

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 464**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2010 PCT/US2010/052896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11047300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10824189 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2488630**

54 Título: **Inducción de células pluripotentes**

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252548 P

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

20.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIN, TONGXIANG y
DING, SHENG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 638 464 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

Inducción de células pluripotentes

5 **Antecedentes de la invención**

Los recientes avances en la generación de células madre pluripotentes inducidas artificialmente (iPSC) (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007); Yu, J. *et al.*, *Science* 318, 1917-20 (2007); Muller, L. U. W., *et al.*, *Mol. Ther.* 17, 947-53 (2009)) han aumentado las esperanzas para su utilidad en la investigación biomédica y en las aplicaciones clínicas. Sin embargo, la generación de iPSC sigue siendo un proceso muy lento (~4 semanas) e ineficaz (<0,01 % Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007); Yu, J. *et al.*, *Science* 318, 1917-20 (2007)) que produce una población heterogénea de células. La identificación de iPSC completamente reprogramadas a partir de dicha mezcla es tediosa y requiere la experiencia específica en el cultivo de células humanas pluripotentes.

Aunque los peligros de la inserción genómica de factores de reprogramación exógenos se están superando, la baja eficiencia y la cinética lenta de la reprogramación siguen presentando un enorme problema para las aplicaciones finales de las iPSC humanas. Por ejemplo, se podría producir un aumento en las anomalías genéticas o epigenéticas durante el proceso de reprogramación, en el que se pueden inhibir los supresores tumorales y activarse las vías oncogénicas. Aunque estudios recientes han informado de una mayor eficiencia de la reprogramación mediante manipulaciones genéticas (Feng, B. *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 301-12 (2009)), además de los cuatro factores originales, dichas manipulaciones normalmente dificultan aún más el proceso y aumentan el riesgo de alteraciones genéticas y tumorigenicidad. Por lo tanto, todavía existe una tremenda necesidad de un procedimiento más seguro, más fácil y más eficiente para la generación de iPSC humanas, y facilitar la identificación y la caracterización de mecanismos fundamentales de reprogramación.

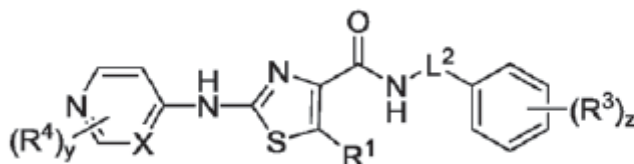
25

Breve resumen

La presente invención proporciona mezclas (por ejemplo, útiles para inducir iPSC). En particular, la invención proporciona una composición que comprende:

30

- (a) un inhibidor de quinasa de tipo receptor de activina 5 (ALK5);
- (b) un inhibidor de MAP/ERK quinasa (MEK); y
- (c) un inhibidor de Rho quinasa (ROCK), teniendo el inhibidor de ROCK la estructura:



(II)

35

en la que

- L² es alquileo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido;
- y es un número entero de 0 a 3;
- z es un número entero de 0 a 5;
- X es -N=, -CH= o -CR⁵=; R¹ es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;
- R³, R⁴ y R⁵ son independientemente -CN, -S(O)_nR⁶, -NR⁷R⁸, -C(O)R⁹, -NR¹⁰-C(O)R¹¹, -NR¹²-C(O)-OR¹³, -C(O)NR¹⁴R¹⁵, -NR¹⁶S(O)₂R¹⁷, -OR¹⁸, -S(O)₂NR¹⁹, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en los que n es un número entero de 0 a 2, en los que si z es superior a 1, dos fracciones R³ se unen opcionalmente entre sí para formar un cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido; y
- R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

55

o uno de sus racematos, diastereómeros, tautómeros o isómeros geométricos, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunos aspectos de la divulgación, una mezcla comprende:

células de mamífero;

5 un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5;

un inhibidor de MEK; y

un inhibidor de la vía de Rho GTPasa/ROCK.

10

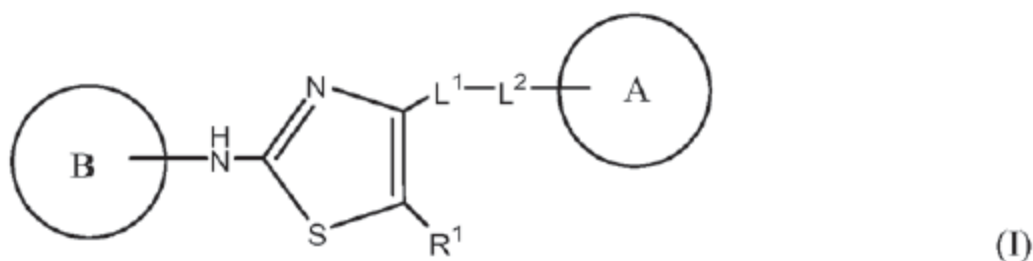
En algunos aspectos de la divulgación, al menos el 99 % de las células son células no pluripotentes. En algunos aspectos de la divulgación, todas o esencialmente todas las células son células no pluripotentes. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células humanas.

15 En algunas realizaciones, el inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5 es SB431542.

En algunas realizaciones, el inhibidor de MEK es PD0325901.

20

En el presente documento, se desvela un inhibidor de ROCK que es un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

25 el anillo A es un cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido; el anillo B es un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

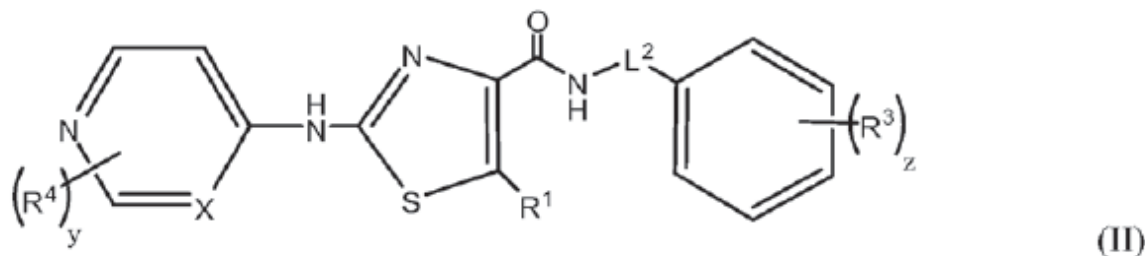
L¹ es -C(O)-NR²- o -C(O)-NR²-;

L² es un enlace, alquileno sustituido o no sustituido, o heteroalquileno sustituido o no sustituido; y

30 R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

También se desvela un inhibidor de ROCK que tiene la fórmula:

35



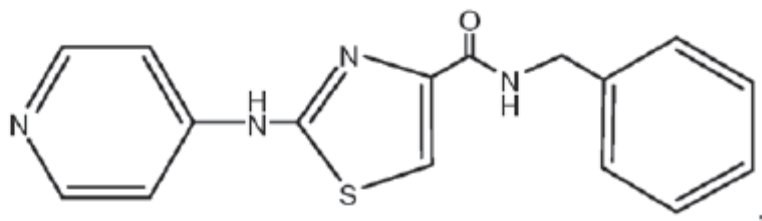
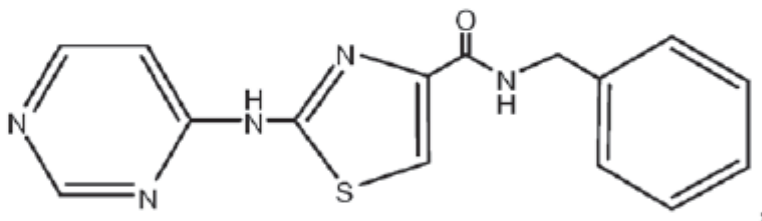
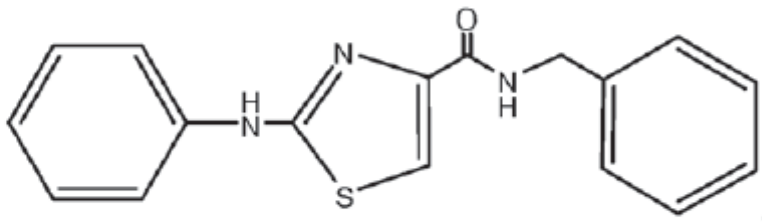
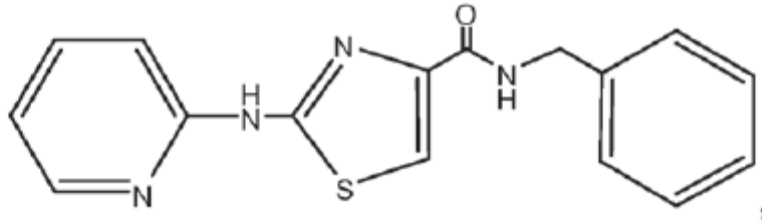
en la que y es un número entero de 0 a 3; z es un número entero de 0 a 5; X es -N=, -CH= o -CR⁵=; R³, R⁴ y R⁵ son independientemente CN, S(O)_nR⁶, NR⁷R⁸, C(O)R⁹, NR¹⁰-C(O)R¹¹, NR¹²-C(O)-OR¹³, -C(O)NR¹⁴R¹⁵, -NR¹⁶S(O)₂R¹⁷, -OR¹⁸, -S(O)₂NR¹⁹, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en los que n es un número entero de 0 a 2, en los que si z es superior a 1, dos fracciones R³ se unen opcionalmente entre sí para formar un cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido; y R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no

40

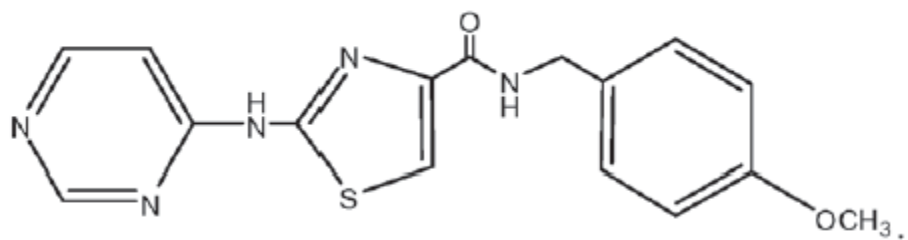
45

sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

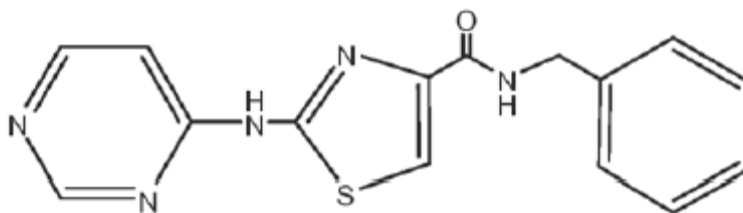
También se desvelan inhibidores de ROCK que tienen la fórmula:



5
o



En algunas realizaciones, el inhibidor de ROCK es



5 En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de los inhibidores es suficiente para mejorar en al menos un 10 % la eficacia de la inducción de células no pluripotentes en la mezcla en células madre pluripotentes inducidas cuando la mezcla se somete a condiciones suficientes para inducir la conversión de las células en células madre pluripotentes inducidas.

10 En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende además un inhibidor de GSK3 y/o un inhibidor de HDAC.

15 La invención también proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* de inducción de células de mamífero no pluripotentes en células madre pluripotentes inducidas, que comprende: introducir al menos un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en Oct-3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc en células no pluripotentes; y poner en contacto las células no pluripotentes con la composición de la invención; en condiciones suficientes para inducir las células madre pluripotentes.

Las células se seleccionan de células humanas, células animales no humanos, células de ratón, células de primates no humanos y células de otros animales.

20 En algunas realizaciones, las células se ponen en contacto además con un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC).

25 En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende introducir al menos dos, tres o cuatro factores de transcripción exógenos en las células no pluripotentes, en el que los factores de transcripción se seleccionan del grupo que consiste en Oct-3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc.

30 En algunas realizaciones, el al menos un factor de transcripción se introduce introduciendo un polinucleótido en las células no pluripotentes, en el que el polinucleótido codifica al menos un factor de transcripción exógeno, expresando de ese modo el/los factor/es de transcripción en las células.

35 En algunas realizaciones, el al menos un factor de transcripción se introduce poniendo en contacto un polipéptido exógeno con las células no pluripotentes, en las que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos del factor de transcripción, en las que la introducción se realiza en condiciones para introducir el polipéptido en las células. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que mejora el transporte a través de las membranas celulares.

40 La presente divulgación también proporciona kits de inducción de la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes. En algunos aspectos de la divulgación, el kit comprende un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5; un inhibidor de MEK; y un inhibidor de ROCK.

Definiciones

45 Un "polipéptido Oct" se refiere a cualquiera de los miembros naturales de la familia de octámeros de factores de transcripción, o variantes de los mismos, que mantienen la actividad del factor de transcripción similar (en al menos un 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro natural más cercano de la familia, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro natural de la familia, y pueden comprender además un dominio de activación de la transcripción. Los polipéptidos Oct ilustrativos incluyen Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, Oct-7, Oct-8, Oct-9 y Oct-11, por ejemplo, Oct3/4 (denominado en el presente documento "Oct4") contiene el dominio POU, una secuencia de 150 aminoácidos conservada entre Pit-1, Oct-1, Oct-2 y uric-86. Véase, Ryan, A. K. y Rosenfeld, M. G. *Genes Dev.* 11, 1207-1225 (1997). En algunos aspectos, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 85 %, 90 % o 95 % en toda su secuencia en comparación con un miembro natural de la familia de polipéptidos Oct tal como los enumerados anteriormente o tal como se enumeran en el número de registro del Genbank NP_002692.2 (Oct4 humano) o NP_038661.1 (Oct4 de ratón). Los polipéptidos Oct (por ejemplo, Oct3/4) pueden ser humanos, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se usará la misma especie de proteína con las especies de células que se manipulen.

55 Un "polipéptido Klf" se refiere a cualquiera de los miembros naturales de la familia de factores de tipo Krüppel (Klfs), proteínas de dedo de cinc que contienen secuencias de aminoácidos similares a las del regulador del patrón

embrionario de *Drosophila* Krüppel, o variantes de los miembros naturales que mantienen la actividad del factor de transcripción similar (en al menos el 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro natural más cercano de la familia, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro natural de la familia, y puede comprender además un dominio de activación de la transcripción. Véase, Dang, D. T., Pevsner, J. y Yang, V. W. *Cell Biol.* 32, 1103-1121 (2000). Los miembros ilustrativos de la familia Klf incluyen, Klf1, Klf2, Klf3, Klf-4, Klf5, Klf6, Klf7, Klf8, Klf9, Klf10, Klf11, Klf12, Klf13, Klf14, Klf15, Klf16 y Klf17. Klf2 y Klf-4 resultaron ser factores capaces de generar células iPS en ratones, y los genes Klf1 y Klf5 relacionados también, aunque con una eficiencia reducida. Véase Nakagawa, *et al.*, *Nature Biotechnology* 26:101 - 106 (2007). En algunos aspectos, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del al menos un 85 %, 90 % o 95 % a lo largo de toda su secuencia en comparación con un miembro natural de la familia del polipéptidos Klf, tal como los enumerados anteriormente o tal como los enumerados en el número de acceso del Genbank CAX16088 (Klf4 de ratón) o CAX14962 (Klf4 humano). Los polipéptidos Klf (por ejemplo, Klf1, Klf4 y Klf5) pueden ser humanos, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se usará la misma especie de proteína con las especies de células que se manipulen. En la medida en que se describe en el presente documento un polipéptido Klf, éste puede ser reemplazado por un polipéptido receptor de estrógeno beta (Essrb). Así pues, se pretende que para cada aspecto de polipéptido Klf descrito en el presente documento, se describa igualmente un aspecto correspondiente que use un Essrb en lugar de un polipéptido Klf4.

Un "polipéptido Myc" se refiere a cualquiera de los miembros naturales de la familia Myc (véase, por ejemplo, Adhikary, S. y Eilers, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:635-645 (2005)), o variantes de los mismos, que mantienen la actividad del factor de transcripción similar (en al menos un 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro natural más cercano de la familia, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro natural de la familia, y pueden comprender además un dominio de activación de la transcripción. Los polipéptidos Myc ilustrativos incluyen, por ejemplo, c-Myc, N-Myc y L-Myc. En algunos aspectos, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del al menos un 85 %, 90 % o 95 % a lo largo de toda su secuencia en comparación con un miembro natural de la familia del polipéptidos Myc, tal como los enumerados anteriormente o tal como los enumerados en el número de acceso del Genbank CAA25015 (Myc humano). Los polipéptidos Myc (por ejemplo, c-Myc) pueden ser humanos, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se usará la misma especie de proteína con las especies de células que se estén manipulando.

Un "polipéptido Sox" se refiere a cualquiera de los miembros naturales de los factores de transcripción de la caja de HMG relacionados con SRY (Sox), caracterizados por la presencia del dominio del grupo de alta movilidad (HMG), o variantes de los mismos, que mantienen la actividad del factor de transcripción similar (en al menos un 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro natural más cercano de la familia, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro natural de la familia, y pueden comprender además un dominio de activación de la transcripción. Véase, por ejemplo, Dang, D. T., *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1103-1121 (2000). Los polipéptidos Sox ilustrativos incluyen, por ejemplo, Sox1, Sox-2, Sox3, Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, Sox8, Sox9, Sox10, Sox11, Sox12, Sox13, Sox14, Sox15, Sox17, Sox18, Sox-21 y Sox30. Sox1 ha mostrado producir células iPS con una eficiencia similar a Sox2, y los genes Sox3, Sox15 y Sox18 también han mostrado generar células iPS, aunque con algo de menos eficiencia que Sox2. Véase Nakagawa, *et al.*, *Nature Biotechnology* 26:101-106 (2007). En algunos aspectos, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del al menos un 85 %, 90 % o 95 % a lo largo de toda su secuencia en comparación con un miembro natural de la familia del polipéptidos Sox, tal como los enumerados anteriormente o tal como los enumerados en el número de acceso del Genbank CAA83435 (Sox2 humano). Los polipéptidos Sox (por ejemplo, Sox1, Sox2, Sox3, Sox15 o Sox18) pueden ser humanos, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. En general, se usará la misma especie de proteína con las especies de células que se estén manipulando.

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

El término "pluripotente" o "pluripotencia" se refiere a células con la capacidad de dar lugar a células de la progenie que pueden experimentar diferenciación, en las condiciones apropiadas, en tipos de células que muestran colectivamente características asociadas con los linajes celulares del total de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre pluripotentes pueden contribuir a todos los tejidos derivados del embrión de un animal prenatal, postnatal o adulto. Para establecer la pluripotencia de una población celular, se puede usar un ensayo convencional aceptado por la técnica, tal como la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de vida; sin embargo, la identificación de diversas características de células madre pluripotentes también se puede usar para detectar células pluripotentes.

"Características de las células madre pluripotentes" se refiere a las características de una célula que distinguen las células madre pluripotentes de otras células. La capacidad de dar lugar a una progenie que pueda experimentar diferenciación, en las condiciones apropiadas, en tipos de células que demuestren colectivamente características asociadas con los linajes celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) es una característica de las células madre pluripotentes. La expresión o la no expresión de ciertas combinaciones de marcadores moleculares son también características de las células madre pluripotentes. Por ejemplo, las células

madre pluripotentes humanas expresan al menos algunos, y en algunos aspectos, todos los marcadores de la siguiente lista no limitante: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox2, E-cadherina, UTF-1, Oct4, Rex1 y Nanog. Las morfologías de las células asociadas con las células madre pluripotentes también son características de las células madre pluripotentes.

5 Como se usa en el presente documento, "células no pluripotentes" se refiere a células de mamífero que no son células pluripotentes. Los ejemplos de dichas células incluyen células diferenciadas, así como células progenitoras. Los ejemplos de células diferenciadas incluyen, pero sin limitación, células de un tejido seleccionado de médula ósea, piel, músculo esquelético, tejido graso y sangre periférica. Los ejemplos de tipos de células incluyen, pero sin limitación, fibroblastos, hepatocitos, mioblastos, neuronas, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos T.

En algunos aspectos de la divulgación en los que un individuo se va a tratar con las células pluripotentes resultantes, se usan las propias células no pluripotentes del individuo para generar células pluripotentes de acuerdo con los métodos de la divulgación.

15 Las células pueden ser de, por ejemplo, seres humanos o mamíferos no humanos. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, gatos, perros, conejos, cobayas, hámsteres, ovejas, cerdos, caballos, bovinos y primates no humanos (por ejemplo, chimpancés, macacos y simios).

20 Un polinucleótido "recombinante" es un polinucleótido que no está en su estado nativo, por ejemplo, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos no encontrada en la naturaleza, o el polinucleótido está en un contexto distinto de aquel en el que se encuentra de forma natural, por ejemplo, separado de las secuencias de nucleótidos con las que normalmente está en la proximidad de la naturaleza, o secuencias de nucleótidos adyacentes (o contiguos) con las que normalmente no está en proximidad. Por ejemplo, la secuencia en cuestión puede clonarse en un vector, o recombinarse de otro modo con uno o más ácidos nucleicos adicionales.

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

30 El término "promotor" y la expresión "secuencia de control de la expresión" se usan en el presente documento para referirse a una serie de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden ubicarse tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen promotores constitutivos e inducibles. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y evolutivas. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o evolutiva. La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor o selección de sitios de unión a factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

45 Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", como se usan en el presente documento, es aquella o aquel que se origina a partir de una fuente foránea a la célula hospedadora en particular o, si procede de la misma fuente, se modifica con respecto a su forma original. De este modo, un casete de expresión heterólogo de una célula es un casete de expresión que no es endógeno a la célula hospedadora en particular, por ejemplo, por estar enlazado a secuencias de nucleótidos de un vector de expresión en lugar de ADN cromosómico, por estar unido a un promotor heterólogo, por estar unido a un gen indicador, etc.

50 La expresión "ácido nucleico" y el término "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma monocatenaria o bicatenaria. El término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos, o restos o enlaces de cadena principal modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil-fosfonatos, metil-fosfonatos quirales, 2-O-metil-ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

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

65 Los términos "inhibidores", "activadores" y "moduladores" de la expresión o de la actividad se usan para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo*

para la expresión o la actividad de una proteína diana descrita (o polinucleótido codificante), por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, inhiben la expresión o se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación o la actividad inhibidora de la proteasa, reducen, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la actividad de la proteína diana descrita, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo, inducen o activan la expresión de una proteína diana descrita o se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación o actividad inhibidora de proteasa, sensibilizan o regulan positivamente la actividad de la proteína diana descrita (o polinucleótido codificante), por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen ligandos, antagonistas y agonistas de origen natural y sintéticos (por ejemplo, moléculas químicas pequeñas, anticuerpos y similares que funcionan como agonistas o antagonistas). Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, la aplicación de compuestos moduladores putativos a células que expresan la proteína diana descrita y luego la determinación de los efectos funcionales sobre la actividad de la proteína diana descrita, como se ha descrito anteriormente. Las muestras o ensayos que comprenden la proteína diana descrita que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado del efecto. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor relativo de actividad del 100 %. La inhibición de una proteína diana descrita se logra cuando el valor de actividad relativo al control es del aproximadamente 80 %, opcionalmente del 50 % o 25, 10 %, 5 % o 1 %. La activación de la proteína diana descrita se consigue cuando el valor de actividad relativo al control es del 110 %, opcionalmente del 150 %, opcionalmente del 200, 300 %, 400 %, 500 % o 1.000-3.000 %) o superior.

Quando los grupos sustituyentes químicos están especificados por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a $-\text{OCH}_2-$

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal (es decir, no ramificada) o ramificada, o combinación de las mismas, que puede estar completamente saturada, mono- o poliinsaturada, y que puede incluir radicales di- y multivalentes que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ significa de uno a diez átomos de carbonos). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturados incluyen, pero sin limitación, grupos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es aquel que tiene uno o más enlaces dobles o triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin limitación, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores.

El término "alquilenno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alquilo, como el ilustrado, pero sin limitación, por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Por lo general, un grupo alquilo (o alquilenno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, ilustrándose en la presente divulgación aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquilenno inferior" es un grupo alquilo o alquilenno de cadena más corta que, en general, tiene ocho o menos átomos de carbono.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo seleccionados del grupo que consiste en O, N, P, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y de azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El/los heteroátomo/s de O, N, P y S y Si pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH=CHO-CH}_3$, $-\text{Si(CH}_3\text{)}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$, $-\text{CH=CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, O-CH_3 , $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ y $-\text{CN}$. Puede haber hasta dos heteroátomos consecutivos tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{-O-Si(CH}_3\text{)}_3$. De igual manera, el término "heteroalquilenno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como los ilustrados, pero sin limitación, por $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2-$. Para los grupos heteroalquilenno, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxo, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Aún más, para los grupos enlazadores de alquilenno y heteroalquilenno, no hay ninguna orientación del grupo enlazador implícita en la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo enlazador. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ representa tanto $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ como $-\text{R}'\text{C(O)}_2$. Como se ha descrito anteriormente, los grupos heteroalquilo, como se usan en el presente documento, incluyen aquellos grupos que están unidos al resto de la molécula a través de un heteroátomo, tal como $-\text{C(O)R}'$, $-\text{C(O)NR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{OR}'$, $-\text{SR}'$ y/o $-\text{SO}_2\text{R}'$. Cuando se cita "heteroalquilo", seguido de la mención de grupos heteroalquilo específicos, tales como $-\text{NR}'\text{R}''$ o similares, se entenderá que los términos heteroalquilo y $-\text{NR}'\text{R}''$ no son redundantes ni excluyentes entre sí. Más bien, los grupos heteroalquilo específicos se citan para añadir claridad. Por lo tanto, el término "heteroalquilo" no debe ser interpretado en el presente documento como excluyente de grupos heteroalquilo específicos, tales como $-\text{NR}'\text{R}''$ o similares.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Un "cicloalquileno" y "heterocicloalquileno" se refieren a un radical divalente derivado de cicloalquilo y heterocicloalquilo, respectivamente.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, los términos tales como "haloalquilo", pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, la expresión "haloalquilo (C₁-C₄)" pretende incluir, pero sin limitación, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado poliinsaturado, aromático, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (preferentemente, de 1 a 3 anillos) que están condensados entre sí o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y de azufre están opcionalmente oxidados, y el/los átomo/s de nitrógeno está/n opcionalmente cuaternizado/s. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo anteriormente indicados se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación. "Arieno" y "heteroarileno" se refieren a un radical divalente derivado de un arilo y heteroarilo, respectivamente.

Por razones de brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxilo, ariltioxilo, arilalquilo) incluye anillos tanto de arilo como de heteroarilo según lo definido anteriormente. Así pues, el término "arilalquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que se ha reemplazado un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno), por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo) y similares).

El término "oxo", como se usa en el presente documento, significa un oxígeno que está doblemente unido a un átomo de carbono.

El término "alquilsulfonilo", como se usa en el presente documento, significa una fracción que tiene la fórmula -S(O₂)-R', en la que R' es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente. R' puede tener un número especificado de átomos de carbonos (por ejemplo, alquil (C₁-C₄)-sulfonilo).

Se pretende que cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluya tanto formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. A continuación, se proporcionan sustituyentes ilustrativos para cada tipo de radical.

Los sustituyentes de los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos a los que se suele hacer referencia como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados entre, pero sin limitación: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR'C(O)₂R', -NRC(NR'R"R"')=NR''', -NR-C(NR'R"R"')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R"', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m' + 1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R", R''' y R'''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos), grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituidos o no sustituidos, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la divulgación incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando están presentes más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, se pretende que -NR'R'' incluya, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. De la descripción anterior de sustituyentes, un experto en la materia comprenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

Similares a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi (C₁-C₄) y fluoroalquilo (C₁-C₄), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos y donde R', R'', R''' y R'''' se seleccionan independientemente preferentemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la divulgación incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando están presentes más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden formar opcionalmente un anillo de la fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en la que T y U son independientemente, -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede estar reemplazado opcionalmente por un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de fórmula -(CRR')_s-X'-(C''R''')_d-, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X' es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- o -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan preferentemente independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" o "heteroátomo anular" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P) y silicio (Si).

Un "grupo sustituyente", como se usa en el presente documento, significa un grupo seleccionado entre las siguientes fracciones:

(A) -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, oxo, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido y

(B) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre:

(i) oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido y

(ii) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado entre:

(a) oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido y

(b) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo, sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de oxo, -OH, -NH₂, -SH, -CN, -CF₃, -NO₂, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido y heteroarilo no sustituido.

Un "sustituyente de tamaño limitado" o "grupo sustituyente de tamaño limitado", como se usan en el presente documento, significa un grupo seleccionado entre todos los sustituyentes descritos anteriormente para un "grupo sustituyente", en el que cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo C₁-C₂₀ sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo C₄-C₈ sustituido o no sustituido y cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 4 a 8 miembros sustituido o no sustituido.

Un "sustituyente inferior" o "grupo sustituyente inferior", como se usan en el presente documento, significa un grupo seleccionado entre todos los sustituyentes descritos anteriormente para un "grupo sustituyente", en el que cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo C₁-C₈ sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo C₅-C₇ sustituido o no sustituido y cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de los compuestos activos que se

preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de bases poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, hidriódico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como los ácidos acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, *p*-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónicos o galacturónicos y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente divulgación contienen funcionalidades básicas y ácidas que permiten que los compuestos se conviertan bien en sales de adición de base o de ácido.

Así pues, los compuestos pueden existir en forma de sales con ácidos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dichas sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (por ejemplo, (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos incluyendo mezclas racémicas, succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico. Estas sales se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia.

