinaciones diferentes de factores de transcripción que pueden reprogramarse, incluyendo Oct4, Klf4, Sox2 y C-Myc; Oct4, Nanog, Lin28, Sox2; Sox2, Klf4, y Lrh1; Oct4 y bml1, así como genes relacionados con la reprogramación tales como esrrb y tbx3. Para las combinaciones de factores de transcripción requeridas por métodos de reprogramación existentes, es necesario incorporar hasta 3 ó 4 factores de transcripción y la eficacia de inducción es baja. Cómo reducir el número de factores de transcripción a la vez que se mantiene una alta eficacia de reprogramación es de mayor importancia para reducir la acumulación de mutaciones celulares en la reprogramación y para mejorar la capacidad de funcionamiento de la técnica de reprogramación. Además, la búsqueda de genes que sustituyan a factores de transcripción comunes facilita el estudio del mecanismo de reprogramación y la mejora de la técnica de reprogramación.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de reducir el número de factores de transcripción a la vez que se mantiene una alta eficacia de reprogramación, reduciendo la acumulación de mutaciones de célula en la reprogramación y mejorando la capacidad de funcionamiento de la técnica de reprogramación.

Para lograr este objetivo, se adopta la siguiente solución técnica para proporcionar un método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes, que comprende las etapas siguientes:

a. transferir un factor de transcripción y Jhdm1a a células adultas de mamífero que entonces se cultivan en un medio de inducción para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que las células adultas de mamífero son fibroblastos embrionarios de ratón, el medio de inducción incluye medio DMEM con alto contenido en glucosa, suero bovino fetal 15, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, β-mercaptoetanol 55 μM, penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 μg/ml y factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml, y el factor de transcripción es una combinación de Oct4, Klf4 y Sox2, o una combinación de Oct4, Klf4, Sox2 y C-Myc.

Preferiblemente, el método comprende además la etapa b: cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre que es el medio de inducción tal como se describe en la etapa a.

Preferiblemente, la transferencia de Jhdm1a a células adultas de mamífero en el método mencionado anteriormente se logra mediante la incorporación de un vector que puede expresar Jhdm1a en las células.

Preferiblemente, el vector en el método mencionado anteriormente es un vector viral y un vector de plásmido.

Preferiblemente, el vector viral en el método mencionado anteriormente es un retrovirus que es un vector pMXs.

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

- 5 a. transferir un factor de transcripción y Jhdm1a a células adultas de mamífero que entonces se cultivan en un medio de inducción para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que las células adultas de mamífero son fibroblastos embrionarios de ratón, el medio de inducción incluye medio DMEM con alto contenido en glucosa, suero bovino fetal 15, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 55 μM, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 μg/ml, factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml y, y 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.

Preferiblemente, el método mencionado anteriormente comprende además la etapa b: cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre que es el medio de inducción tal como se describe en la etapa a.

- 15 Preferiblemente, la transferencia de Jhdm1a a células adultas de mamífero en el método mencionado anteriormente se logra mediante la incorporación de un vector que puede expresar Jhdm1a en las células.

Preferiblemente, el vector en el método mencionado anteriormente es un vector viral y un vector de plásmido.

Preferiblemente, el vector viral en el método mencionado anteriormente es un retrovirus que es un vector pMXs.

- 20 Los efectos beneficiosos de la presente invención son los siguientes: utilizando los polipéptidos Jhdm1b y Jhdm1a que modifican histona, y un factor de inducción de células madre, la presente invención aumenta la eficacia de inducción de células madre pluripotentes y aumenta la calidad de las células madre pluripotentes inducidas. El presente método logra mejores efectos usando menos tipos de factores de inducción de células madre en comparación con los métodos existentes de inducir células madre pluripotentes. Preferiblemente, el método de la presente invención usa Oct4, Klf4 y Sox2, Oct4 y Klf4, Oct4 y Sox2 u Oct4 solo. El método de la presente invención comprende además exponer las células a vitamina C, lo que aumenta adicionalmente la eficacia de inducción de células madre pluripotentes en comparación con el caso en que no se usa vitamina C. Mediante el uso de menos factores de reducción de células madre, el método de la presente invención reduce la carcinogénesis potencial, obtiene una alta eficacia de inducción y proporciona células madre pluripotentes inducidas de alta calidad que pueden realizar transmisión de línea germinal.

Breve descripción de dibujos

- 30 La figura 1 muestra datos que indican que Jhdm1a o Jhdm1b aumenta la eficacia de inducción de células madre pluripotentes mediada por SKO, en los que el control es un vector vacío pMXs-FLAG donde no se inserta ninguna secuencia génica;

la figura 2 muestra datos que indican que Jhdm1a o Jhdm1b promueve la eficacia de reprogramación mediada por SKOM;

- 35 la figura 3 muestra que en presencia de vitamina C, Jhdm1a y Jhdm1b actúan juntos para permitir la reprogramación usando sólo SO, KO y Oct4;

en la figura 4, a y d son microfotografías de las células madre pluripotentes inducidas que se forman finalmente usando Oct4+Jhdm1b (abreviado como OB); b y e son fotografías de descendencia quimérica que se desarrolla una vez que las células madre pluripotentes inducidas formadas finalmente usando OB se inyectan en la blástula; y c y f son fotografías de la descendencia que se genera una vez que las quimeras se aparean con ratones de tipo silvestre, en las que las quimeras se desarrollan una vez que las células madre pluripotentes inducidas formadas finalmente usando OB se inyectan en la blástula);

- 45 la figura 5 muestra los resultados de la amplificación por PCR de los ADN genómicos de los clones de células madre pluripotentes, que indican que en los genomas de los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15 y C16, sólo se integran Oct4 y Jhdm1b, en los que el control son los ADN genómicos extraídos de células infectadas con Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc y Jhdm1b, y MEF indica ADN genómicos extraídos de fibroblastos embrionarios de ratón;

- 50 la figura 6 muestra los resultados de la PCR cuantitativa, que indican que los genes exógenos de los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15 y C16 se expresan de manera silenciosa, en los que el control de OB D4 es un molde de ADNc obtenido mediante transcripción inversa de ARNm extraídos de las células que se han infectado con Oct4 y Jhdm1b y se han cultivado durante 4 días, y MEF es el fibroblasto embrionario de ratón;

la figura 7 muestra los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real, que indican 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 el fibroblasto embrionario de ratón;

5 la figura 8 muestra los resultados de inmunofluorescencia, que indican que el clon de células madre pluripotentes inducidas por OB, C14 expresa el gen específico de células madre embrionarias Rex1 y el marcador de superficie específico de células madre embrionarias SSEA-1, en la que Marcador representa una molécula marcadora específica de células madre (es decir, Rex1 o SSEA-1);

la figura 9 muestra los resultados de análisis de la metilación medida de CpG en una región de Oct4 adyacente al promotor en fibroblastos embrionarios de ratón y células madre pluripotentes inducidas;

10 la figura 10 muestra los resultados de análisis de la metilación medida de CpG en una región de Nanog adyacente al promotor en fibroblastos embrionarios de ratón y células madre pluripotentes inducidas;

la figura 11 muestra los cariogramas de células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdm1b;

15 la figura 12 muestra las eficacias de inducir células madre pluripotentes mediante los diversos mutantes de Jhdm1b. La mutación de Jmjc implica mutar histidina en la posición 221, isoleucina en la posición 222 y ácido aspártico en la posición 223 para dar alanina; la mutación de CxxC implica mutar cisteína en las posiciones 586, 589 y 592 para dar alanina;

la figura 13 muestra el espectro del plásmido pMXs-FLAG.

Descripción detallada de la invención

20 Todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entienden los expertos habituales en la técnica. Para las definiciones y los términos de la técnica, un experto puede hacer referencia a, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, editado por by Ausubel, *et al*, John Wiley & Sons, 2009. Las abreviaturas de residuos de aminoácido son los códigos convencionales de 3 letras y/o 1 letra que se usan en la técnica para representar uno de los 20 L-aminoácidos comunes.

25 A pesar de las aproximaciones de parámetros e intervalos numéricos mostradas en el amplio alcance de la presente invención, los valores mostrados en las realizaciones específicas deben registrarse de la manera más exacta posible. Sin embargo, inevitablemente, cualquier valor debe contener un error determinado por sí mismo, que es atribuible a sus desviaciones estándar presentes en sus mediciones respectivas. Además, debe interpretarse que todos los intervalos dados a conocer en el presente documento cubren cualquier subintervalo de los mismos.

30 Los términos "polipéptido" y "proteína" usados en el presente documento pueden usarse de manera intercambiable para indicar una serie de al menos dos residuos de aminoácido que se interconectan entre sí a través de un enlace covalente (por ejemplo, enlace peptídico), que pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos. Particularmente, los polipéptidos descritos en el presente documento son polipéptidos de ser humano y/o ratón.

35 Los términos "variante", "variante de polipéptido" o "análogo" usados en el presente documento indican un polipéptido que es diferente del polipéptido original en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, deleciones, inserciones, fusiones, truncamientos o cualquier combinación de los mismos. El polipéptido variante puede ser completamente funcional o puede carecer de una o más funciones activas. El término "variante funcional" usado en el presente documento sólo contiene, por ejemplo, cambios conservadores o los cambios en residuos no críticos o regiones no críticas, y conserva las funciones del polipéptido original. La variante funcional puede contener adicionalmente la sustitución de aminoácidos similares, lo que da como resultado funciones sin cambiar o cambios de función insignificantes. Los aminoácidos que son importantes para las funciones pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por glicina (Cunningham, B. y Wells, J., Science, 244: 1081-1085, 1989). Los sitios que son cruciales para la actividad del polipéptido puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis estructural tal 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).

40 En algunas realizaciones de la presente invención, las variantes de Jhdm1a se seleccionan de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 70 (preferiblemente 80, 90, 95, 98 y 99) 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 comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 70 (preferiblemente 80, 90, 95, 98 y 99) a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos codificada por Jhdm1a es SEQ ID NO: 7.

55 El término "fragmento" usado en el presente documento se refiere a una molécula que es sólo una parte de una secuencia de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento polipeptídico de Jhdm1b es Jhdm1b truncado. Los fragmentos pueden contener una secuencia de cualquier extremo de la secuencia de longitud o una secuencia del centro de la secuencia de longitud completa. El fragmento puede ser un "fragmento funcional", por ejemplo, un

fragmento que conserva una o más funciones del polipéptido de longitud completa. El término “fragmento funcional” usado en el presente documento indica que dicho fragmento conserva las funciones del polipéptido de longitud completa, por ejemplo, inducir células madre pluripotentes o aumentar la eficacia de inducir células madre pluripotentes.

