

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 999**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014 E 14182568 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2843052**

54 Título: **Proteína de fusión con permeabilidad celular para facilitar la inducción de la reprogramación y su uso**

30 Prioridad:

28.08.2013 KR 20130102195

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

14.11.2017

73 Titular/es:

**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB
FOUNDATION (100.0%)
56-1, Sinrim 9-dong
Gwanak-gu, Seoul 151-050, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, YOON JEONG;
LEE, GENE;
NAM, HYUN,;
SUH, JIN SOOK;
CHUNG, CHONG-PYOUNG y
LEE, JUE-YEON,**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 641 999 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

Proteína de fusión con permeabilidad celular para facilitar la inducción de la reprogramación y su uso

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una célula madre pluripotente inducida por reprogramación a partir de una célula somática derivada de humanos que utiliza una proteína de fusión en la que se fusionan un factor inductor de la reprogramación y un péptido con permeabilidad celular (CPP) y a una proteína de fusión en la que se fusionan un factor inductor de la reprogramación y un péptido con permeabilidad celular.

Antecedentes de la técnica

10 Las células madre tienen diferentes potencias de diferenciación dependiendo del origen de cada célula madre, a diferencia de las células somáticas generales. Entre ellas, se forma una célula madre embrionaria a partir de un blastocisto que es una de las etapas más tempranas del desarrollo embrionario y la característica más importante de la célula madre embrionaria es que es pluripotente. Es decir, la célula madre embrionaria puede diferenciarse en la mayoría de los tipos de células presentes en el cuerpo incluyendo tres capas germinales de endodermo, mesodermo y ectodermo y regenerarse.

15 Sin embargo, el principal punto débil de la célula madre embrionaria es que una tecnología de diferenciación en una célula deseada no es suficiente y existe la posibilidad de formar cáncer en el momento del trasplante. Debido al problema anterior, existe una limitación en el desarrollo de un agente terapéutico celular. Sin embargo, continuamente se ha estado investigando una tecnología para desarrollar un agente terapéutico que utiliza células madre embrionarias en respuesta a la escasez de órganos de trasplante o al tratamiento de enfermedades genéticas y no renovables.

20 El grupo de Yamanaka estableció una reprogramación de células madre pluripotentes que tienen propiedades similares a las de una célula madre embrionaria a partir de un fibroblasto de una cola de un ratón mediante la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción de la reprogramación (Yamanaka, S, Cell, 126: 663-76, 2006). Al año siguiente, el grupo de Yamanaka y el grupo de James A. Thomson publicaron que una célula madre pluripotente en reprogramación similar a la célula madre embrionaria puede formarse a partir de una célula somática humana. Los dos grupos utilizaron diferentes factores de transcripción para inducir la reprogramación, en los que el grupo de Yamanaka utilizó Oct-4/Sox-2/c-Myc/Klf-4 y el grupo de Thomson utilizó Oct-4/Nanog/Sox-2/Lin28 (Cell. 131:861-72, 2007; Science., 318(5858):1917-20, 2007). En la etapa inicial, los virus se utilizaron para la sobreexpresión en el factor de transcripción de la reprogramación. Sin embargo, al desarrollar un agente terapéutico usando el virus, se produjo un problema de estabilidad. Después de eso, junto con los esfuerzos para reducir el número de factores de reprogramación, se han realizado investigaciones para el desarrollo de una combinación de genes capaz de aumentar la eficacia de la reprogramación y procedimientos para inducir la reprogramación sin utilizar virus.

35 Sin embargo, un gen plantea varios problemas en el sentido de que no es fácil transferir el gen a una célula, en particular, es significativamente difícil de ser permeado en un núcleo, la duración en la que la proteína se expresa en una célula es corta y es significativamente difícil de ajustar artificialmente la cantidad de proteína a expresar en una célula diana (Verma, I.M. y Somia, N., Nature 389:239-242, 1997). Además, como ejemplo de procedimientos de transferencia del gen, existe un procedimiento de introgresión en una célula mediante una alteración del electrodo aplicando una estimulación eléctrica a una membrana celular. Sin embargo, el procedimiento de introgresión tiene el inconveniente de que el número de células que están pegadas entre sí debido al daño de la membrana celular y que no crecen de nuevo corresponde aproximadamente al 70 %. El procedimiento más comúnmente utilizado es un procedimiento en el que una molécula que tiene un gen rodeado con una membrana lipídica como forma liposómica se introduce en una célula mediante endocitosis. En este procedimiento, la citotoxicidad no es causada en gran medida en comparación con un procedimiento de estimulación eléctrica. Sin embargo, cuando se considera que la eficiencia de permeación se deteriora significativamente, se considera que este procedimiento experimental tampoco es el mejor procedimiento. Por el contrario al procedimiento de permeabilidad celular, existe un procedimiento para transferir un gen mediante un virus. El tratamiento en una línea celular que es un hospedador, con lentivirus, virus Sendai y retrovirus, como vehículo, permite una fácil transferencia a una célula como un mecanismo que causa una infección en un ser humano, pero también permite insertar los genes de los virus en un cromosoma. Este procedimiento también se usa generalmente cuando se inducen materiales de sobreexpresión que tienen un gran peso molecular tal como un agente terapéutico o un gen en un experimento biológico en una célula. Sin embargo, dado que este procedimiento es un procedimiento experimental basado en virus, la eficiencia de la introgresión es significativamente excelente y en el momento de ser aplicado a una prueba clínica, existe una limitación en el sentido de que la seguridad no puede ser asegurada. Por lo tanto, se ha solicitado un procedimiento de suministro más seguro y eficaz de materiales que tienen actividad biológica en un citoplasma o un núcleo de una célula viva.