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferentemente poniendo en contacto la sal con una base o un ácido, y aislando el compuesto precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares.

Además de las formas de sal, la presente divulgación proporciona compuestos que están en una forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en el presente documento son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente divulgación. Además, los profármacos pueden convertirse en los compuestos de la presente divulgación mediante métodos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente divulgación cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o un reactivo químico adecuado.

Ciertos compuestos de la presente divulgación pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas, y están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Ciertos compuestos de la presente divulgación pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente divulgación y pretenden estar dentro del alcance de la presente divulgación.

Ciertos compuestos de la presente divulgación poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales están englobados dentro del alcance de la presente divulgación. Los compuestos de la presente divulgación no incluyen aquellos que son conocidos en la técnica como demasiado inestables para sintetizarse y/o aislarse.

Los compuestos de la presente divulgación también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden radiomarcarse con isótopos radiactivos, tales como, por ejemplo, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente divulgación, ya sean radiactivas o no, están englobadas dentro del alcance de la presente divulgación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. El tratamiento con los compuestos durante siete días es suficiente para inducir células madre pluripotentes a partir de fibroblastos humanos transducidos con los cuatro factores de reprogramación. (a) Línea temporal para la inducción de iPSC humanas usando el tratamiento combinado con SB431542 y PD0325901 junto con los 4 FT. El tratamiento comenzó con la resiembra celular el día 7 después de la transducción de 4 FT y se mantuvo durante 7 días. (b) tinción para las colonias ALP⁺ que emergieron en los cultivos no tratados (izquierda) o cultivos tratados con 2 compuestos (derecha) en siete días. (c) RT-PCR que muestra una expresión de ARNm endógeno elevada de los marcadores de pluripotencia OCT4 y NANOG en cultivos tratados con 2 compuestos. (d) tinción con TRA-1-81 el día 14 sin (izquierda) o con (derecha) tratamiento con 2 compuestos. (e)

Se representan los números de colonias NANOG⁺ del día 14 en diferentes condiciones de tratamiento. (f) Tinción típica para marcadores específicos de hESC (NANOG y SSEA4) presentada por iPSC de D14. Barras de escala, 50 µm en (d y f).

5 **Figura 2.** El tratamiento prolongado con los compuestos y el paso de las células aumentaron espectacularmente el número de colonias reprogramadas. (a) Línea temporal de la inducción de iPSC humanas usando SB431542, PD0325901 y tiazovivina. (b) Las iPSC del Día 30 expresaron marcadores de pluripotencia NANOG, SSEA4 y TRA-1-81. Barras de escala, 50 µm. (c) Tinción con ALP de los cultivos del día 30 con (paneles superiores) o sin (paneles inferiores) el tratamiento con 3 compuestos. Las zonas con recuadros de los paneles de la izquierda se amplían en los paneles de la derecha. Barras de escala, 200 µm. (d) Número de colonias NANOG⁺ del día 30 en diferentes condiciones de tratamiento, sin división. (e) Número de colonias NANOG⁺ del día 30 de cultivos tratados con 3 compuestos sometidos a tripsinización como se indica. (f) La RT-PCR en las colonias de iPSC obtenidas con el tratamiento de 3 compuestos muestra una expresión reactiva de marcadores endógenos de pluripotencia. HDF: Fibroblasto dérmico humano.

15 **Figura 3.** Diferenciación *in vitro* e *in vivo* de iPSC generadas con el tratamiento de 3 compuestos. (a) Las micrografías muestran los cuerpos embrioides (EB) generados a partir de iPSC y la diferenciación *in vitro* en tipos de células ectodérmicas (β III TUBULINA), mesodérmicas (BRACHYURY) y endodérmicas (PDX1). Barras graduadas, EB: 100 µm; otros 10 µm. (b) RT-PCR que muestra la expresión de los marcadores de linaje representativos y la ausencia de la expresión del ARN m de OCT4 en células diferenciadoras. U-indiferenciado, D-diferenciado. (c) Los teratomas generados en ratones desnudos de iPSC (3 colonias independientes ensayadas) consisten en tejidos de las tres capas germinales. Panel izquierdo: 1 - músculo, 2 -epitelio neuronal; panel central: 1 - piel, 2 - epitelio intestinal; panel derecho: 1 - hueso, 2 - cartílago. Barras graduadas, 20 µm.

25 **Figura 4.** El tratamiento con compuestos mejoró la generación de células iPS de una manera dependiente de la dosis.

Figura 5. Estructura química de Tiazovivina.

30 **Figura 6.** La expresión transgénica y el silenciamiento son independientes del tratamiento con los compuestos.

Figura 7. Las colonias de células iPS expandidas establemente generadas a través del tratamiento con los compuestos presentaron un cariotipo normal.

35 **Figura 8. Generación de células madre pluripotentes inducidas por seres humanos a partir de queratinocitos primarios por un solo gen, OCT4 y moléculas pequeñas.** (a) El tratamiento con PD0325901 (PD) 0,5 µM y A-83-01 (A83) 0,5 µM mejoró significativamente la generación de iPSC a partir de queratinocitos humanos primarios transducidos con los 4 FT (4F, OKSM) o 3TF (3F, OKS). Se sembraron NHEK a una densidad de 100.000 células transducidas por placa de 10 cm. (b) Exploraciones químicas adicionales identificaron PS48, NaB y su combinación que pueden mejorar esencialmente la reprogramación de queratinocitos humanos primarios transducidos con 2TF (OK). Se sembraron NHEK a una densidad de 100.000 células transducidas por placa de 10 cm. (c) Esquema experimental para la generación de iPSC humanas a partir de queratinocitos humanos primarios transducidos por un único gen de reprogramación, OCT4. KCM, medio de cultivo de queratinocitos; hESCM, medios de cultivo de ESC humanas. (d) Inmunotinción viva con TRA-1-81 de colonias de iPSC que se generaron a partir de queratinocitos humanos primarios transducidos con 2TF/OK o 1TF/OCT4 antes de la recogida de las colonias. (e) Las células iPSC-OK e iPSC-O humanas establecidas expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo ALP (fosfatasa alcalina), OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4 y TRA-1-81. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

50 **Figura 9. Caracterizaciones en profundidad de células iPSC-OK e iPSC-O humanas.** (a) Análisis de la expresión mediante RT-PCR de los genes de pluripotencia endógenos, y OCT4 y KLF4 exógenos. Se usó GAPDH como un control de entrada. (b) Análisis de la metilación de promotores de OCT4 y NANOG mediante secuenciación genómica con bisulfato. Los círculos abiertos y los círculos cerrados indican CpG no metilados y metilados en las regiones promotoras, respectivamente. (c) diagramas de dispersión que comparan patrones de expresión génica global entre células iPSC-O y NHEK, y hESC. Las posiciones de los genes de pluripotencia OCT4, NANOG y SOX2 se muestran mediante flechas. Las líneas negras indican el equivalente lineal y cambios del doble en los niveles de expresión génica entre las muestras. (d) Las iPSC-OK e iPSC-O humanas se pudieron diferenciar eficazmente *in vitro* en células en las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neuronales (β III tubulina), células mesodérmicas (SMA) y células endodérmicas (AFP) usando el método EB. (e) Ensayo de PCR cuantitativa de los marcadores de las tres capas germinales de iPSC humanas diferenciadas usando el método EB: ectodermo (PAX6, β III TUBULINA), mesodermo (FOXF1, HAND1) y endodermo (AFP, GATA6). Los datos denotan cambios normalizados de GAPDH en relación con iPSC humanas parentales indiferenciadas. (f) iPSC-OK e iPSC-O humanas pudieron producir eficazmente el teratoma completo, que contiene células diferenciadas en las tres capas germinales, en ratones SCID.

65 **Figura 10. Generación y caracterizaciones de células madre pluripotentes inducidas por seres humanos a**

partir de células endoteliales de vena umbilical por un solo gen, OCT4 y moléculas pequeñas. (a) Esquema experimental para la generación de iPSC humanas a partir de HUVEC transducidas por OCT4. HCM, medio de cultivo de HUVEC; hESCM, medios de cultivo de ESC humanas. (b) Las células hiPSC-O establecidas a partir de HUVEC expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (c) Análisis de la expresión mediante RT-PCR de los genes de pluripotencia endógenos. Se usó *GAPDH* como un control de entrada. (d) Análisis de la metilación de promotores de *OCT4* y *NANOG* mediante secuenciación genómica con bisulfato. Los círculos abiertos y los círculos cerrados indican CpG no metilados y metilados en las regiones promotoras, respectivamente. (e) las células hiPSC-O de HUVEC pudieron diferenciarse eficazmente *in vitro* en células en las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neuronales (β III tubulina), células mesodérmicas (SMA) y células endodérmicas (AFP) usando el método EB. (f) las células hiPSC-O pudieron producir con eficacia el teratoma completo, que contiene células diferenciadas en las tres capas germinales en ratones *SCID*.

Figura 11. Caracterización de células iPSC-OK humanas a partir de AHEK. (a) Las células hiPSC-O establecidas a partir de queratinocitos adultos expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG, SOX2 y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (b) Estas células hiPSC-O pudieron diferenciarse eficazmente *in vitro* en células en las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neuronales (β III tubulina), células mesodérmicas (SMA) y células endodérmicas (AFP) usando el método EB.

Figura 12. Caracterización de células iPSC-O humanas a partir de AFDC. (a) Las células hiPSC-O establecidas a partir de células derivadas de líquido amniótico expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG, SOX2 y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (b) Estas células hiPSC-O pudieron diferenciarse eficazmente *in vitro* en células en las tres capas germinales, incluyendo células ectodérmicas neuronales (β III tubulina), células mesodérmicas (SMA) y células endodérmicas (AFP) usando el método EB.

Figura 13. Estirpes celulares de hiPSC adicionales expresan marcadores de pluripotencia típicos. El resto de estirpes celulares hiPSC-O establecidos expresan marcadores de pluripotencia típicos, incluyendo NANOG y SSEA-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Figura 14. Cultivo sin alimentación de estirpes celulares hiPSC. Se dividieron hiPSC sobre placas recubiertas con Matrigel/ECM en medio de hESC químicamente definido como se informó anteriormente. Estas hiPSCa pudieron mantenerse y ampliarse en un entorno sin alimentación. ICC mostró la expresión de los marcadores de pluripotencia, OCT4 y SSEA4. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Figura 15. Genotipificación de las hiPSC. El análisis mediante RT-PCR usando ADN genómico muestra que solo el transgén OCT4 se integró en el genoma de las estirpes de hiPSC-O (hiPSC-O n.º 1, hiPSC-O n.º 3, hiPSC-O n.º 21, hiPSC-O n.º 26 y hiPSC-O n.º 31). Las NHEK (a) y las HUVEC (b) se usaron como controles negativos, mientras que los vectores se usaron como controles positivos.

Figura 16. Integración del transgén OCT4 en las hiPSC. Se digirió el ADN genómico (10 μ g) con EcoRI y se hibridó con la sonda de ADNc de *OCT4* (un fragmento EcoRI/Spel de pSin-EF2-OCT4-Pur). Se detectaron múltiples integraciones transgénicas.

Figura 17. Cariotipificación para estirpes celulares hiPSC. La propagación en metafase de hiPSC-O n.º 1 (a) y hiPSC-O n.º 21 (b) muestran el cariotipo normal después del paso 15.

Descripción detallada

I. Introducción

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que una combinación de un inhibidor de ALK5, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ROCK mejoran enormemente la eficacia de inducción de la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes transformadas con cuatro factores de transcripción. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos según lo expuesto en las reivindicaciones de inducción de la pluripotencia en células de mamífero no pluripotentes, método que comprende poner en contacto las células no pluripotentes con al menos un inhibidor del receptor de TGF β /ALK5, en combinación con un inhibidor de la vía MEK/ERK y un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK.

II. Inhibidores del receptor de TGF β /ALK5

La quinasa de tipo receptor de activina 5 (ALK-5) es el principal receptor de TGF β que media en las respuestas celulares a los TGF- β (Massague J. *Annu Rev Biochem* 67:753-791 (1998); Massague J., Chen Y. G. *Genes Dev* 14:627-644 (2000); Franzen P, et al., *Cell* 75:681-692 (1993)). Tras la unión del ligando, la T β RII quinasa constitutivamente activa fosforila ALK-5 que, a su vez, activa las cascadas de transducción de señalase cadena abajo. La fosforilación de Smad2 y Smad3 activada por ALK-5 es la vía más destacada (Massague J., Chen Y. G. *Genes Dev* 14:627-644 (2000)). Una vez activado, Smad2/3 se asocia con Smad4 y se translocaliza hasta el núcleo, donde el complejo regula a nivel de la transcripción la expresión del gen diana.

- Los inhibidores del receptor de TGFβ (es decir, ALK5) pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que suprimen la expresión de los receptores de TGFβ (por ejemplo, ALK5). Los ejemplos de inhibidores del receptor de TGFβ/ALK5 incluyen, pero sin limitación, SB431542 (véase, por ejemplo, Inman, *et al.*, *Molecular Pharmacology* 62(1):65-74 (2002)), A-83-01, también conocido como 3-(6-metil-2-piridinil)-*N*-fenil-4-(4-quinolinil)-1*H*-pirazol-1-carbotioamida (véase, por ejemplo, Tojo, *et al.*, *Cancer Science* 96(11):791-800 (2005), y disponible en el mercado, por ejemplo, en eToicris Bioscience); 2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, por ejemplo, Dalton, *et al.*, WO2008/094597), BMP4 (véase Dalton, *supra*), GW788388 (-(4-3-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-4-il]piridin-2-il)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)benzamida) (véase, por ejemplo, Gellibert, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* 49(7):2210-2221 (2006)), SM16 (véase, por ejemplo, Suzuki, *et al.*, *Cancer Research* 67(5):2351-2359 (2007)), IN-1130 (3-((5-(6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1*H*-imidazol-2-il)metil)benzamida) (véase, por ejemplo, Kim, *et al.*, *Xenobiotica* 38(3):325-339 (2008)), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1*H*-pirazol-4-il)piridina) (véase, por ejemplo, de Gouville, *et al.*, *Drug News Perspective* 19(2):85-90 (2006)), SB-505124 (clorhidrato de 2-(5-benzo-1,3]dioxol-5-il-2-*terc*-butil-3*H*-imidazol-4-il)-6-metilpiridina) (véase, por ejemplo, DaCosta, *et al.*, *Molecular Pharmacology* 65(3):744-752 (2004)) y derivados de pirimidina (véanse, por ejemplo, los numerosos en Stiefl, *et al.*, WO2008/006583). Además, aunque no se pretende que un "inhibidor de ALK5" abarque inhibidores de quinasa no específicos, se ha de entender que un "inhibidor de ALK5" abarca inhibidores que inhiben ALK4 y/o ALK7, además de ALK5, tales como, por ejemplo, SB-431542 (véase, por ejemplo, Inman, *et al.*, *J. Mol. Pharmacol.* 62(1): 65-74 (2002)).
- En vista de los datos que, en el presente documento, muestran el efecto de la inhibición de ALK5, se cree que la inhibición de la vía TGFβ/activina tendrá efectos similares. Por lo tanto, cualquier inhibidor (por ejemplo, cadena arriba o cadena abajo) de la vía de TGFβ/activina puede usarse en combinación con, o en lugar de, inhibidores de ALK5 descritos en cada párrafo del presente documento. Los inhibidores de la vía de TGFβ/activina ilustrativos incluyen, pero sin limitación: inhibidores del receptor de TGFβ, inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3, inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD4 y activadores/agonistas de SMAD6 y SMAD7. Además, las categorizaciones descritas a continuación son meramente con fines organizativos, y un experto en la materia sabría que los compuestos pueden afectar a uno o más puntos dentro de una vía y, por tanto, los compuestos pueden funcionar en más de una de las categorías definidas.
- Los inhibidores del receptor de TGFβ pueden incluir anticuerpos frente, variantes negativas dominantes de y ARNip o ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a receptores de TGFβ. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero sin limitación, SU5416; clorhidrato de 2-(5-benzo-1,3]dioxol-5-il-2-*terc*-butil-3*H*-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124); lerdelimumb (CAT-152); metelimumab (CAT-192); GC-1008; ID11; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; Gleevec; 3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona (Morin); activina-M108A; P144; TBR2-Fc soluble; y células tumorales transfectadas antisentido que se dirigen a receptores de TGFβ. (Véase, por ejemplo, Wrzesinski, *et al.*, *Clinical Cancer Research* 13(18):5262-5270 (2007); Kaminska, *et al.*, *Acta Biochimica Polonica* 52(2):329-337 (2005); y Chang, *et al.*, *Frontiers in Bioscience* 12:4393-4401 (2007)). Además, los inventores han encontrado que los inhibidores de TGFβ BMP-4 y BMP-7 tienen efectos similares de reprogramación celular a los del inhibidor de ALK5 descrito en los ejemplos, proporcionando así evidencias adicionales de que los inhibidores de TGFβ pueden usarse para la reprogramación (por ejemplo, en combinación con un inhibidor de la vía de MEK/ERK y un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK). Los ejemplos de secuencias de proteínas BMP-4 y BMP-7 humanas se exponen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.405.192.
- Los inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3 pueden incluir anticuerpos frente, variantes negativas dominantes de y ácidos nucleicos antisentido dirigidos a SMAD2 o SMAD3. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen PD169316; SB203580; SB-431542; LY364947; A77-01; y 3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona (Morin). (Véase, por ejemplo, Wrzesinski, *supra*; Shimanuki, *et al.*, *Oncogene* 26:3311-3320 (2007); y Kataoka, *et al.*, EP1992360.)
- Los inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y smad4 pueden incluir anticuerpos frente, variantes negativas dominantes de y ácidos nucleicos antisentido dirigidos a SMAD2, SMAD3 y/o smad4. Los ejemplos específicos de inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD4 incluyen, pero sin limitación, Trx-SARA, Trx-xFoxH1b and Trx-Lef1. (véase, por ejemplo, Cui, *et al.*, *Oncogene* 24:3864-3874 (2005) y Zhao, *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 17:3819-3831 (2006).)
- Los activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de y ácidos nucleicos antisentido dirigidos a SMAD 6 o SMAD 7. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos de PTO como smad7. Véase, por ejemplo, Miyazono, *et al.*, US6534476, y Steinbrecher, *et al.*, US2005119203.
- Los expertos en la materia apreciarán que la concentración del inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5 dependerá de qué inhibidor específico se use. En general, la concentración de un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5 en un cultivo celular estará en el intervalo de CI20-CI100 (es decir, concentraciones en las que se alcanza una inhibición del 20 % al 100 % de inhibición en las células). Por ejemplo, SB432542 se usaría a 0,5-10 μM, óptimamente a aproximadamente 1-5 μM. En ciertos aspectos, se puede usar una combinación de dos o más inhibidores diferentes del receptor de TGFβ/ALK5.

III. Inhibidores de la vía de MEK/ERK

La vía de MEK/ERK se refiere a las serina/treonina quinasas MEK y ERK que forman parte de una vía de transducción de señales. En general, Ras activado activa la actividad de la proteína quinasa de la RAF quinasa. La RAF quinasa fosforila y activa MEK que, a su vez, fosforila y activa una proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La MAPK fue originalmente denominada "quinasas reguladas por señales extracelulares" (ERK) y la proteína quinasa asociada a los microtúbulos (MAPK). Por lo tanto, "ERK" y "MAPK" se usan como sinónimos.

Los inhibidores de la vía de MEK/ERK se refieren a inhibidores bien de MEK o de ERK que forman parte de la vía de Raf/MEK/ERK. Debido a que los inventores han encontrado que los inhibidores de MEK son eficaces para mejorar la inducción de las iPSC, y dado que MEK controla directamente la actividad de ERK, se cree que los inhibidores de MEK descritos para la presente divulgación se pueden reemplazar por un inhibidor de ERK como se desee.

[0110] Los inhibidores de MEK (es decir, MEK1 (también conocido como proteína quinasa quinasa 1 activada por mitógenos) y/o MEK2 (también conocida como proteína quinasa quinasa 2 activada por mitógenos) pueden incluir anticuerpos contra, variantes negativas dominantes de, y ARNip y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que suprimen la expresión de MEK. Los ejemplos específicos de inhibidores de MEK incluyen, pero sin limitación, PD0325901, (véase, por ejemplo, Rinehart, *et al.*, *Journal of Clinical Oncology* 22: 4456-4462 (2004)), PD98059 (disponible, por ejemplo, en Cell Signaling Technology), U0126 (disponible, por ejemplo, en Cell Signaling Technology), SL 327 (disponible, por ejemplo, en Sigma-Aldrich), ARRY-162 (disponible, por ejemplo, en Array Biopharma), PD184161 (véase, por ejemplo, Klein, *et al.*, *Neoplasia* 8:1-8 (2006)), PD184352 (CI-1040) (véase, por ejemplo, Mattingly, *et al.*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:456-465 (2006)), sunitinib (véase, por ejemplo, Voss, *et al.*, US2008004287), sorafenib (véase, Voss *supra*), Vandetanib (véase, Voss *supra*), pazopanib (véase, por ejemplo, Voss *supra*), Axitinib (véase, Voss *supra*) y PTK787 (véase, Voss *supra*).

En la actualidad, varios inhibidores de MEK están siendo sometidos a evaluaciones de ensayos clínicos. CI-1040 se ha evaluado en ensayos clínicos de fase I y II para el cáncer (véase, por ejemplo, Rinehart, *et al.*, *Journal of Clinical Oncology* 22(22):4456-4462 (2004)). Otros inhibidores de MEK que se están evaluando en ensayos clínicos incluyen PD184352 (véase, por ejemplo, English, *et al.*, *Trends in Pharmaceutical Sciences* 23(1):40-45 (2002)), BAY 43-9006 (véase, por ejemplo, Chow, *et al.*, "Cytometry" (*Communications in Clinical Cytometry*) 46:72-78 (2001)), PD-325901 (también PD0325901), GSK1120212, ARRY-438162, RDEA119, AZD6244 (también ARRY-142886 o ARRY-886), RO5126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704). (Véase, por ejemplo, la información de los Institutos Nacionales de Salud ubicada en la World Wide Web en clinicaltrials.gov, así como la información del Instituto Nacional del Cáncer ubicada en la World Wide Web en cancer.gov/clinicaltrials).

Los inhibidores ilustrativos de ERK (es decir, ERK1 (también conocido como MAPK3) y/o ERK2 (también conocido como MAPK1)) incluyen PD98059 (véase, por ejemplo, Zhu, *et al.*, *Oncogene* 23:4984-4992 (2004)), U0126 (véase, Zhu, *supra*), FR180204 (véase, por ejemplo, Otori, *Drug News Perspective* 21(5):245-250 (2008)), sunitinib (véase, por ejemplo, el documento US2008004287), sorafenib, Vandetanib, pazopanib, Axitinib y PTK787.

Los expertos en la materia apreciarán que la concentración del inhibidor de la vía de MEK/ERK dependerá de qué inhibidor específico se use. En aspectos particulares, se puede usar una combinación de dos o más inhibidores de la vía de MEK/ERK diferentes.

IV. Inhibidores de Rho GTPasa/ROCK

La presente divulgación proporciona usos y composiciones que comprenden inhibidores de la vía de Rho-GTPasa/ROCK. La vía incluye la proteína cadena abajo Miosina II, que está más abajo de ROCK (Rho-ROCK-Miosina II forma la vía/el eje). Por lo tanto, se puede usar cualquiera o todos los inhibidores de Rho GTPasa, un inhibidor de ROCK o un inhibidor de miosina II para conseguir los efectos descritos en el presente documento. Los expertos en la materia apreciarán que la concentración del inhibidor de la vía de Rho-GTPasa/ROCK dependerá de qué inhibidor específico se use. En aspectos adicionales, se puede usar una combinación de dos o más inhibidores de la vía de Rho-GTPasa/ROCK diferentes.

Cualquier Rho GTPasa debe ser eficaz en los métodos y en las composiciones de la divulgación. Los inhibidores de Rho GTPasa pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que se dirigen a Rho GTPasa. Un ejemplo de inhibidor de la Rho GTPasa es la toxina C3 de *Clostridium botulinum*.

Cualquier inhibidor de miosina II debe ser eficaz en los métodos y en las composiciones de la divulgación. Los inhibidores de la miosina II pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que se dirigen a la miosina II. Un ejemplo de inhibidor de la miosina II es la blebbistatina. Los inventores han encontrado que la blebbistatina puede sustituirse por SB431542 (un inhibidor de ALK5), aunque con un efecto reducido, en las mezclas y en los métodos descritos en el apartado de ejemplos. Otros inhibidores incluyen, pero sin limitación, los descritos en la patente de EE.UU. n.º

7.585.844.

"ROCK" usado en el presente documento se refiere a una serina/treonina quinasa que actúa cadena abajo de Rho. ROCK I (también denominada ROK β o p160ROCK) y ROCK II (también denominada ROK α o Rho quinasa) están
 5 ambas reguladas por RhoA. Véase, por ejemplo, Riento, K. y Ridley, A. J., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4, 446-456 (2003). Un "inhibidor de ROCK" se refiere a agentes que inhiben a ambas o a cualquiera de las ROCK. Los inhibidores de ROCK pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de, y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que se dirigen a ROCK. Algunos ejemplos de inhibidores de ROCK incluyen, pero sin limitación, los descritos en las publicaciones internacionales n.º:
 10 WO98/06433, WO00/78351, WO01/17562, WO02/076976, WO02/076977, WO2003/062227, WO2003/059913, WO2003/062225, WO2002/076976, WO2004/039796, WO03/082808, WO05/035506, WO05/074643; y las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 2005/0209261, 2005/0192304, 2004/0014755, 2004/0002508, 2004/0002507, 2003/0125344 y 2003/0087919. Los inhibidores de ROCK incluyen, por ejemplo, diclorhidrato de (+)-(R)-*trans*-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida o Wf536; monoclorhidrato de 4-(1R)-1-aminoetil]-N-(4-piridil)benzamida o Fasudil; clorhidrato de 5-(hexahidro-1H-1,4-diazepin-1-ilsulfonil)isoquinolina o Compuesto 1; 4-(*trans*-4-aminociclohexil)amino]-2,5-difluorobenzamida o Compuesto 2; 4-(*trans*-4-aminociclohexil)amino]-5-cloro-2-fluorobenzamida o Compuesto 3; diclorhidrato de 2-(4-(1H-indazol-5-il)fenil]-2-propanamina o Compuesto 4; N-(3-metoxibencil)-4-(4-piridil)benzamida, Y-27632 (véase, por ejemplo, Ishizaki *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 57, 976-983 (2000); Narumiya *et al.*, *Methods Enzymol.* 325,273-284 (2000)), Fasudil (también denominado HA1077) (véase, por ejemplo, Uenata *et al.*, *Nature* 389: 990-994 (1997)), sc-3536 (véase, por ejemplo, Darenfed, H., *et al. Cell Motil. Cytoskeleton.* 64: 97-109, 2007), H-1152 (véase, por ejemplo, Sasaki *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 93: 225-232 (2002)), Wf-536 (véase, por ejemplo, Nakajima *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol.* 52(4): 319-324 (2003)), Y-30141 (descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.478.838) y sus derivados, y ácido nucleico antisentido para ROCK, ácido nucleico inductor de interferencia de ARN (por ejemplo, ARNip), péptidos competitivos, péptidos antagonistas,
 25 anticuerpos inhibidores, fragmentos de anticuerpo-ScFV, variantes negativas dominantes y vectores de expresión de los mismos.

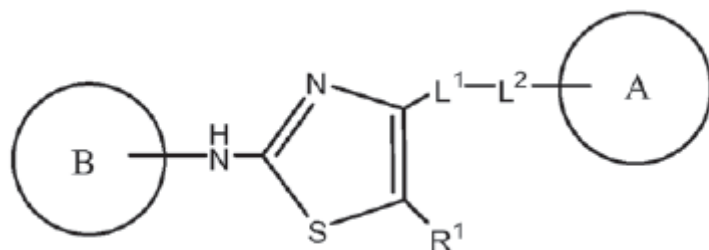
Los compuestos anteriores se pueden preparar en forma de sales de adición de ácidos con ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables, según se requiera. Los ejemplos de las sales de adición de ácido
 30 incluyen sales con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares; sales con ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido aspártico y ácido glutámico; y sales con ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido hidroxibencenosulfónico, ácido dihidroxibencenosulfónico y similares.

Los compuestos y las sales de adición de ácido de los mismos pueden ser un anhídrido, hidrato o solvato de los mismos.

Para poner en práctica la presente divulgación, los inhibidores de ROCK, en general, son adecuados sin limitación, siempre que un inhibidor pueda inhibir la función de la Rho-quinasa (ROCK), y los inhibidores adecuados incluyen Y-27632 (por ejemplo, véase Ishizaki *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 57, 976-983 (2000); Narumiya *et al.*, *Methods Enzymol.* 325,273-284 (2000)), sc-3536 (véase, por ejemplo, Darenfed, H., *et al. Cell Motil. Cytoskeleton.* 64: 97-109, 2007), Fasudil (también denominado HA1077) (véase, por ejemplo, Uenata *et al.*, *Nature* 389: 990-994 (1997)), H-1152 (véase, por ejemplo, Sasaki *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 93: 225-232 (2002)), Wf-536 (véase, por ejemplo, Nakajima *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol.* 52(4): 319-324 (2003)), Y-30141 (descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.478.838) y sus derivados, y ácidos nucleicos antisentido para ROCK, ácido nucleico inductor de interferencia de ARN (por ejemplo, ARNip), péptidos competitivos, péptidos antagonistas, anticuerpos inhibidores, fragmentos de anticuerpo-ScFV, variantes negativas dominantes y vectores de expresión de los mismos. Además, dado que se conocen otros compuestos de bajo peso molecular como inhibidores de ROCK, dichos compuestos o derivados de los mismos
 50 también pueden usarse en la presente divulgación (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patentes de EE.UU. n.º 20050209261, 20050192304, 20040014755, 20040002508, 20040002507, 20030125344 y 20030087919, y las publicaciones de patente internacional n.º 2003/062227, 2003/059913, 2003/062225, 2002/076976 y 2004/039796). En la presente divulgación, también se puede usar una combinación de uno o dos o más de los inhibidores de ROCK.