- 5 A menos que se indique otra cosa, cuando se mencionan polipéptidos, ácidos nucleicos u otras moléculas en el presente documento, incluyen variantes funcionales y fragmentos funcionales. Por ejemplo, Jhdm1b y Jhdm1a indican además las variantes funcionales y los fragmentos funcionales de Jhdm1b y Jhdm1a naturales, respectivamente.

- 10 El término “Jhdm1b” usado en el presente documento puede indicar un miembro de la familia de la histona desmetilasa que contiene el dominio JmjC (JHDM) que está conservada evolutivamente y se expresa ampliamente. También se denomina Fox110. En particular, dicho polipéptido es un polipéptido de ser humano y/o ratón.

El término “Jhdm1a” usado en el presente documento puede indicar otro miembro de la familia de la histona desmetilasa que contiene el dominio JmjC (JHDM). También se denomina Fbx111. En particular, dicho polipéptido es un polipéptido de ser humano y/o ratón.

- 15 El término “células madre pluripotentes inducidas” o “IPS” usado en el presente documento puede usarse de manera intercambiable para indicar células madre pluripotentes obtenidas induciendo artificialmente células no pluripotentes (tales como células somáticas). Dicha inducción se logra generalmente mediante la expresión forzada de un gen específico, y este procedimiento también se denomina “inducir células en células madre pluripotentes” en el presente documento.

- 20 El término “factor de inducción de células madre” usado en el presente documento indica un factor que puede inducir células para dar células madre pluripotentes por sí mismo solo o en combinación con otros factores, tales como proteínas, polipéptidos y ARN codificado o no codificante. Preferiblemente, el factor de inducción 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 de inducción de células madre se selecciona de uno o más de Oct4, Klf4, Sox2 y C-Myc. Más preferiblemente, el factor de inducción de células madre incluye al menos Oct4. En particular, el polipéptido es un polipéptido de ser humano y/o ratón.

El término “Oct4” usado en el presente documento indica un miembro de la familia de factores de transcripción de octámeros. Desempeña un papel crucial en mantener la pluripotencia de las células. En la bibliografía, Oct4 también se denomina Oct3.

- 30 El término “Klf4” usado en el presente documento indica un miembro de la familia de tipo Krüppel de factores de transcripción.

El término “Sox2” usado en el presente documento indica un miembro de la familia de Sox de factores de transcripción.

- 35 El término “c-myc” usado en el presente documento indica un factor de transcripción que conocen bien los expertos en la técnica. Regula la expresión de muchos genes y capta histona transacetilasa. Sus mutaciones están relacionadas con muchos cánceres.

El término “modificación de histona” usado en el presente documento indica una variedad de modificaciones para histona, tal como acetilación, metilación, desmetilación, fosforilación, adenilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación. En particular, la modificación de histona incluye la desmetilación de histona.

- 40 El término “objeto” usado en el presente documento 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, oveja, cerdo y caballo) o animales de laboratorio (tales como mono, rata, ratón, conejo y cobaya).

- 45 El término “consistencia”, “porcentaje de consistencia”, “homología” o “identidad” usado en el presente documento se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico. El porcentaje de consistencia puede determinarse mediante la alineación de dos secuencias, y se refiere al número de residuos idénticos (es decir, aminoácidos o nucleótidos) en las posiciones comunes a las secuencias comparadas. La alineación y comparación de secuencias puede llevarse a cabo mediante los algoritmos convencionales 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. Natl. Acad. Sci., USA, 85:2444) o una versión computerizada de esos algoritmos (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group 575 Science Drive, Madison, WI). La versión computerizada está disponible públicamente como BLAST y FASTA. Adicionalmente, ENTREZ disponible del Instituto Nacional de Salud (Bethesda MD) puede usarse para comparación de secuencias. Cuando se usan los programas BLAST y BLAST con huecos, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (tal como BLASTN, que está disponible del sitio de internet del Centro Nacional de Información Biotecnológica). En una realización, puede usarse GCG con valor de hueco de 1 para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias, de manera que a cada hueco de aminoácido se le da un valor como si

fuera un apareamiento erróneo de un solo aminoácido entre las dos secuencias. Alternativamente, puede usarse el programa ALIGN (versión 2.0), que es forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG (Accelrys, San Diego, CA).

5 El término “vector” usado en el presente documento se usa en el significado bien conocido por los expertos en la técnica y puede 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 episomas y vectores de ARNm, o pueden sintetizarse químicamente de manera directa. Preferiblemente, el vector de virus es un vector de retrovirus y/o lentivirus. Más preferiblemente, el retrovirus es un vector pMXs.

10 El término “excesivo” usado en el presente documento indica que se encuentra en una cantidad significativamente mayor que el nivel normal, e indica particularmente que la expresión de un polipéptido es estadísticamente mayor de manera significativa que en células normales. Preferiblemente, es mayor en 20, 50, 100, 200 o incluso 5, 10 ó 100 veces.

15 El término “sobrexpresión” usado en el presente documento indica que el nivel de expresión es significativamente mayor que el nivel normal, e indica particularmente que la expresión de un polipéptido es estadísticamente mayor de manera significativa que en células normales. Preferiblemente, es mayor en 20, 50, 100, 200 o incluso 5, 10 ó 100 veces.

20 El término “incorporación” usado en el presente documento indica a procedimiento para introducir sustancias exógenas (tales como ácidos nucleicos o proteínas) en células mediante por ejemplo, transfección de fosfato de calcio, infección de virus, transfección de liposomas, electroporación, pistola génica o similares.

En el presente documento, la administración de un polipéptido exógeno a las células puede llevarse a cabo mediante diversos métodos, por ejemplo, mediante transportadores o factores de transporte, y preferiblemente, mediante liposomas, fragmentos polipeptídicos bacterianos o similares (véase el documento WO2002/079417, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia).

25 Las células que pueden usarse en el método de la presente invención son preferiblemente células de mamífero, y más preferiblemente células de ser humano y ratón. En particular, las células son células somáticas, tal como células epiteliales, células neurales, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células hematopoyéticas, inmunocitos y linfocitos. Más particularmente, las células son células beta pancreáticas, células madre neuronales
30 derivadas de tejido adiposo, células de sangre de cordón umbilical, células positivas para CD34 de sangre periférica y queratinocitos.

Ejemplo 1

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

a. Diseño de cebadores para clonación

35 Se obtuvieron los datos de secuencia de ADNc de Jhdm1a y Jhdm1b de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, en los que la secuencia de la región codificante del ADNc de Jhdm1a es SEQ ID NO: 1, y la secuencia de la región codificante del ADNc de Jhdm1b es SEQ ID NO: 2. Las secuencias codificantes de Jhdm1a y Jhdm1b se amplificaron mediante el diseño de cebadores específicos.

La secuencia de base del cebador en el sentido de 5' de Jhdm1a se muestra como SEQ ID NO: 3;

40 La secuencia de base del cebador en el sentido de 3' de Jhdm1a se muestra como SEQ ID NO: 4;

La secuencia de base del cebador en el sentido de 5' de Jhdm1b se muestra como SEQ ID NO: 5;

La secuencia de base del cebador en el sentido de 3' de Jhdm1b se muestra como SEQ ID NO: 6;

b. Amplificación de secuencias codificantes mediante RT-PCR

45 Se extrajeron los ARNm totales de fibroblastos embrionarios aislados de ratón ICR (MEF) y células madre embrionarias HI humanas según el método siguiente: se retiró un medio de cultivo de una bandeja de cultivo, se aclararon las células con 3-5 ml de solución salina normal (PBS) (Gibco) y se desechó la disolución de aclarado. Entonces, se añadió 1 ml de lisado celular Trizol (Takara) en la bandeja de cultivo y se usó una pipeta para extraer la disolución de mezcla resultante y se soplaron suavemente las células de modo que se disolvieron completamente en el lisado. A continuación, se transfirieron a un tubo de centrifuga transparente de 1,5 ml para almacenarse a
50 -80°C o se sometieron inmediatamente a la siguiente etapa de extracción. Después, se añadieron al mismo 200 µl de triclorometano y se mezcló bien la mezcla girando el tubo hacia arriba y hacia abajo durante aproximadamente 30 segundos y luego se centrifugó a 4°C a 12000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a un tubo de centrifuga transparente de 1,5 ml y entonces se añadió al mismo un volumen igual de