55 Como resultado de la investigación dirigida a la demanda, se sugirió un péptido con permeabilidad celular (CPP). Entre las investigaciones, se ha estudiado básicamente un transactivador de la proteína de transcripción (TAT) que es una especie de proteína del tipo 1 del virus de la inmunodeficiencia humana y se sabe que la proteína TAT pasa efectivamente a través de una membrana celular y se transfiere fácilmente al citoplasma. Se sabe que esta función

se proporciona debido a la propiedad de un dominio de transducción de proteínas, que es el dominio medio de la proteína TAT (Green, M. y Loewenstein, P.M., Cell, 55: 1179, 1988; Ma, M. y Nath, A., J. Virol., 71: 2495, 1997). Sin embargo, se cree que el dominio TAT funciona directamente sobre la doble capa lipídica de la membrana celular (Vives, E. et al., J. Biol. Chem. 272:16010, 1997). Sin embargo, el CPP es una proteína derivada del virus, que está asociada a toxicidad. Por otra parte, incluso en los casos de un péptido que tiene secuencias de aminoácidos desde el 339 hasta el 355 una proteína antennapedia (ANTP) derivada de la mosca del vinagre (*Drosophila* sp.) (Schwarze, S.R. et al., Trends. Pharmacol. Sci., 21:45, 2000) y un péptido artificial en el cual se enumeran aminoácidos eléctricamente positivos, se confirmó su permeabilidad celular mediante experimentos (Laus, R. et al., Nature Biotechnol., 18: 1269, 2000).

Sin embargo, después de comprobar que en el caso de conectar el CPP existente con otros péptidos o proteínas el transporte a la célula de la proteína de fusión es efectivo, se intentaron diversas aplicaciones usando el CPP (Patente Coreana N.º 568.457). Las proteínas de fusión que comprenden un péptido con permeabilidad celular y un factor inductor de la reprogramación y su uso para preparar células madre pluripotentes inducidas se desvelan en los documentos WO2010/059806, WO2010/138517, WO2010/115052; Zhang et al., Biomaterials, 33: 5047, 2012 y Kim et al., Stem Cell Stem, 4:472. Una proteína de fusión que comprende protamina de bajo peso molecular como péptido con permeabilidad celular y su uso para transferir un regulador transcripcional de la diferenciación de células madre en células madre de pulpa dental humana se desvela en Suh et al., J. Dent. Res., 91:90, 2012.

Divulgación

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de fusión con permeabilidad celular para preparar eficazmente una célula madre pluripotente inducida por reprogramación.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar eficazmente una célula madre pluripotente inducida utilizando la proteína de fusión con permeabilidad celular

Solución técnica

Con el fin de conseguir los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una proteína de fusión para preparar una célula madre pluripotente inducida transportando la proteína de fusión en una célula madre derivada de pulpa dental humana, en la que un factor inductor de la reprogramación y un péptido con permeabilidad celular se fusionan, en el que dicho péptido con permeabilidad celular es protamina de bajo peso molecular (LMWP) representada por la SEQ ID NO: 2 y en el que dicho factor inductor de la reprogramación es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4 y Oct4. Además, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que codifica la proteína de fusión para preparar una célula madre pluripotente inducida.

Además, la presente invención proporciona un vector recombinante que contiene el polinucleótido recombinante y un microorganismo recombinante transformado con el vector recombinante.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una célula madre pluripotente inducida que comprende las etapas de: (a) cultivar una célula madre derivada de pulpa dental humana en un medio que contiene la proteína de fusión para preparar una célula madre pluripotente inducida, induciendo así la reprogramación de la célula madre derivada de pulpa dental humana y (b) recuperar una célula madre pluripotente inducida en la cual se induce la reprogramación de la célula madre derivada de pulpa dental humana

Efectos ventajosos

De acuerdo con la presente invención, la célula madre pluripotente inducida que tiene alta eficiencia y alta estabilidad puede prepararse maximizando el efecto del factor de transcripción inductor de la reprogramación más allá del transportador de péptido viral existente, al inducir la reprogramación de la célula somática.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra esquemáticamente un procedimiento para preparar una proteína de fusión de reprogramación con permeabilidad celular de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 2(a) muestra un procedimiento para preparar vectores de expresión (pCPP-c-Myc, pCPP-Lin28, pCPP-Sox2, pCPP-Klf4, pCPP-Oct4) de un péptido con permeabilidad celular-factor inductor de la reprogramación utilizando un vector pET-21a.

La FIG. 2(b) es un diagrama esquemático de dominios en una proteína de fusión en la que se expresa el péptido con permeabilidad celular-factor inductor de la reprogramación (CPP-c-Myc, CPP-Lin28, CPP-Sox2, CPP-Klf4, CPP-Oct4) y dominios en una proteína en la cual se expresa un factor inductor de la reprogramación sin permeabilidad celular como un grupo de control negativo (c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4, Oct4).

La FIG. 3(a) muestra un resultado obtenido expresando una proteína de factor inductor de la reprogramación sin permeabilidad celular en *E. coli*, y realizando una electroforesis en una proteína de un grupo en el que la

expresión no se induce y una proteína de un grupo en el que se induce la expresión, utilizando un gel SDS.

La FIG. 3(b) muestra un resultado obtenido expresando una proteína de fusión de reprogramación con permeabilidad celular en *E. coli* y realizando una electroforesis en una proteína de un grupo en el que la expresión no se induce y una proteína de un grupo en el que se induce la expresión, utilizando un gel SDS.

La FIG. 4(a) muestra un resultado obtenido confirmando el gel SDS de la FIG. 3(a) mediante un procedimiento de transferencia Western.

La FIG. 4(b) muestra un resultado obtenido confirmando el gel de SDS de la FIG. 3(b) mediante un procedimiento de transferencia Western.

La FIG. 5(a) es una fotografía que muestra un resultado del análisis de un fragmento de proteína recogido de cada etapa durante un procedimiento de expresión de un factor inductor de la reprogramación sin permeabilidad celular en *E. coli* y después realizando un procedimiento de purificación mediante SDS-PAGE 10 %.