Otros inhibidores de ROCK adicionales incluyen, por ejemplo, HA1100, 3-(4-piridil)-1H-indol y N-(4-piridil)-N-(2,4,6-triclorofenil)urea, cada una de las cuales se encuentra disponible en el mercado (por ejemplo, en Alexis Biochemicals (Plymouth Meeting, PA)).

60 En algunos aspectos, los inhibidores de ROCK tienen la fórmula:



(I).

En la fórmula (I), el anillo A es un cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido. El anillo B es un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

L^1 es $-C(O)-NR^2-$ o $-NR^2-C(O)-$. L^2 es un enlace, alquileo sustituido o no sustituido, o heteroalquileo sustituido o no sustituido.

R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

En algunos aspectos, el anillo A es un arilo sustituido o no sustituido. El anillo A también puede ser un fenilo sustituido o no sustituido.

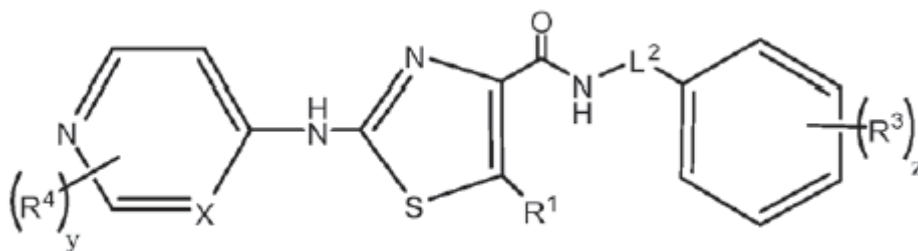
En otros aspectos el anillo B es un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido. El anillo B puede ser un heteroarilo sustituido o no sustituido. En otros aspectos más, el anillo B es un pirazolilo sustituido o no sustituido, furanilo sustituido o no sustituido, imidazolilo sustituido o no sustituido, isoxazolilo sustituido o no sustituido, oxadiazolilo sustituido o no sustituido, oxazolilo sustituido o no sustituido, pirrolilo sustituido o no sustituido, piridilo sustituido o no sustituido, pirimidilo sustituido o no sustituido, piridazinilo sustituido o no sustituido, tiazolilo sustituido o no sustituido, triazolilo sustituido o no sustituido, tienilo sustituido o no sustituido, dihidrotienopirazolilo sustituido o no sustituido, tianafenilo sustituido o no sustituido, carbazolilo sustituido o no sustituido, benzotienilo sustituido o no sustituido, benzofuranilo sustituido o no sustituido, indolilo sustituido o no sustituido, quinolinilo sustituido o no sustituido, benzotriazolilo sustituido o no sustituido, benzotiazolilo sustituido o no sustituido, benzooxazolilo sustituido o no sustituido, bencimidazolilo sustituido o no sustituido, isoquinolinilo sustituido o no sustituido, isoindolilo sustituido o no sustituido, acridinilo sustituido o no sustituido, benzoisazolilo sustituido o no sustituido, o dimetilhidantoína sustituida o no sustituida.

L^2 puede ser alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. En algunos aspectos, L^2 es alquilo C_1-C_{10} no sustituido. L^2 también puede ser metileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, metileno no sustituido).

R^2 puede ser hidrógeno. R^1 puede ser hidrógeno o alquilo C_1-C_{10} no sustituido. En algunos aspectos, R^1 es simplemente hidrógeno.

En algunos aspectos de la Fórmula (I), el anillo A es arilo sustituido o no sustituido, el anillo B es heteroarilo sustituido o no sustituido, R^1 es hidrógeno y L^2 es alquilo C_1-C_{10} no sustituido.

En otro aspecto de la divulgación, el inhibidor de ROCK tiene la fórmula:



(II).

En la Fórmula (II), y es un número entero de 0 a 3 y z es un número entero de 0 a 5. X es $-N=$, $-CH=$ o $-CR^4=$. R^1 y L^2 son como se han definido anteriormente en las definiciones de la Fórmula (I).

R^3 , R^4 y R^5 son independientemente $-CN$, $-S(O)_nR^6$, $-NR^7R^8$, $-C(O)R^9$, $-NR^{10}-C(O)R^{11}$, $-NR^{12}-C(O)-OR^{13}$, $-C(O)NR^{14}R^{15}$, $-NR^{16}S(O)_2R^{17}$, $-OR^{18}$, $-S(O)_2NR^{19}$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no

sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en los que n es un número entero de 0 a 2, en los que si z es superior a 1, dos fracciones R³ se unen opcionalmente entre sí para formar un cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

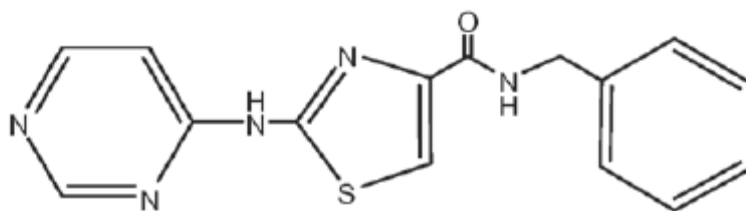
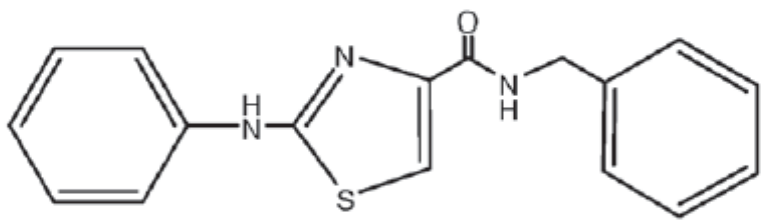
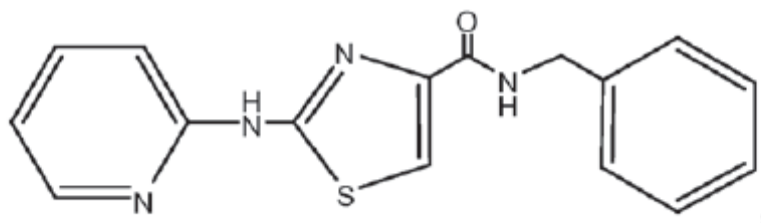
5 R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido.

10 En algunos aspectos, L² es alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. L² también puede ser alquilo C₁-C₁₀ no sustituido. Como alternativa, L² es metileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, metileno no sustituido).

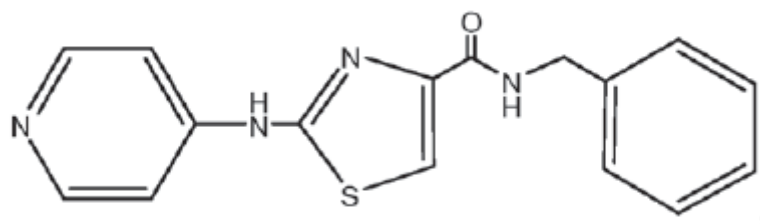
En otros aspectos, X es -N= o -CH=. El símbolo z puede ser 2. En otros aspectos más, dos fracciones R³ en vértices adyacentes están unidas entre sí a partir de un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. El símbolo z también puede ser 1. El símbolo y puede ser 0 o 1. R³ puede ser -OR¹⁸. R¹⁸ puede ser hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀ no sustituido.

En algunos aspectos, L² es metileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, metileno sustituido), X es -N= o -CH=, R¹ es hidrógeno, y y z son 0.

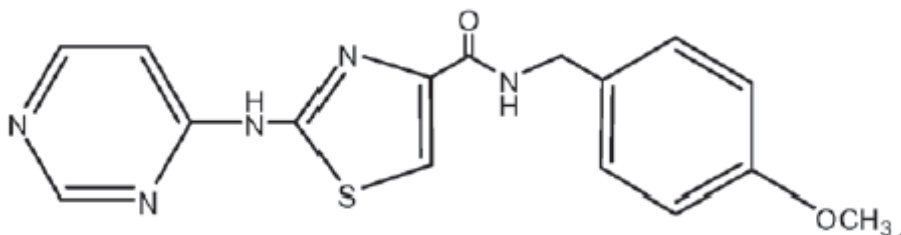
20 En otros aspectos, los compuestos tienen la fórmula:



(también denominado Tiazovivina o "Tzv"),



25
o



V. Inhibidores de GSK3

5 En diversos aspectos de la divulgación, uno o más inhibidores de GSK3 pueden incluirse en los métodos, en las mezclas y en los kits de la divulgación. Los inventores proporcionan la inclusión de inhibidores de GSK3 con al menos un inhibidor del receptor de TGF β /ALK5, en combinación con un inhibidor de vía de MEK/ERK y un inhibidor Rho GTPasa/ROCK. Los inhibidores de GSK3 pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de y ARNip, microARN, ácidos nucleicos antisentido y otros polinucleótidos que se dirigen a GSK3. Los ejemplos específicos de inhibidores de GSK3 incluyen, pero sin limitación, Kenpaullone, 1-azakenpaullone, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418 (véase, por ejemplo, Gould, *et al.*, *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 7:387-390 (2004)), CT 99021 (véase, por ejemplo, Wagman, *Current Pharmaceutical Design* 10:1105-1137 (2004)), CT 20026 (véase, Wagman, *supra*), SB216763 (véase, por ejemplo, Martin, *et al.*, *Nature Immunology* 6:777-784 (2005)), AR-A014418 (véase, por ejemplo, Noble, *et al.*, *PNAS* 102:6990-6995 (2005)), litio (véase, por ejemplo, Gould, *et al.*, *Pharmacological Research* 48: 49-53 (2003)), SB 415286 (véase, por ejemplo, Frame, *et al.*, *Biochemical Journal* 359:1-16 (2001)) y TDZD-8 (véase, por ejemplo, Chin, *et al.*, *Molecular Brain Research*, 137(1-2):193-201 (2005)). Otros inhibidores de GSK3 ilustrativos adicionales disponibles en Calbiochem (véase, por ejemplo, Dalton, *et al.*, WO2008/094597), incluyen, pero sin limitación, BIO (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxima (inhibidor de GSK3 IX); BIO-Acetoxima (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxima (inhibidor de GSK3 X); (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina (inhibidor de GSK3 XIII); Complejo de piridocarbazol-ciclopenadienilrutenio (inhibidor de GSK3 XV); TDZD-8 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (inhibidor de GSK3beta I); 2-tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-1,3,4]-oxadiazol (inhibidor de GSK3beta II); OTDZT 2,4-dibencil-5-oxotiadiazolidin-3-tiona (inhibidor de GSK3beta III); alfa-4-Dibromoacetofenona (inhibidor de GSK3beta VII); AR-AO 14418 *N*-(4-metoxibencil)-*N'*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea (inhibidor de GSK-3beta VIII); 3-(1-(3-hidroxipropil)-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-il]-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona (inhibidor de GSK-3beta XI); TWS1 19 compuesto de pirrolopirimidina (inhibidor de GSK3beta XII); L803 H-KEAPPAPPQSpP-NH2 o su forma miristoilada (inhibidor de GSK3beta XIII); 2-cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-il)-etanona (inhibidor de GSK3beta VI); AR-AO144-18; SB216763; y SB415286. Se han identificado restos de GSK3b que interaccionan con inhibidores. Véase, por ejemplo, Bertrand *et al.*, *J. Mol Biol.* 333(2): 393-407 (2003). Los inhibidores de GSK3 pueden activar, por ejemplo, la vía de Wnt/ β -catenina. Muchos de los genes β -catenina cadena abajo regulan conjuntamente las redes de genes de la pluripotencia. Por ejemplo, un inhibidor de GSK activa la expresión de cMyc, así como aumenta su estabilidad proteica y actividad a nivel de la transcripción. Así pues, en algunos aspectos, los inhibidores de GSK3 se pueden usar para estimular la expresión del polipéptido MYC endógeno en una célula, eliminando de este modo la necesidad de la expresión de MYC para inducir la pluripotencia.

35 Los expertos en la materia apreciarán que la concentración del inhibidor de GSK3 dependerá de qué inhibidor específico se use. En ciertos aspectos, se puede usar una combinación de dos o más inhibidores de GSK3 diferentes.

VI. Métodos de inducción de la pluripotencia

40 Hasta la fecha, se ha establecido un gran número de diferentes métodos y protocolos para inducir células de mamífero no pluripotentes en células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Se cree que los agentes descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con esencialmente cualquier protocolo para generar iPSC y, de este modo, mejorar la eficacia del protocolo. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona la incubación de células no pluripotentes con al menos un inhibidor del receptor de TGF β /ALK5, en combinación con un inhibidor de la vía de MEK/ERK y un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK en combinación con cualquier protocolo para generar iPSC. Se describe a continuación una selección de protocolos, y se cree que cada uno es combinable con los agentes de la divulgación para mejorar la eficacia del protocolo.

45 La mejora en la eficacia de un protocolo de generación de iPSC dependerá del protocolo y de los agentes de la divulgación que se usen. En algunos aspectos, la eficiencia se mejora en al menos un 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 % o más en comparación con el mismo protocolo sin la inclusión de los agentes de la divulgación (es decir, inhibidor del receptor de TGF β /ALK5, inhibidor de la vía de MEK/ERK e inhibidor de Rho GTPasa/ROCK). La eficiencia se mide con respecto a la mejora del número de iPSC generadas en un marco de tiempo particular o la velocidad a la que se generan las iPSC.

55

Los estudios han mostrado que la transducción retroviral de fibroblastos de ratón con cuatro factores de

- transcripción que están altamente expresados en ESC (Oct-3/4, Sox2, KLF4 y c-Myc) generan células madre pluripotentes inducidas (iPS). Véase Takahashi, K. y Yamanaka, S. *Cell* 126, 663-676 (2006); Okita, K., Ichisaka, T. y Yamanaka, S. *Nature* 448, 313-317 (2007); Wernig, M. *et al.* *Nature* 448, 318-324 (2007); Maherali, N. *et al.* *Cell Stem Cell* 1, 55-70 (2007); Meissner, A., Wernig, M. y Jaenisch, R. *Nature Biotechnol.* 25, 1177-1181 (2007);
- 5 Takahashi, K. *et al.* *Cell* 131, 861-872 (2007); Yu, J. *et al.* *Science* 318, 1917-1920 (2007); Nakagawa, M. *et al.* *Nature Biotechnol.* 26, 101-106 (2007); Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. y Jaenisch, R. *Cell Stem Cell.* 2, 10-12 (2008). Las células iPS son similares a las ESC en morfología, proliferación y pluripotencia, evaluadas por la formación de teratomas y la contribución de quimeras.
- 10 Como se ha indicado anteriormente, mientras que el protocolo original implicó la introducción de cuatro factores de transcripción en células no pluripotentes, se ha descubierto más recientemente que se pueden omitir algunos factores de transcripción. Por lo tanto, en algunos aspectos, los protocolos implican la introducción de uno, dos o tres de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox a células no pluripotentes en condiciones que permiten que las células no pluripotentes se conviertan en iPSC. Por ejemplo, cada uno de Maherali
- 15 y Konrad Hochedlinger, "TGFβ Signal Inhibition Cooperates in the Induction of iPSC and Replaces Sox2 and cMyc" *Current Biology* (2009) y el documento WO/2009/117439 describen protocolos que no requieren los cuatro factores de transcripción para inducir la pluripotencia. Además, los inventores han encontrado que las iPSC se pueden generar introduciendo Oct4 solo en las células e incubando las células con un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5, un inhibidor de la vía de MEK/ERK, un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK y un inhibidor de histona desacetilasa
- 20 (HDAC). Por ejemplo, la introducción de Oct4 exógeno en células de mamífero, en presencia de una cantidad suficiente de SB431542, PD0325901, Tzv y ácido valproico o butirato de sodio, generó con éxito células iPSC.
- Los inhibidores de HDAC ilustrativos pueden incluir anticuerpos que se unen a, variantes negativas dominantes de, y
- 25 ARNip y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a una o más HDAC. Los inhibidores de HDAC incluyen, pero sin limitación, TSA (tricotostatina A) (véase, por ejemplo, Adcock, *British Journal of pharmacology* 150:829-831 (2007)), VPA (ácido valproico) (véase, por ejemplo, Munster, *et al.*, *Journal of Clinical Oncology* 25:18S (2007): 1065), butirato de sodio (NaBu) (véase, por ejemplo, Han, *et al.*, *Immunology Letters* 108:143-150 (2007)), SAHA (ácido suberoilánilida-hidroxámico o vorinostat) (véase, por ejemplo, Kelly, *et al.*, *Nature Clinical Practice Oncology* 2:150-157 (2005)), fenilbutirato de sodio (véase, por ejemplo, Gore, *et al.*, *Cancer Research* 66:6361-6369 (2006)),
- 30 depsipéptido (FR901228, FK228) (véase, por ejemplo, Zhu, *et al.*, *Current Medicinal Chemistry* 3(3):187-199 (2003)), trapoxina (TPX) (véase, por ejemplo, Furumai, *et al.*, *PNAS* 98(1):87-92 (2001)), péptido que contiene ácido hidroxámico cíclico 1(CHAP1) (véase, Furumai *supra*), MS-275 (véase, por ejemplo, Carninci, *et al.*, WO2008/126932), LBH589 (véase, por ejemplo, Goh, *et al.*, WO2008/108741) y PXD101 (véase, Goh, *supra*). En general, a nivel global, las células pluripotentes tienen más acetilación de la histona, y las células diferenciadas
- 35 tienen menos acetilación de la histona. La acetilación de la histona también participa en la regulación de la metilación de la histona y del ADN. En algunos aspectos, los inhibidores de HDAC facilitan la activación de los genes de la pluripotencia silenciados.
- Para abordar los problemas de seguridad que surgen de los genomas de células diana que albergan secuencias
- 40 exógenas integradas, se han desarrollado varios protocolos genéticos modificados. Estos protocolos producen células iPS con riesgos potencialmente reducidos, e incluyen adenovirus no integrantes para administrar genes de reprogramación (Stadtfield, M., *et al.* (2008) *Science* 322, 945-949), transfección transitoria de plásmidos de reprogramación (Okita, K., *et al.* (2008) *Science* 322, 949-953), sistemas de transposición piggyBac (Woltjen, K., *et al.* (2009). *Nature* 458, 766-770, Kaji, K., *et al.* (2009) *Nature* 458, 771-775), virus escindibles por Cre (Soldner, F., *et al.* (2009) *Cell* 136, 964-977) y el sistema de expresión episómica basado en oriP/EBNA1 (Yu, J., *et al.* (2009) *Science* DOI: 10.1126).). Además, las estrategias de explotación de la expresión de genes endógenos en ciertos tipos de células también permitió una reprogramación más fácil y/o con menos genes exógenos necesarios (Shi, Y., *et al.* (2008b). *Cell Stem Cell* 2, 525-528; Aasen, T., *et al.* (2008) *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284; Kim, J. B., *et al.* (2008). *Nature* 454, 646-650). Además, se han identificado moléculas pequeñas que mejoran la eficiencia de la reprogramación y reemplazan ciertos factores de reprogramación (Shi, Y., *et al.* (2008) *Cell Stem Cell* 2, 525-528, Shi, Y., *et al.* (2008) *Cell Stem Cell* 3, 568-574, Li, W., *et al.* (2009) *Cell Stem Cell* 4, 16-19; Huangfu, D., *et al.* (2008) *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275, Huangfu, D., *et al.* (2008) *Nat Biotechnol* 26, 795-797).
- Además, recientemente, se ha demostrado que los factores de transcripción se pueden suministrar como proteína
- 55 exógena a células no pluripotentes, para generar iPSs. Véase, por ejemplo, el documento WO/2009/117439; Zhou *et al.*, *Cell Stem Cell* 4:381-384 (2009). Se puede introducir un polipéptido exógeno (es decir, una proteína proporcionada desde fuera de la célula y/o que no sea producida por la célula) en la célula mediante una serie de diferentes métodos que no implican la introducción de un polinucleótido que codifique el polipéptido. Por lo tanto, en algunos aspectos de la divulgación, las células no pluripotentes se ponen en contacto con un inhibidor del receptor
- 60 de TGFβ/ALK5, en combinación con un inhibidor de la vía de MEK/ERK y un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK y una o más proteínas exógenas de factor de transcripción, por ejemplo, uno, dos, tres o los cuatro de entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox.
- Se ha descrito una variedad de formas de introducir los factores proteicos relevantes en las células diana. En una
- 65 realización, la introducción de un polipéptido en una célula puede comprender la introducción de un polinucleótido que comprende uno o más casetes de expresión en una célula y la inducción de la expresión, introduciendo de ese

modo los polipéptidos en la célula mediante la transcripción y la traducción desde el casete de expresión.

Como alternativa, se pueden cultivar simplemente una o más proteínas en presencia de células diana en condiciones que permitan la introducción de las proteínas en la célula. Véase, por ejemplo, Zhou H. *et al.*, "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins". *Cell Stem Cell*. 8 de mayo de 2009;4(5):381-4. En algunos aspectos, las proteínas exógenas comprenden el polipéptido de factor de transcripción de interés unido (por ejemplo, enlazado como una proteína de fusión o unido mediante enlace covalente o no covalente) a un polipéptido que mejore la capacidad del factor de transcripción para entrar en la célula (y, en algunos aspectos, el núcleo celular).

Los ejemplos de secuencias de polipéptidos que mejoran el transporte a través de las membranas incluyen, pero sin limitación, la proteína de transcripción de la homeoproteína antenopapina de *Drosophila* (AntHD) (Joliot *et al.*, *New Biol.* 3: 1121-34,1991; Joliot *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88: 1864-8,1991; Le Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 9120-4,1993), la proteína estructural VP22 del virus del herpes simple (Elliott y O'Hare, *Cell* 88: 223-33,1997); la proteína TAT del activador de la transcripción del VIH-1 (Green y Loewenstein, *Cell* 55: 1179-1188, 1988; Frankel y Pabo, *Cell* 55: 1 289-1193, 1988); transportadores que mejoran la administración, tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.730.293 (incluyendo, pero sin limitación, una secuencia peptídica que comprende al menos 7-25 argininas contiguas); y el péptido Penetratin™ 1 disponible en el mercado, y los vectores peptídicos Diatos ("DPV") de la plataforma Vectocell® disponible en Daitos S.A. de París, Francia. Véanse también los documentos WO/2005/084158 y WO/2007/123667, y los transportadores adicionales descritos en los mismos. No solo estas proteínas pueden pasar a través de la membrana plasmática, sino que la unión de otras proteínas, tales como los factores de transcripción descritos en el presente documento, es suficiente para estimular la captación celular de estos complejos.

En algunos aspectos, los polipéptidos de factor de transcripción descritos en el presente documento se introducen exógenamente como parte de un liposoma o cóctel de lípidos tal como Fugene6 y Lipofectamina disponibles en el mercado). En otra alternativa, las proteínas de factor de transcripción se pueden microinyectar o introducir directamente de otra manera en la célula diana.

Como se describe en los ejemplos del documento WO/2009/117439, la incubación de células con los polipéptidos de factor de transcripción durante períodos prolongados es tóxica para las células. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona la incubación intermitente de células de mamífero no pluripotentes con uno o más de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y/o un polipéptido Sox, con períodos intermedios de incubación de las células en ausencia de uno o más polipéptidos. En algunos aspectos, el ciclo de incubación con y sin los polipéptidos puede repetirse durante 2, 3, 4, 5, 6 o más veces y se realiza durante suficientes períodos de tiempo (es decir, las incubaciones con y sin proteínas) para conseguir el desarrollo de células pluripotentes. Se pueden incluir diversos agentes (por ejemplo, inhibidor de la vía de MEK/ERK y/o inhibidor de GSK3 y/o inhibidor de TGFβ/ALK5 y/o inhibidor de la vía de Rho GTPasa/ROCK) para mejorar la eficiencia del método.

Los diversos inhibidores (por ejemplo, el inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5, el inhibidor de la vía de MEK/ERK y el inhibidor de Rho GTPasa/ROCK y/o el inhibidor de GSK3, etc.) pueden ponerse en contacto con células no pluripotentes bien antes, simultáneamente con o después del suministro de los factores de transcripción de la programación (por ejemplo, suministrados a través de un casete de expresión o como proteínas). Por comodidad, el día en que se suministran los factores de reprogramación se designa "día 1". En algunos aspectos, los inhibidores se ponen en contacto con las células en un agregado (es decir, como un "cóctel") en aproximadamente los días 3-7 y se continúa durante 7-14 días. Como alternativa, en algunos aspectos, el cóctel se pone en contacto con las células el día 0 (es decir, un día antes de los factores de preprogramación) y se incuban durante aproximadamente 14-30 días.

En otros aspectos de la divulgación, se añaden diferentes inhibidores en distintos momentos. En algunos aspectos, entre 1 y 7 días después del suministro de los factores de reprogramación, las células se ponen en contacto con la combinación de compuestos de un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5 (por ejemplo, SB431542) y un inhibidor de ROCK durante 1-8 días, seguido de la puesta en contacto de las células con el inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5, inhibidor de ROCK y una vía de MEK/ERK (por ejemplo, PD0325901) durante 1-8 días. A esto, le puede seguir opcionalmente el contacto con el inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5 y el inhibidor de la vía de MEK/ERK (pero no necesariamente el inhibidor de ROCK) durante 1-4 días, seguido del contacto con el inhibidor de la vía de MEK/ERK (pero no el inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5 o inhibidor de ROCK) y, opcionalmente, finalmente con medio ES basal (Por ejemplo, humano basal) sin inhibidores durante 1-4 días. También se pueden emplear otras combinaciones.

IV. Transformación

La presente invención emplea técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que desvelan los métodos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (3ª ed. 2001); Kriegler, "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual" (1990); y "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, eds., 1994).

En algunos aspectos, la especie de célula y proteína que se va a expresar es la misma. Por ejemplo, si se usa una célula de ratón, se introduce un ortólogo de ratón en la célula. Si se usa una célula humana, se introduce un ortólogo humano en la célula.

- 5 Se apreciará que cuando se han de expresar dos o más proteínas en una célula, pueden usarse uno o múltiples casetes de expresión. Por ejemplo, cuando un casete de expresión expresa múltiples polipéptidos, se puede usar un casete de expresión policistrónico.

A. Vectores plasmídicos

- 10 En ciertos aspectos de la divulgación, se contempla un vector plasmídico para su uso en la transformación de una célula hospedadora. En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en conexión con estos hospedadores. El vector puede portar un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas.

B. Vectores víricos

- 20 La capacidad de ciertos virus para infectar las células o entrar en las células a través de la endocitosis mediada por receptores, e integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes víricos de forma estable y eficiente, los han convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos foráneos a células (por ejemplo, células de mamífero). A continuación, se describen ejemplos no limitantes de vectores víricos que pueden usarse para suministrar un ácido nucleico de la presente divulgación.

i. Vectores adenovíricos

- Un método particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores adenovíricos tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica se contrarresta por la alta eficiencia de la transferencia génica proporcionada por estos vectores. Se entiende que "vector de expresión adenovírico" incluye aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción; y (b) para expresar en última instancia una construcción específica del tejido o de la célula que se ha clonado en el mismo. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus de ADN lineal de doble hélice de ~36 kb, permite la sustitución de grandes fragmentos de ADN adenovírico con secuencias foráneas de hasta 7 kb (Grunhaus *et al.*, *Seminar in Virology*, 200(2):535-546, 1992).

ii. Vectores AAV

- 40 El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando la transfección asistida por adenovirus. Se han descrito mayores eficiencias de transfección en sistemas celulares usando sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994; Cotten *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 89(13):6094-6098, 1992; Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64, 1994.). El virus adeno-asociado (AAV) es un atractivo sistema vectorial, ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células que no se dividen, haciéndolo así útil para el suministro de genes en células de mamífero, por ejemplo, en cultivo de tejidos (Muzyczka, *Curr Top Microbial Immunol*, 158:97-129, 1992) o *in vivo*. Los detalles relativos a la generación y al uso de vectores rAAV se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.139.941 y 4.797.368.

iii. Vectores retrovíricos

- 50 Los retrovirus son prometedores como vectores de suministro de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma del hospedador, transferir una gran cantidad de material genético foráneo, infectar un amplio espectro de especies y tipos de células, y de ser empaquetados en estirpes celulares especiales (Miller *et al.*, *Am. J Clin. Oncol.*, 15(3):216-221, 1992).