- isopropanol. Se mezcló bien, se dejó estar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y entonces se centrifugó a 4°C a 12000 rpm durante 5 minutos, tiempo en el cual se encontró un pequeño precipitado blanco en el fondo del tubo. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante y a continuación se añadieron 500 µl de una disolución de etanol 80 en el tubo para aclarar el isopropanol residual. Se centrifugó el tubo a 12000 rpm para retirar la disolución de etanol. Se mantuvo el centrifugado a temperatura ambiente durante 30 minutos de modo que se secó completamente el ARNm total blanco en el fondo del tubo. A continuación, se añadieron 30-50 µl de agua destilada doble al tubo de centrifuga para incubar a 55°C durante 30 minutos. Después, se extrajo el tubo y se midió para determinar la concentración del ARNm total mediante un espectrofotómetro. Se almacenó el ARNm total extraído a -80°C o se usó directamente para preparar ADNc mediante transcripción inversa para su uso posterior.
- El procedimiento y el método específicos de transcripción inversa son tal como sigue. En general, se tomó 1 µg de ARNm total para realizar transcripción inversa, al que se añadió oligodT (Takara), dNTP (Takara), RTace (Toyobo), tampón RT y RRI (inhibidor de ARNasa, Takara), y se añadió agua libre de ARNasa/ADNasa. Se hizo reacción la mezcla con un instrumento de PCR a 42°C durante 60 minutos, se incubó a 98°C durante 5 minutos y entonces se enfrió hasta temperatura ambiente. Una vez obtenida con éxito la transcripción inversa, se extrajeron 0,5 µl de la reacción para actuar como molde para amplificar el gen diana mediante PCR usando los cebadores diseñados mediante el método anterior. Los reactivos usados incluyen polimerasa de alta fidelidad KOD y su tampón (Toyobo), dNTP (Takara) y cebadores. Se realizó el procedimiento siguiente en el instrumento de 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; se repitieron 2-4 etapas durante 32 veces.
- c. Construcción de plásmidos
- Véase la figura 13. Una vez completada la amplificación, se sometió el producto de PCR a electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron fragmentos de PCR usando un kit de extracción en gel (TIANGEN, DP214-03). Se usó el vector pMXs (adquirido de addgene, e insertado con múltiples sitios de clonación y secuencias y secuencias de marcaje FLAG). El vector pMXs modificado se denomina pMXs-FLAG, cuya presentación de plásmido se muestra en la figura 13. El vector se escindió con *pmeI* y se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal calf (CIAP) para evitar su auto-ligamiento. Se recuperó el vector tratado usando un kit de extracción en gel (TIANGEN, DP214-03) para su uso posterior. El vector pMX-FLAG y los fragmentos génicos de *Jhdm1a/Jhdm1b* se ligaron mediante un kit de ligamiento (Takara, kit de ligamiento de ADN), y entonces se usó el producto de ligamiento para transformar *E. coli* competentes. Se seleccionaron los clones positivos, se extrajeron los plásmidos y se secuenciaron, y finalmente se prepararon plásmidos a gran escala.
2. Introducción de las secuencias codificantes de *Jhdm1a/Jhdm1b* y la célula madre pluripotente induciendo el factor (factor de transcripción) en fibroblastos embrionarios de ratón
- A menos que se indique específicamente otra cosa, se llevó a cabo la reprogramación somática basada en ratón de la siguiente manera en todos los casos.
- Medio de cultivo
- El medio de cultivo para las células de la capa alimentadora, células MEF y células PlatE consiste en: medio DMEM basal con alto contenido en glucosa (Gibco), más suero bovino fetal 10 (FBS, PAA).
- Medio de inducción: la presente invención usó un medio de inducción que es convencional en el laboratorio, y la composición de un medio de inducción preferido incluye medio DMEM con alto contenido en glucosa (Gibco), suero bovino fetal 15 (FBS, Gibco), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (NEAA, Gibco), L-glutamina 2 mM (Glutamax, Gibco), piruvato sódico 1 mM (Gibco), β-mercaptoetanol 55 µM (β-ME, Gibco), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml), factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml (LIF, Millipore), y según sea necesario, vitamina C 50 µg/ml (sigma).
- Medio de cultivo de células madre: la presente invención usó un medio de cultivo de células madre que es convencional en el laboratorio, y preferiblemente el medio de cultivo de células madre mES, cuya composición de consiste en: medio DMEM con alto contenido en glucosa (Gibco) complementado con suero bovino fetal 15, aminoácidos no esenciales 0,1 mM (NEAA, Gibco), L-glutamina 2 mM (Glutamax, Gibco), piruvato sódico 1 mM (Gibco), β-mercaptoetanol 55 µM (Gibco), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 mg/ml), y factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml (LIF, Millipore). Se incorporó vitamina C 50 µg/ml (sigma) según fue necesario.
- Medio de cultivo libre de suero KSR: KSR, la abreviatura de Knockout Serum Replace (sustitutivo de suero Knockout), es un suero comercializado que sustituye al aditivo de cultivo de células madre y se usa como medio libre de suero KSR completo para cultivar clones de células madre o iPS, cuya composición consiste en: KNOCKOUT DMED (un medio basal con presión osmótica optimizada que es adecuada para cultivar células madre), un aditivo de KSR 15, aminoácidos no esenciales 0,1 mM (NEAA, Gibco), L-glutamina 2 mM (Glutamax, Gibco), piruvato sódico 1 mM (Gibco), β-mercaptoetanol 55 µM (β-ME, Gibco), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 mg/ml), factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml (LIF, Millipore). Todos los medios de cultivo de clonación y procesos de iPS están complementados con factor inhibidor de leucemia de leucemia (LIF, Millipore, nombre comercial: ESGRO, un factor

de crecimiento que inhibe la diferenciación de células madre de ratón) a una concentración final de 1000 U/ml.

3. Células para reprogramación

5 Todas las células somáticas para reprogramación son fibroblastos embrionarios de ratón OG2 (preparado en el laboratorio), cuyo número de pases no supera tres. Una propiedad del ratón OG2 es que hay una proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor de Oct4 que se expresa específicamente por las células madre. En la reprogramación, cuando se activa el Oct4 endógeno de los fibroblastos embrionarios de ratón de OG2, la proteína fluorescente verde se expresa de manera concomitante. Tal como se observa a través de un microscopio de fluorescencia, los agregados celulares clonados o células reprogramadas satisfactoriamente son verdes y es fácil comparar las eficacias de reprogramación en diferentes condiciones añadiendo directamente el número de clones reprogramados, es decir, el número de clones de fluorescencia verde, o analizando la proporción de células de fluorescencia verde a través de un citómetro de flujo.

Las células reprogramadas se prepararon tal como sigue. Se sembraron las células en placas de 12 pocillos (Corning) a una densidad de 20000 células por pocillo, y tras 6-18 horas, se infectaron con virus basándose el factor de reprogramación de ratón en la densidad y el estado de las células.

15 4. Preparación de virus

Los factores de transcripción para reprogramación incluyen el vector de retrovirus pMXs para ADNc de ratón Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (de Addgene, numerados Plásmido 13366, Plásmido 13367, Plásmido 13370 y Plásmido 13375 respectivamente); Oct4, número de registro de NCBI: NM_013663; Sox2, número de registro de NCBI: NM_011443; Klf4, número de registro de NCBI: 010637; y c-Myc, número de registro de NCBI: NM_001177353. Se transfectoron los plásmidos de factor de reprogramación en el vector pMX en las células de empaquetamiento viral (PlatE) usando un reactivo de transfección de fosfato de calcio preparado en el laboratorio, y el procedimiento específico es: se sembraron 7500000 células PlatE en una bandeja de cultivo de 10 cm de diámetro (Corning), y 12 horas después, se sustituyó el medio de cultivo antiguo por 7,5 ml de un medio de cultivo libre de penicilina/estreptomina, y entonces se colocaron las células en un incubador. A continuación, se preparó la mezcla de transfección: se tomaron 25 mg de de plásmidos y se colocaron en un tubo de centrífuga de 15 ml, y se añadió al mismo 156,25 µl de una disolución de cloruro de calcio 2 M secuencialmente y se añadió adicionalmente una cantidad apropiada de agua de modo que el volumen total del mismo fuera de 1,25 ml; se mezclaron bien y se añadieron la mismo 1,25 ml de una disolución de HBS; se mezcló bien la mezcla resultante inmediatamente, se permitió que reposara durante 2 minutos, y entonces se añadió gota a gota a una bandeja de cultivo de PlatE y se mezcló bien. 9-12 horas tras la transfección, se sustituyó el medio de cultivo antiguo por 10 ml de una disolución de cultivo recién preparada; 48 horas tras la transfección, se recogió la disolución de cultivo y se filtró con una membrana de filtro de 0,45 µm que iba a usarse como disolución viral para la primera infección; al mismo se añadió una disolución de cultivo recién preparada 24 horas después, y se recogió de nuevo la disolución de cultivo de este modo para usarse como disolución viral para la segunda infección.

35 5. Infección de células MEF con el virus

Se llevó a cabo la infección en dos rondas, en las que los factores de inducción usados infectaron las células simultáneamente, cada pocillo de las placas de 12 pocillos se infectó con 1 ml del virus, la segunda ronda de infección se llevó a cabo 24 horas tras la primera ronda de infección, y la disolución viral se sustituyó con el medio de cultivo mES (tal como se describió anteriormente) 24 horas tras la segunda ronda de infección. El día de la sustitución de disolución se registró como el día 0 (D0); en diferentes puntos de tiempo tras 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 de GFP usando un citómetro de flujo según se requirió por el experimento.

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

45 Se recogieron monoclonos del tipo de células madre embrionarias con forma hinchada y bordes claros usando agujas de vidrio y se transfirieron directamente a placas de cultivo (Corning) depositadas con células de la capa alimentadora (las células de la capa alimentadora son fibroblastos de ratón ICR tratados con mitamicina) antes del cultivo con el medio de cultivo KSR. En el día 2 tras la infección, se sustituyó el sistema de cultivo con un medio de inducción recién preparado, y después, se sustituyó el medio de inducción cada día hasta que se completó el experimento.

50 Basándose en el método anterior para producir clones de células madre, se llevaron a cabo los experimentos usando diferentes combinaciones de factores de inducción de células madre pluripotentes.

Las combinaciones de factores de inducción de células madre pluripotentes se describen a continuación:

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.

C4, C14, C15 y C16 son los cuatro clones recogidos de las células reprogramadas inducidas por OB.

5 Los resultados de los experimentos usando las combinaciones de factor de inducción de células madre son tal como sigue:

en referencia a la figura 1, independientemente de si estaba presente vitamina C o no, Jhdm1a o Jhdm1b mejoraron obviamente la eficacia de la reprogramación, y en presencia de vitamina C, la mejora fue más significativa. La figura 1 muestra los datos de que Jhdm1a o Jhdm1b mejoraron la eficacia de inducción de células madre pluripotentes mediado por SKO, en la que el control es un vector vacío pMXs-FLAG sin secuencia génica insertada en el mismo;

10

en referencia a la figura 2, independientemente de si estaba presente vitamina C o no, Jhdm1a o Jhdm1b mejoraron obviamente la eficacia de la reprogramación, y en presencia de vitamina C, la mejora fue más significativa. La figura 2 muestra los datos de que Jhdm1a o Jhdm1b mejoraron la eficacia de inducción de células madre pluripotentes mediado por SKOM, en la que el control es un vector vacío pMXs-FLAG sin secuencia génica insertada en el mismo;

15 en referencia a la figura 3, en presencia de vitamina C, Jhdm1b y Jhdm1b actuaron juntos para permitir la inducción de células madre pluripotentes sólo en disponibilidad de SO, KO u Oct4, en la que mESC+Vc indica que el medio de cultivo usado en la inducción es medio de cultivo de células madre mES complementado con vitamina C 50 µg/ml, y el control es un vector vacío pMXs-FLAG.

20 Por tanto, la presente invención alcanza la conclusión de que Jhdm1a y Jhdm1b pueden mejorar significativamente la eficacia de inducción de células madre pluripotentes, reducir enormemente los tipos de factores de transcripción requeridos para incorporarse a la vez que se mantiene una alta eficacia de reprogramación, lo que proporciona grandes beneficios para reducir la acumulación de mutaciones celulares reprogramadas y reducir su carcinogénesis. Además, el método de la presente invención también mejora la capacidad de funcionamiento de la técnica de reprogramación, reduce la dificultad operativa y facilita las aplicaciones médicas posteriores.

25 Ejemplo 2

Identificación de las células madre pluripotentes inducidas a partir del ejemplo 1:

Tal como se muestra en la figura 3 y de la figura 6 a la figura 10, se llevaron a cabo una series de experimentos de identificación 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, ensayo de inmunofluorescencia de sus marcadores de superficie, análisis del grado de metilación del promotor, identificación del cariotipo, formación de quimeras, etc.

30

Experimentos de PCR cuantitativa:

Todos los experimentos de PCR cuantitativa se realizaron en un instrumento de PCR cuantitativa 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, lectura del valor de fluorescencia, repetición durante 40 ciclos.