La FIG. 5(b) es una fotografía que muestra el resultado de un análisis de un fragmento de proteína recogido de cada etapa durante un procedimiento de expresión de una proteína de fusión de reprogramación con permeabilidad celular en *E. coli* y después realizando un procedimiento de purificación mediante SDS-PAGE 10 %.

La FIG. 6(a) muestra un resultado obtenido tratando la proteína (la proteína de control negativo o la proteína de fusión de reprogramación con permeabilidad celular) en una célula derivada de pulpa dental humana y luego separando una fracción de citoplasma y una fracción nucleica, seguida de confirmación con un marcador correspondiente a las fracciones.

La FIG. 6(b) muestra un resultado obtenido tratando la proteína (la proteína de control negativo o la proteína de fusión de reprogramación con permeabilidad celular) en una célula derivada de pulpa dental humana y después separando una fracción de citoplasma y una fracción nucleica, seguido por confirmación del grado de permeación de la proteína factor de reprogramación mediante un procedimiento de transferencia Western.

La FIG. 6(c) muestra un resultado obtenido tratando la proteína (la proteína de control negativo o la proteína de fusión de reprogramación con permeabilidad celular) combinada con un marcador fluorescente en una célula derivada de pulpa dental humana, seguido de observación con un microscopio de fluorescencia confocal con barrido láser.

La FIG. 7 es un diagrama que muestra tres condiciones de reprogramación de la inducción con una célula derivada de pulpa dental humana de cultivo primario, incluyendo una condición de cocultivo directo con una célula alimentadora, una condición de cocultivo indirecto con una célula alimentadora y una condición inductora de la reprogramación sin una célula alimentadora, que muestra la reprogramación induciendo planes según tres condiciones.

La FIG. 8(a) muestra cada forma típica de las células madre de reprogramación preparadas a partir de tres condiciones de la FIG. 7.

La FIG. 8(b) es una fotografía fluorescente de imágenes de células vivas de Tra-1-60 y SSEA-4 para la distinción de la reprogramación parcial.

Mejor modo

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión para preparar una célula madre pluripotente inducida transportando la proteína de fusión en una célula madre derivada de pulpa dental humana, en la que se fusionan un factor inductor de la reprogramación y un péptido con permeabilidad celular, en la que dicho péptido con permeabilidad celular es una protamina de bajo peso molecular (LMWP) representada por la SEQ ID NO: 2 y en la que dicho factor inductor de la reprogramación es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4 y Oct4 y un polinucleótido recombinante que codifica la proteína de fusión recombinante, un vector recombinante que contiene el polinucleótido recombinante y un microorganismo recombinante transformado con el vector recombinante.

Con el fin de resolver el problema de estabilidad que puede provocar un transportador de virus al transferir o expresar el gen inductor de la reprogramación en una célula, se preparó una proteína de fusión en la que se fusiona un factor inductor de la reprogramación con la proteína de fusión específica, es decir, una secuencia del péptido con permeabilidad celular sin suministrar el gen a la célula somática. A continuación, se confirmó que en el caso de añadir la proteína de fusión a un medio de cultivo y cultivar una célula somática, la proteína se introducía eficazmente en la célula somática y se inducía la reprogramación.

El factor inductor de la reprogramación en la presente invención es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4 y Oct4.

En la presente invención, el péptido con permeabilidad celular es una protamina de bajo peso molecular (LMWP) (VSRRRRRRGRRRR: SEQ ID NO: 2). Los péptidos con permeabilidad celular alternativos que no forman parte de la presente invención son TAT (YGRKKRRQRRR: SEQ ID NO: 3), penetratina (YGRKKRRQRRR: SEQ ID NO: 4), antennapedia (ANTP: SEQ ID NO: 5), dominio de unión a heparina HBD) (SSRKKNPNCRRH: SEQ ID NO: 6), oligopéptido D-arginina (R₈ o más) y el oligopéptido L-arginina (R₈ o más).

En una realización, la presente invención proporciona un vector de expresión de CPP-factor inductor de la reprogramación capaz de sobreexpresar y purificar fácilmente una proteína de fusión CPP-factor inductor de la reprogramación. Los vectores de expresión (pCPP-c-Myc, pCPP-Lin28, pCPP-Sox2, pCPP-Klf4, pCPP-Oct4)

incluyeron 14 aminoácidos de los dominios humanos de transducción c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4, Oct4 y CPP (en los presentes dibujos, LMWP se utilizó como CPP, y por lo tanto, en lo sucesivo, se denominará proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación). Además, la presente invención proporciona el polinucleótido recombinante capaz de expresar seis residuos de histidina en el terminal del factor inductor de la reprogramación (véanse las Figuras 2(a) y 2(b)). Como vector, se puede usar un vector TA general, y similares, y la expresión del vector puede realizarse bajo el control de un promotor T7 y un operador LacO. La proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación se sobreexpresó en *E. coli* utilizando el vector de expresión, seguido de purificación en el estado desnaturizado mediante cromatografía de afinidad con Ni como quelante. La purificación en el estado desnaturizado significa purificación después de que la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación se desnaturiza con urea 4M a 8M. Aquí, en el caso de utilizar menos de urea 4M, la inducción no es fácil de realizar, y en el caso de utilizar más de urea 8M, se produce la aglomeración.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una célula madre pluripotente inducida que comprende las etapas de: (a) cultivar una célula madre derivada de pulpa dental humana en un medio que contiene la proteína de fusión para preparar una célula madre pluripotente inducida, inducir así la reprogramación de la célula madre derivada de pulpa dental humana y (b) recuperar una célula madre pluripotente inducida en la cual se induce la reprogramación de la célula madre derivada de pulpa dental humana.