- 55 Para construir un vector retrovírico, se inserta un ácido nucleico (por ejemplo, un gen de codificación de interés) en el genoma vírico en lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que sea defectuoso en la replicación. Para producir viriones, se construye una estirpe celular de empaquetamiento que contenga los genes gag, pol y env, pero sin la LTR ni los componentes de empaquetamiento (Mann *et al.*, *Cell*, 33: 153-159, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retrovírica y las secuencias de empaquetamiento se introduce en una estirpe celular especial (por ejemplo, por precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que el producto de la transcripción del ARN del plásmido recombinante sea empaquetado en partículas víricas, que luego son secretadas en los medios de cultivo (Nicolas y Rubinstein, en: "Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses", Rodríguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pág. 494-513, 1988; Temin, en: "Gene Transfer", Kucherlapati (ed.), Nueva York: Plenum Press, pág. 149-188, 1986; Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983). A continuación, se recogen los medios que contienen los retrovirus recombinantes, opcionalmente, se concentran y se usan para la transferencia génica. Los vectores retrovíricos son capaces de

infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable normalmente implican la división de las células hospedadoras (Paskind *et al.*, "Virology", 67:242-248, 1975).

5 Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovéricos comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivíricos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey *et al.*, *Nat Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997; Blomer *et al.*, *J Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997; las patentes de EE.UU. n.º 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia simia: VIS. Los vectores lentivíricos se han generado por atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por
10 ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se eliminan haciendo que el vector sea biológicamente seguro.

Los vectores lentivíricos recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y pueden usarse tanto para la transferencia de genes *in vivo* como *ex vivo* y la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, el lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide en la que se transfiere una célula hospedadora
15 adecuada se transfecta con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetamiento, en concreto, gag, pol y env, así como rev y tat se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.994.136. Es posible dirigirse al virus recombinante mediante el enlace de la proteína de la envoltura con un anticuerpo o un determinado ligando para dirigirse a un receptor de un determinado tipo de célula. Al insertar una secuencia (que incluye una región reguladora) de interés en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula
20 diana específica, por ejemplo, el vector se vuelve específico de la diana.

iv. Administración usando virus modificados

Un ácido nucleico que se vaya a administrar puede alojarse dentro de un virus infeccioso que haya sido modificado por ingeniería genética para expresar un ligando de unión específico. La partícula del virus se unirá así específicamente a los receptores afines de la célula diana y administrará el contenido a la célula. Se desarrolló una nueva metodología diseñada para permitir la dirección específica de vectores retrovéricos basándose en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de restos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos a través de receptores de sialoglicoproteínas.
25

Se diseñó otra metodología para dirigir los retrovirus recombinantes, en la que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retrovívica y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través de los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 86:9079-9083, 1989). Usando anticuerpos contra antígenos de clase I y clase II de complejo de histocompatibilidad mayor, demostraron la infección de una variedad de células humanas portadoras de esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).
30

C. Administración de vectores y transformación celular

Se cree que métodos adecuados para la administración de ácido nucleico para la transformación de una célula, un tejido o un organismo para su uso con la presente divulgación incluyen prácticamente cualquier método mediante el cual se pueda introducir un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como sería conocido por un experto en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, la administración directa de ADN, tal como mediante transfección *ex vivo* (Wilson *et al. Science*, 244:1344-1346, 1989, Nabel y Baltimore, *Nature* 326:711-713, 1987), opcionalmente con Fugene6 (Roche) o Lipofectamina (Invitrogen), por inyección (patentes de EE.UU. n.º 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo la microinyección (Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985; patente de EE.UU. n.º 5.789.215); por electroporación (patente de EE.UU. n.º 5.384.253; Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 81:7161-7165, 1984); mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, "Virology", 52:456-467, 1973; Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987; Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985); mediante carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 84:8463-8467, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 76:3348-3352, 1979; Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987; Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980; Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989; Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987); y cualquier combinación de dichos métodos.
40
45
50
55

60 VII. Mezclas

La presente divulgación proporciona mezclas que mejoran la eficiencia de generación de iPSC. Por ejemplo, la divulgación proporciona mezclas de un inhibidor del receptor de TGFβ/ALK5, un inhibidor de la vía de MEK/ERK, un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK, en aspectos particulares, con células de mamífero. Por ejemplo, las mezclas se pueden incluir en medios de cultivo celular, con o sin células. El contenido de los medios de cultivo celular, en general, se conoce en la técnica. Los ejemplos de medios de cultivo celular se describen en detalle en los ejemplos.
65

En general, los cultivos de células que comprenden células de mamífero y agentes de la divulgación (inhibidor del receptor de TGF β /ALK5, un inhibidor de la vía de MEK/ERK y un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK) contendrán inicialmente todas o esencialmente todas las células no pluripotentes. Sin embargo, con el tiempo, especialmente en las condiciones de los protocolos descritos en el presente documento, una parte de las células se convertirá en pluripotentes (es decir, iPSC).

Las células que se inducirán a la pluripotencia pueden cultivarse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Las pautas generales para las condiciones de cultivo para generar iPSC se pueden encontrar, por ejemplo, en Maherali, *et al.*, *Cell Stem Cell* 3:595-605 (2008).

En algunos aspectos de la divulgación, las células se cultivan en contacto con células alimentadoras. Las células alimentadoras ilustrativas incluyen, pero sin limitación, células de fibroblastos, por ejemplo, células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Los métodos de cultivo de células en células alimentadoras son conocidos en la técnica.

En algunos aspectos de la divulgación, las células se cultivan en ausencia de células alimentadoras. Las células, por ejemplo, se pueden unir directamente a una superficie sólida de cultivo (por ejemplo, una placa de cultivo), por ejemplo, a través de un cordón molecular. Los inventores han descubierto que cultivar células inducidas a la pluripotencia tiene una eficiencia mucho mayor de inducción a la pluripotencia (es decir, una mayor parte de células alcanza la pluripotencia) cuando las células se unen directamente a la superficie de cultivo sólido en comparación con la eficiencia de las células tratadas por lo demás de forma idéntica que se cultivan en células alimentadoras. Los ejemplos de cordones moleculares incluyen, pero sin limitación, Matrigel[®], una matriz extracelular (ECM), análogos de ECM, laminina, fibronectina o colágeno. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que esta es una lista no limitante y que se pueden usar otras moléculas para unir células a una superficie sólida. Los métodos para la unión inicial de los cordones a la superficie sólida son conocidos en la técnica.

Como se describe en el presente documento, en algunos aspectos, las mezclas de la divulgación pueden incluir o excluir células de mamífero (incluyendo células pluripotentes o no pluripotentes) y uno o más de un inhibidor de HDAC, inhibidor de GSK3 o un agonista del canal de Ca de tipo L; un activador de la vía de AMPc; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando del receptor nuclear, por ejemplo, como se describe en el documento PCT WO/2009/117439.

VIII. Kits

La presente divulgación también proporciona kits, por ejemplo, para su uso en la generación de células madre pluripotentes inducidas. Dichos kits pueden comprender cualquiera o todos los reactivos descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación: un inhibidor del receptor de TGF β /ALK5, un inhibidor de la vía de MEK/ERK y/o un inhibidor de Rho GTPasa/ROCK, como se describe en el presente documento. Estos tres agentes, o subconjuntos de los mismos, pueden estar presentes en el kit en viales separados, o juntos en forma de una mezcla. Los kits también pueden incluir, uno o más de un inhibidor de HDAC, un inhibidor de GSK3 o un agonista del canal de Ca de tipo L; un activador de la vía de AMPc; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); y un ligando del receptor nuclear.

En un aspecto, los kits incluirán uno o más tipos de células de mamífero (por ejemplo, humano, ratón, rata, etc.) y/o medios de cultivo celular.

En un aspecto particular, los kits incluirán uno o más polinucleótidos que comprenderán casetes de expresión para la expresión de uno o más polipéptidos Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox. Además, o como alternativa, los kits pueden comprender una o más proteínas de factor de transcripción aisladas, por ejemplo, uno, dos, tres o los cuatro de entre un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox. En otro aspecto particular, las proteínas de factor de transcripción pueden fusionarse con una secuencia polipeptídica para mejorar el transporte de las proteínas de factor de transcripción a través de las membranas celulares.

VI. Usos para células pluripotentes

La presente divulgación permite el estudio y el desarrollo adicionales de tecnologías de células madre, incluyendo, pero sin limitación, usos profilácticos o terapéuticos. Por ejemplo, en algunos aspectos de la divulgación, las células de la divulgación (bien células pluripotentes o células inducidas para diferenciarse a lo largo de un destino celular deseado) se introducen en individuos que lo necesitan, incluyendo, pero sin limitación, individuos que necesitan la regeneración de un órgano, tejido o tipo de célula. En algunos aspectos, las células se obtienen originalmente en una biopsia de un individuo; se inducen a la pluripotencia como se describe en el presente documento, opcionalmente, inducidas a diferenciarse (por ejemplo, en una determinada célula progenitora deseada) y luego se trasplantan de nuevo al individuo. En algunos aspectos, las células se modifican genéticamente antes de su introducción en el individuo.

En algunos aspectos, las células pluripotentes generadas de acuerdo con los métodos de la divulgación son inducidas subsiguientemente a formar, por ejemplo, células hematopoyéticas (madre/progenitoras), células neuronales (madre/progenitoras) (y, opcionalmente, células más diferenciadas, tales como neuronas de un subtipo específico, oligodendrocitos, etc.), células pancreáticas (por ejemplo, células progenitoras endocrinas o células que expresan hormonas pancreáticas), hepatocitos, células cardiovasculares (madre/progenitoras) (por ejemplo, cardiomiocitos, células endoteliales, células de músculo liso), células de retina, etc.

Se conoce una variedad de métodos para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en tipos de células deseados. A continuación, se presenta una lista no limitante de publicaciones de patentes recientes que describen métodos de inducción de la diferenciación de células madre en diversos destinos celulares. Publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2007/0281355; 2007/0269412; 2007/0264709; 2007/0259423; 2007/0254359; 2007/0196919; 2007/0172946; 2007/0141703; 2007/0134215.

Se puede mejorar una variedad de enfermedades mediante la introducción y, opcionalmente, la dirección de células pluripotentes de la divulgación en un determinado tejido lesionado. Los ejemplos de enfermedades producidas por una lesión tisular incluyen, pero sin limitación, enfermedad neurodegenerativa, infarto cerebral, enfermedad vascular obstructiva, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema pulmonar, bronquitis, enfermedad pulmonar intersticial, asma, hepatitis B (daño hepático), hepatitis C (daño hepático), hepatitis alcohólica (daño hepático), cirrosis hepática (daño hepático), insuficiencia hepática (daño hepático), pancreatitis, diabetes mellitus, enfermedad de Crohn, colitis inflamatoria, glomerulonefritis IgA, glomerulonefritis, insuficiencia renal, decúbito, quemadura, herida de sutura, laceración, herida por incisión, herida por mordisco, dermatitis, queloides cicatriciales, queloides, úlcera diabética, úlcera arterial y úlcera venosa.

En un aspecto, las iPSC pueden usarse en diversos ensayos y explorarlas para identificar moléculas que modulen su función, incluyendo, pero sin limitación, la potenciación de la supervivencia y/o la diferenciación de las iPSC.

Ejemplos

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

Ejemplo 1: Plataforma química para mejorar la inducción de las iPSC humanas

Los fibroblastos de tipo mesenquimal reprogramados con los "cuatro factores" (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*; 4 FT de aquí en adelante en el presente documento) experimentaron cambios morfológicos espectaculares que dieron lugar a iPSC con distinta polaridad celular, distintos límites y distintas interacciones célula-célula. Las células reprogramadas expresaron E-cadherina, un marcador para células epiteliales (Hay, E. D., *Acta Anat.* (Basel) 154, 8-20 (1995)), que también está expresado a un alto nivel en las células madre embrionarias humanas (hESC). Los presentes inventores pensaron que los factores que potencian la transición mesenquimal a epitelial (MET), tales como los antagonistas de la vía de TGFB β , tendrían un impacto directo en el proceso de reprogramación. Además, anteriormente se mostró que la inhibición de la vía de MEK-ERK desempeñaba un papel importante en varias etapas de la reprogramación (Chen, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104, 10482-87 (2007); Shi, Y. *et al.*, *Cell Stem Cell* 2, 525-8 (2008)). Además, los factores que potencian la supervivencia celular también podrían ser beneficiosos para mejorar la eficiencia de la reprogramación. Por consiguiente, se centraron en las moléculas pequeñas que pueden regular estos tres procesos y vías, ya que las moléculas pequeñas tienen muchas ventajas Feng, B. *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 301-12 (2009); Shi, Y. *et al.*, *Cell Stem Cell* 2, 525-8 (2008); Xu, Y. *et al.*, *Nature* 453, 338-44 (2008)) en el estudio de los procesos biológicos, y son una opción más segura que la manipulación genética. En el presente documento, se describe una plataforma química sencilla que potencia sustancialmente la generación de iPSC humanas completamente reprogramadas a partir de fibroblastos a través de un proceso mucho más rápido y más eficiente.

Se ensayaron inhibidores conocidos del receptor de TGFB β y MEK sobre 1×10^4 fibroblastos primarios humanos (CRL2097 o BJ) (Feng, B. *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 301-12 (2009)), que se transdujeron retrovíricamente con los 4 FT, por su efecto sobre la cinética y la eficiencia de LA reprogramación (véase la Fig. 1a para más detalles). El día 7 (D7) después de la infección, se añadieron los compuestos, individualmente o en combinaciones, y se examinaron los cultivos para determinar las iPSC durante las siguientes 1 a 3 semanas.

El día 7 después del tratamiento (D14), se observó el efecto más potente en los cultivos tratados con una combinación de inhibidor de ALK5 SB431542 (2 μ M) e inhibidor de MEK PD0325901 (0,5 μ M), que dio lugar a ~45 colonias grandes ALP⁺ (Fig. 1b) con morfología de tipo hESC característica, de las cuales más de 24 colonias eran TRA-1-81⁺ (Fig. 1d), y de aproximadamente 6 a 10 colonias se tiñeron positivas para SSEA4 y NANOG, un factor de pluripotencia maduro que no se introduce ectópicamente (Fig. 1e y 1f). Además, los cultivos tratados mostraron una expresión de alto nivel del ARNm endógeno para los genes de pluripotencia (Fig. 1c). Por el contrario, no se observaron colonias NANOG⁺ en los cultivos de control sin tratar (Fig. 1e y Fig. 4a) o en los cultivos que se trataron solo con PD0325901 (Fig. 4a). Sin embargo, en los cultivos tratados solo con SB431542, todavía se observaron 1-2 colonias de tipo hESC ALP⁺ (Fig. 4a). Es importante destacar que el efecto combinado de ambos inhibidores (Fig. 4b y 4c), así como el efecto individual de SB431542 fue dependiente de la dosis.

Quando se mantuvieron los cultivos tratados con SB43142 más PD0325901 durante 30 días sin división, se obtuvieron aproximadamente 135 colonias de iPSC por pocillo (Fig. 2d), una mejora de > 100 veces en la eficiencia con respecto al método convencional. De acuerdo con los informes anteriores (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007)), en los controles no tratados que portaban los 4 FT, se observaron 1-2 colonias iPSC además de varias colonias granuladas (Fig. 2c). Se ha sugerido que estas estructuras granuladas son colonias parcialmente reprogramadas (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007)). También se observaron colonias de granulados en los cultivos tratados con SB431542, que superaban en número por varias veces las pocas colonias de tipo hESC. Curiosamente, el número de colonias de granulado se redujo drásticamente en el tratamiento combinado de SB431542 y PD0325901, lo que dio lugar a un aumento concomitante en el número de colonias de tipo hESC. Esto sugiere que una inhibición combinada de ALK5 y MEK puede guiar a las colonias parcialmente reprogramadas a un estado completamente reprogramado y, de este modo, mejorar el proceso de reprogramación global. Por otra parte, el hecho de que se observara una mejor inducción de iPSC tan temprano como 7 días después del tratamiento sugiere que el tratamiento con estas moléculas pequeñas no solo mejoró la eficiencia del proceso de reprogramación, sino que también pudo haber acelerado su cinética (Fig. 1a). Se requieren experimentos adicionales para determinar si las células reprogramadas en esta etapa de hecho se vuelven totalmente independientes de los factores de reprogramación exógenos antes que en los cultivos sin tratar.

Aunque las colonias de iPSC se recogieron y se expandieron, como en los cultivos de hESC, los cultivos divididos por tripsinización dieron lugar a una baja supervivencia. A partir de un rastreo reciente realizado en el laboratorio de los presentes inventores, se identificó una nueva molécula pequeña, la tiazovivina (Fig. 5), que mejoró espectacularmente la supervivencia de las hESC tras la tripsinización. La adición de tiazovivina al presente cóctel de SB431542 y PD0325901 también mejoró enormemente la supervivencia de las iPSC después de la división mediante tripsinización (Fig. 2a), y se obtuvo un gran número de colonias reprogramadas. A partir de 10.000 células que se sembraron originalmente, una sola separación de 1:4 en el día 14 dio lugar a ~1.000 colonias de tipo hESC el día 30 (Fig. 2e), mientras que dos series de división (el día 14 y el día 21 (1:10)) dio lugar a ~11.000 colonias de tipo hESC (Fig. 2c y 2e) el día 30. Estas colonias mostraron altos niveles de ARNm endógeno (Fig. 2f) y expresión de proteínas (Fig. 2b y 2c) de los marcadores de pluripotencia, mientras que la expresión de los cuatro transgenes difícilmente se pudo detectar (Fig. 2f). Por el contrario, no se obtuvieron colonias de iPSC a partir de muestras no tratadas o tratadas con 2 compuestos que se sometieron a tripsinización (Tabla 1).

Tabla 1: Comparación del número de colonias de iPSC observado en los cultivos sin tratamiento, tratados con 2 compuestos y tratados con 3 compuestos el día 30

	Sin compuesto	2 compuestos	3 compuestos
Sin división	1	135	205
1 división (el día 14)	0	0	900
2 divisiones (el día 14 y el día 21)	ND	ND	11.000

Para examinar si el efecto positivo de la tiazovivina se debe únicamente a la supervivencia de las colonias después de la división o si también aumenta el efecto de reprogramación del tratamiento combinado con SB431542 y PD0325901, se ensayó el cóctel de 3 compuestos en células transducidas con los 4 FT que no se sometieron a división. En estos cultivos, el día 14 se observaron ~25 colonias grandes que expresaban Nanog (Fig. 1e). Hacia el día 30, se observaron ~205 colonias NANOG⁺ muy grandes (Fig. 2d), que también eran TRA-1-81⁺ y SSEA4⁺ (datos no mostrados), lo que se tradujo en una mejora de más de 200 veces en la eficacia frente a ningún tratamiento con compuesto y un aumento del doble frente al tratamiento con 2 compuestos.

Los tratamientos con dos compuestos también dieron lugar a un mayor número de colonias positivas en fosfatasa alcalina en comparación con los controles no tratados cuando los factores de reprogramación se introdujeron usando un sistema lentivírico en lugar de un sistema retrovírico (Fig. 6a). Además, el cóctel de 3 compuestos no pareció influir en la expresión del factor de reprogramación desde los vectores retrovíricos (Fig. 6b-f).

Las colonias de iPSC generadas usando el cóctel de 3 compuestos se expandieron rápida y establemente a largo plazo en las condiciones convencionales de cultivo de hESC (más de 20 pasajes) y se asemejaron mucho a las hESC en términos de morfología, expresión típica de marcadores de la pluripotencia y potenciales de diferenciación. Presentaban un cariotipo normal (Fig. 7) y pudieron diferenciarse en derivados de las tres capas germinales, tanto *in vitro* (Fig. 3a y 3b) como *in vivo* (Fig. 3c). Estos resultados también sugirieron que no hay ningún efecto adverso a corto plazo asociado con el procedimiento de tripsinización mucho más conveniente.

La demostración de que la inhibición de la vía de TGFB β y MEK-ERK mejoró la reprogramación de los fibroblastos sugirió papeles fundamentales para estas dos vías de señalización y mecanismos MET en el proceso. De manera sistemática, la adición de TGF β tuvo un efecto inhibitorio sobre la reprogramación mediada por los 4 factores de los fibroblastos (datos no mostrados). TGF β y los miembros de su familia desempeñan importantes papeles contextuales en la autorrenovación y la diferenciación de las ESC (Watabe, T. Y Miyazono, K., *Cell Res.* 19, 103-15 (2009)). Además, el TGF β es una citocina prototípica para la inducción de la transición mesenquimal epitelial (EMT) y el mantenimiento del estado mesenquimal (Willis, B. C. y Borok, Z., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293, L525-34 (2007)). Un punto final importante de esta señalización, en este contexto, es la regulación negativa de la E-

cadherina (Thiery, J. P. y Sleeman, J. P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 131-42 (2006)). Se ha demostrado que la E-cadherina es importante para el mantenimiento de la pluripotencia de las ESC y, recientemente, se ha sugerido que es un regulador de la expresión de NANOG (Chou, Y. F. *et al.*, *Cell* 135, 449-61 (2008)). Por lo tanto, la inhibición de la señalización de TGF β , que produce la desrepresión del destino epitelial, podría beneficiar al proceso de reprogramación de múltiples maneras. La señalización de ERK también potencia la EMT (Thiery, J. P. y Sleeman, J. P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131-42 (2006)), y está cadena abajo de TGF β en el proceso (Chou, Y. F. *et al.*, *Cell* 135, 449-61 (2008)). Anteriormente los presentes inventores habían demostrado que el efecto de la reversina, una molécula pequeña que puede reprogramar los mioblastos a un estado multipotencial, está mediado en parte por la inhibición de MEK-ERK (Chen, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104, 10482-87 (2007)). Esto puede explicar el efecto observado en la reprogramación cuando se combinó con la inhibición de TGF β .

La plataforma química descrita en el presente documento es única, ya que modula las vías de señalización cadena arriba y podría mejorar radicalmente la reprogramación en un tipo de célula general, como los fibroblastos. Las condiciones químicas descritas en el presente documento proporcionan una plataforma básica para métodos de reprogramación más eficientes y más seguros, no basados en virus ni en ADN (Zhou, H. *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 381-84, (2009)), que podrían potenciar un suministro ilimitado de iPSC humanas seguras para diversas aplicaciones.

MÉTODOS

20 Cultivo celular

Los fibroblastos primarios de piel CRL2097 y BJ (prepucio neonatal) se adquirieron de la ATCC. Todos los reactivos de los medios de cultivo celular se adquirieron en Invitrogen Corporation, CA. Las células se mantuvieron en DMEM (10313-021) que contenía FBS al 10 % (10439-024), 1 x aminoácido no esencial MEM (11140-050), 1 x Glutamax (35050-061), Hepes 10 mM (15630-080) y 2-mercaptoetanol 0,1 mM (21985-023). Las células se pasaron 1:5 usando (1 x) tripsina-EDTA al 0,05 % (25300-054).

Plásmidos

30 Los vectores pMXs codificantes de los ADNc humanos para OCT4, SOX2, c-MYC y KLF4, descritos anteriormente (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007)), se obtuvieron en ADDGENE. Se clonó ORF de Slc7a1 de ratón en pWPXLD (Addgene), como se ha descrito anteriormente (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007)).

35 Infección retroviral y generación de células iPS

Se produjeron lentivirus portadores de *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *LIN28* como se ha descrito anteriormente (Yu, J. *et al.*, *Science* 318, 1917-20 (2007)). Para la producción de retrovirus, se sembraron células de empaquetamiento PLAT-E en placas a 1×10^5 células/pocillo de una placa de 6 pocillos. Después de 24 horas, se transfectaron las células con vectores pMXs portadores de ADNc de *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC* y *KLF4* usando reactivo de transfección Fugene 6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, se reemplazó el medio por medio recién preparado, y se transfirió la placa a 32 °C para la producción de retrovirus. Se recogieron los virus a las 48 horas y 72 horas, y se filtraron con filtro de 0,45 μ m antes de la transducción.

Se sembraron las células de fibroblastos humanos con expresión de Slc7a1 en 1×10^5 células/pocillo de una placa de 6 pocillos el día 1. El día 2, se añadieron 0,25 ml de cada sobrenadante retroviral a las células en presencia de 6 μ g/ml de polibreno. Se realizó una segunda serie de transducción el día 3. Se estimó la eficiencia de la infección mediante microscopía de fluorescencia en células transducidas en paralelo con retrovirus portadores de genes de GFP o RFP. Siete días después de la transducción inicial, se cosecharon los fibroblastos por tripsinización y se volvieron a colocar en placas a 1×10^4 células/pocillo de una placa de 6 pocillos recubierta con matrigel (dilución 1:50, cat. 354234, BD Biosciences). Para el tratamiento con compuesto, se cultivaron las células en medio de reprogramación humano (DMEM/F12, sustituto de suero desactivado al 20 %, 1 x aminoácido no esencial MEM, 1 x glutamax, 2-Mercaptoetanol 0,11 mM, 20 ng/ml de bFGF y 1.000 U/ml de LIF) y se trataron con SB431542 2 μ M (Stemgent), PD0325901 0,5 μ M (Stemgent), Tiazovivina 0,5 μ M o combinaciones de los compuestos. Los medios se cambiaron cada 2-3 días dependiendo de la densidad celular. Siete días después del tratamiento con compuesto, se fijaron las placas y se tiñeron para determinar la actividad de fosfatasa alcalina (ALP), o se tiñeron para determinar los marcadores de proteína, o se prosiguió con los cultivos con o sin división indicada por tripsinización hasta el día 30. Para los cultivos divididos, se dividieron las células (1:4) y se volvieron a colocar sobre una capa alimentadora de CFF-1 MEF irradiada ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo) en cada pocillo de la placa de 6 pocillos y se dividieron de nuevo el día 21. Se mantuvieron las células en el mismo medio y el cóctel de compuestos descrito anteriormente excepto para las concentraciones de PD0325901 (0,5 μ M para D14 y 1 μ M para D21) y SB431542 (0,5-1 μ M tras el D14). Las colonias de iPSC se mantuvieron posteriormente en medios de hESC convencionales en ausencia de los compuestos anteriores.

65 Tinción con fosfatasa alcalina e inmunocitoquímica

La tinción con fosfatasa alcalina se realizó usando el kit de detección de ALP (cat n.º SCR004, Chemicon) de

acuerdo con las instrucciones del producto. Para la inmunocitoquímica, se fijaron las células en paraformaldehído al 4 % (10 min, TA), se lavaron dos veces con PBS, se bloquearon usando suero normal de burro al 5 % (Chemicon) y 0TritonX-100 al 0,1 % (15 min, TA) y luego se trataron con anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios usados fueron anti-NANOG (cat n.º AB9220, Chemicon, 1:1,000); anti-OCT4 (cat n.º sc-5279, Santa Cruz biotech, 1:200), anti-SSEA 4 (cat n.º mab4304, Chemicon, 1:500), anti-Tra-1-81 (cat n.º 560123, BD Biosciences, 1:100), anti-Tra-1-81 (mAb 4381, Chemicon, 1:500), anti-βIII TUBULINA (cat n.º MMS-435P, Covance Research Products Inc, 1:1000), anti-PDX 1 (1:500) (un obsequio del Dr. C. Wright), anti-BRACHYURY (cat n.º AF2085, R&D, concentración final de 0,2 µg/ml). Las células se lavaron dos veces con PBS y después se trataron con anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios usados fueron IgG anti-conejo o anti-ratón de burro Alexa fluor 488 (Invitrogen, 1:1,000) e IgG anti-conejo o anti-ratón de burro Alexa fluor 555 (Invitrogen, 1:1,000). Los núcleos se tiñeron con 0,5 µg/ml DAPI (Sigma). Las imágenes se capturaron usando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U/X-cite 120 EXFO con una cámara fotográfica CoolSnap HQ2.

15 Ensayo *in vitro* de diferenciación y teratomas

Se realizaron la generación de cuerpos embrioides y la diferenciación *in vitro* como se describe en otra parte (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007)). Para el ensayo de los teratomas, se inyectaron de 3 a 5 millones de células bajo la cápsula renal de ratones SCID. Treinta y un días más tarde, se extirparon los tumores y se fijaron en paraformaldehído al 4 %, y se analizaron histológicamente en el centro de histología TSRI. El uso de ratones SCID fue aprobado por el comité de investigación animal de UCSD.

RT-PCR

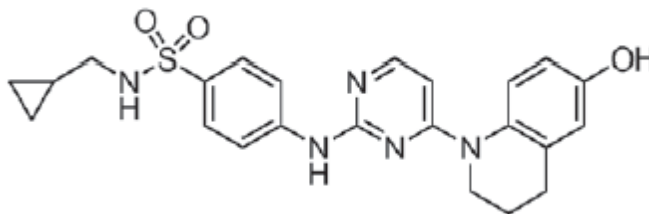
25 Se extrajo ARN total de las células usando el minikit RNeasy (Qiagen). Se sintetizaron ADNc de acuerdo con las instrucciones del producto usando el kit de síntesis de primeras cadenas superscript III (Invitrogen). Se usaron dos microlitros del producto de reacción durante 24-28 ciclos de PCR usando los respectivos cebadores. Las secuencias de los cebadores se describen en otra parte (Takahashi, K. *et al.*, *Cell* 131, 861-72 (2007)).

30 Citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo, se sometieron los cultivos a tripsinización suave y se recogieron de placas de 6 pocillos. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en tampón FACS (PBS, EDTA 2 mM, HEPES 2 mM, FBS al 1 %) y se analizaron en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) con el programa CellQuest.