35

Análisis de metilación de la región promotora

El análisis se llevó a cabo mediante secuenciación con bisulfito sódico. Se extrajeron los ADN genómicos en las células diana (Promega, kit de purificación de ADN Wizard Genomic), se midió la concentración, se colocaron aproximadamente 2 µg de los ADN en un tubo de 1,5 ml EP donde se diluyeron con ddH₂O hasta 50 µl, al mismo se añadieron 5,5 µl de NaOH 3 M recién preparado, y se trató la disolución resultante en un baño de agua a 42°C durante 30 minutos; a continuación, se extrajo la disolución, se añadieron 30 µl de hidroquinona 10 mM (sigma) en la disolución de mezcla tras el tratamiento en baño de agua, y entonces se añadieron adicionalmente 520 µl de bisulfito sódico 3,6 M (Sigma, S9000) a la disolución tras el tratamiento en baño de agua; se envolvió el tubo EP con papel de lámina de aluminio exterior para evitar la luz, y se mezcló bien la disolución girando suavemente el tubo EP hacia arriba y hacia abajo; se añadieron al mismo 200 µl de aceite de parafina para impedir la evaporación de agua y la oxidación, y se trató la disolución en un baño de agua a 50°C en la oscuridad durante 16 horas.

45

A continuación, se colocó la punta de una pipeta por debajo de la capa de aceite de parafina para introducir la disolución de mezcla en un tubo de centrifuga transparente de 1,5 ml, y se recuperó el ADN modificado usando un sistema de purificación y retracción de ADN Wizard Cleanup de Promega (Promega, A7280), y entonces se almacenó a -20°C o se sometió a un experimento adicional. Se tomaron 50 ng de los ADN extraídos anteriores como molde para realizar la reacción de PCR. Después, se recuperó el producto de PCR mediante extracción en gel (TIANGEN, DP214-03), y entonces se ligaron y se transformaron el producto de PCR y un vector T (Takara). Se

50

seleccionaron los clones positivos y se enviaron a una empresa de secuenciación para la secuenciación y se compararon los resultados para analizar estadísticamente la metilación de las islas CpG.

Identificación del cariotipo de células iPS

La identificación del cariotipo de células iPS se realizó según el método siguiente: 2-3 horas antes de la recogida, se añadió a las células que iban a analizarse para determinar el cariotipo, 0,1 ml de colchicina 5 µg/ml (disponible comercialmente, con una concentración final de 0,1 µg/ml). Se mezclaron bien, se cultivaron adicionalmente durante 2-3 horas, se transfirieron a un tubo de centrifuga de 10 ml, y luego se centrifugaron a 1500-2000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadieron al tubo 8 ml de una disolución hipotónica (KCl 0,075 M, precalentado a 37°C). Se sopló el precipitado celular de manera homogénea y se colocó en un incubador a 37°C durante media hora. Al mismo se añadió 1 ml de un líquido estacionario recién preparado (una mezcla de metanol y ácido acético glacial a una razón de volumen de 3:1, disponible comercialmente). Se mezcló suavemente la mezcla resultante y se centrifugó a la misma velocidad de rotación durante el mismo periodo de tiempo que anteriormente. Se trasvasó el sobrenadante. Se añadieron al mismo 8 ml del líquido estacionario. Se mezclaron adecuadamente las células, se fijaron a temperatura ambiente durante al menos media hora, y se centrifugaron de nuevo. Se descartó el sobrenadante y se añadió al mismo un líquido estacionario recién preparado para mezclar adicionalmente las células durante al menos media hora (de manera deseable durante la noche). Al precipitado celular obtenido tras la centrifugación y la retirada del sobrenadante, se añadieron aproximadamente 0,2 ml de un líquido estacionario recién preparado, y se mezcló bien la mezcla resultante. Se vertió la suspensión celular resultante sobre portaobjetos enfriados previamente (es aconsejable verter 3 gotas de la suspensión celular sobre cada portaobjetos) que entonces se calentaron en una lámpara de alcohol. Entonces se enfriaron las células y se dispusieron en bandas.

Prueba de quimera de blástula

En la prueba de quimera de blástula, se inyectaron células iPS en el blastocite de ratones donantes, y entonces se trasplantaron las blástulas inyectadas a los úteros de ratones hembra pseudopreñadas para obtener ratones quiméricos. Se determinó si los ratones nacidos producían quimeras basándose en el color de su pelaje.

Se llevaron a cabo los experimentos según el método anterior y se analizaron los resultados tal como sigue:

en referencia a la figura 5, los resultados de amplificación por 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, sólo se integra Oct4 con Jhdm1b, en el que el control es son ADN genómicos extraídos de células infectadas con Sox2, klf4, oct4, cMyc y Jhdm1b, y MEF indica ADN genómicos extraídos de fibroblastos embrionarios de ratón;

en referencia a la figura 6, los resultados de la PCR cuantitativa muestran que los genes exógenos de los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15 y C16 se expresaron de manera silenciosa, en los que el control de OB D4 es un molde de ADNc obtenido mediante transcripción inversa de ARNm extraídos de células que se han infectado con Oct4 y Jhdm1b y se han cultivado durante 4 días, y MEF es fibroblasto embrionario de ratón;

en referencia a la figura 7. Tal como se muestra en la figura 7, los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real muestran que los clones de células madre pluripotentes inducidas por OB C4, C14, C15 y C16 expresaron genes específicos de células madre embrionarias, en los que R1 es la línea de células madre embrionarias de ratón y MEF es fibroblasto embrionario de ratón; el nivel de expresión de factores de transcripción de células madre embrionarias endógenas obtenidos usando la combinación de Oct4 con Jhdm1b fue sustancialmente coherente con el de 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 tanto indica que las células madre pluripotentes inducidas por el método de la presente invención tienen las características de células madre pluripotentes.

Referencia a la figura 8. Tal como se muestra en la figura 8, los resultados de inmunofluorescencia muestran que las células madre pluripotentes obtenidas a través de OB expresaban SSEA-1 sobre la superficie y también expresaban Rex1.

Referencia a la figura 9 que muestra el análisis de metilación de islas CpG en la región promotora de Oct4, en el que las islas CpG de las células donantes se metilaron, mientras que las islas CpG en las posiciones correspondientes de las células madre pluripotentes inducidas se desmetilaron significativamente.

Referencia a la figura 10 que muestra el análisis de metilación de islas CpG en la región promotora de Nanog, en el que OB-C14, OB-C15 y OB-C16 son tres células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdm1b. Las partes negras indican metilación y las partes blancas indican ausencia de metilación. Las islas CpG de las células donantes se metilaron, mientras que las islas CpG en las posiciones correspondientes de las células madre pluripotentes inducidas se desmetilaron significativamente; Nanog y Oct4 son genes que se expresan específicamente por células madre embrionarias y sus estados de expresión están estrechamente relacionados con el destino celular. Estos

resultados muestran que las células obtenidas usando el grupo OB tenían un destino cambiado, es decir, se indujeron para dar células madre pluripotentes.

5 Referencia a la figura 11 que muestra que las células madre obtenidas mediante el método de la presente invención tenían cariotipos normales, en las que OB-14, OB-C15 y OB-C16 son tres células madre pluripotentes inducidas por Oct4 y Jhdm1b y tienen cariotipos normales.

10 Referencia a la figura 4. Tal como se muestra en la figura 4, a y d son las microfotografías de las células madre pluripotentes inducidas formadas finalmente por Oct4 + Jhdm1b (abreviado como OB); b y e son las fotografías de descendencia quimérica que se desarrollan una vez que las células madre pluripotentes inducidas formadas finalmente mediante OB se inyectan en la blástula; c y f son fotografías de la descendencia que se generan una vez que las células madre pluripotentes inducidas formadas finalmente usando OB se inyectan en la blástula. Esto muestra que las células madre obtenidas mediante el método de la presente invención pueden formar quimeras, en las que las células donantes son células madre pluripotentes inducidas originadas a partir de células OG2/129, mientras que los ratones pseudopreñados son ratones ICR alimentados en el laboratorio. Las quimeras pudieron transmitir las células donantes originales a la descendencia a través de la línea germinal, lo que indica que tales células madre tienen buena calidad.

Determinación de las funcionalidades de variantes de Jhdm1b:

20 Referencia a la figura 12. Tal como se muestra en la figura 12, las variantes de Jhdm1b que están mutadas no tenían la actividad de mejorar la eficacia de reprogramación, por lo que el dominio de unión a ADN (CXXC) y el dominio catalítico (Jmic) de Jhdm1b son necesarios para la reprogramación y una carencia de cualquiera de ellos hará que no se promueva el proceso de reprogramación. Además, la combinación de Oct4 con Jhdm1b puede completar la reprogramación en un medio de cultivo común, y logra efectos más significativos en presencia de vitamina C.

Lista de secuencias

- 25 <110> Instituto Guangzhou de Biomedicina y Salud, Academia China de Ciencias
- <120> Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 30 <211> 3486
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <400> 1

atggaacctg aagaagaaag gattcgggtac agccagagat tgcgtggtac catgcgtcgt	60
cgctatgaag atgatggcat ttcagatgat gaaattgaag ggaaaagaac ttttgacttg	120
gaagagaagc tccaaaccaa caaatataat gccaaatttg ttacttttat ggagggaaaa	180
gattttaatg tagagtatat ccagcggggt ggcttgagag acccttcat tttcaagaat	240
tctgatggac ttggaataaa gatgccggat ccagacttca cagtgaatga tgtcaaatg	300
tgtgtgggga gtcgtcggat ggtggatgtc atggatgtga acacacagaa ggggattgaa	360
atgaccatgg cacaatggac acgatactat gagactccag aggaagagcg agaaaaactc	420
tataatgta tcagcctaga gtttagccac accaggcttg agaatatggt gcagcggcct	480
tccacgggtg atttcattga ctgggtagat aacatgtggc caaggcactt gaaagaaagt	540
cagacagaat caacaaatgc catcttagag atgcagtacc ctaaagtgca aaagtactgt	600
ctaatgagtg ttcgaggctg ctatactgac ttccatgtgg attttgagg tacttctgtt	660
tggtatcaca tccaccaagg tggaaaggtc ttctggctca tccccctac agcccacaac	720
ctggagctgt acgagaattg gctgctatca gggaaacagg gagacatctt tctgggtgac	780
cgggtgtcag atgccaacg aattgagctc aagcagggtc ataccttctg tattccctca	840
ggttgattc atgctgtgta tactcctaca gacacattag tgtttgagg caatttttg	900
catagcttca acatccccat gcaattaaag atatacagca ttgaagatcg aacacgggtt	960