La presente invención se caracteriza por cocultivar directa o indirectamente la célula madre derivada de pulpa dental humana en la cual se induce la reprogramación en la etapa (a) y la célula alimentadora.

En una realización de la presente invención, se utiliza una protamina de bajo peso molecular (LMWP) como el péptido con permeabilidad celular, y con el mismo se fusionan cinco proteínas inductoras de la reprogramación (c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4 y Oct4), preparando de este modo cinco tipos de proteínas de fusión. El transporte de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación preparada al citoplasma y un núcleo celular en un tiempo corto (60 minutos) en un grupo de fibroblastos incluía una célula madre derivada de pulpa dental humana cultivada después de extraer una muela del juicio humana para asegurar que se obtenía tejido de pulpa dental y el tejido de pulpa dental obtenido se pulverizó y a continuación luego se confirmó mediante un procedimiento de transferencia Western y en un microscopio de fluorescencia confocal con barrido láser. En comparación, una proteína de inducción de la reprogramación en la que el LMWP no está codificado, como proteína de control negativo, no se transportó a la célula.

La mayoría de las técnicas de administración de fármacos en las células dependen de la endocitosis usando un receptor en una superficie de la célula. Sin embargo, puesto que los péptidos muestran una carga (+), que es completamente diferente de la endocitosis que es uno de los mecanismos de transporte de material existentes en las células, los péptidos dependen de la carga (-) de la membrana celular, se unen a la misma y se liberan, de modo que los materiales que se van a transportar a las células pueden ser introducidos efectiva y directamente en un corto espacio de tiempo.

La célula somática derivada del ser humanos incluye piel, cabello, grasa y similares, sin limitación.

Los planes de tratamiento de las cinco proteínas de fusión incluyen un caso de inducción de la reprogramación de células madre a través de cocultivo directo e indirecto utilizando la célula alimentadora y un caso de inducción de la reprogramación de células madre en una placa de cultivo recubierta con Matrigel sin la célula alimentadora. El caso de la utilización de la célula alimentadora y el cocultivo directo significa que las cinco proteínas de fusión se tratan cuatro veces a intervalos de cinco días y después se transportan a la célula alimentadora. El caso de usar la célula alimentadora y el cocultivo indirecto significa que la célula se cultiva en la placa de cultivo recubierta con Matrigel y después la célula alimentadora se cultiva en el inserto. Las cinco proteínas de fusión se tratan a intervalos de cinco días para inducir la reprogramación. En el caso de no utilizar la célula alimentadora, la célula se cultiva en la placa de cultivo recubierta con Matrigel y las cinco proteínas de fusión se tratan a intervalos de cinco días para inducir la reprogramación (Figura 7). La célula madre inducida para la reprogramación se cultiva mientras se forman colonias y tiene una forma de una célula madre embrionaria típica (Figura 8 (a)). Además, para confirmar si se había conseguido o no una reprogramación completa de la célula madre, se confirmó la tinción de Tra-1-60 y SSEA-4, lo que significa que se realizó una reprogramación completa en lugar de una reprogramación parcial (Figura 8(b)).

El medio es un medio general para cultivo celular que contiene la proteína de fusión. Para el cultivo se puede utilizar como medio un medio suplementado con medio de sustitución sin suero, aminoácidos no esenciales, FGF básico, penicilina y estreptomina en DMEM/F12 o el mTeSR comercializado.

La proteína de fusión inducida para la reprogramación con permeabilidad celular de acuerdo con la presente invención puede fusionarse química o biológicamente. Sin embargo, se prefiere un procedimiento de fusión biológico ya que se generan menos subproductos. El procedimiento de fusión química consiste en inducir el acoplamiento S-S de un grupo amino de la proteína del factor de transcripción y un péptido con permeabilidad celular usando 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,11-bis-maleimidotetraetilenglicol (BM [PEO]4), clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), succinimidil-4-[N-maleimidometilciclohexano-1-carboxi-[6-amido caproato] (SMCC) y sus sulfonidas (sulfo-SMCC), succidimil 6-[3-(2-piridilditio)-propionamido] hexanoato (SPDP) y sus sulfonidas (sulfo-SPDP), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y sus sulfonidas (sulfo-MBS),

succimidil [4-(p-maleimidofenil)butirato] (SMPB) y sus sulfonidas (sulfo-SMPB), y similares, como un agente reticulante, en el que el péptido está acoplado no selectivamente con el grupo amino de la proteína, dando lugar a subproductos en los cuales se introducen varios péptidos en una proteína. Sin embargo, puesto que el procedimiento de fusión biológica está diseñado de manera que se introduce un péptido molecular en el momento de construir un plásmido, se reduce el riesgo de generación de subproductos.

Todos los términos técnicos y científicos usados en la descripción detallada de la presente invención tienen el mismo significado que entenderían generalmente los expertos en la materia a los que pertenece la presente invención. En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria descriptiva es bien conocida en los ámbitos técnicos y se utiliza generalmente.

La “célula” utilizada en la presente invención significa una célula somática o una célula madre que tiene varios orígenes. La “célula madre” es una célula blástica que tiene una potencia de diferenciación en diversos tipos de tejidos en el cuerpo, y puede clasificarse en gran medida en una célula madre embrionaria y una célula madre de un adulto. La “célula madre embrionaria”, que es una célula blástica que tiene potencia de diferenciación, significa una célula que tiene pluripotencia que se diferencia en varias células de tejido en condiciones apropiadas en un estado indiferenciado e incluye una amplia variedad de cuerpos embrioides derivados de la célula madre embrionaria. La “célula madre adulta” significa una célula que tiene una potencia de diferenciación limitada que no es capaz de ser diferenciada en cada tejido del cuerpo pero que se diferencia en cada órgano diana. Además, la “potencia de diferenciación” significa una potencia en la que una parte del embrión es capaz de diferenciarse en diversos tipos de órganos o tejidos dependiendo de las condiciones de desarrollo en el desarrollo temprano de los organismos.