Ejemplo 2: Síntesis de *N*-(ciclopropilmetil)-4-(4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2*H*)-il)pirimidin-2-ilamino) bencenosulfonamida (Tiazovivina)

40 Se calentó el matraz de reacción que contenía 2,4-dicloropirimidina (372 mg, 2,5 mmol), 6-metoxi-2,3,4-tetrahidroquinolina (489 mg, 3 mmol) y diisopropiletilamina (0,52 ml, 3 mmol) en *n*-butanol (10 ml) a 40 °C durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía en columna ultrarrápida, dando 2-cloro-4-(6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-1(2*H*)-il)pirimidina (551 mg, 80 %). Se disolvió este producto intermedio (250 mg, 0,91 mmol) a continuación en diclorometano y se trató con BBr₃ (1 M en diclorometano) (1 ml, 1 mmol) a -78 °C. Se calentó la mezcla de reacción lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1 h, se vertió en agua, se extrajo con diclorometano. Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía en columna ultrarrápida, dando 2-cloro-4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2*H*)-il)pirimidina (154 mg, 65 %). A una solución agitada de 2-cloro-4-(6-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-1(2*H*)-il)pirimidina (29 mg, 0,11 mmol) y 4-amino-*N*-(ciclopropilmetil)bencenosulfonamida (27 mg, 0,12 mmol) en DMF (0,5 ml), se añadió ácido *p*-toluenosulfónico (2 M en dioxano) (55 µm, 0,11 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 90 °C durante una noche, después se purificó por HPLC, dando el compuesto del título (27 mg, 56 %).



55 Ejemplo 3: Reprogramación de células somáticas primarias humanas por OCT4 y compuestos químicos

En el presente documento, se presenta un nuevo cóctel de moléculas pequeñas que permite la reprogramación de

las células somáticas primarias humanas a iPSC con la expresión exógena de OCT4 solamente.

Entre los varios tipos de células somáticas humanas primarias disponibles, los queratinocitos que se pueden aislar fácilmente de la piel humana o del folículo piloso representan una atractiva fuente celular para la reprogramación, ya que expresan endógenamente KLF4 y cMYC, y se informó que se reprogramaron más eficientemente usando los cuatro FT convencionales o tres FT (sin MYC) (Aasen, T. *et al.*, *Nat Biotechnol* 26:1276-1284 (2008), Maherali, N. *et al.*, *Cell Stem Cell* 3, 340-345(2008)). Más recientemente, los presentes inventores informaron que la inhibición doble de TGF β y MAPK/ERK usando moléculas pequeñas (es decir, SB431542 y PD0325901, respectivamente) proporciona una condición drásticamente mejorada para la reprogramación de los fibroblastos humanos con cuatro FT exógenos (es decir, OSKM) (Lin, T. *et al.*, *NatMethods* 6:805-808 (2009)). Además, demostraron que dicha inhibición de la vía doble también podría potenciar la reprogramación de los queratinocitos humanos mediante dos FT exógenos (es decir, OK) con dos moléculas pequeñas, Parnate (un inhibidor de la desmetilasa 1 específica de LA lisina) y CHIR99021 (un inhibidor de GSK3) (Li, W. *et al.*, *Stem Cells* 27:2992-3000 (2009)). Sin embargo, este proceso de reprogramación de 2 FT fue muy ineficiente y complejo (por ejemplo, implicando dos FT exógenos y cuatro productos químicos), y la reprogramación con incluso un FT menos parecía desalentadora. Hacia la reprogramación solo con OCT4, los presentes inventores desarrollaron una estrategia por etapas en el perfeccionamiento de la condición de la reprogramación y la identificación de nuevas entidades químicas de reprogramación. En primer lugar, intentaron optimizar más el proceso de reprogramación bajo los cuatro o tres FT (es decir, OSKM u OSK) en los queratinocitos epidérmicos humanos neonatales (NHEK) mediante el ensayo de diversos inhibidores de las vías de TGF β y MAPK a diferentes concentraciones usando métodos de caracterización de iPSC humanas previamente descritos (Lin, T. *et al.*, *Nat Methods* 6:805-808 (2009)). Alentadoramente, los presentes inventores encontraron que la combinación de PD0325901 0,5 μ M y A-83-01 0,5 μ M (un inhibidor más potente y selectivo del receptor de TGF β) fue más eficaz en la potenciación de la reprogramación de los queratinocitos humanos transducidos con OSKM u OSK (Figura 8a). Sorprendentemente, cuando redujeron aún más las transducciones víricas a solo dos factores/OK, todavía pudieron generar iPSC a partir de NHEK cuando se trataron con PD0325901 0,5 μ M y A-83-01 0,5 μ M, aunque con baja eficiencia. Entonces, comenzaron a rastrear pequeñas moléculas adicionales de una colección de compuestos bioactivos conocidos a diversas concentraciones como se ha informado anteriormente. Entre docenas de compuestos ensayados hasta la fecha, sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que un activador de molécula pequeña de PDK1 (quinasa-1 dependiente del 3'-fosfoinositido), PS48 (5 μ M) que nunca se ha informado en la reprogramación, puede mejorar significativamente la eficiencia de la reprogramación aproximadamente quince veces. Curiosamente, también encontraron que el butirato de sodio 0,25 mM (NaB, un inhibidor de la histona desacetilasa) resultó ser mucho más fiable y eficiente que el VPA 0,5 mM previamente publicado para la generación de iPSC en condiciones de OK (Figura 8b). Estudios de seguimiento posteriores demostraron que la combinación de PS48 5 μ M y NaB 0,25 mM podría mejorar aún más la eficiencia de la reprogramación en más de veinticinco veces (Figura 8b y Tabla 4). Con dicha eficiencia sin precedentes en la reprogramación de NHEK bajo solo dos FT, los presentes inventores exploraron aún más la posibilidad de generar iPSC solo con OCT4 perfeccionando las combinaciones de esas moléculas pequeñas durante diferentes ventanas de tratamiento. Los NHEK primarios se transdujeron con OCT4 y se trataron con productos químicos (Figura 8c). Entre diversas condiciones, aparecieron colonias pequeñas de iPSC semejantes a las hESC (de cuatro a seis colonias de 1.000.000 de células sembradas) en los NHEK infectados con OCT4 que se trataron con NaB 0,25 mM, PS48 de 5 μ M y A-83-01 0,5 μ M durante las cuatro primeras semanas, seguido por el tratamiento con NaB 0,25 mM, PS48 5 μ M, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M durante otras cuatro semanas (Figura 8c). Dichas colonias de iPSC positivas en TRA-1-81 (Figura 8d) crecieron más bajo los medios de cultivo de hESC convencionales, y se pudieron pasar en serie para producir clones de iPSC estables que se caracterizaron adicionalmente (Figura 8e y 9). De manera más significativa, también se pudieron generar iPSC solo con OCT4 a partir de queratinocitos adultos humanos mediante la adición de Parnate 2 μ M y CHIR99021 3 μ M (que ha demostrado mejorar la reprogramación de los NHEK en condiciones de OK) a este cóctel químico. Después de la reprogramación fiable de los queratinocitos primarios a iPSC mediante OCT4 y moléculas pequeñas, los presentes inventores aplicaron las condiciones a otros tipos de células primarias humanas, incluyendo HUVEC (células mesodérmicas diferenciadas) y AFDC (células derivadas de líquido amniótico). De forma similar, las colonias de iPSC positivas en TRA-1-81 aparecieron en las HUVEC infectadas con OCT4 y las AFDC que se trataron con productos químicos. Sorprendentemente, parecía que la reprogramación de las HUVEC y las AFDC fue más eficiente y más rápida que la reprogramación de los NHEK en condiciones de OCT4 y de moléculas pequeñas (Tabla 4). Se expandieron dos clones de iPSC de cada tipo de célula a largo plazo durante más de 20 pasajes en condiciones convencionales de cultivo de hESC y se caracterizaron adicionalmente (Tabla 5).

Estas células hiPSC-OK y hiPSC-O expandidas establemente no se pueden distinguir morfológicamente de las hESC, y podrían cultivarse sobre superficie recubierta de ECM en condiciones sin alimentación y químicamente definidas (Figura 8e y Figura 13). Se tiñeron positivas para la fosfatasa alcalina (ALP) y se expresaron marcadores típicos de la pluripotencia, incluyendo OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-81 y SSEA4, detectados por inmunocitoquímica/ICC (Figura 8e, 10b, Figuras 11-12). Además, el análisis por RT-PCR confirmó la expresión de los genes endógenos humanos *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *REX1*, *UTF1*, *TDGF2*, *FGF4* y el silenciamiento de *OCT4* y *KLF4* exógenos (Figura 9a y 10c). Además, el análisis de secuenciación con bisulfito reveló que los promotores de *OCT4* y *NANOG* de las células hiPSC-OK y hiPSC-O están en gran parte desmetilados (Figura 9b y 10d). Este resultado proporciona más pruebas para la reactivación del programa de transcripción de la pluripotencia en las células hiPSC-OK y hiPSC-O. El análisis de la expresión génica global de las células hiPSC-O, NHEK y hESC

mostró que las células hiPSC-O son distintas de los NHEK (valor de correlación de Person: 0,87) y más similares a las hESC (valor de correlación de Person: 0,98) (Figura 9c). El análisis de genotipificación demostró que las células hiPSC-O solo contenían el transgén *OCT4* sin la contaminación del transgén *KLF4* o *SOX2* (Figura 15). El análisis de transferencia de Southern demostró que había múltiples sitios de integración diferentes del transgén *OCT4* (Figura 16) entre los diferentes clones. Además, el resultado del cariotipo demostró que hiPSC-O mantuvo un cariotipo normal durante todo el proceso de reprogramación y expansión (Figura 17). Además, el análisis de identificación genética del ADN excluyó la posibilidad de que estas hiPSC surgieran de la contaminación de hESC en el laboratorio (Tabla 6). Para examinar el potencial evolutivo de estas células HiPSC-O, se diferenciaron *in vitro* mediante el método convencional de diferenciación del cuerpo embrionario (EB). Los análisis de ICC demostraron que pudieron diferenciarse eficazmente en células neuronales características β III-tubulina⁺ (ectodermo), células mesodérmicas SMA⁺ y células endodérmicas AFP⁺ (Figura 9d y 10e). Los análisis de PCR cuantitativa confirmaron además la expresión de estos y otros genes marcadores específicos del linaje, incluyendo células ectodérmicas (*βIII-tubulina* y *NESTIN*), células mesodérmicas (*MSX1* y *MLC2α*) y células endodérmicas (*FOXA2* y *AFP*) (Figura 9e). Siguiendo el protocolo de EB, estas células hiPSC-OK y hiPSC-O también pudieron dar lugar a cardiomiocitos de latido rítmico. Para ensayar su pluripotencia *in vivo*, se trasplantaron en ratones SCID. De cuatro a seis semanas más tarde, estas células hiPSC-O generaron eficazmente teratomas típicos que contenían derivados de las tres capas germinales (Figura 9f y 10f). En conjunto, estas caracterizaciones *in vitro* e *in vivo* demostraron que un solo factor de transcripción, *OCT4*, combinado con un cóctel definido de moléculas pequeñas es suficiente para reprogramar varias células somáticas primarias humanas a iPSC que son morfológica, molecular y funcionalmente similares a las hESC pluripotentes.

Los estudios presentados anteriormente tienen una serie de implicaciones importantes: (1) aunque se demostró que las NSC fetales se reprogramaron a iPSC mediante la expresión ectópica de Oct4 solo, hay un gran escepticismo en torno a si el gen Oct4 exógeno solo sería suficiente para reprogramar otras células somáticas humanas más prácticas que no expresen endógenamente Sox2 (uno de los dos genes maestros de la pluripotencia en la reprogramación), que se encuentran en estadios de desarrollo posteriores (por ejemplo, embrionario/fetal temprano frente a nacido/adulto) y que pueden obtenerse sin daños significativos en el individuo. Según lo que se sabe, el presente estudio es la primera demostración de que las iPSC pueden derivarse en la práctica de células somáticas humanas primarias fácilmente disponibles (por ejemplo, queratinocitos) transducidas con un solo gen de reprogramación exógeno, Oct4. En contraste con las células madre neuronales del cerebro, los queratinocitos son más accesibles y pueden obtenerse fácilmente de individuos nacidos con procedimientos menos invasivos. Esto refuerza aún más la estrategia de explotar diversas células somáticas humanas accesibles en la práctica para la generación de iPSC con metodologías más seguras y/o mejores cualidades. Por lo tanto, este nuevo método y su desarrollo adicional facilitarían significativamente la producción de células madre pluripotentes específicas de pacientes para diversas aplicaciones. (2) Aunque se han identificado moléculas pequeñas y sus combinaciones para reemplazar solo uno o dos FT de reprogramación, la generación de iPSC se convierte en un desafío exponencial cuando se omiten más FT de reprogramación exógenos juntos. La identificación de este nuevo cóctel de moléculas pequeñas, que repone funcionalmente tres factores maestros de transcripción todos juntos (es decir, Sox2, Klf4 y cMyc) para permitir la generación de iPSC con Oct4 solo, representa otra etapa importante hacia la reprogramación final con solo moléculas pequeñas, y demostró y reforzó aún más el enfoque químico hacia las iPSC. (3) Esta condición de un solo gen demostrada también tiene una implicación significativa para la tecnología de las células madre pluripotentes inducidas por proteínas (piPSC). Un desafío práctico para la tecnología de piPSC es la producción a gran escala y fiable de las cuatro proteínas de reprogramación transducible, cada una de las cuales se comporta de manera diferente en la fabricación (por ejemplo, su expresión, plegamiento, estabilidad, etc.). Como es evidente, la combinación de este cóctel de moléculas pequeñas con una sola proteína transducible simplificaría significativamente la tecnología de piPSC y facilitaría sus aplicaciones. (4) Más significativamente, los presentes inventores identificaron una nueva molécula pequeña, PS48, con una nueva diana/mecanismo en la potenciación de la reprogramación. PS48 es un activador alostérico de molécula pequeña de PDK1, que es una importante quinasa cadena arriba para varias quinasas AGC, incluyendo Akt/PKB (Alessi *et al.*, *Curr Biol* 7, 261-269 (1997)). Su efecto potenciador de la reprogramación puede atribuirse en parte a la activación de Akt/PKB, que potencia la proliferación celular y la supervivencia ((Manning, B. D., Cantley, L. C., *Cell* 129, 1261-1274 (2007)). Otras caracterizaciones en profundidad sobre cómo los mecanismos implicados en PDK1 se regulan con precisión durante el proceso de reprogramación deben proporcionar conocimientos adicionales subyacentes a la reprogramación y a la pluripotencia. Además, debido a que podría haber riesgos ocultos aún mayores (por ejemplo, se podrían generar o seleccionar anomalías genéticas y/o epigenéticas más sutiles durante el proceso de reprogramación) impuestos por la baja eficiencia y la cinética lenta de la reprogramación, la identificación de nuevas moléculas pequeñas para potenciar la reprogramación como se ilustra de nuevo en este estudio siempre sería muy valiosa para un procedimiento más seguro, más fácil y más eficiente para la generación de iPSC humanas. Por último, este nuevo y potente cóctel de moléculas pequeñas para la reprogramación validó la estrategia de selección y de optimización química por etapas que se presenta en el presente documento como una metodología productiva hacia las células madre pluripotentes finales puramente inducidas por productos químicos. Por otra parte, el hallazgo de que diferentes moléculas pequeñas que modulan la misma diana/mecanismo podrían tener efectos significativamente diferentes sobre la reprogramación en un contexto diferente, ilustrado por las mejores actividades potenciadoras de la reprogramación de A-83-01 y NaB en los queratinocitos humanos, sugiere la importancia de la optimización y el tratamiento "individualizados" con diferentes regímenes para un contexto de reprogramación específico.

Cultivo celular

Se mantuvieron queratinocitos epidérmicos humanos normales (Lonza) en medio de cultivo de queratinocitos (KCM, Lonza). Se mantuvieron células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC, Millipore) en medio completo de EndoGRO-VEGF (HCM, CHEMICON). Se cultivaron ESC y hiPSC humanas en células de alimentación MEF en medios de cultivo de ESC humanas convencionales (hESCM: DMEM/F12, sustitución de suero desactivado al 15 %, Glutamax al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, penicilina/estreptomicina al 1 %, β -mercaptoetanol 0,1 mM y 10 ng/ml de bFGF). Todos los productos de cultivo celular eran de Invitrogen/Gibco BRL a menos que se mencione otra cosa.

Producción de lentivirus

Los sobrenadantes de lentivirus se produjeron y se cosecharon como se ha descrito previamente (Yu, J. *et al.*, *Science* 318:1917-1920 (2007)). Los plásmidos usados para la producción de lentivirus incluyen pSin-EF2-Puro-hOCT4, pSin2-EF2-PurohSOX2, pLove-mKlf4, pLove-mMyc, el plásmido empaquetado psPAX2 y el plásmido pMD2.G codificante de la envoltura (Yu, J. *et al.*, *Science* 318:1917-1920 (2007) y Li, W. *et al.*, *Stem Cells* 27:2992-3000 (2009)).

Reprogramación de NHEK

Se cultivaron NHEK en una placa de cultivo tisular de 100 mm y se transdujeron 3 veces (3-4 horas cada transducción) con sobrenadantes de lentivirus recién producidos. Se sembraron 1.000.000 NHEK transducidos en las células alimentadoras CF1 MEF inactivadas por rayos X irradiadas en una placa de 100 mm, y se cultivaron en KCM y se trataron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM (Stemgent) y A-83-01 0,5 μ M (Stemgent) durante 2 semanas, seguido del cambio de la mitad del volumen de medio a hESCM y la suplementación con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM y A-83-01 0,5 μ M durante otras 2 semanas. A continuación, se cambiaron los medios de cultivo de células a hESCM y se suplementaron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M (Stemgent) durante cuatro semanas más. Los mismos queratinocitos infectados con OCT4 cultivados en medio sin productos químicos se usaron como control. El cultivo se dividió mediante Accutase (Millipore) y se trató con tiazovivina 1 μ M (Stemgent) el primer día después de la división. Las colonias de iPSC teñidas positivamente con anticuerpo anti-TRA-1-81 humano de ratón Alexa Fluor 555 (BD Pharmingen) se recogieron para la expansión en células alimentadoras en hESCM y se cultivaron rutinariamente.

Reprogramación de células HUVEC

Se cultivaron HUVEC en una placa de cultivo tisular de 100 mm y se transdujeron 2 veces (4-6 horas cada transducción) con sobrenadantes de lentivirus recién producidos. Se sembraron 200.000 HUVEC transducidas en una placa de 100 mm recubierta con gelatina, se cultivaron en HCM y se trataron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM y A-83-01 0,5 μ M durante 2 semanas, seguido del cambio de la mitad de volumen de medio a hESCM y la suplementación PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM y A-83-01 0,5 μ M durante otras 2 semanas. A continuación, se cambiaron los medios de cultivo de células a hESCM y se suplementaron con PS48 5 μ M, NaB 0,25 mM, A-83-01 0,5 μ M y PD0325901 0,5 μ M durante 1-2 semanas más. Los mismos queratinocitos infectados con OCT4 cultivados en medio sin productos químicos se usaron como control. Las colonias de iPSC teñidas positivamente con anticuerpo anti-TRA-1-81 humano de ratón Alexa Fluor 555 se recogieron para la expansión en células alimentadoras en hESCM y se cultivaron rutinariamente. El cultivo se dividió mediante Accutase y se trató con tiazovivina 1 μ M el primer día después de la división.

Diferenciación *in vitro*

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

Ensayo de tinción con fosfatasa alcalina e inmunocitoquímica

La tinción con fosfatasa alcalina se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante usando el kit de detección de fosfatasa alcalina (Stemgent). Se llevó a cabo un ensayo de inmunocitoquímica convencional como se ha informado anteriormente (Li, W. *et al.*, *Stem Cells* 27:2992-3000 (2009)). Los anticuerpos primarios usados se pueden encontrar en la Tabla 3. Los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-ratón o anti-conejo de mono Alexa Fluor 488 (1:1000) (Invitrogen). Los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (Sigma-Aldrich). Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

Análisis de expresión de genes mediante RT-PCR y qRT-PCR

Para los análisis de RT-PCR y de qRT-PCR, se extrajo el ARN total de iPSC humanas usando el minikit RNeasy Plus en combinación con QIAshredder (Qiagen). La transcripción inversa de la primera cadena se realizó con 2 µg de ARN usando el kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad). La expresión de los marcadores de pluripotencia se analizó mediante RT-PCR usando Platinum PCR SuperMix (Invitrogen). La expresión de los marcadores específicos del linaje después de la diferenciación se analizó mediante qRT-PCR usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Los cebadores se pueden encontrar en la Tabla 2.

10 Análisis de micromatrices

Se usó el BeadChip de expresión de Ref-8_v3 humanas (Illumina, CA, EE.UU.) para las hibridaciones de micromatrices para examinar la expresión génica global de células NHEK, hiPSC y hES. Se sintetizó ARNc marcado con biotina-16-UTP a partir de 500 ng de ARN total con el Kit de amplificación de ARN TotalPrep de Illumina (Ambion AMIL1791, Foster City, CA, EE.UU.). La mezcla de hibridación que contenía 750 ng de ARNc amplificado marcado se preparó de acuerdo con el manual del sistema BeadStation 500x de Illumina (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) usando los reactivos suministrados y la solución de tinción de estreptavidin-Cy3 de GE Healthcare. La hibridación al BeadChip de expresión de Ref-8_v3 humanas de Illumina se produjo durante 8 h a 55 °C en un BeadChip Hyb Wheel. Se exploró la matriz con el lector BeadArray de Illumina. Todas las muestras se prepararon en dos duplicados biológicos. El procesamiento y análisis de los datos de las micromatrices se realizaron con el software BeadStudio de Illumina. Se sustrajeron los datos del fondo y se normalizaron usando la opción de rango invariante.

25 Secuenciación genómica con bisulfato

Se aislaron ADN genómicos usando el kit de aislamiento de ADN Non Organic (Millipore) y luego se trataron con el kit de metilación de ADN Methylation-Gold de EZ (Zymo Research Corp., Orange, CA). Los ADN tratados se usaron entonces como moldes para amplificar secuencias de interés. Los cebadores usados para la amplificación de fragmentos promotores de OCT4 y NANOG se indican en la Tabla 2. Se clonaron los fragmentos resultantes usando el kit de clonación TOPO TA para la secuenciación (Invitrogen) y se secuenciaron.

35 Genotipificación de hiPSC

La genotipificación de las estirpes de hiPSC se realizó usando RT-PCR de ADN genómico con cebadores específicos (Tabla 2; Yu, J. *et al.*, *Science* 318:1917-1920 (2007) y Li, W. *et al.*, *Stem Cells* 27:2992-3000 (2009)).

Formación de teratomas

Se cosecharon las estirpes de hiPSC usando tripsina-EDTA al 0,05 %. Se inyectaron cinco millones de células bajo la cápsula renal de ratones SCID (n = 3). Tras 4-6 semanas, se recogieron teratomas bien desarrollados, se fijaron y luego se analizaron histológicamente en el centro de histología del TSRI.

Tabla 2. Cebadores usados

Gen	Directos	Inversos
Para RT-PCR		
Endo-OCT4	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTTCCCTCCAACC
Endo-SOX2	CAAAAATGGCCATGCAGGTT	AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT
Endo-NANOG	TTTGGAAGCTGCTGGGGAAG	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA
Endo-KLF4	ACGATCGTGCCCGGAAAAGGACC	GATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC
Endo-cMYC	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG
REX1	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
UTF1	CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG	CGCGCTGCCAGAATGAAGCCCAC
TDGF2	CTGCTGCCTGAATGGGGAACTGC	GCCACGAGGTGCTCATCCATCACAAGG
FGF4	CTACAACGCCTACGAGTCTACA	GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG
Exo-OCT4	TGTCTCCGTCACCACTCTGG	ATGCATGCGGATCCTTCG
PAX6	TGTCCAACGGATGTGAGT	TTTCCAAGCAAAGATGGAC
βIII TUBULINA	CAACAGCACGGCCATCCAGG	CTTGGGGCCCTGGGCCTCCGA
FOXF1	AAAGGAGCCACGAAGCAAGC	AGGCTGAAGCGAAGGAAGAGG

HAND1	TCCCTTTTCCGCTTGCTCTC	CATCGCTACCTGATGGACG
AFP	AGCAGCTTGGTGGTGGATGA	CCTGAGCTTGGCACAGATCCT
GATA6	TGTGCGTTCATGGAGAAGATCA	TTTGATAAGAGACCTCATGAACCGACT
GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
Para la secuenciación con bisulfato		
OCT4-1	TTAGGAAAATGGGTAGTAGGGATTT	TACCCAAAAACAAATAAATTATAAAACCT
OCT4-2	GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG	CCTAAACTCCCCTTCAAATCTATT
NANOG	GAGTTAAAGAGTTTTGTTTTAAAAATTA	TCCCAAATCTAATAATTTATCATATCTTTC
Para la genotipificación		
OCT4-Int	CAGTGCCCGAAACCCACAC	AGAGGAACTGCTTCCTTCACGACA
SOX2-Int	TACCTCTTCCTCCCACTCCA	AGAGGAACTGCTTCCTTCACGACA
KLF4-Int	CACCTTGCCTTACACATGAAGAGG	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGA

Tabla 3. Anticuerpos primarios aplicados

Anticuerpo	Especie	Dilución	Vendedor
Anti-OCT4 (1)	Ratón	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-OCT4 (2)	Conejo	1:500	Stemgent
Anti-SOX2	Conejo	1:1000	Chemicon
Anti-NANOG	Conejo	1:500	Abcam
Anti-SSEA4	Ratón	1:500	Stemgent
Anti-TRA-1-81	Ratón	1:500	Stemgent
TUT1 (Anti- β III TUBULINA)	Ratón	1:3.000	Covance Research Products
Anti-SMA	Ratón	1:500	Sigma
Anti-AFP	Ratón	1:500	Sigma

5

Tabla 4. Sumario de los experimentos de reprogramación

Células donantes	Factores de inducción	Compuestos químicos	Experimentos	Colonias positivas en TRA-1-81
NHEK (número de lote: 0000087940)	OCT4+KLF4+SOX2+MYC	DMSO	n.º 1	17
			n.º 2	20
			n.º 3	23
		A83+PD	n.º 1	72
			n.º 2	104
			n.º 3	91
	OCT4+KLF4+SOX2	DMSO	n.º 1	2
			n.º 2	3
			n.º 3	8
		A83+PD	n.º 1	26
			n.º 2	35
			n.º 3	44
	A83+PD	n.º 1	1	
		n.º 2	2	
		n.º 3	0	
			n.º 1	15

Células donantes	Factores de inducción	Compuestos químicos	Experimentos	Colonias positivas en TRA-1-81		
	OCT4+KLF4	A83+PS48+PD	n.º 2	18		
			n.º 3	5		
		A83+VPA+PD	n.º 1	6		
			n.º 2	0		
			n.º 3	3		
		A83+NaB+PD	n.º 1	20		
			n.º 2	17		
			n.º 3	18		
		A83+PS48+NaB+PD	n.º 1	21		
			n.º 2	30		
			OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 3	27
					n.º 1	4
n.º 2	0					
	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 3	3		
			n.º 1	2		
			n.º 2	3		
NHEK (número de lote: 2F0661)	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 3	0		
			n.º 1	3		
			n.º 2	2		
AHEK	OCT4	A83+PS48+NaB+PD +Par+CHIR	n.º 1	3		
			n.º 2	2		
HUVEC	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	n.º 1	4		
			n.º 2	7		
			n.º 3	4		
HUVEC	OCT4	A83+PS48+NaB+PD +Par+CHIR	n.º 1	23		
			n.º 2	17		
AFDC	OCT4	A83+PS48+NaB+PD +Par+CHIR	n.º 1	5		
			n.º 2	11		

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

Tabla 5. Caracterización de las estirpes celulares iPSC humanas establecidas

Clon de hiPSC	Factores de inducción	Fuente celular	Expresión del marcador	Ensayo de RT-PCR	Diferenciación de EB	Ensayo de teratomas
hiPSC-OK n.º 1	OCT4+KLF4	NHEK	√	√	√	√
hiPSC-OK n.º 3			√	√	√	
hiPSC-O n.º 1			√	√	√	√

Clon de hiPSC	Factores de inducción	Fuente celular	Expresión del marcador	Ensayo de RT-PCR	Diferenciación de EB	Ensayo de teratomas
hiPSC-O n.º 3	OCT4	NHEK	√	√	√	
hiPSC-O n.º 4			√			
hiPSC-O n.º 5			√			
3 estirpes más						
hiPSC-O n.º 21	OCT4	HUVEC	√	√	√	√
hiPSC-O n.º 22			√			
hiPSC-O n.º 26			√	√	√	
hiPSC-O n.º 31			√	√	√	√
7 estirpes más						
hiPSC-O n.º 52	OCT4	AHEK	√		√	
hiPSC-O n.º 57			√			
hiPSC-O n.º 63	OCT4	AFDC	√		√	
hiPSC-O n.º 65			√			

Se expandieron a largo plazo las estirpes celulares caracterizadas durante más de 20 pasajes en condiciones de cultivo de hESC convencionales y se caracterizaron además para la expresión de marcadores y la pluripotencia, mientras que otras estirpes celulares establecidas se almacenaron en el pasaje 5 o 6. Las entradas en blanco indican sin determinar.