ES 2 628 912 T3

ccaaataaat tccgttacc attttactat gaaatgtgtt ggtatgtgtt ggagcgctat 1020
 gtatactgca taaccaaccg atcccaccta actaaggatt ttcagaaaga atcccttagc 1080
 atggatatgg agttaaata gttggagtct ggaaatggtg atgaggaagg ggtggacaga 1140
 gaagcccgcac gcatgaacaa taagcgatct gtgcttacca gccctgttgc taatggagtg 1200
 aacctggatt acgatggact tggcaaagcc tgccgaagtc ttccaagtct gaagaaaact 1260
 ttgtctggag actcatcctc agactctacc cggggatccc acaatggcca agtttgggat 1320
 cccaatgta gccctaaaaa ggataggcaa gtgcatctca cccatttga acttgaaggt 1380
 cttcgatgic ttgtagataa gttagagtca ctgccactgc acaagaagtg tgtccccaca 1440
 ggaatagaag acgaagatgc tctgattgct gatgtaaaga tttgctgga agaacttgc 1500
 agtagcgcac ccaagttagc cctcactgga gtcctatag tacagtggcc aaaaagggat 1560
 aagcttaaat tcctaccag gccaaagggtg agggttccta caattccat cacaaagcct 1620
 cacaccatga agccagctcc acgcttaaca cctgtaaggc ctgctgcagc ctccccatt 1680
 gtgtcaggag ccaggcggag aagagtgcgg tgcaggaaat gcaaagcttg tgtgcaagga 1740
 gaatgtggag tctgccacta ctgcaggac atgaagaaat ttggtggacc tggacgcatg 1800
 aagcaatcct gtgtcctccg acagtgctta gcaccagac tgcctcattc agttacgtgt 1860
 tctctctgtg gagaagtaga tcagaatgaa gagaccagg actttgaaa gaaactcatg 1920
 gaatgctgca tctgcaacga gatagttcat cctggctgcc tccagatgga tggagagggg 1980
 ttgctgaacg aggaattgcc aaattgctgg gagtgtccaa agtgttacca ggaagacagc 2040
 tcggacaaag cccagaagcg gaaaatagaa gagagtgatg aagaagctgt acaagccaaa 2100
 gtcttacggc cctgaggag ctgagaggag cctctcacac cccgcctca ctacctact 2160
 tccatgctgc agctcatcca cgaccgggtt tctccccggg gtatggtgac tcggtcatcc 2220
 cctggggctg gccccagcga ccaccacagt gccagccgtg atgaacgctt caaacggcgg 2280
 cagttgctgc ggctacaagc caccgagcgc accatggtac gggaaaagga gaacaatccc 2340
 agcggcaaaa aggagctgtc tgaagttgag aaagccaaga tccggggatc gtacctact 2400
 gtactctac agaggccac caaagagctc cacgggacat ccattgtgcc caagctgcag 2460

gccatcacgg cctcctctgc caaccttcgc cctaaccccc gcgctgctaataat gcagcactgc 2520
 ccagccccgaa acccccagca tgggggatgag gaggggcttg ggggagagga ggaggaagag 2580
 gaggaggagg aggaagatga cagtgcagag gaggggggtg cagccaggct gaatggccgg 2640
 ggcagttggg ctgagatgg agacgaaagc tggatgcagc gggaggtctg gatgtctgctc 2700
 ttccgctacc tcagccgcaa agaactttgt gaatgtatgc gactgtgcaa gacatggtat 2760
 aatgggtgct gtgataaacg actttggaca aaaattgact tgagtaggtg taaggccatc 2820
 gtaccacaag ctctcagtgg tatcatcaag cggcagccag taagcctcga cctcagctgg 2880
 actaacatct ccaaaaagca gctgacatgg ctggtcaata ggctgccagg attaaaagac 2940
 ctctcctag caggctgttc ctggtctgca gtatctgccc tcagcacttc cagctgcccg 3000
 cttctcagga cccttgatct tcggtgggca gtaggaatta aagaccctca aattcgggac 3060
 ttgctgactc cacccacaga taagccaggt caagacaatc gaagcaaact ccggaacatg 3120
 actgacttcc ggctggcagg ccttgacatc acagatgcta ctctccgact catcattcgc 3180
 cacatgcccc tttgtctcg acttgacctc agtcaactgca gtcaccttac agatcagctc 3240
 tccaacctac taactgctgt cgggtcttcc actcgatact cccttacaga gctcaatatg 3300
 gcaggttgca ataaattgac agaccagacc ctgttcttcc taaggcgaat tgctaattgc 3360
 accttgattg accttcgagg atgcaaacag atcacgagaa aagcctgtga gcacttcac 3420
 tcagacttgt ccatcaacag cctctactgc ctgtctgatg agaaactgat acagaagatt 3480

agctaa
 3486

<210> 2

<211> 3930

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<400> 2

atggaggcag agaaagactc tggaagaaga ttgcgtgcga ttgaccgcca gagatacgac 60
gagaacgaag acttgcgga cgtggaggaa attgtcagcg tccgtggctt cagcctggag 120
gagaagctac gtagccagtt ataccagggg gacttcgtgc atgctatgga aggcaaagat 180

ES 2 628 912 T3

ttaactatg agtacgtaca gagagaagct ctcaggtcc ccctggttt tgggacaag 240
gatggactag ggatcaagat gccagacct gattcacag tccgagacgt caaactcctg 300
gtggggagcc gccgttggg ggatgtcatg gacgtcaaca cccagaaggg taccgagatg 360
agcatgtccc agtttgcg ctactacgag acaccagagg cacagcggga taaactgtac 420
aacgtcatca gcctcgagtt cagccatacg aagctggagc atctggtaa gcgtcccact 480
gtggtggacc tggcgcactg ggtggacaac atgtggcctc agcatctaaa ggaaaagcag 540
acagaagcca ccaatgccct tgcagagatg aagtaccca aagtgaaaa gtactgtctg 600
atgagcgtga agggctgtt cactgactc cacattgact ttggaggcac ctccgtgtg 660
taccatgtgt tccgtgggg caagatctt tggctgatcc ctccaacct gcacaactg 720
gctttgtacg aggagtggg gctgtctggc aacagagcg acatcttct gggagaccgc 780
gtggaacgct gccaaagaat ttagctgaag caaggctaca ccttttcat ccctccggt 840
tggatccatg cggtttatac gcctgtggac tctctggtg tggcgggaa catcctgcat 900
agcttcaacg tgccatgca gctgcggatc tacgagatcg aggacaggac ccgggttcag 960
ccaagtcc gttaccctt ctactatgag atgtgctgg atgtcttga gagatatgtg 1020
tactgtgtga ccagcgcct ctacctact caggaatacc agagagaatt aatgcttatt 1080
gatgccccaa gaaaaccag ttagacggc tttcatccg actcctggct ggacatggag 1140
gaggagtcc tgcagcagca gccacaggag gaagaggagg aggaggagga caaggaggag 1200
gaaggagatg gtgcagataa aacaccaag ccaccaccg atgaccacac ctaccacc 1260
agcaccgcc ccgaagacca ggacagcaca gggaagaagc ctaaagcccc tgccatacgg 1320
ttctcaaga ggacgtgtc caatgagtca gaggaaagt tcaagtcgac ctgatgcc 1380
acggacgatc ccaagacgcc cacgggctcc ccggccacc agggttctac caagtggact 1440
cacctaccg aattgaact gaagggttg aaagccctg ttgaaaagct agagtcctt 1500
ccggagaata agaagtgtg ccctgaggga atcgaggacc ccaggccct cctggaagg 1560
gtaaagaatg tactgaaaga gcacgtgat gacgaccca ccctggccat caccggggtc 1620
cctgtgtca gctggccaaa gaaaactgca aagaaccggg tgggtggctg gcctaaggc 1680

ES 2 628 912 T3

aagttgggccc cggcctcagc ggtgaagttg gctgccaacc gaacaacagc aggagctcgc 1740
aggcgccgga cgcgatgccg caagtgcgag gcctgcctgc ggacggagtg tggagagtgc 1800
cacttttgca aggacatgaa gaagtttga ggtcctgggc gcatgaagca gagctgcatc 1860
atcgggcagt gcatcgcgcc agtctgccc cacaccgccg tgtgccttgt gtgtggcgag 1920
gcaggggaagg aggacacagt ggaagaggaa gaaggcaagt ttaacctcat gctcatggaa 1980
tgctccatct gcaacgagat catccacctt ggtgcctta agattaagga atcggagggt 2040
gtgtcaacg atgagcttcc caactgctgg gtagtccga agtgaacca tgccggcaag 2100
accgggaaac aaaagcgtgg ccctggcttt aagtatgcct ccaacctgcc tggctcctg 2160
ctcaaggagc agaagatgaa ccgggacaac aaggaagggc aagagcctgc caagcggaga 2220
agtgagtgtg aagaggctcc ccgtcggagg tcagacgagc acccaaaaa ggtgcctgca 2280
gatggcatcc tccgccgaaa gtctgatgat gtgcacctga ggaggaagcg gaaatacgag 2340
aagccccaag agctgagtgg acgcaagcga gcctcgtcgc ttcaaactgc ccccggttc 2400
tcctctacc tctcggcag gccccctta ggacagctc tcagccctg gtggagatcc 2460
agtctcactt acttccagca gcagctaaaa cctggcaaag aagataagct tttcaggaaa 2520
aagcggcggg cctggaagaa cgctgaggat cgtctgtcac tggccaacaa gcccttcgg 2580
cgcttaagc aggaaccgga ggacgatctg cctgaggcac ctctaagac ccgggagagt 2640
gatcagtcac gttccagctc acccactgct ggtcccagca ctgagggagc tgaaggccca 2700
gaagagaaga aaaaggtgaa gatgcgccgg aagcggcgac ttgtaacaa ggagctgagc 2760
aaagagctaa gcaaggagct caacctgag atccaaaaga cggagagcac cctggctcac 2820
gagagccagc agcccatcaa gtcagagcct gagagcgaga acgacgagcc caagaggccc 2880
ttaagccact gcgagcgcgc ccaccgctc agcaaagggc tcaacggcac acctcgggag 2940
ctcgggcact cgctgggacc tggcctgcgt agtccacctc gtgttatgtc ccggcccccg 3000
ccctctgcat cccacccaa gtgcatccag atggagcgtc acgtgatccg gccaccgccc 3060
atcagcccc cacctgactc gctgccctg gatgatggag cagcccacgt catgcatagg 3120
gaggtgtgga tggcagtctt cagctacctc agccaccgag acctgtgtgt ctgcatgccc 3180

gtctgcagga cctggaaccg ctggtgctgc gataagcggg tgtggaccg catcgacctg 3240
aaccgctgca agtccatcac acccctgatg ctgagcggta tcatccggcg acagcctgtc 3300
tcccttgacc tcagttggac caacatctcc aagaagcagc tgagttggct catcaaccgg 3360
ttgcctgggc tccgagactt ggtgctgtca ggctgctcat ggatcgctgt ctcagccctc 3420
tgtagctcca gttgtccatt gctccggacc ctggatgtcc agtgggtaga aggactaaag 3480
gatgcccaga tgagggatct cctgtctcca cccacagaca acaggccagg tcagatggac 3540
aatcggagca agctccggaa cattgtagag ctgcgcctag ctggcctgga catcacagat 3600
gtctccctgc ggctcattat tcgcatatg ccctgctct cgaagctcca actcagttac 3660
tgtaaccaca tcaatgacca gtccatcaac ctgctcactg ccgtcggcac caccaccga 3720
gactcgctga cagaggtcaa cctatcagac tgtaataagg taactgacct gtgcctgtcc 3780
ttcttcaaac gctgtggaaa tatctgtcat attgacctga ggtactgcaa gcaagtcacc 3840
aaggaaggct gtgagcaatt catagctgaa atgtctgtga gttccaatt tgggcaagtg 3900
gaagagaaac tctgcaaaa actaagttag 3930