La “desdiferenciación” en la presente invención significa un proceso de regresión epigenética en el que una célula parcial o finalmente diferenciada se deja que vuelva al estado indiferenciado tal como un estado pluripotente o un estado versátil, de manera que se puede formar un nuevo tejido diferenciado. El fenómeno de desdiferenciación es posible ya que es un proceso reversible en el que los cambios epigenéticos de un genoma celular no están fijos, pero pueden ser borrados y pueden formarse de nuevo. La desdiferenciación puede denominarse “reprogramación” y se refiere a un proceso de cambio del perfil genético y de expresión de la célula parcial o finalmente diferenciada de manera que sea similar al de la célula madre embrionaria. Por ejemplo, el cambio incluye un cambio en el patrón de metilación, un cambio en la velocidad de expresión de un gen de la célula madre y similares.

La “célula madre pluripotente inducida” utilizada en la presente invención significa una célula madre que tiene potencia de diferenciación en todas las células triploblásticas, incluyendo el mesodermo, el endodermo y el ectodermo necesarios para formar entidades biológicas, lo que indica la potencia final de la célula madre. Además, el gen de la célula madre pluripotente significa un marcador que tiene potencia o un gen que tiene la potencia de inducir la pluripotencia, de tal manera que el gen de la célula madre pluripotente se clasifica como un factor inductor de la reprogramación.

La “célula alimentadora” o la “capa alimentadora” utilizada en la presente invención, que es una célula utilizada para cultivar la célula madre embrionaria o la célula madre a reprogramar, se trata con mitomicina C o se usa en un estado en el que la división celular es detenida por irradiación. Como célula alimentadora, se usa habitualmente un fibroblasto embrionario de ratón (MEF) y se utiliza la línea celular STO comercializada, SNL o similar. Recientemente, se ha intentado excluir materiales extraños utilizando una célula somática humana, en la que pueden incluirse fibroblastos derivados de tejidos humanos.

A continuación, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son solo para ejemplificar la presente invención, y será evidente para los expertos en la materia que el alcance de la presente invención no se considera limitado a estos ejemplos.

Ejemplo 1. Preparación de un conjugado con la secuencia de un péptido con permeabilidad celular-factor inductor de la reprogramación y transformación

Para sobreexpresar cinco proteínas de fusión protamina de bajo peso molecular (LMWP: VSRRRRRRGRRRR)-factor inductor de la reprogramación y cinco factores inductores de la reprogramación sin LMWP, se diseñaron la secuencia de LMWP, la secuencia del factor inductor de la reprogramación y seis residuos de histidina en cada vector pET- 21a en una secuencia continua y como grupo de control negativo, se diseñó la secuencia del factor inductor de la reprogramación con excepción del LMWP y seis residuos de histidina en una secuencia continua en cada vector, las cuales se muestran en su totalidad en la FIG. 2(a). Un total de 10 transgénicos diseñados fueron solicitados a Cosmogenetech Co., Ltd. El gen del factor inductor de la reprogramación utilizado como proteína de fusión se muestra en la Tabla 1, y la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos del péptido con permeabilidad celular, es decir, LMWP se muestran en la Tabla 2. Los plásmidos solicitados se transformaron en cada célula competente (Novagen, cepa BL21, Rosetta 2 (DE3)), se seleccionaron las *E. coli* BL21 transformadas (DE3), se inocularon las colonias en 200 ml de medio y se añadió al medio 1 mM de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (en lo sucesivo denominado IPTG; Duchefa, Holanda), obteniéndose de esta manera un LMWP-factor de reprogramación, seguido de sobreexpresión. Cada diagrama esquemático de la proteína expresada y la proteína de control se muestra en la FIG. 2 (b)

[Tabla 1]

Factor inductor de la reprogramación	N.º Genebank
c-Myc	NM002467
Lin28	AF521099
Sox2	NM003106
Klf4	NM004235
Oct4	NM002701

[Tabla 2]

CPP	Tipo	Secuencias
LMWP	Base	GTT TCA AGA AGA AGG AGA AGA AGG GGA GGA AGA AGG AGA AGA (SEQ. 1)
	Aminoácido	VSRRRRRRGRRRR (SEQ. 2)

5 *E. coli* con la proteína de fusión sobreexpresada con IPTG se sometió a citólisis mediante BugBuster Master Mix (Novagen, EE.UU.), seguido por centrifugación y la proteína en el sobrenadante se separó mediante electroforesis SDS-PAGE al 10 %. La FIG. 3(a) es una fotografía de una proteína de control teñida con azul de Coomassie y la FIG. 3(b) es una fotografía teñida de LMWP-factor inductor de la reprogramación. Al comparar un carril en el que se indujo la sobreexpresión con IPTG con un carril en el que no se indujo la sobreexpresión, se confirmó la porción de sobreexpresión (mostrada como asterisco blanco). Por lo tanto, se demostró la sobreexpresión de la proteína de fusión con una alta concentración.