5

Tabla 6. Análisis de identificación genética del ADN en iPSC inducidas con Oct4 y estirpes celulares parentales

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

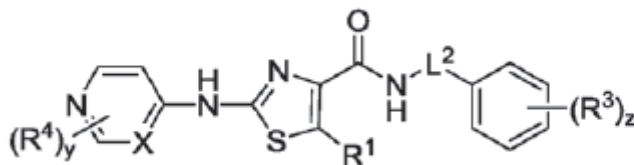
10 Se investigaron quince locus de ADN polimórficos de secuencias cortas repetidas en tándem (STR) y el marcador de

cromosoma sexual amelogenina.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 (a) un inhibidor de quinasa de tipo receptor de activina 5 (ALK5);
 (b) un inhibidor de MAP/ERK quinasa (MEK); y
 (c) un inhibidor de Rho quinasa (ROCK), teniendo el inhibidor de ROCK la estructura:



(II)

10 en la que

L^2 es alquileo C_1 - C_{10} sustituido o no sustituido;

y es un número entero de 0 a 3;

15 z es un número entero de 0 a 5;

X es $-N=$, $-CH=$ o $-CR^5=$;

R^1 es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

20 R^3 , R^4 y R^5 son independientemente $-CN$, $-S(O)_nR^6$, $-NR^7R^8$, $-C(O)R^9$, $-NR^{10}-C(O)R^{11}$, $-NR^{12}-C(O)-OR^{13}$, $-C(O)NR^{14}R^{15}$, $-NR^{16}S(O)_2R^{17}$, $-OR^{18}$, $-S(O)_2NR^{19}$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido, en los que n es un número entero de 0 a 2, en los que si z es superior a 1, dos fracciones R^3 se unen opcionalmente entre sí para formar un cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido; y

25 R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} y R^{19} son independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o heteroarilo sustituido o no sustituido;

30 o uno de sus racematos, diastereómeros, tautómeros o isómeros geométricos, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un inhibidor de la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3).

3. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC).

4. La composición de la reivindicación 1, en la que el inhibidor de ALK5 es 3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (A-83-01) o 4-(4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(piridin-2-il)-1H-imidazol-2-il)benzamida (SB431542).

5. La composición de la reivindicación 1, en la que el inhibidor de MEK es N-(2,3-dihidroxi-propoxi)-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-benzamida (PD0325901).

6. La composición de la reivindicación 1, en la que, en el inhibidor de ROCK,

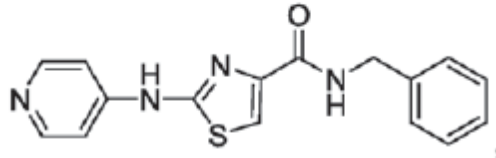
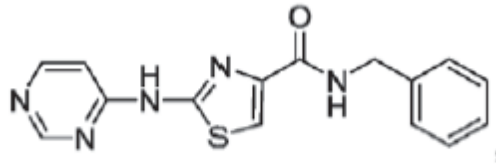
L^2 es metileno;

X es $N=$ o $CH=$;

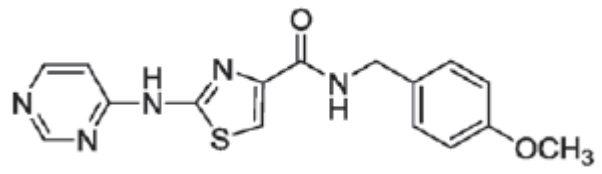
50 R^1 es hidrógeno; y/o

y y z son 0.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que el inhibidor de ROCK tiene la estructura:



o



- 5 8. La composición de la reivindicación 1, que comprende además células de mamífero.
9. Un método *in vitro* o *ex vivo* de inducción de células de mamífero no pluripotentes a células madre pluripotentes inducidas, que comprende:
- 10 introducir al menos un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en: Oct-3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc en las células no pluripotentes; y
poner en contacto las células no pluripotentes con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; en condiciones suficientes para inducir células madre pluripotentes.
- 15 10. El método de la reivindicación 9, en el que la introducción de los factores de transcripción en las células no pluripotentes comprende la introducción de uno o más polinucleótidos codificantes de los factores de transcripción en las células no pluripotentes.
- 20 11. El método de la reivindicación 9, en el que la introducción de los factores de transcripción en las células no pluripotentes comprende poner en contacto las células no pluripotentes con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cada uno de los polipéptidos de factor de transcripción.
- 25 12. El método de la reivindicación 9, que comprende además poner en contacto las células no pluripotentes con un inhibidor de GSK3.
- 30 13. El método de la reivindicación 9, que comprende además poner en contacto las células no pluripotentes con un inhibidor de HDAC.
14. El método de la reivindicación 9, en el que dos factores de transcripción seleccionados del grupo que consiste en Oct-3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc se introducen en las células no pluripotentes.