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<400> 3

atggaggcag agaaagactc t 21

<210> 4

<211> 23

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 4

acttagtttt tgcaggagtt tct 23

<210> 5

15 <211> 25

<212> ADN

ES 2 628 912 T3

<213> Secuencia artificial
<400> 5
atggaacctg aagaagaaag gattc 25
<210> 6
5 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<400> 6
ttagctaadc ttctgatca gttc 25
10 <210> 7
<211> 1162
<212> PRT
<213> Ser humano
<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Val Asn Thr Gln Lys Gly Ile Glu Met Thr Met Ala Gln Trp Thr Arg
 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
 515 520 525

Lys Val Arg Val Pro Thr Ile Pro Ile Thr Lys Pro His Thr Met Lys
 530 535 540

Pro Ala Pro Arg Leu Thr Pro Val Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ile
 545 550 555 560

Val Ser Gly Ala Arg Arg Arg Val Arg Cys Arg Lys Cys Lys Ala
 565 570 575

Cys Val Gln Gly Glu Cys Gly Val Cys His Tyr Cys Arg Asp Met Lys
 580 585 590

Lys Phe Gly Gly Pro Gly Arg Met Lys Gln Ser Cys Val Leu Arg Gln
 595 600 605

Cys Leu Ala Pro Arg Leu Pro His Ser Val Thr Cys Ser Leu Cys Gly
 610 615 620

Glu Val Asp Gln Asn Glu Glu Thr Gln Asp Phe Glu Lys Lys Leu Met
 625 630 635 640

Glu Cys Cys Ile Cys Asn Glu Ile Val His Pro Gly Cys Leu Gln Met
 645 650 655

Asp Gly Glu Gly Leu Leu Asn Glu Glu Leu Pro Asn Cys Trp Glu Cys
 660 665 670

Pro Lys Cys Tyr Gln Glu Asp Ser Ser Glu Lys Ala Gln Lys Arg Lys
 675 680 685

Met Glu Glu Ser Asp Glu Glu Ala Val Gln Ala Lys Val Leu Arg Pro
 690 695 700

Leu Arg Ser Cys Asp Glu Pro Leu Thr Pro Pro Pro His Ser Pro Thr
 705 710 715 720

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
 945 950 955 960

Trp Thr Asn Ile Ser Lys Lys Gln Leu Thr Trp Leu Val Asn Arg Leu
 965 970 975

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

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

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

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

Gln Lys Ile Ser
1160

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes, que comprende las etapas siguientes:
 - a. transferir un factor de transcripción y Jhdm1a a células adultas de mamífero que entonces se cultivan en un medio de inducción para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que las células adultas de mamífero son fibroblastos embrionarios de ratón, el medio de inducción incluye medio DMEM con alto contenido en glucosa, suero bovino fetal 15, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 55 μM, penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 μg/ml y factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml, y el factor de transcripción es una combinación de Oct4, Klf4 y Sox2, o una combinación de Oct4, Klf4, Sox2 y C-Myc.
2. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 1, que comprende además la etapa b: cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre que es el medio de inducción tal como se describe en la etapa a.
3. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 2, caracterizado porque la transferencia de Jhdm1a a células adultas de mamífero se logra mediante la incorporación de un vector que puede expresar Jhdm1a en las células.
4. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 3, caracterizado porque el vector es un vector viral y un vector de plásmido.
5. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 4, caracterizado porque el vector viral es un retrovirus que es un vector pMXs.
6. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes, que comprende las etapas siguientes:
 - a. transferir un factor de transcripción y Jhdm1a a células adultas de mamífero que entonces se cultivan en un medio de inducción para inducir clones de células madre pluripotentes, en el que las células adultas de mamífero son fibroblastos embrionarios de ratón, el medio de inducción incluye medio DMEM con alto contenido en glucosa, suero bovino fetal 15, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 55 μM, penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 μg/ml, factor inhibidor de leucemia 1000 U/ml y vitamina C 50 μg/ml, y 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.
7. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 6, que comprende además la etapa b: cultivar y expandir los clones de células madre pluripotentes inducidas en un medio de cultivo de células madre que es el medio de inducción tal como se describe en la etapa a.
8. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 7, caracterizado porque la transferencia de Jhdm1a a células adultas de mamífero se logra mediante la incorporación de un vector que puede expresar Jhdm1a en las células.
9. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 8, caracterizado porque el vector es un vector viral y un vector de plásmido.
10. Método para aumentar la eficacia de inducción de células madre pluripotentes según la reivindicación 9, caracterizado porque el vector viral es un retrovirus que es un vector pMXs.