Además, la proteína de fusión se determinó por un procedimiento de transferencia Western. Con el fin de realizar el procedimiento de transferencia Western en la proteína separada por SDS-PAGE, la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (membrana de NC). La membrana de NC con la proteína de fusión transferida a la misma se sometió a bloqueo en leche descremada al 5 % a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana NC se lavó tres veces con una solución de TBST (preparada con 8,8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 3 g de base Tris, pH 7,4 y Tween 20 0,05 % en 1 l de solución) durante 10 minutos cada una. La membrana de NC lavada se hizo reaccionar con anticuerpos primarios. Puesto que el LMWP-factor inductor de la reprogramación y la proteína de control negativo tienen el mismo dominio de proteína que el otro, podrían determinarse dos proteínas por el mismo anticuerpo. Se hicieron reaccionar dos proteínas con 1 µg de anticuerpos anti-c-Myc (Cell Signalling, EE.UU.), Lin28 (Cell Signalling, EE.UU.), Sox2 (Cell Signalling, EE.UU.), Klf4 (Abcam, EE.UU.), Oct4 (Santa Cruz, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 4 horas. Los productos reaccionados se lavaron tres veces con TBST durante 10 minutos cada vez, seguido de reacción con anticuerpos secundarios con peroxidasa de rábano picante (HRP) unida a los mismos a temperatura ambiente durante 1 hora. Los productos reaccionados se lavaron tres veces con TBST durante 10 minutos cada uno y se fotosensibilizaron con una película de rayos X en una habitación oscura utilizando quimioluminiscencia (ECL) intensificada. Como resultado, se aprecia en la FIG. 4 que la proteína factor inductor de la reprogramación inducida para la sobreexpresión (a) y la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación (b) se encontraban en la misma posición que la banda de la proteína de la FIG. 3.

Ejemplo 2: Purificación de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación recombinante

30 Con el fin de aumentar el rendimiento de purificación de la proteína de fusión preparada en el Ejemplo 1, el Ejemplo 2 se llevó a cabo en condiciones de desnaturalización en las que se desnaturalizó la estructura tridimensional de la proteína y se añadió urea 8M en tampones (tampón de lisis, tampón de lavado y tampón de elución) usados para la purificación. La *E. coli* BL21 transformada se añadió a un medio LB que contenía ampicilina y se cultivó con agitación a una velocidad de 180 rpm y a una temperatura de 37 °C. Cuando la concentración bacteriana en el medio de cultivo, DO₆₀₀, fue de 0,3, se añadió IPTG al medio para obtener una concentración de 1 mM. A continuación, después de cultivar durante 4 horas, se indujo una sobreexpresión de la proteína. Después de centrifugar las células cultivadas y recogerlas, se añadieron 10 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, urea 8 M, pH 8,0) y 10 mg de lisozima de clara de huevo de pollo (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en 10 ml de cóctel de inhibidor de la proteasa completo sin EDTA (Roche, Reino Unido) y sonicación. A continuación, el producto reaccionado se centrifugó a 4 ° para obtener un sobrenadante, seguido por purificación con cromatografía de afinidad utilizando la etiqueta His presente en la proteína de fusión. En este caso, se utilizó 3 ml de suspensión

de resina de Ni-NTA Agarosa (Qiagen, EE.UU.) y se lavó con tampón de lisis antes de introducirlo en la columna para inducir el equilibrio. A continuación, se inyectó la solución que contenía la proteína de fusión en la columna y se dejó que fluyera y cada 10 ml de tampón de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y urea 8M, pH 8,0) se dejó fluir dos veces por gravedad. A continuación, se añadieron 5 ml de tampón de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM y urea 8M, pH 8,0) y se eluyó la proteína de fusión. Con el fin de confirmar el estado descrito anteriormente, el producto se confirmó por SDS-PAGE y los resultados de la misma se muestran en la FIG. 5 [(a) es la proteína de fusión de control y (b) es la proteína de fusión-LMWP]. A continuación, se recogieron fracciones que contenían la proteína de fusión, seguido por cromatografía en columna de desalinización PD-10 (GE Healthcare, Dinamarca) para eliminar las sales contenidas en las fracciones y replegamiento de la proteína de fusión al mismo tiempo. Dado que la proteína de fusión tiene 6 residuos de histidina en el extremo C terminal, la proteína de fusión se purificó hasta ser casi pura (pureza > 90 %) mediante una sola etapa de una cromatografía de afinidad con quelato metálico inmovilizado. Finalmente, se liofilizó la proteína de fusión y se obtuvo la proteína.

Ejemplo 3: Medición de la permeabilidad celular *in vitro* de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación

3-1: Medición de la permeabilidad celular de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación mediante el procedimiento de transferencia Western

Con el fin de confirmar la permeabilidad celular de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación combinada con ADN en el núcleo celular y que funcionaba como un factor de transcripción, el citoplasma y el núcleo de la proteína de fusión se separaron entre sí y se confirmó mediante el procedimiento de transferencia Western. Cada 1×10^6 de los grupos de fibroblastos que contenían la célula madre derivada de pulpa dental humana se dividieron en una placa de 10 cm y se incubó durante la noche en un medio general para estabilizar la célula, durante 20 horas. Después de la incubación durante la noche durante 20 horas, la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación y la proteína de fusión de control en una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se trataron durante 1 hora y 30 minutos.

A continuación, para comparar los estados en los que permeó la proteína en la célula, las células tratadas con la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación y la proteína de fusión control se separaron en el citoplasma y en el núcleo con reactivos de extracción nucleares y citoplásmicos NE-PER™ (Pierce, EE.UU.) de acuerdo con el procedimiento experimental del fabricante. El lisado separado en el citoplasma y el núcleo se cuantificó en cuanto a proteínas con el ensayo de Bradford, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % con 120 voltios durante 4 horas y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con un tampón de transferencia (Tris 12,5 mM, glicina 0,1 M, PH 8,3) a 310 miliamperios (mA) durante 2 horas. La membrana se bloqueó con una solución de bloqueo (5 % de leche en polvo desnatada, en TBS) y una solución de anticuerpo primario (c-Myc, Lin28, Sox2, Cell Signaling, EE.UU., Klf4, Abcam, EE.UU., Oct4, Santa Cruz, EE.UU., Lamina B, Actina, GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), Santa Cruz, EE.UU.) añadida a la solución de bloqueo para obtener una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se hizo reaccionar durante la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se añadió el anticuerpo secundario a cada anticuerpo primario a la solución de bloqueo en una proporción de 1:2.000 y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Los productos reaccionados fueron fotosensibilizados con una película de rayos X en una habitación oscura usando quimioluminiscencia (ECL) intensificada. Con el fin de confirmar la pureza de la separación del citoplasma y el núcleo, su pureza fue confirmada por GAPDH que es un marcador del citoplasma y Lamina B que es un marcador del núcleo, cuyos resultados se muestran en la FIG. 6(a). Como se muestra en la FIG. 6(b), se pudo confirmar que al observar la cantidad de la proteína de fusión fraccionada en la fracción de citoplasma y la fracción de núcleo y permeada por una reacción antígeno-anticuerpo, la proteína de fusión penetró en el núcleo, así como en el citoplasma para cada concentración de proteína tratada en un tiempo corto (60 minutos). En comparación, la proteína de control negativo no pudo penetrar en la célula en el mismo tiempo y a la misma concentración que la proteína de fusión.