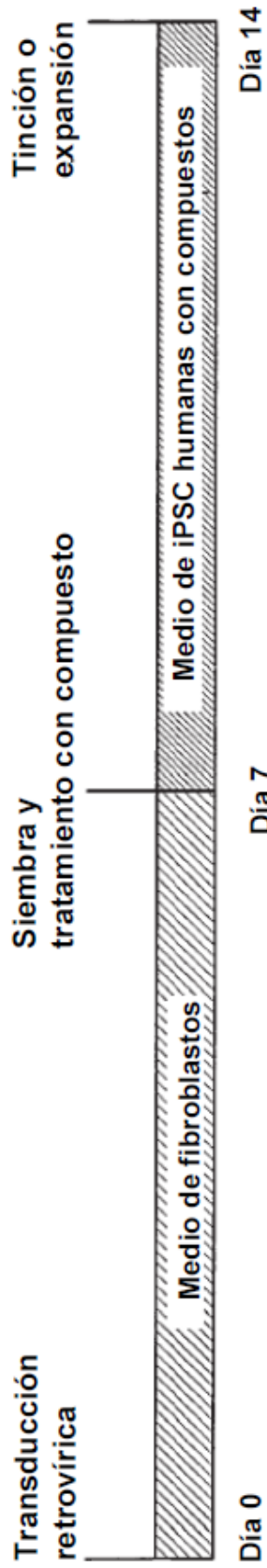


FIG. 1A

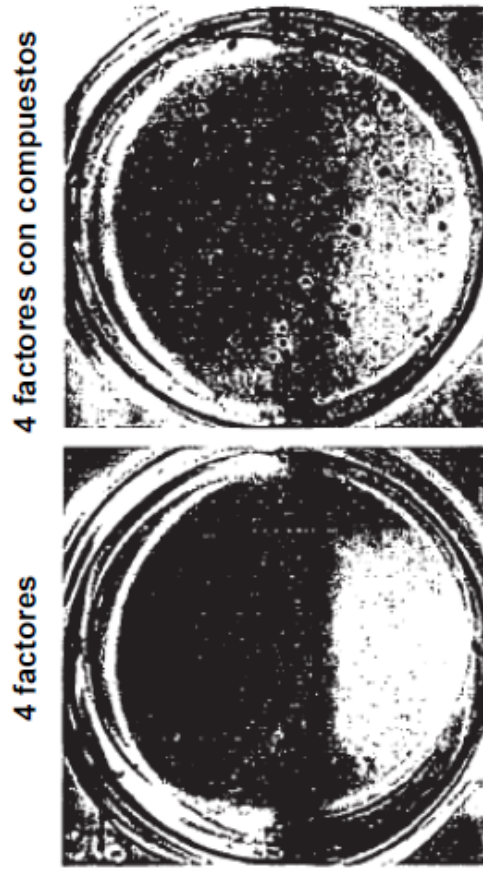


FIG. 1B

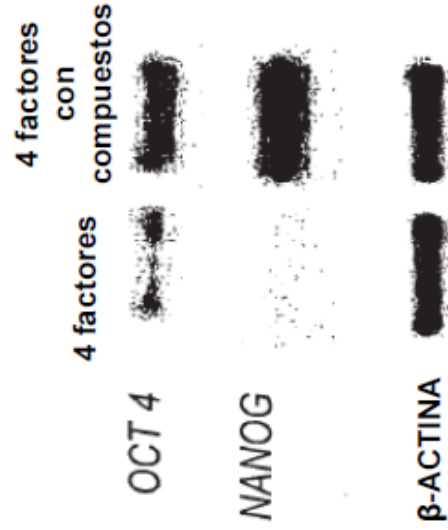


FIG. 1C

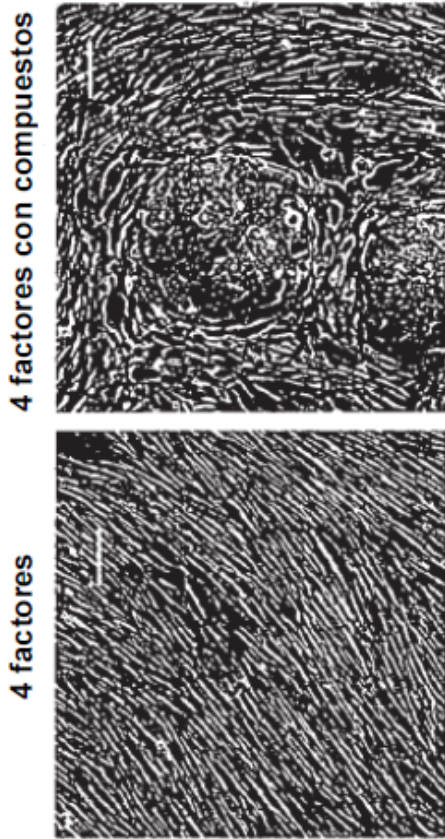


FIG. 1D

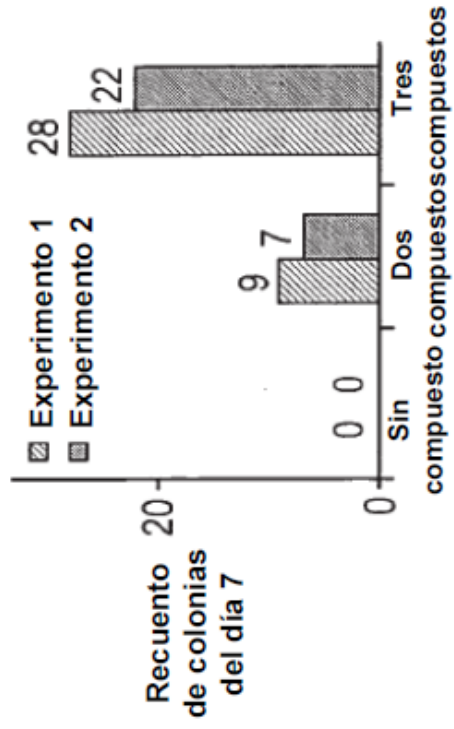


FIG. 1E

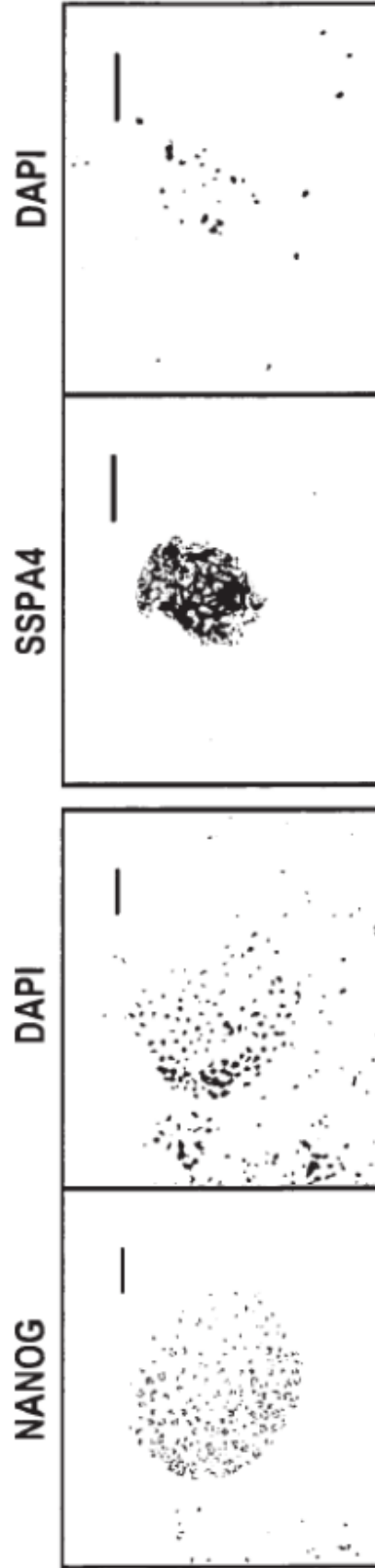


FIG. 1F

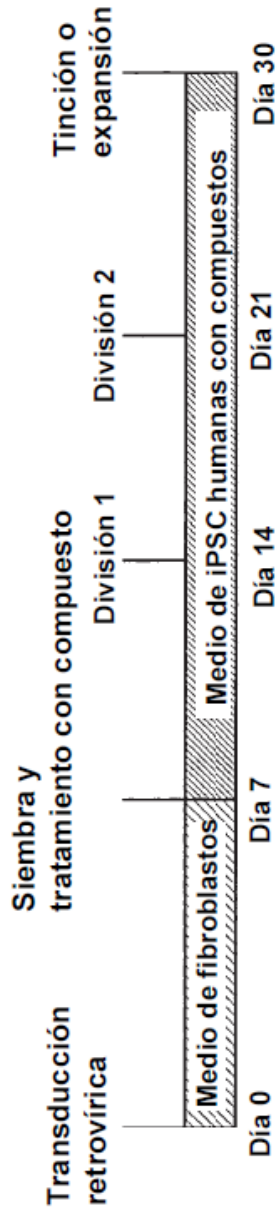


FIG. 2A

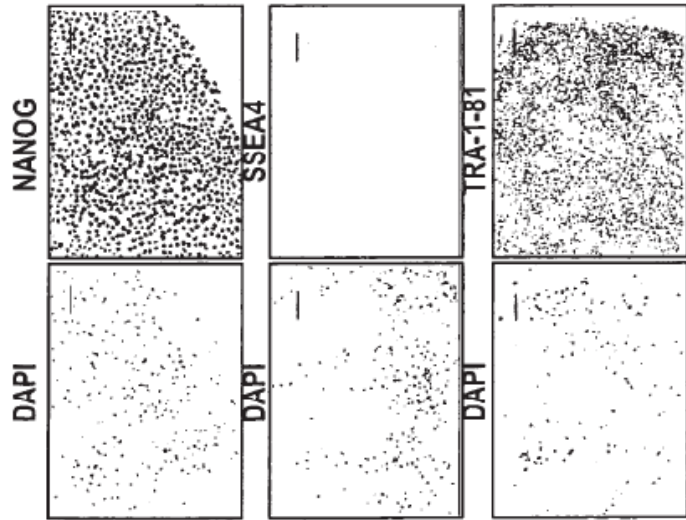


FIG. 2B

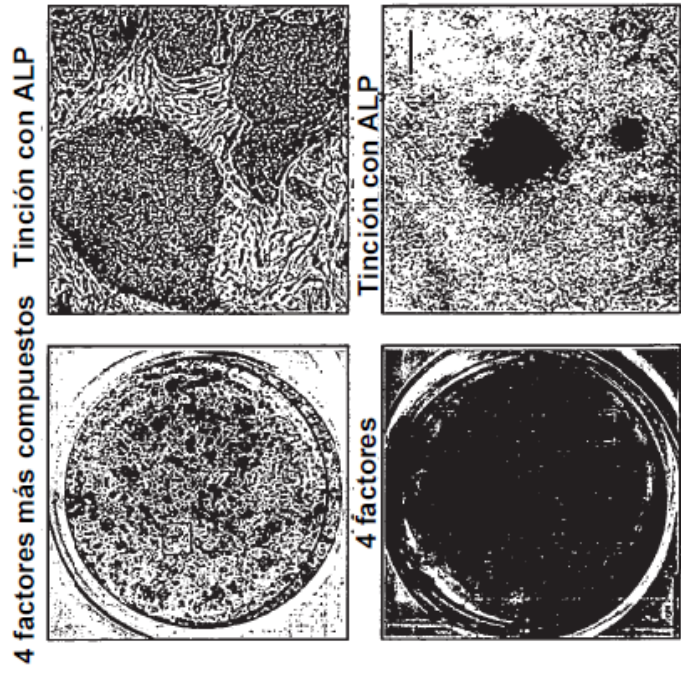


FIG. 2C

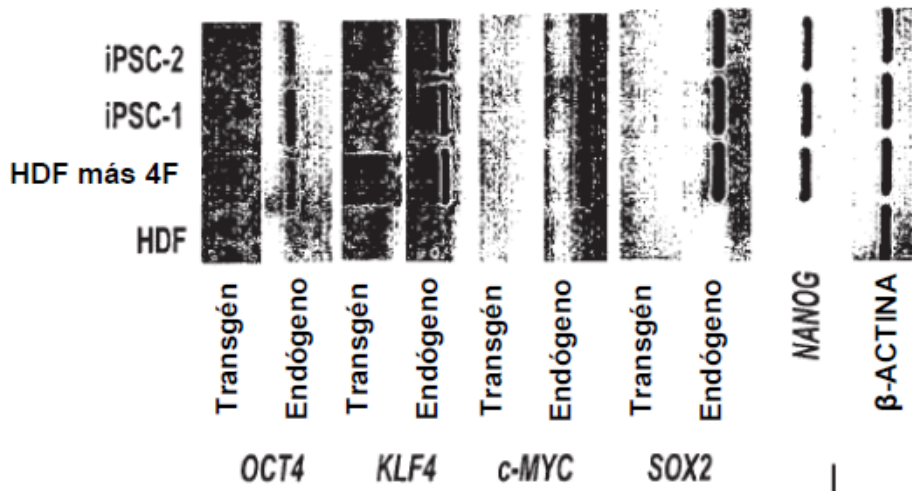


FIG. 2F

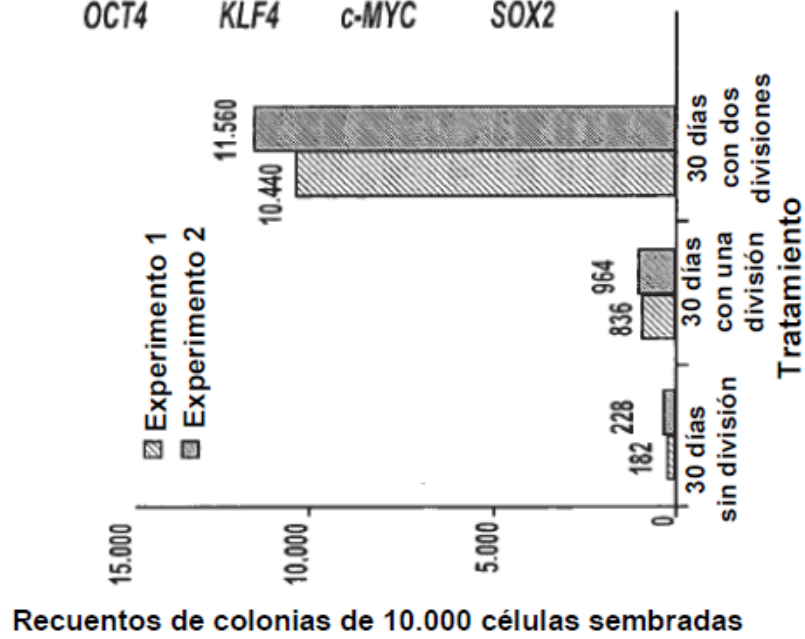


FIG. 2E

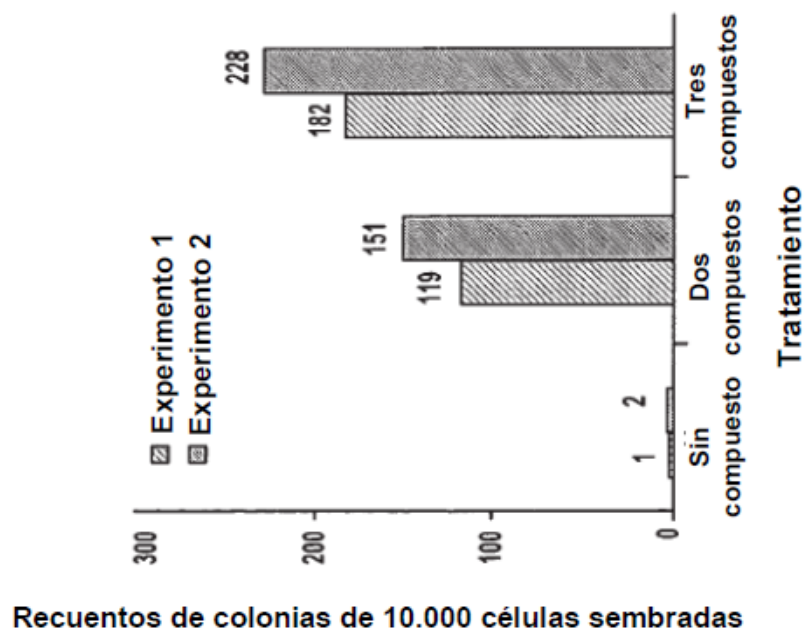


FIG. 2D

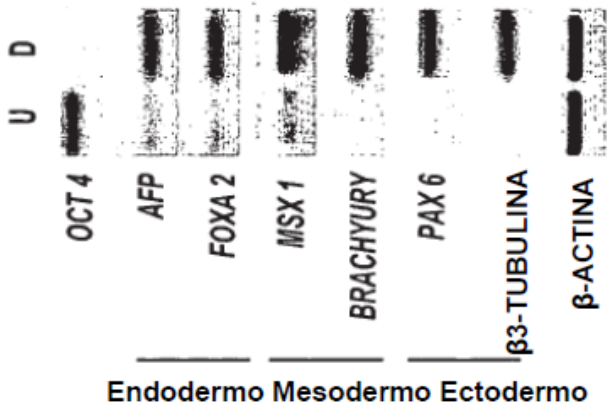


FIG. 3B

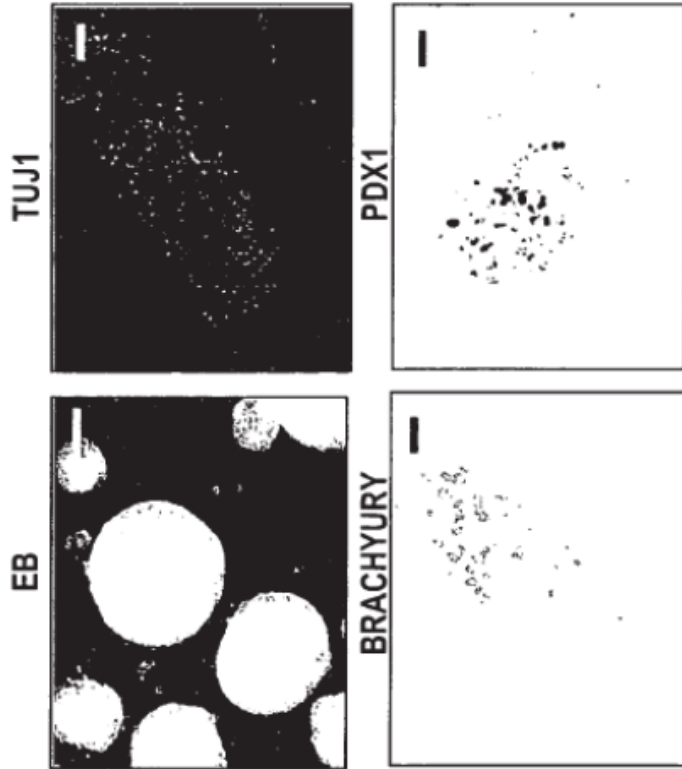


FIG. 3A

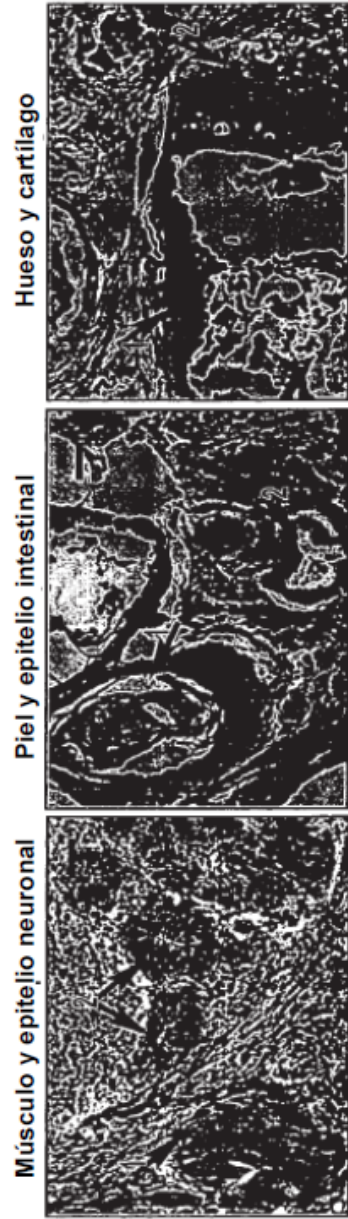


FIG. 3C

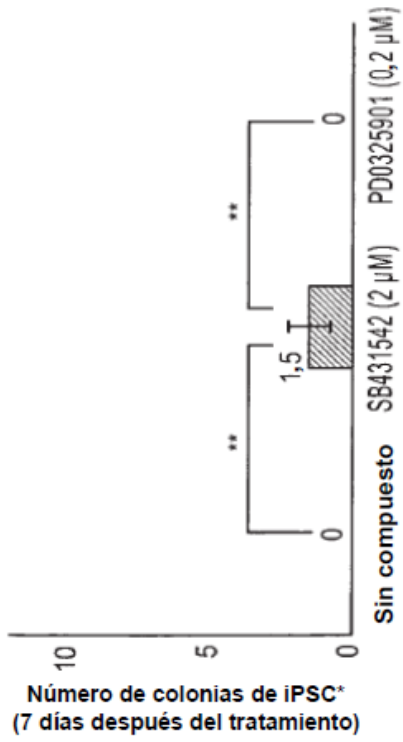


FIG. 4A

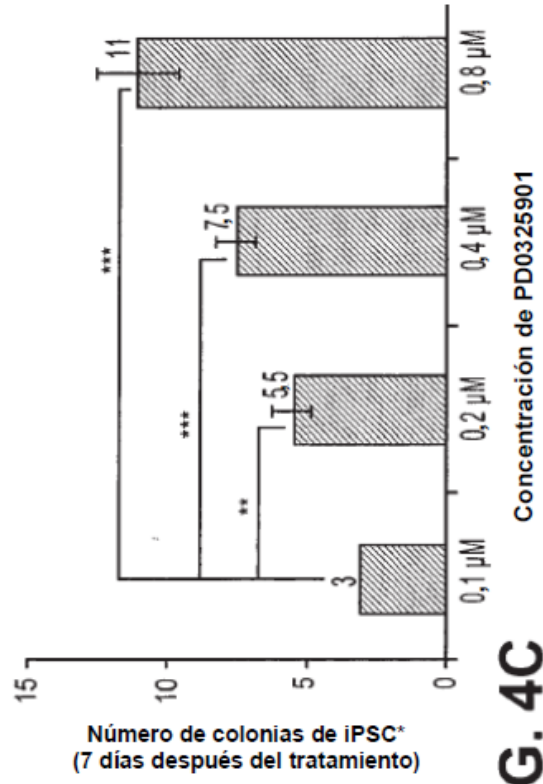


FIG. 4C

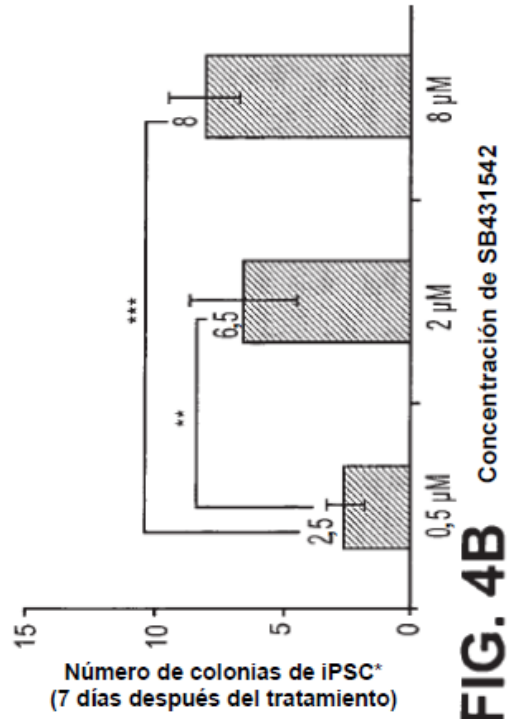


FIG. 4B

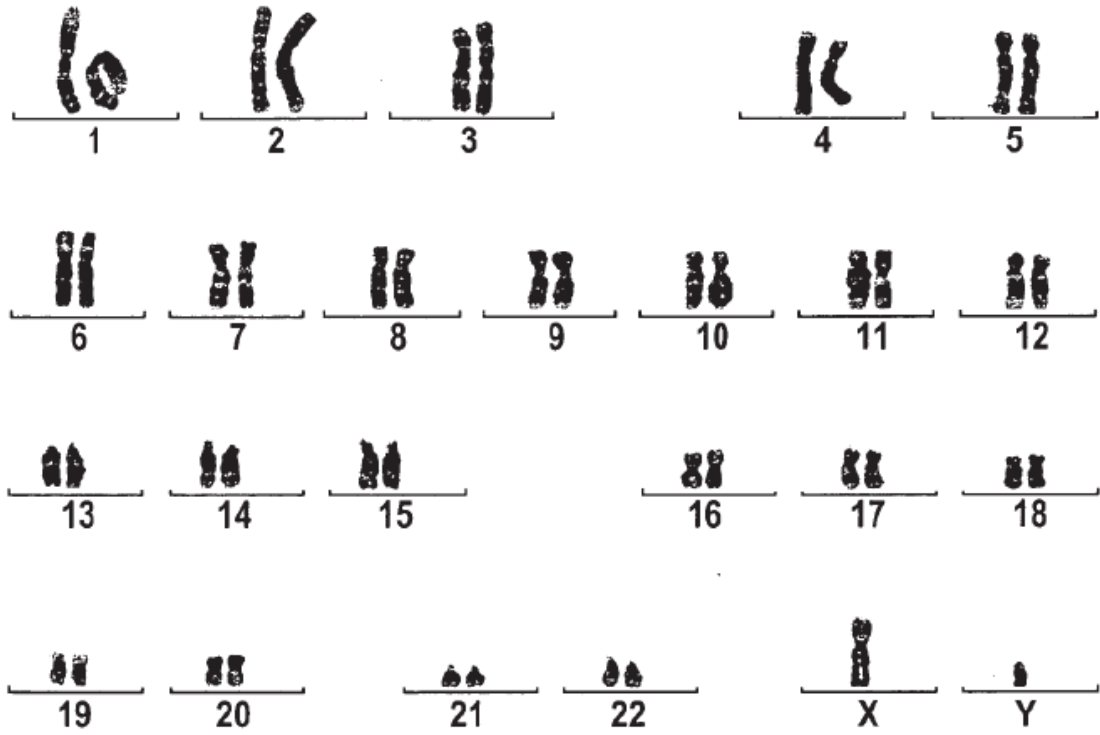


FIG. 5

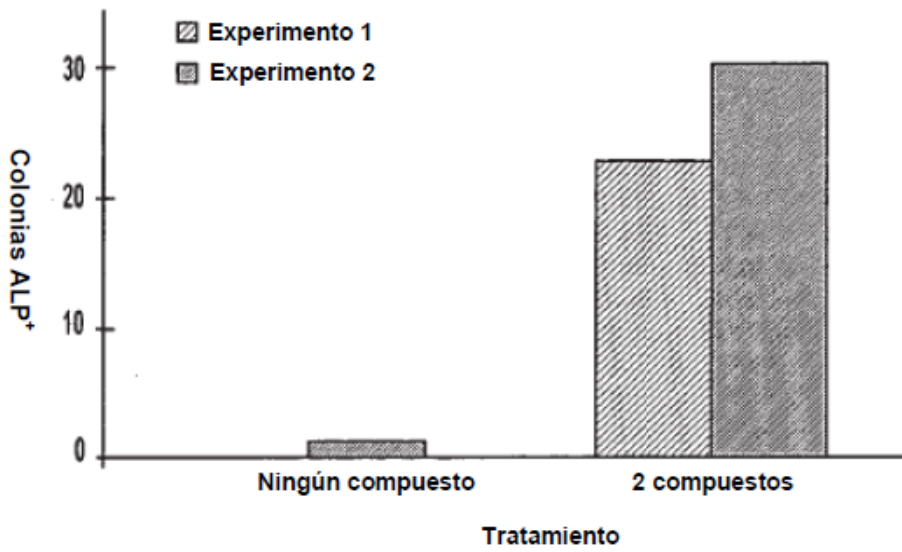


FIG. 6A

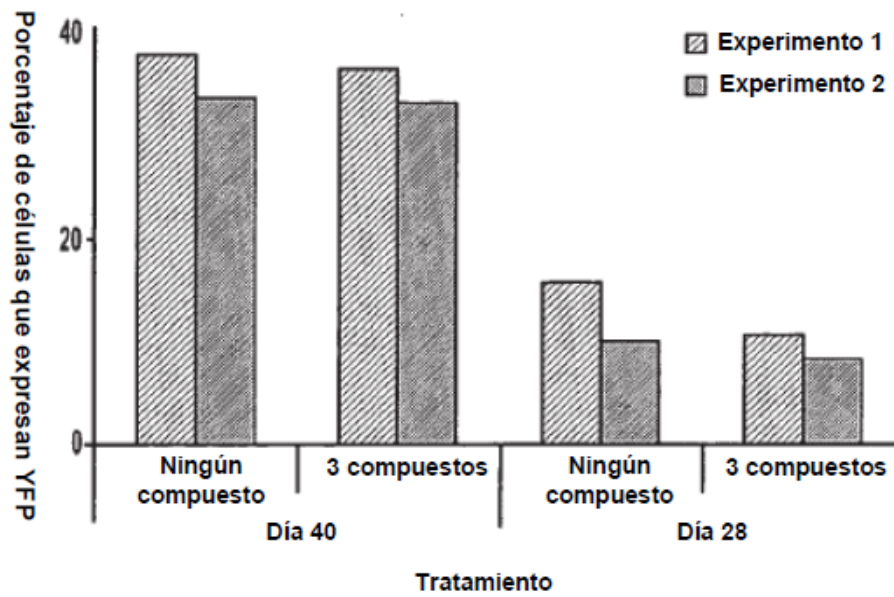
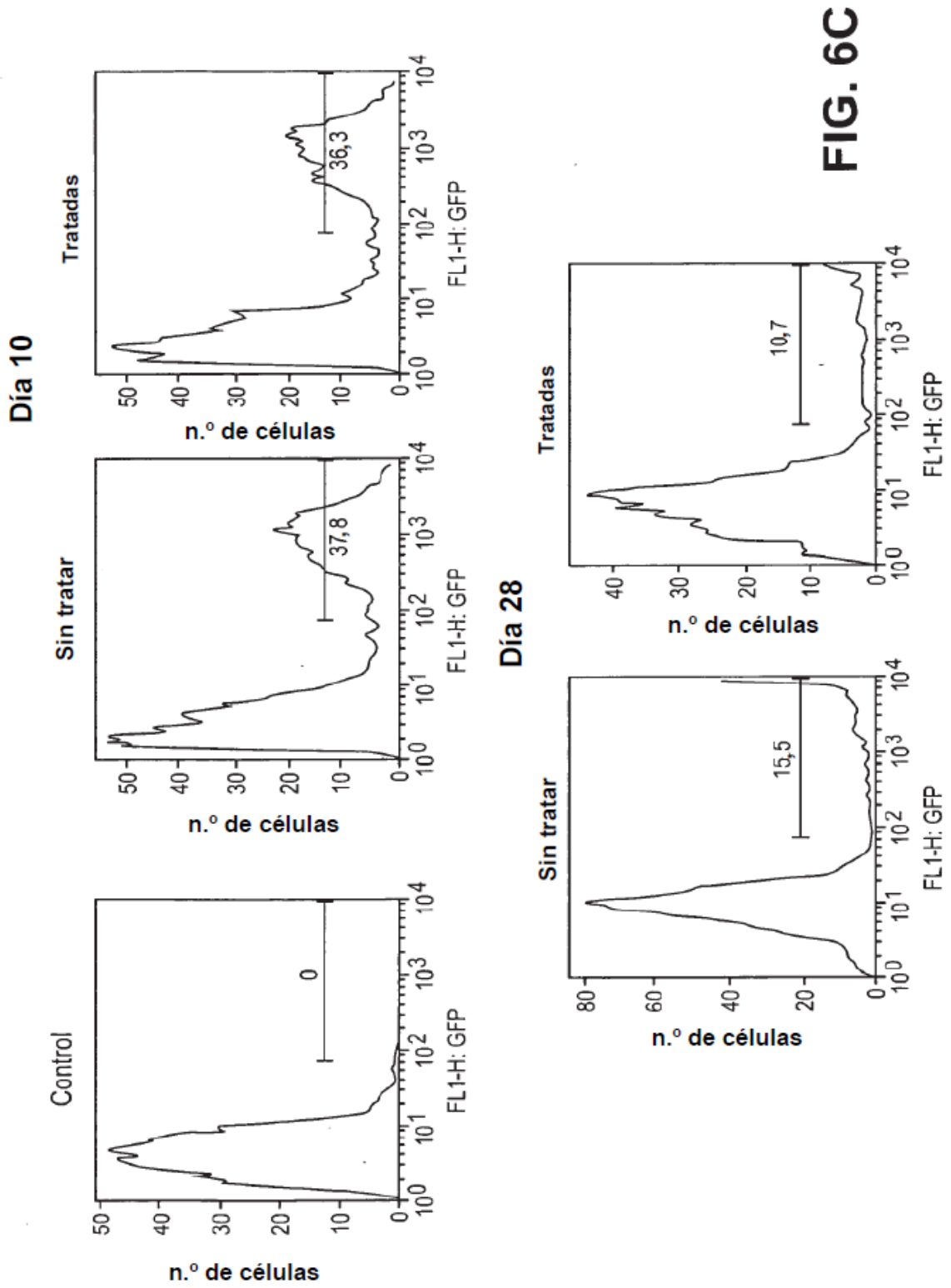


FIG. 6B



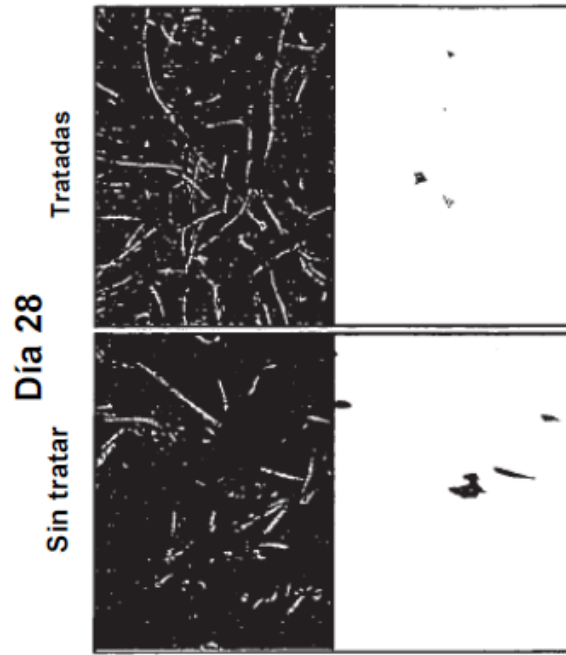


FIG. 6F

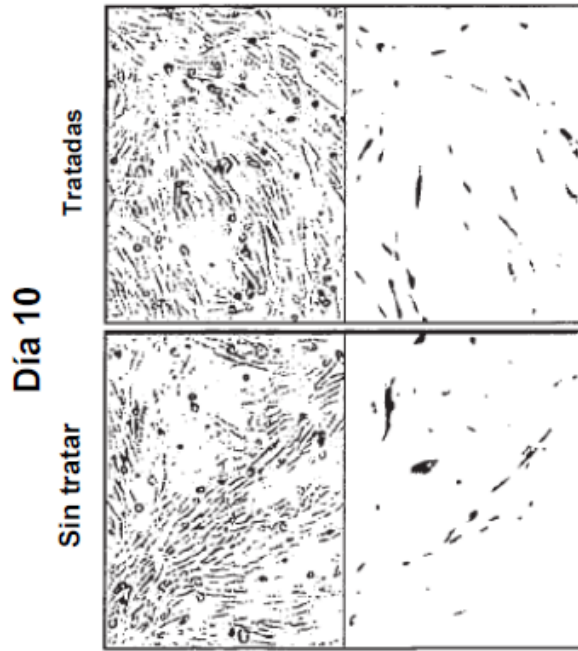


FIG. 6E

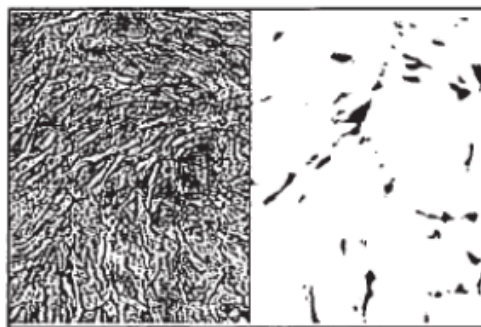


FIG. 6D

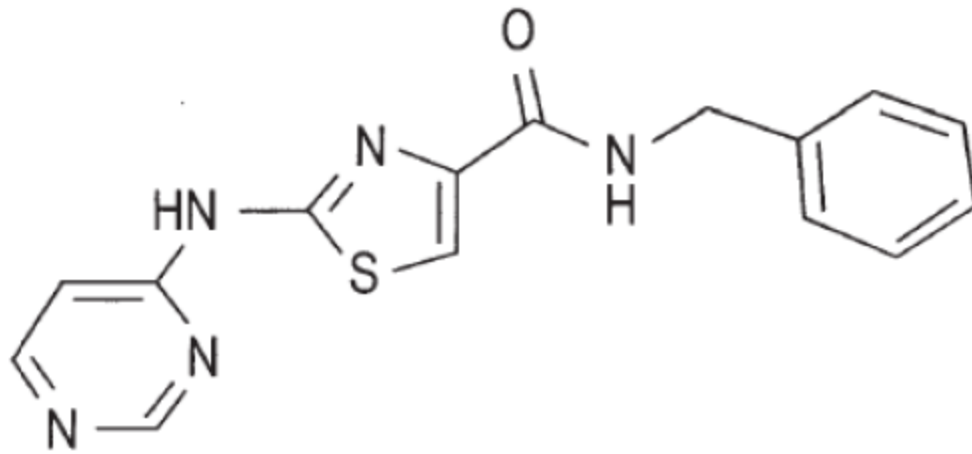


FIG. 7

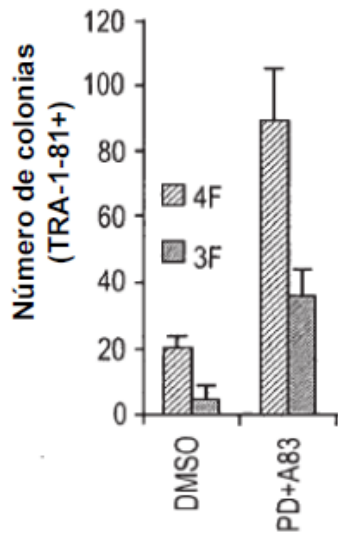


FIG. 8A

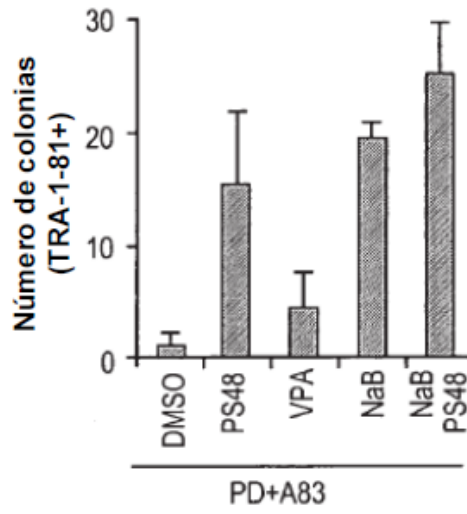


FIG. 8B

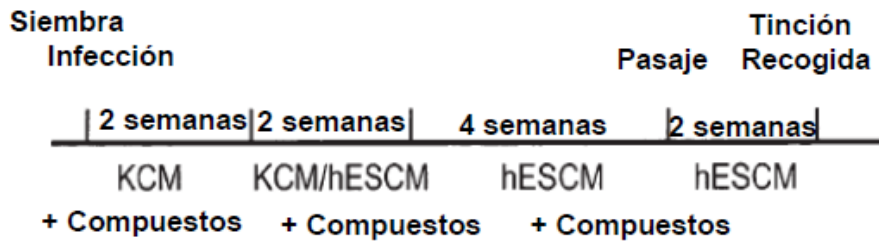


FIG. 8C

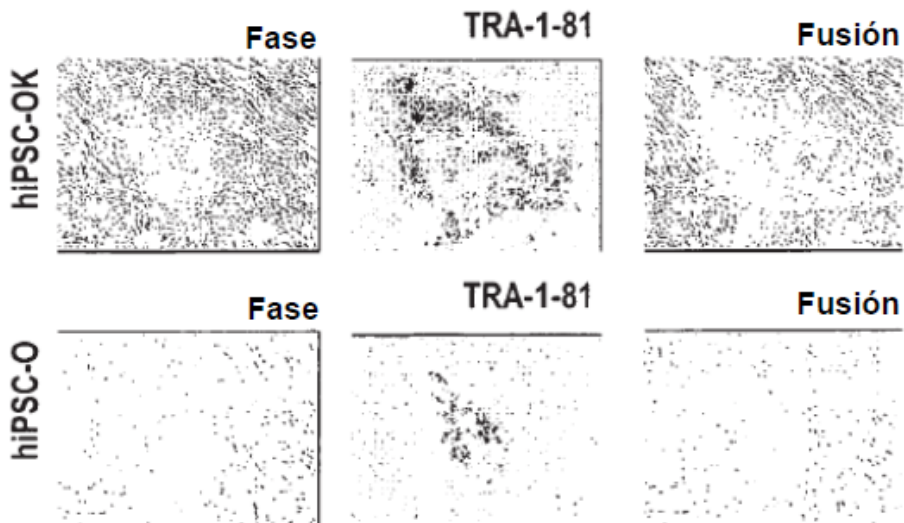


FIG. 8D

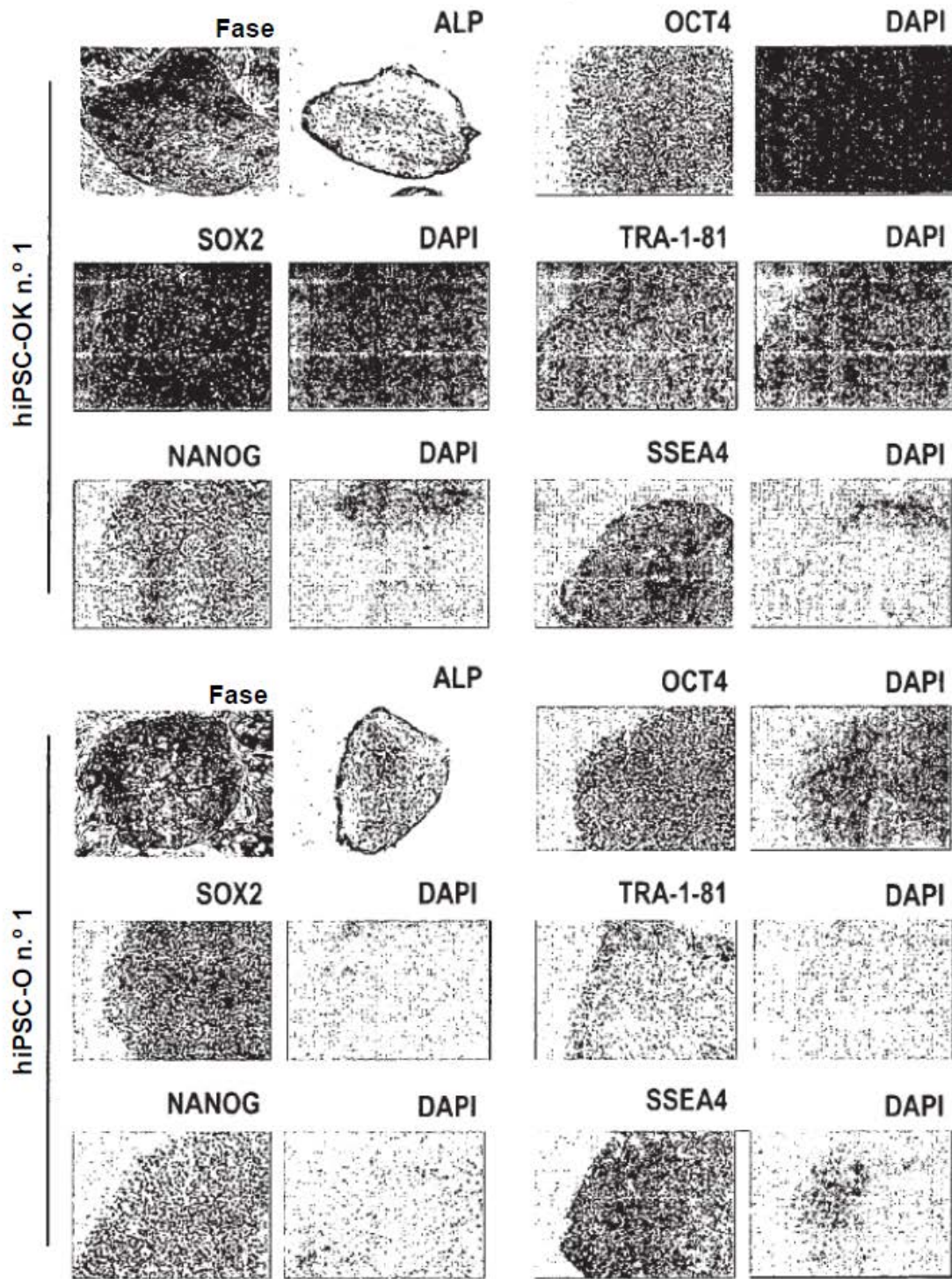


FIG. 8E

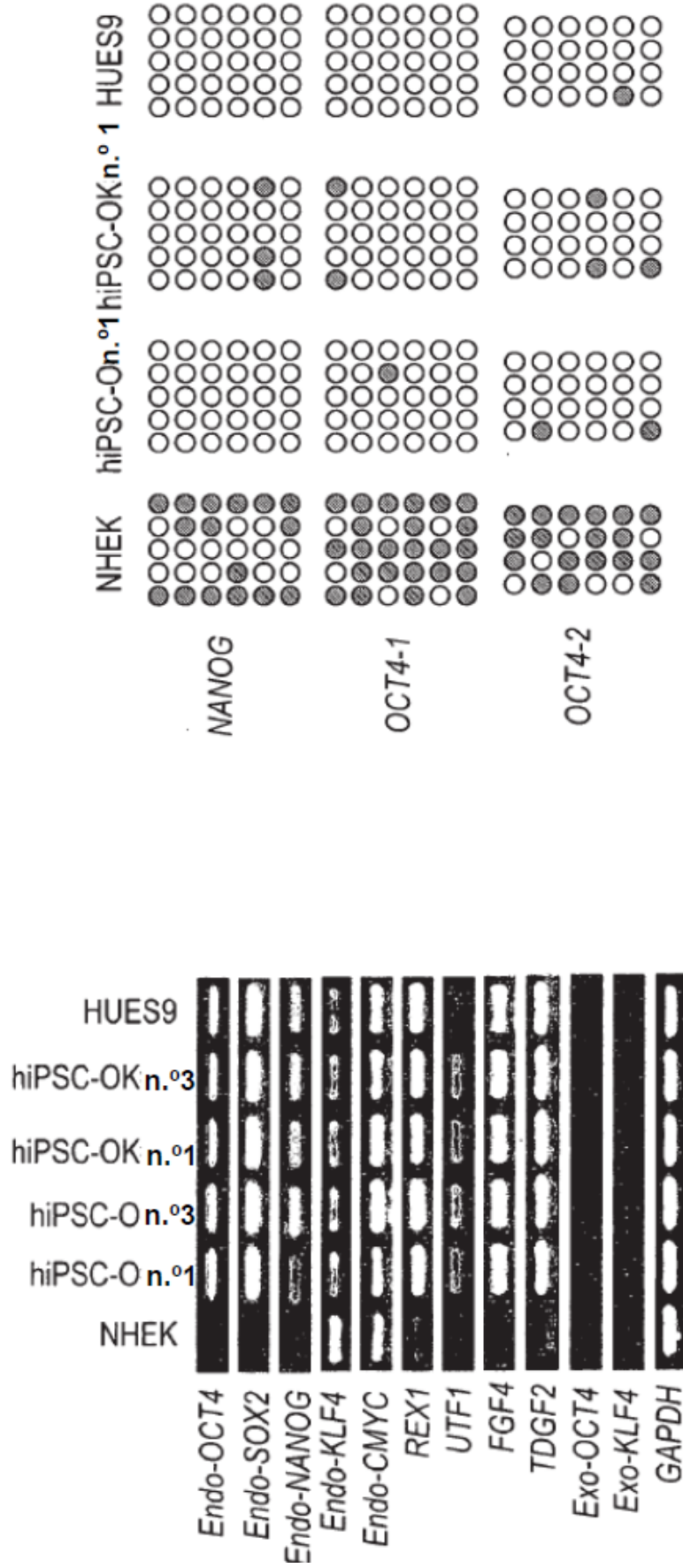


FIG. 9A

FIG. 9B

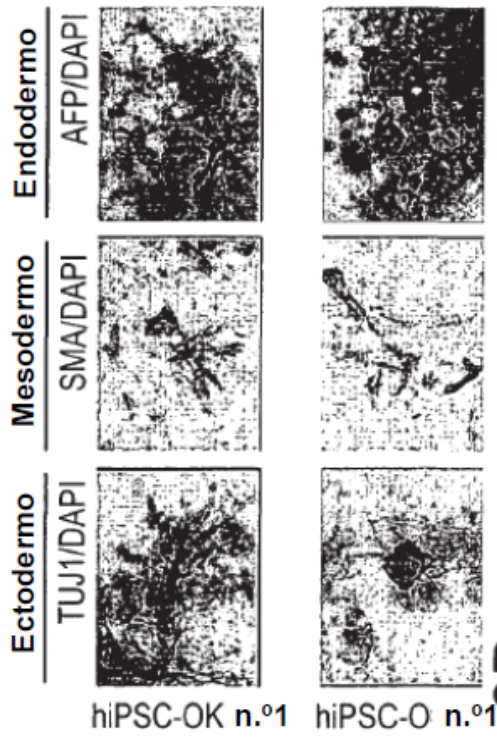


FIG. 9D

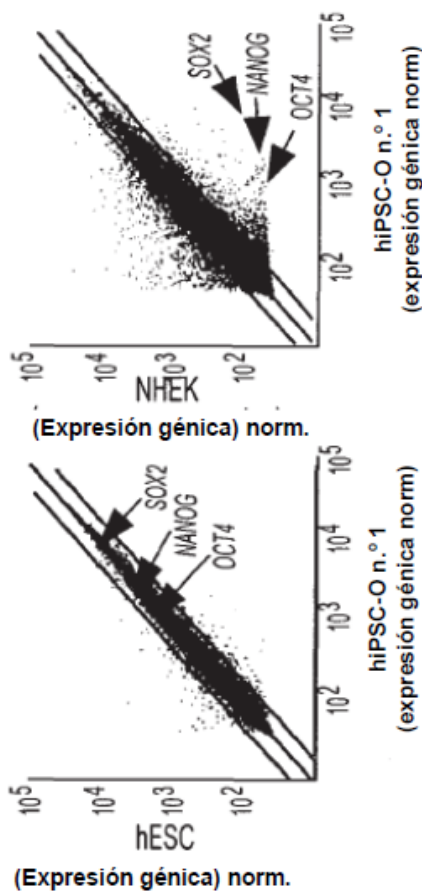


FIG. 9C

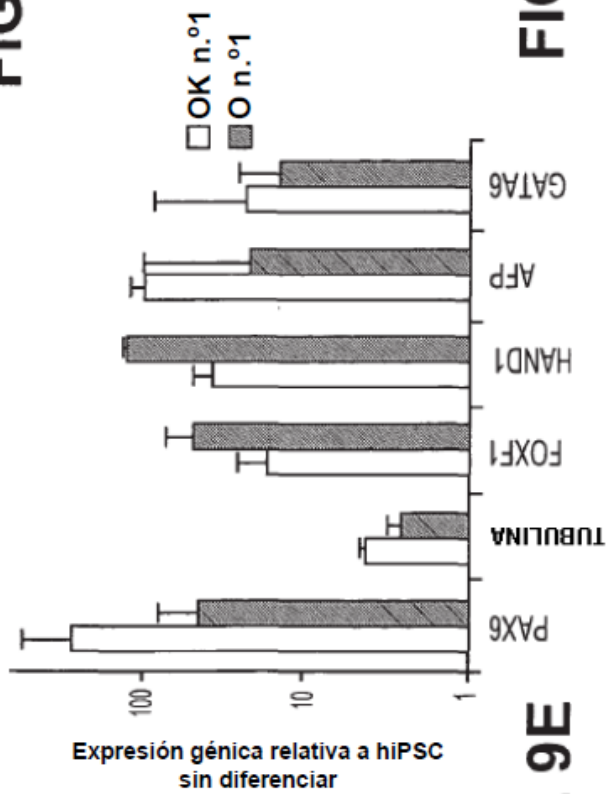


FIG. 9E

FIG. 10A

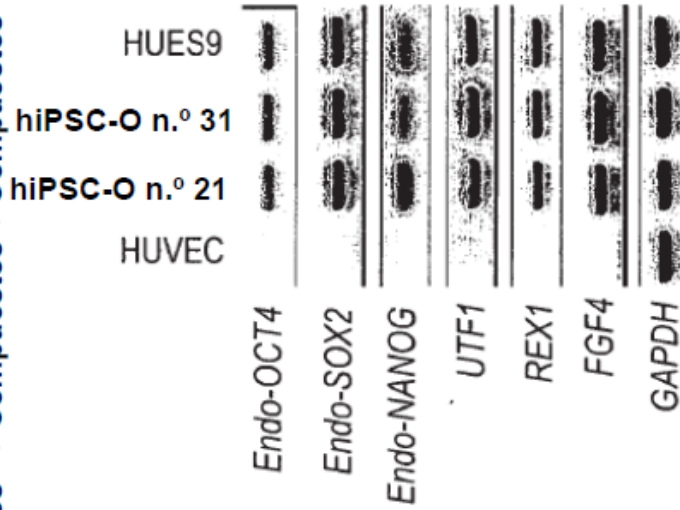
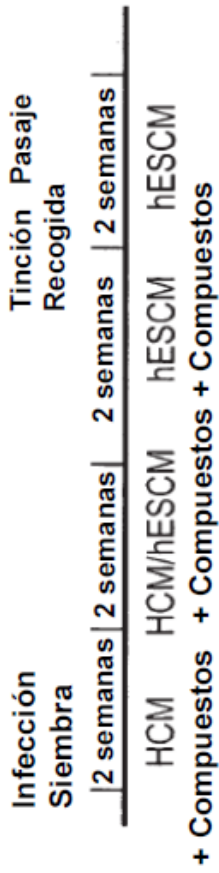