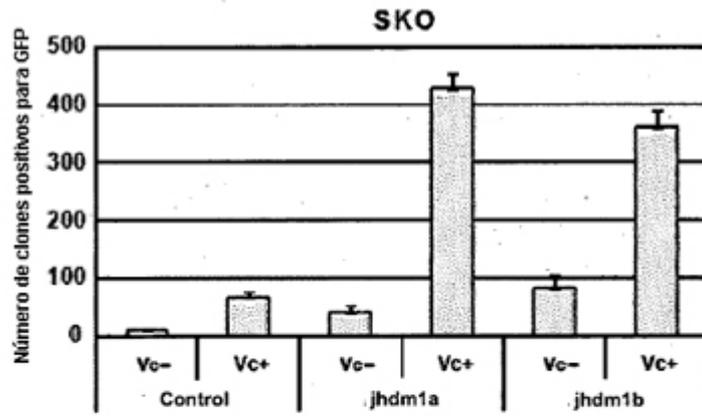


Fig. 1

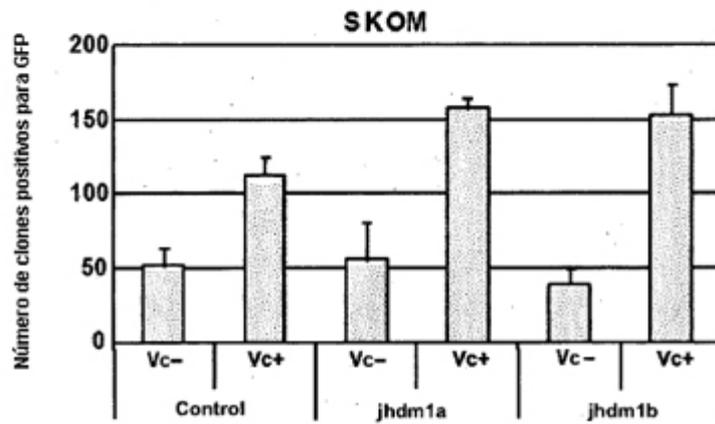


Fig. 2

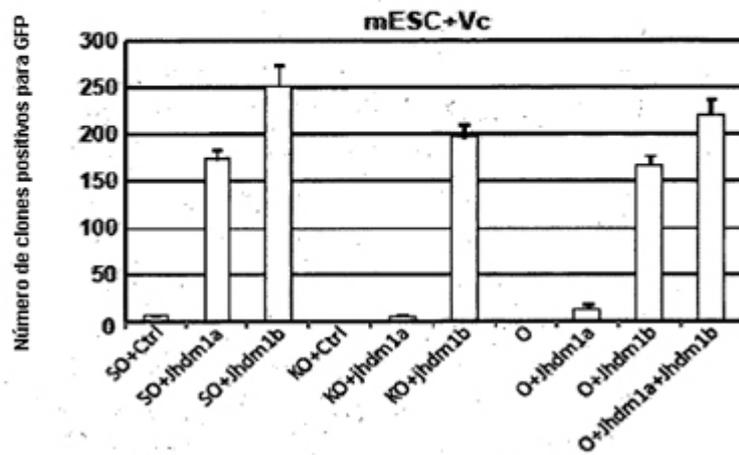


Fig. 3

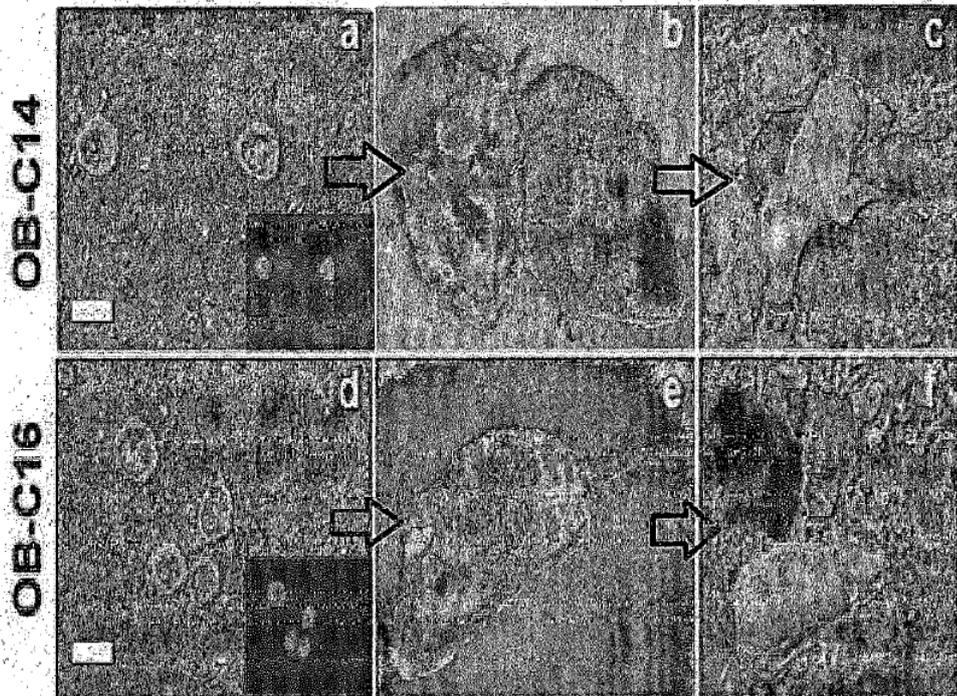


Fig. 4

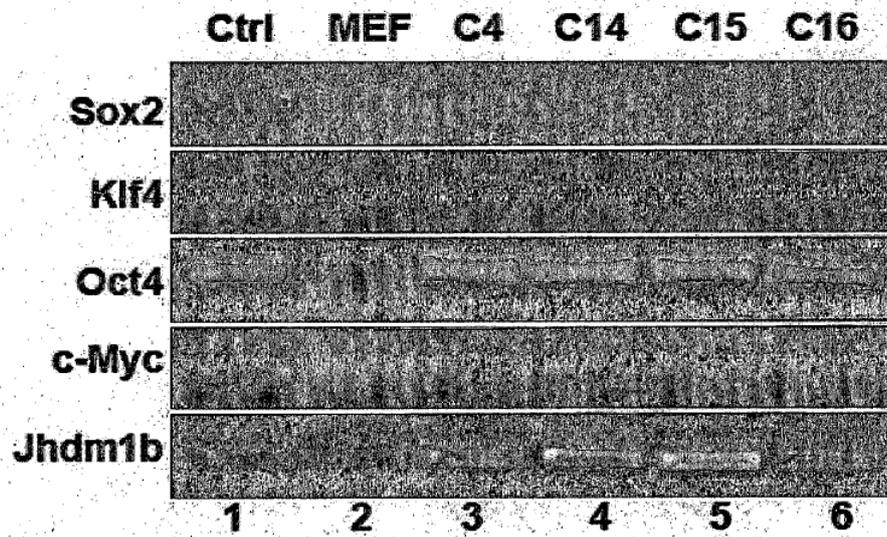


Fig. 5

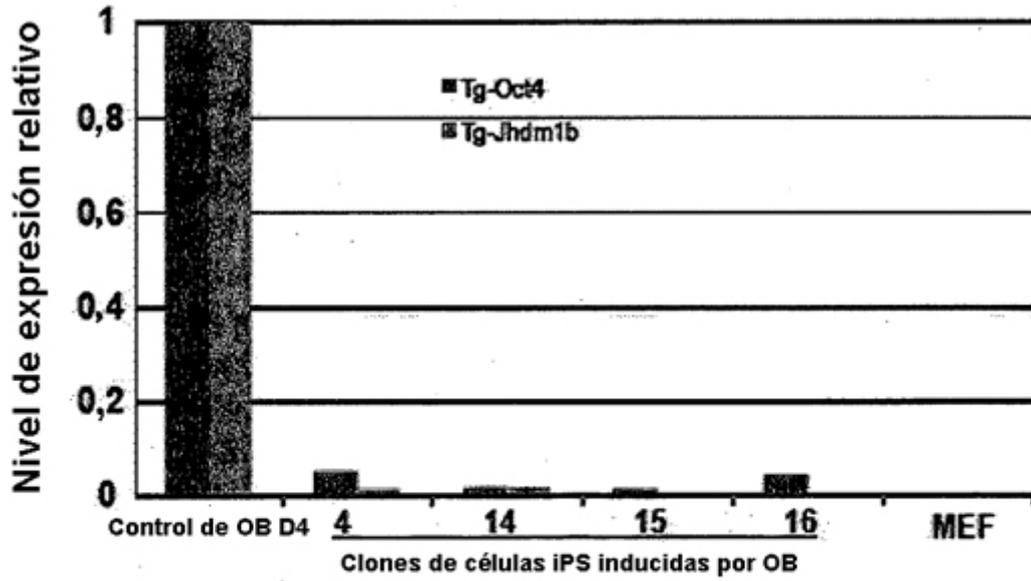


Fig. 6

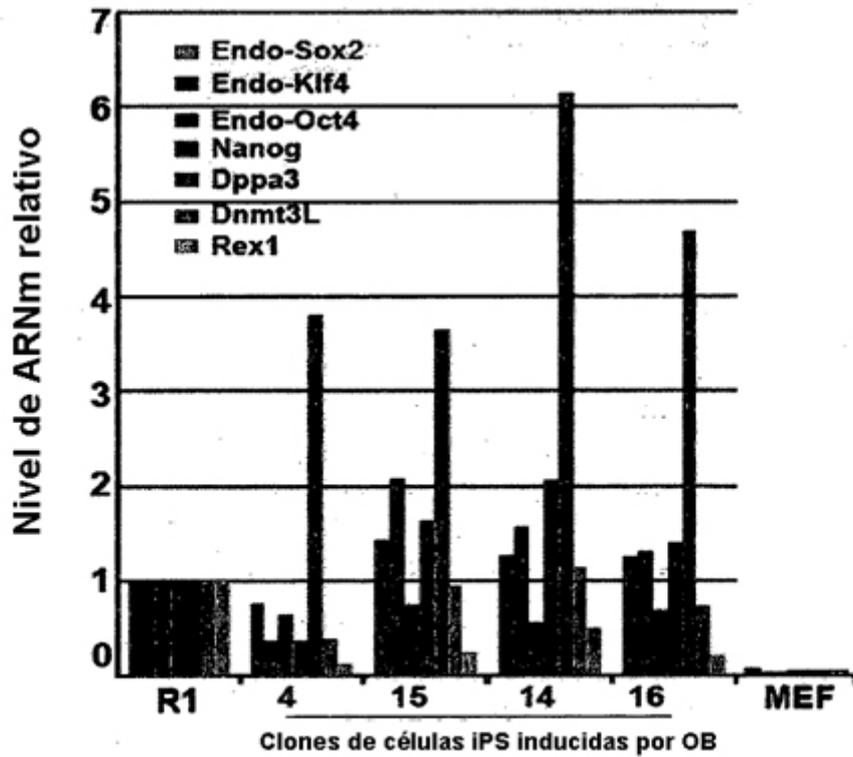