3-2: Síntesis de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación con marcador fluorescente

Con el fin de confirmar la permeabilidad celular de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación preparada, se marcó la proteína de fusión con el marcador fluorescente. Se disolvió 1 mg/ml de la proteína preparada en tampón fosfato (pH 8,5) y se mezcló con isotiocianato de fluoresceína (FITC) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), en la que la cantidad de FITC corresponde al doble del valor calculado de la relación molar obtenida a partir del peso molecular de la proteína. En este caso, para evitar la aglomeración en la reacción de combinación, se dejó inducir la reacción entre cada 1/10 de la solución de FITC y el lisado de proteína a intervalos de 10 minutos, seguido de sombreado a 4 °C para inducir la reacción de combinación. A continuación, el producto se purificó por cromatografía líquida de fase inversa para purificación. Para el análisis, se dejó fluir TFA al 0,1 %/ H_2O y TFA al 0,092 %/acetonitrilo en una columna C_{18} que tiene un diámetro de 5 cm, con un cambio de 0 a 60 % a un caudal de 20 ml/min, durante 30 minutos. En este caso, la longitud de onda del detector UV se fijó en 220 nm y en el caso de la proteína y el péptido marcado con los materiales fluorescentes, la longitud de onda del detector de fluorescencia fue la siguiente: Ex: 493,5 nm, Em: 460 nm y la longitud de onda del detector UV se fijó en 220 nm. La única proteína de fusión marcada fluorescente pura se fraccionó y se liofilizó.

3-3: Medición de la permeabilidad celular en la imagen fluorescente de la proteína de fusión LMWP-factor

inductor de la reprogramación

Con el fin de medir el grado de permeabilidad celular de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación, se dividieron 5×10^4 células en una cámara de 4 pocillos y en medio MEM que no contenía suero bovino fetal (FBS), se inyectaron $4 \mu\text{g/ml}$ de la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación marcada con fluorescencia preparada según la preparación del Ejemplo 3-2 y el control negativo en cada pocillo, después de 1 hora, el producto se lavó dos veces con solución tampón fosfato (PBS) y se trató con un colorante que tiñó el núcleo (Hoechst 33342, azul) a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, el producto se lavó dos veces con solución tampón de fosfato (PBS) y se observó mediante un microscopio de exploración confocal (IX 70, Olympus Co., Tokio, Japón). Como resultado, se puede apreciar en la Fig. 6(c) que en el momento del tratamiento con la proteína de fusión del factor inductor de la reprogramación con permeabilidad celular combinada con el colorante fluorescente preparado según el Ejemplo 3-2 y la proteína de control del mismo, se observa la introgresión en el núcleo, así como en el citoplasma de la fluorescencia en un tiempo breve (60 minutos). En comparación, la proteína de control negativo no podía entrar en la célula al mismo tiempo y a la misma concentración que la proteína de fusión.

Ejemplo 4: Inducción de la reprogramación de células madre usando la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación

4-1: Establecimiento de la reprogramación de células madre utilizando la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación en cocultivo directo con una célula alimentadora

Se cultivó un fibroblasto embrionario de ratón tratado con mitomicina C en placas de 6 pocillos recubiertas con gelatina al 0,2 % durante 24 horas, en medio DMEM que contenía FBS al 10 %. Al día siguiente, la célula madre del mesénquima derivada de pulpa dental humana de cultivo primario en una concentración de 5×10^4 para cada pocillo se colocó en el mismo y se cultivó durante tres días más. A continuación, el medio de cultivo se cambió diariamente con medio de sustitución sin suero 20 %, aminoácidos no esenciales 1 %, FGF básico 100 ng/ml o mTeSR™ 1, en el medio de cultivo de células madre embrionarias DMEM/F12. El medio inductor de la reprogramación contenía cinco proteínas de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación en cada concentración de $8 \mu\text{g/ml}$ con un medio de sustitución sin suero 20 %, aminoácidos no esenciales 1 %, FGF básico 100 ng/ml o mTeSR™ 1 en DMEM/F12 y el medio inductor de la reprogramación fue introducido a intervalos de cinco días. Las colonias fueron aparentes al cabo de 20 días y a continuación se usó el medio de cultivo de células madre embrionarias (Figura 7). Con el fin de diferenciar la reprogramación completa y la reprogramación parcial, se obtuvieron imágenes de células vivas con Tra-1-60 y SSEA-4. Cuando las colonias en las que se realizó la reprogramación completa crecieron hasta tener un tamaño adecuado para el subcultivo, se realizó el subcultivo. Se pudo confirmar a partir de la FIG. 8(a) que cada colonia tenía una forma típica de la célula madre embrionaria y se pudo confirmar a partir de la FIG. 8(b) que dados los resultados de la tinción con Tra-1-60 y SSEA-4, se produjo la reprogramación completa.