FIG. 10C

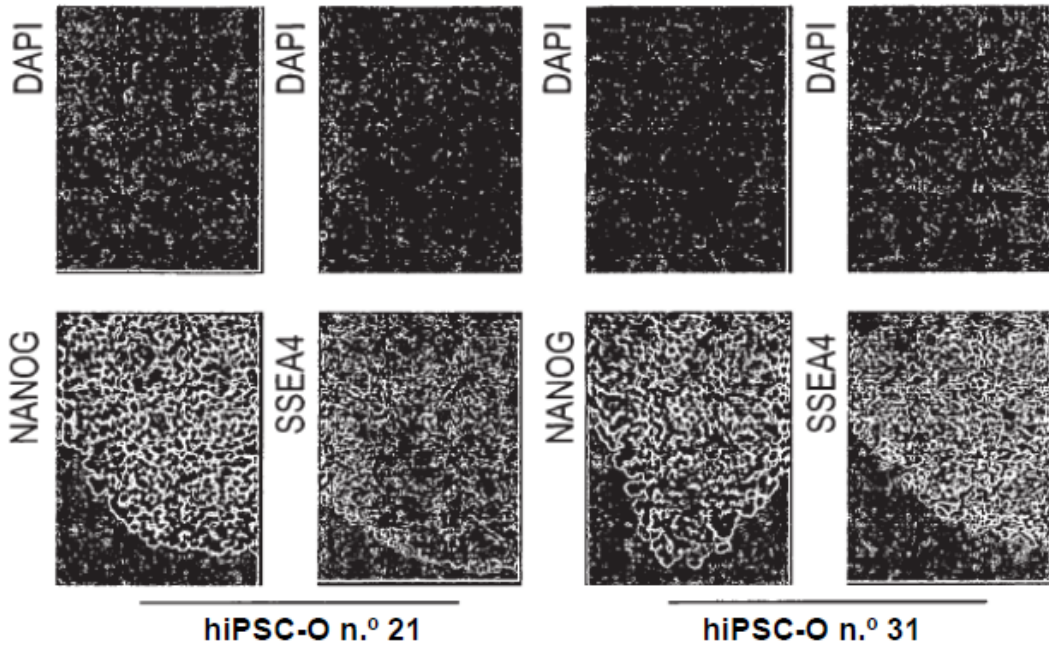


FIG. 10B

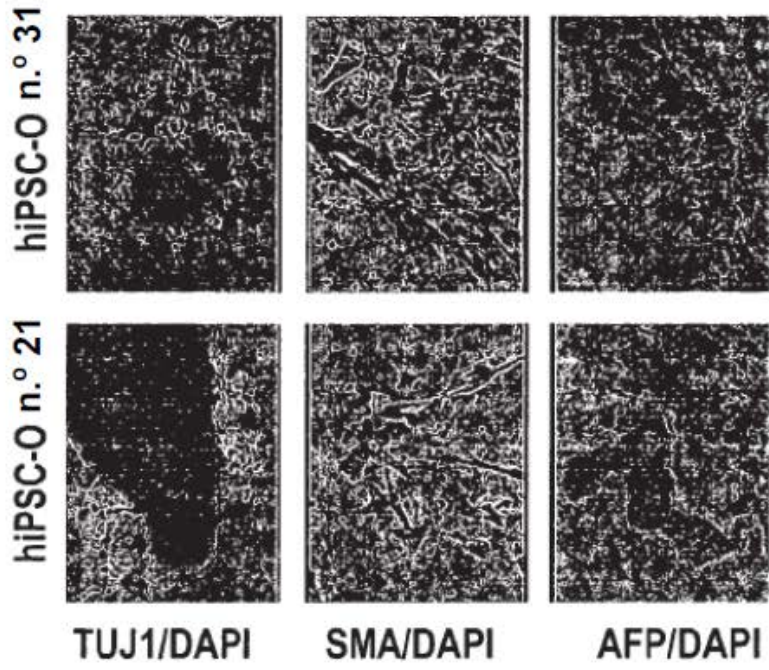


FIG. 10E

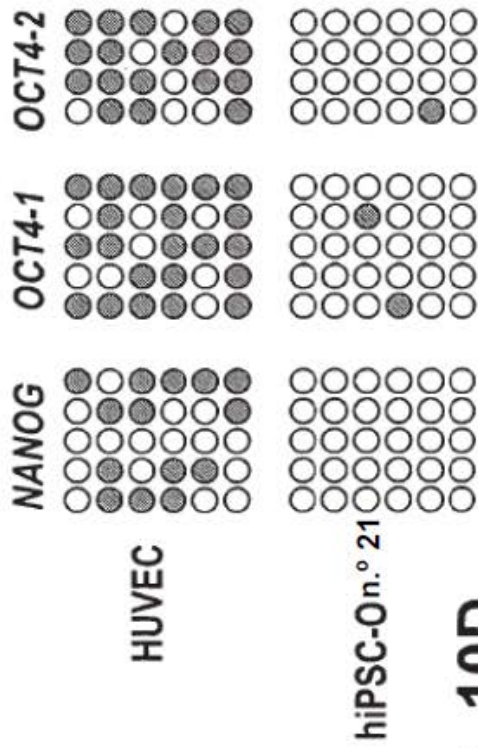


FIG. 10D

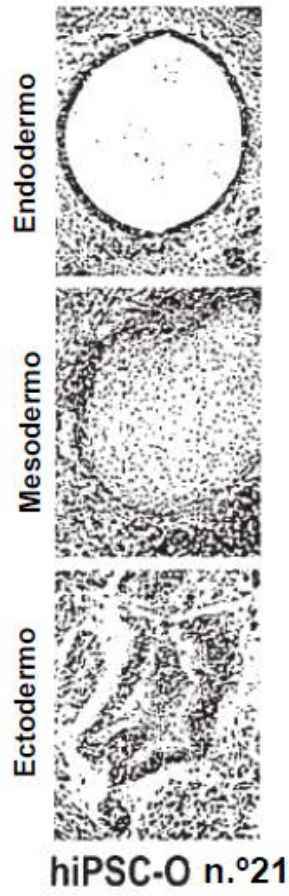


FIG. 10F

FIG. 11A

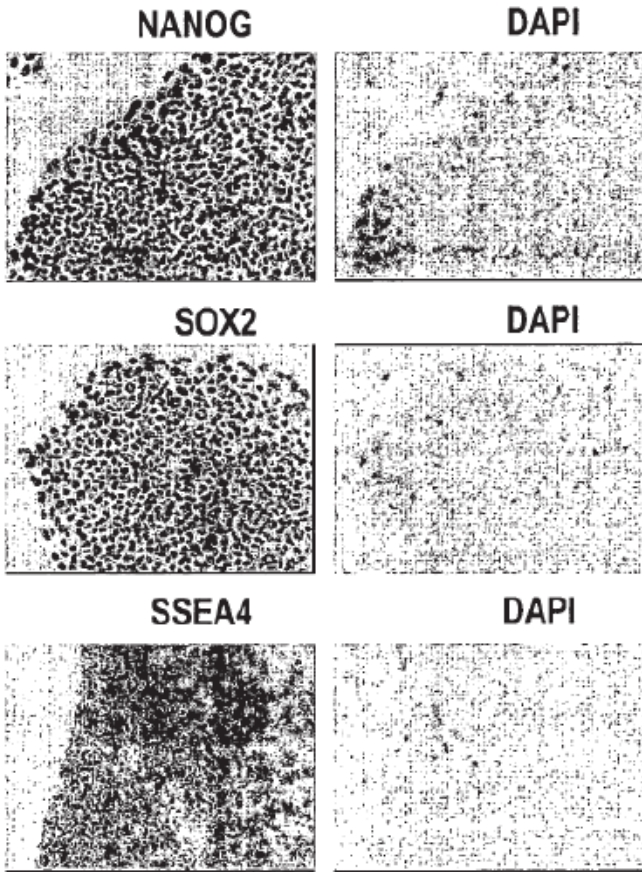


FIG. 11B

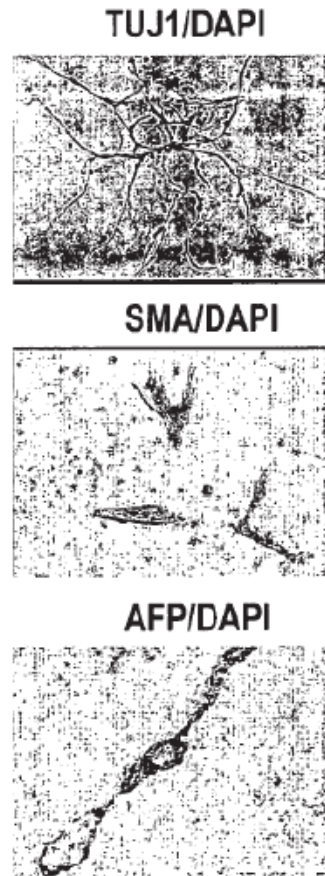


FIG. 12A

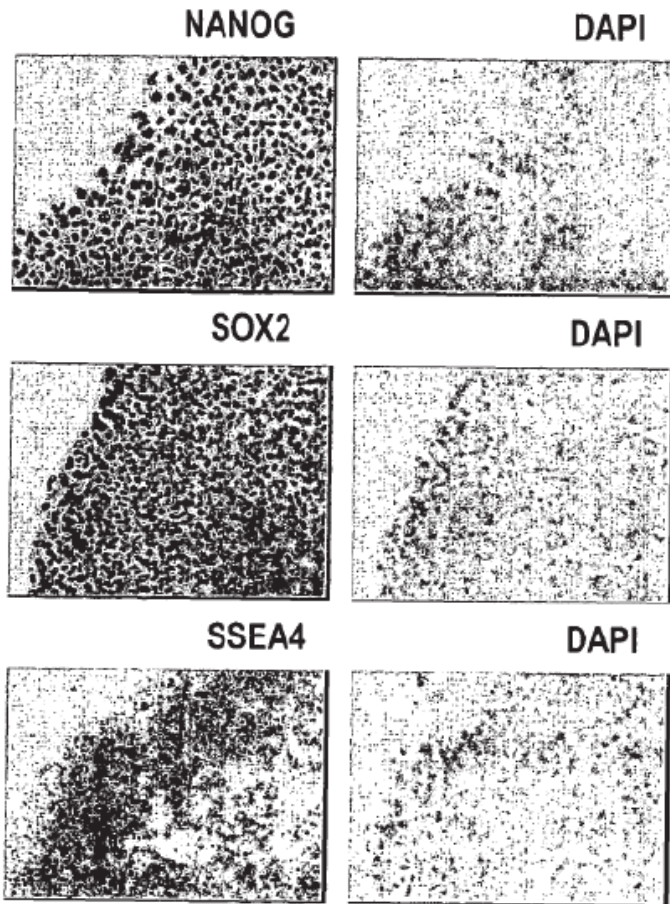
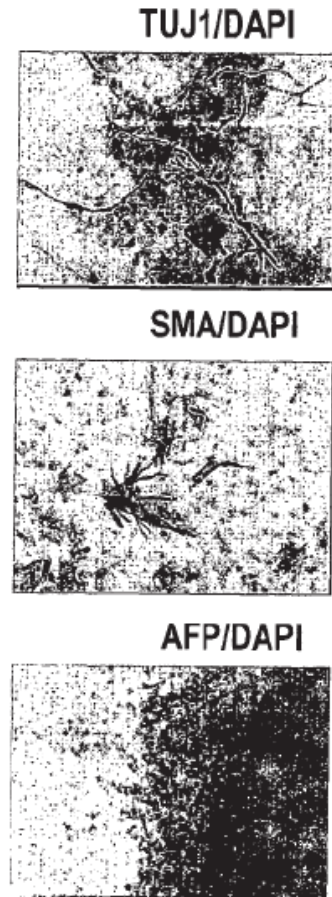


FIG. 12B



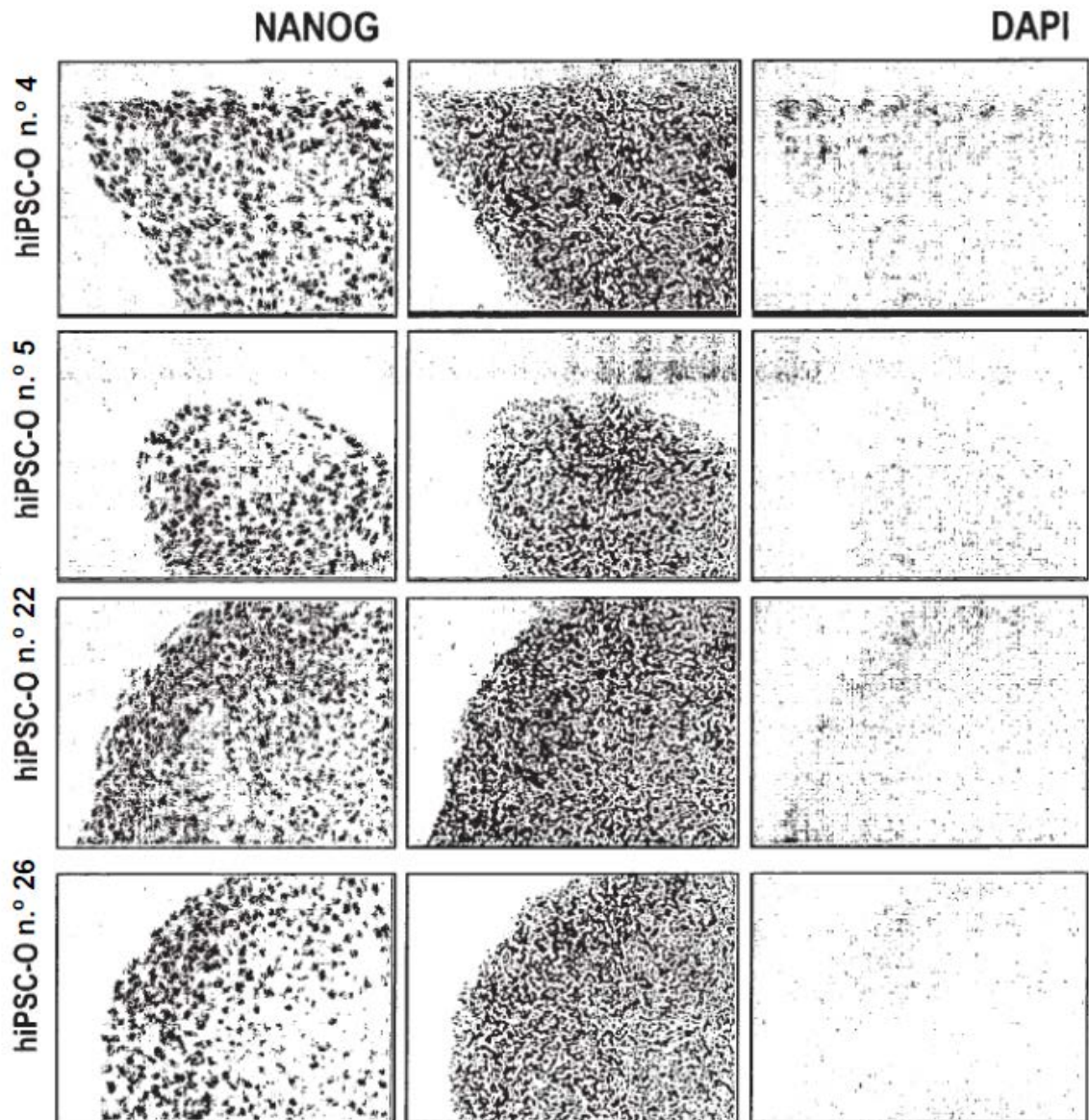


FIG. 13

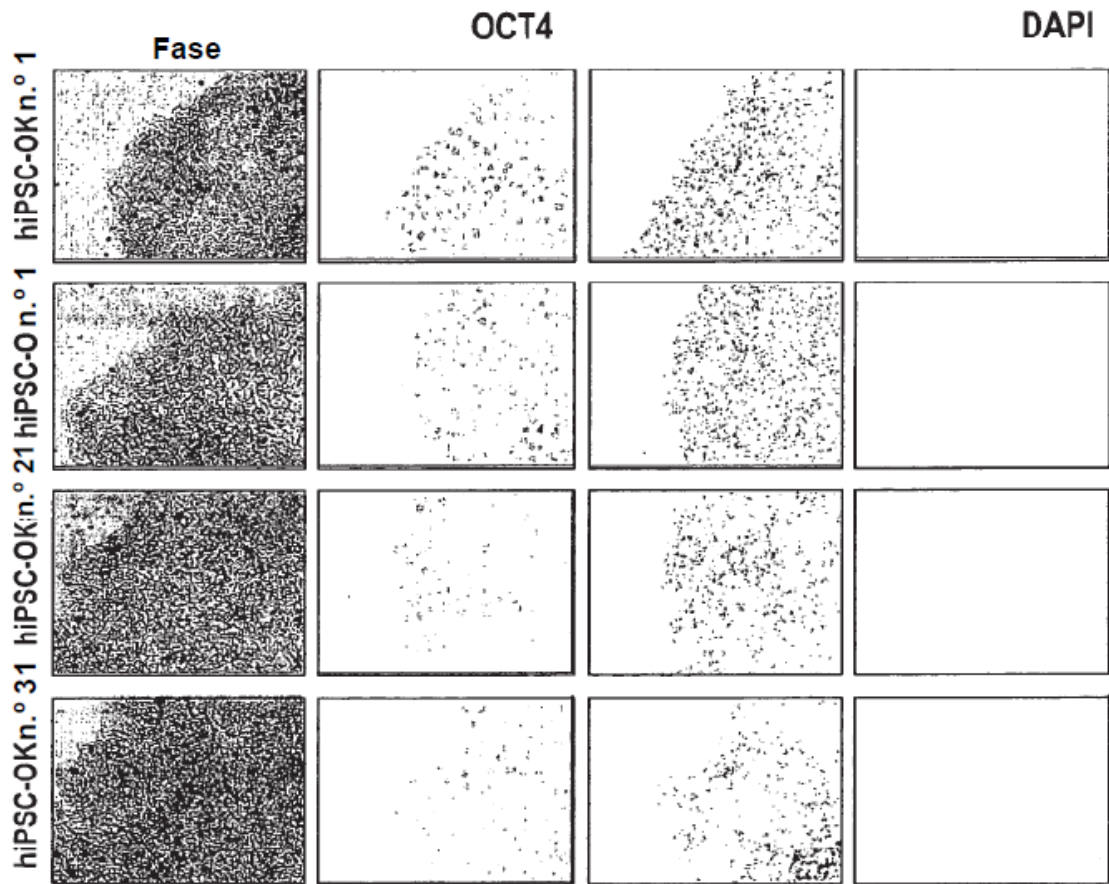


FIG. 14

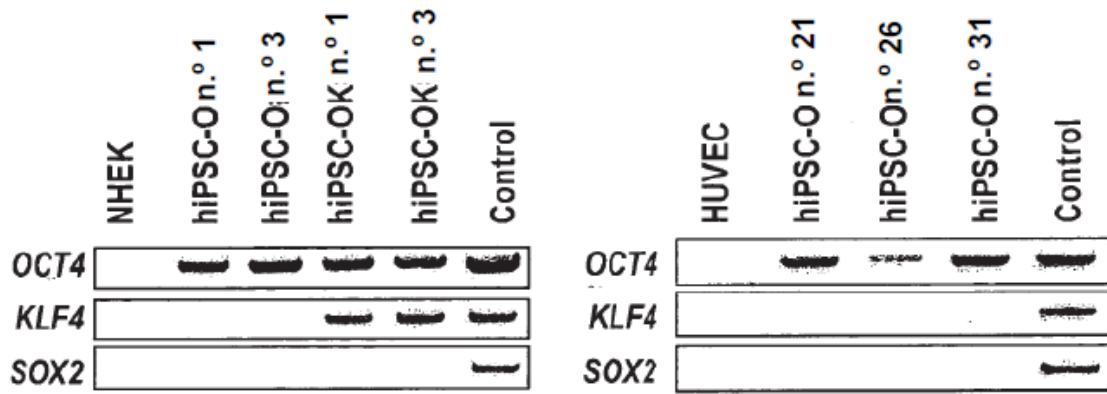


FIG. 15A

FIG. 15B

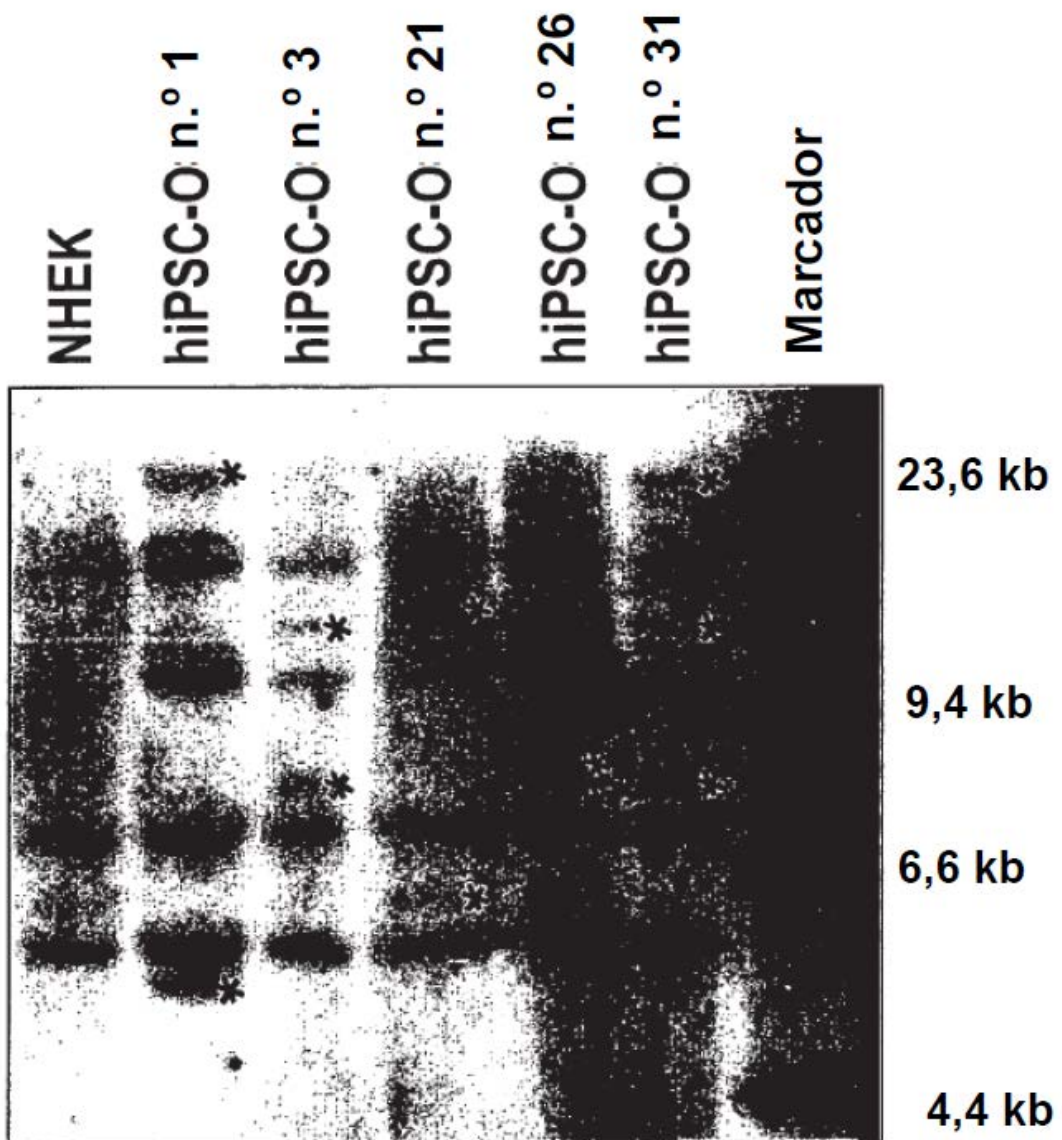


FIG. 16

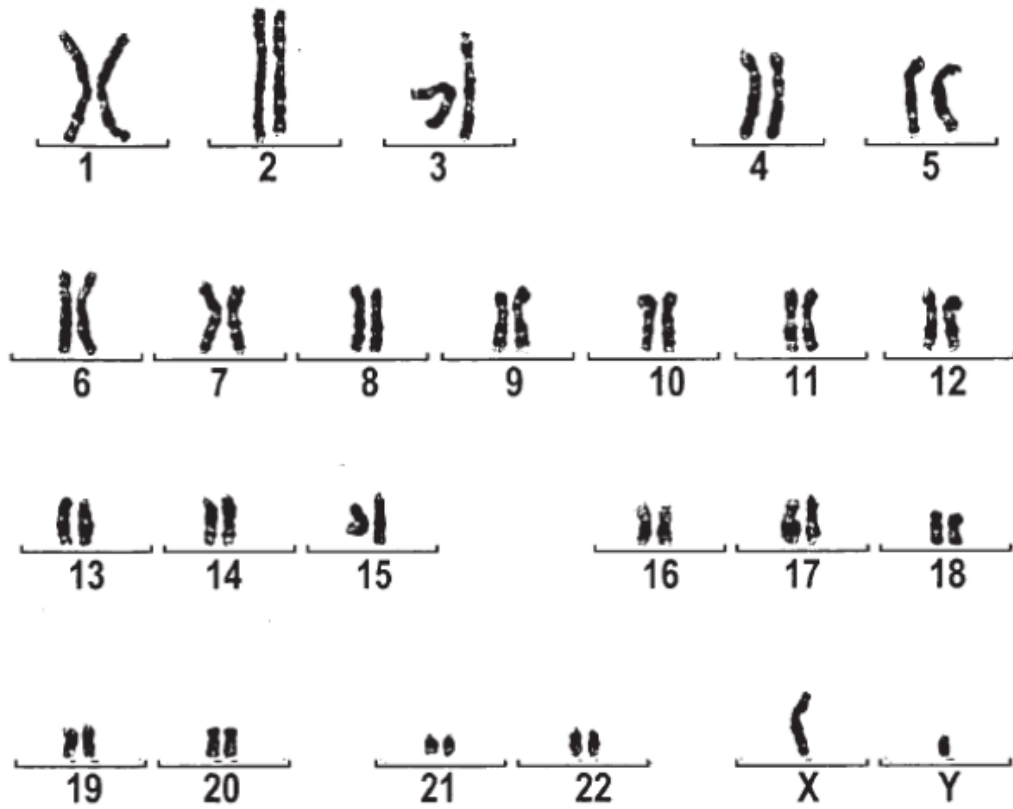


FIG. 17A

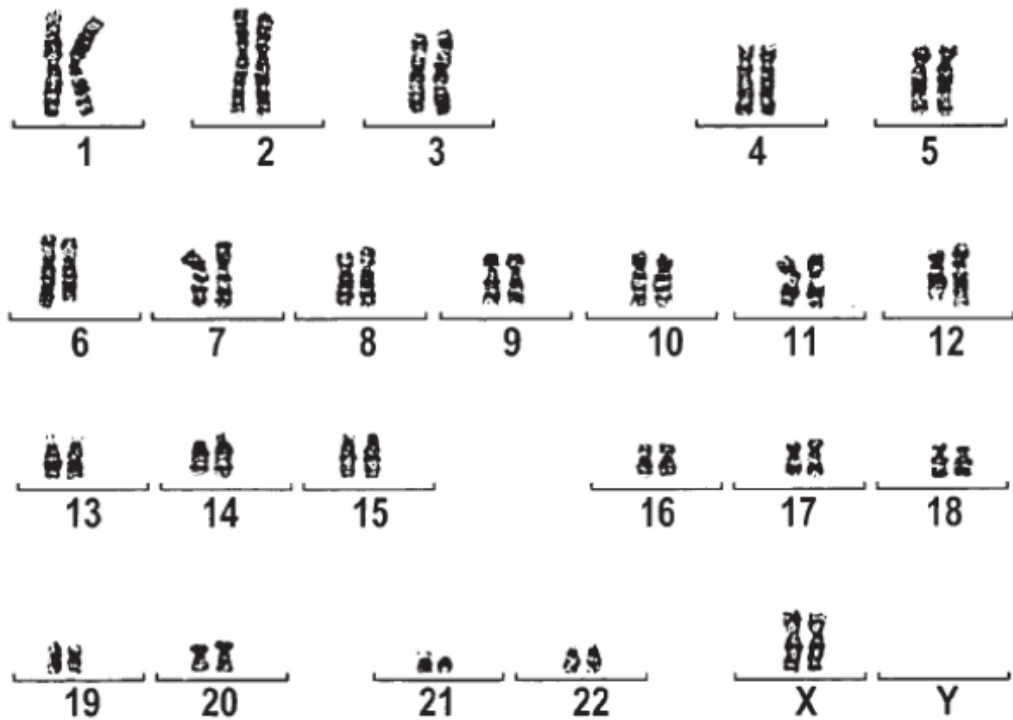


FIG. 17B