Fig. 7

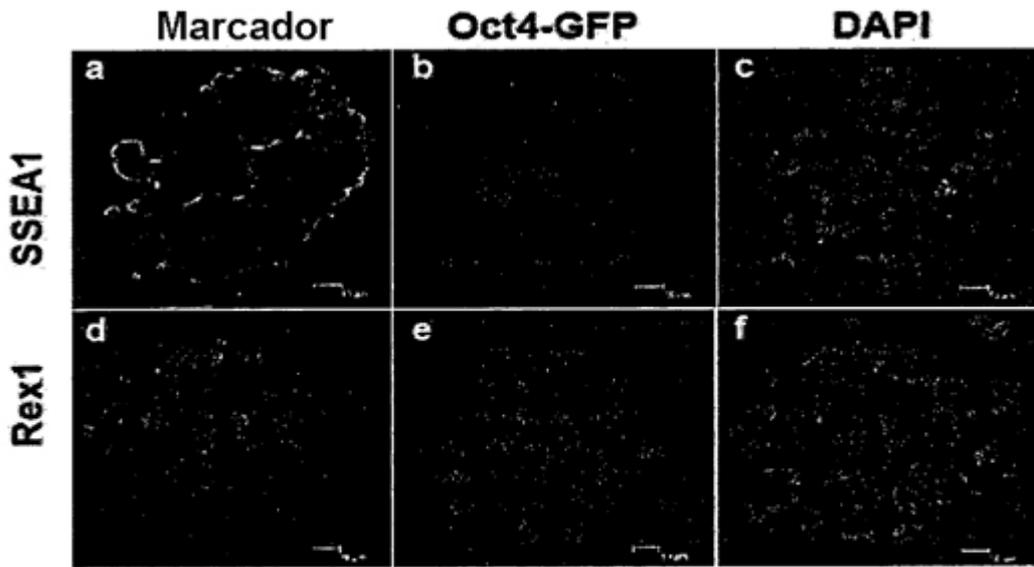


Fig. 8

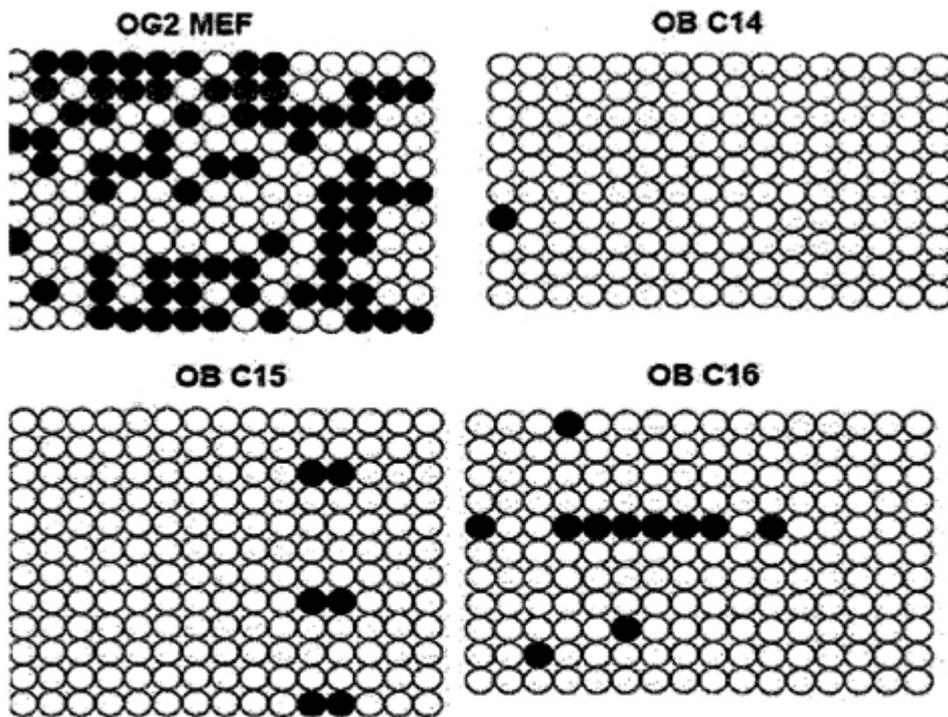


Fig. 9

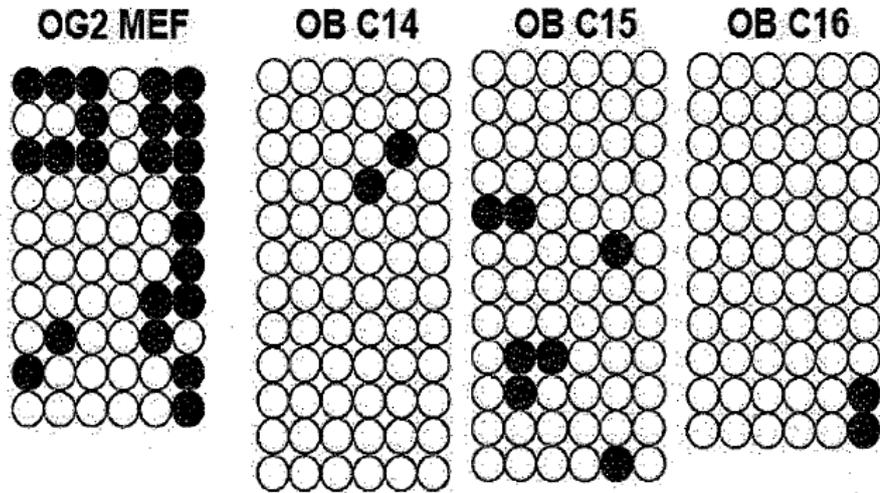


Fig. 10

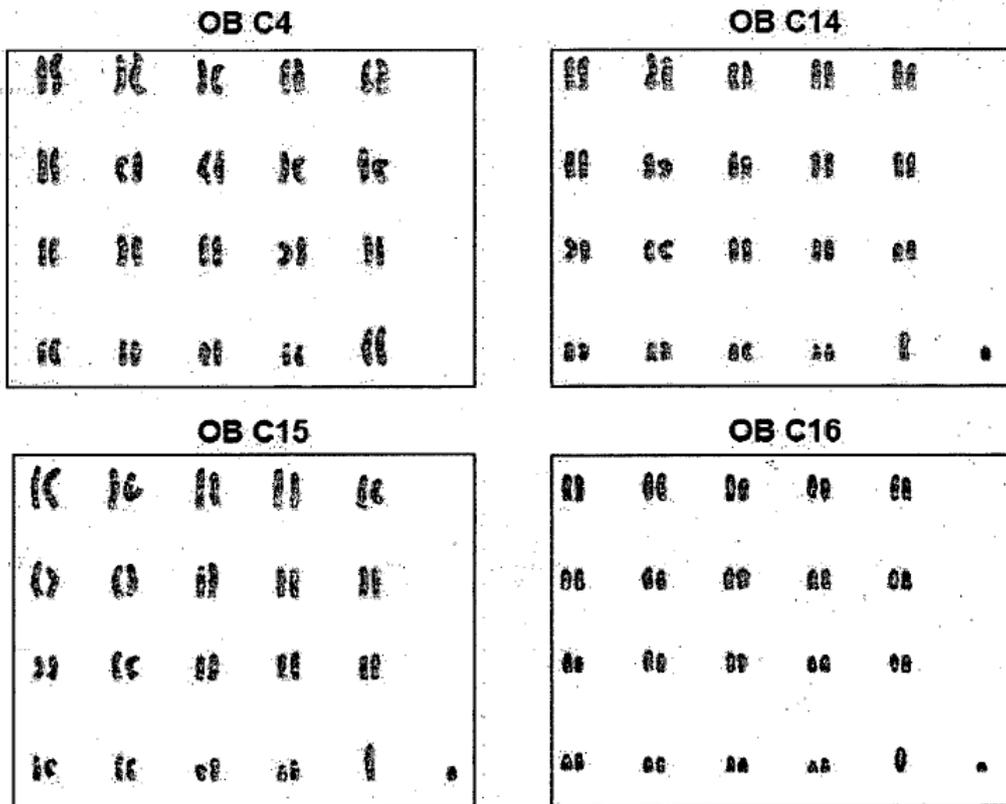


Fig. 11

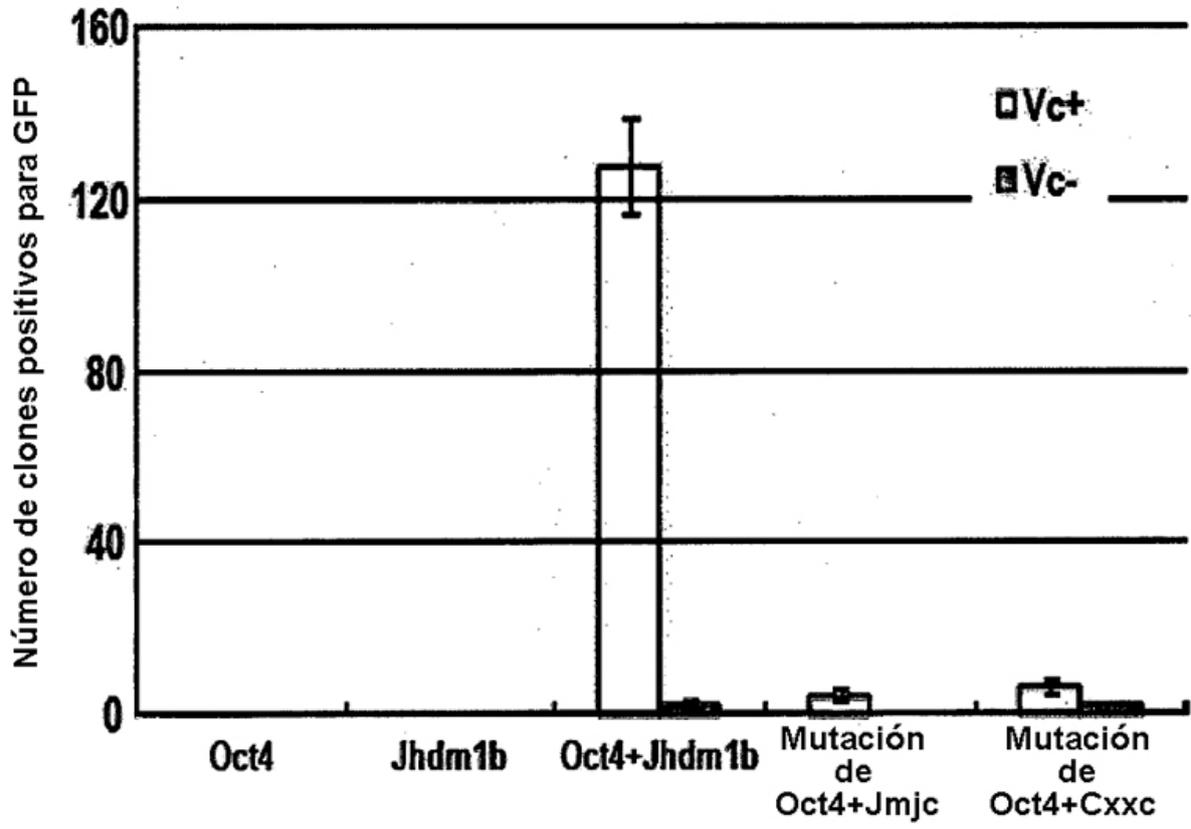


Fig. 12

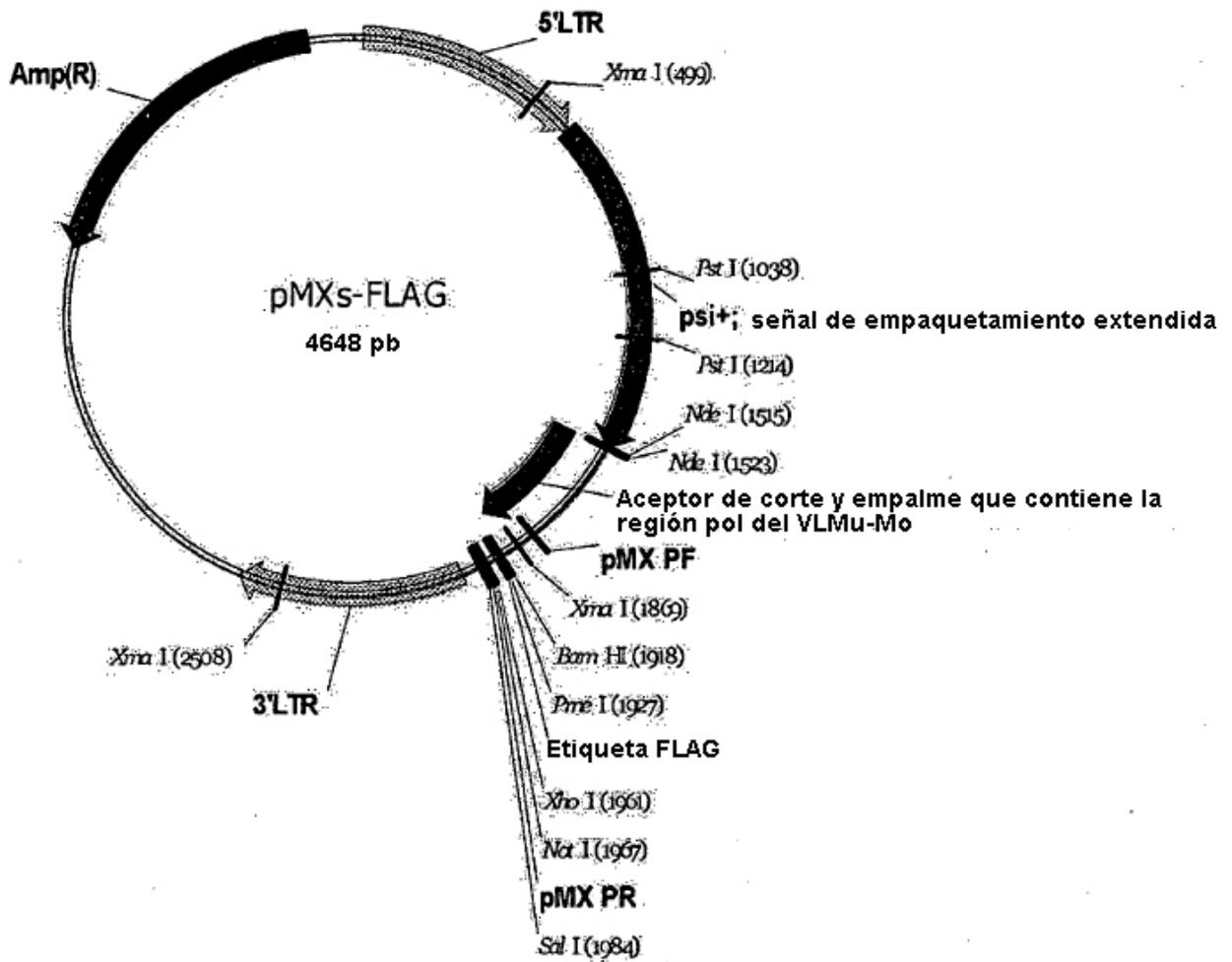


Fig. 13