4-2: Establecimiento de la reprogramación de células madre utilizando la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación en cocultivo indirecto con una célula alimentadora

Se cultivó un fibroblasto embrionario de ratón tratado con mitomicina C en el inserto en medio DMEM que contenía FBS al 10 % durante 3 días. Al mismo tiempo, se cultivó la célula madre del mesénquima derivado de pulpa decidua dental humana en una concentración de 5×10^4 en cada pocillo de la placa de cultivo recubierta con Matrigel, y después de 3 días, el medio de cultivo se cambió por el medio inductor de la reprogramación. El medio inductor de la reprogramación contenía cinco proteínas de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación en cada concentración de $8 \mu\text{g/ml}$ con un medio de sustitución sin suero 20 %, aminoácidos no esenciales 1 %, FGF básico 100 ng/ml o mTeSR™ 1 en DMEM/F12 y el medio inductor de la reprogramación fue introducido a intervalos de cinco días. A continuación, los días en los que no se introdujo el medio inductor de la reprogramación, el medio de cultivo se cambiaba cada 20 días por medio de sustitución sin suero 20 %, aminoácidos no esenciales 1 %, FGF básico 100 ng/ml o mTeSR™ 1, en el medio de cultivo de células madre embrionarias DMEM/F12. Las colonias fueron aparentes al cabo de 20 días y a continuación se usó el medio de cultivo de células madre embrionarias. Cuando las colonias crecieron hasta tener un tamaño adecuado para el subcultivo, se realizó el subcultivo. A continuación, con el fin de diferenciar la reprogramación completa y la reprogramación parcial, se obtuvieron imágenes de células vivas con Tra-1-60 y SSEA-4 (FIG. 7). Cuando las colonias en las que se realizó la reprogramación completa crecieron hasta tener un tamaño adecuado para el subcultivo, se realizó el subcultivo. Se pudo confirmar a partir de la FIG. 8(a) que cada colonia tenía una forma típica de la célula madre embrionaria y se pudo confirmar a partir de la FIG. 8(b) que dados los resultados de la tinción con Tra-1-60 y SSEA-4, se produjo la reprogramación completa.

4-3: Establecimiento de la reprogramación de células madre utilizando la proteína de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación sin una célula alimentadora

La célula madre de mesenquima humano derivado de la pulpa dental humana de cultivo primaria se dispuso en una placa de cultivo recubierta con Matrigel con una concentración de 5×10^4 en cada pocillo y se cultivó durante tres días. Después de 3 días, el medio de cultivo se cambió al medio inductor de la reprogramación. El medio inductor de la reprogramación contenía cinco proteínas de fusión LMWP-factor inductor de la reprogramación en cada

5 concentración de 8 µg/ml con un medio de sustitución sin suero 20 %, aminoácidos no esenciales 1 %, FGF básico 100 ng/ml o mTeSR™ 1 en DMEM/F12 y el medio inductor de la reprogramación fue introducido a intervalos de cinco días. A continuación, los días en los que no se introdujo el medio inductor de la reprogramación, el medio de cultivo se cambiaba cada 20 días por medio de sustitución sin suero 20 %, aminoácidos no esenciales 1 %, FGF básico 100 ng/ml o mTeSR™ 1, en el medio de cultivo de células madre embrionarias DMEM/F12. Las colonias fueron aparentes al cabo de 20 días y a continuación se usó el medio de cultivo de células madre embrionarias. Cuando las colonias crecieron hasta tener un tamaño adecuado para el subcultivo, se realizó el subcultivo. A continuación, con el fin de diferenciar la reprogramación completa y la reprogramación parcial, se obtuvieron imágenes de células vivas con Tra-1-60 y SSEA-4 (FIG. 7). Cuando las colonias en las que se realizó la reprogramación completa crecieron hasta tener un tamaño adecuado para el subcultivo, se realizó el subcultivo. Se pudo confirmar a partir de la FIG. 8(a) que cada colonia tenía una forma típica de la célula madre embrionaria y se pudo confirmar a partir de la FIG. 8(b) que dados los resultados de la tinción con Tra-1-60 y SSEA-4, se produjo la reprogramación completa.

10 Aunque se describen en detalle realizaciones específicas de la presente invención, será evidente para los expertos en la materia que la descripción específica es meramente un ejemplo de realización deseable y no se debe interpretar que limita el alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Seoul National University R & DB Foundation
- <120> Proteína de fusión con permeabilidad celular para facilitar la inducción de la reprogramación y su uso
- <130> 27602EP
- 25 <140>
- <141> 28-08-2014
- <150> KR 10-2013-0102195
- 30 <151> 28-08-2013
- <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.2
- 35 <210> 1
- <211> 42
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> LMWP
- <400> 1
- 45 gttcaagaa gaaggagaag aaggggagga agaaggagaa ga 42
- <210> 2
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 50 <220>
- <223> LMWP
- <400> 2
- 55 Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
- 1 5 10
- <210> 3
- 60 <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 641 999 T3

<220>
<223> TAT

5 <400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 11
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> penetratina

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

20 <210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> antenapedia

<400> 5

Ala Asn Thr Pro
30 1

<210> 6
<211> 12
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio de unión a heparina

40 <400> 6

Ser Ser Arg Lys Lys Asn Pro Asn Cys Arg Arg His
1 5 10

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión para preparar una célula madre pluripotente inducida mediante el transporte de la proteína de fusión a una célula madre derivada de pulpa dental humana, en la cual se fusionan un factor inductor de la reprogramación y un péptido con permeabilidad celular, en el que dicho péptido con permeabilidad celular es protamina de bajo peso molecular (LMWP) representada por la SEQ ID NO: 2 y en la que dicho factor inductor de la reprogramación es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en c-Myc, Lin28, Sox2, Klf4 y Oct4.
2. Una proteína de fusión que codifica un polinucleótido recombinante para preparar una célula madre pluripotente inducida de la reivindicación 1.
3. Un vector recombinante que contiene el polinucleótido recombinante de la reivindicación 2.
- 10 4. Un microorganismo recombinante transformado con el vector recombinante de la reivindicación 3.
5. Un procedimiento de preparación de una célula madre pluripotente inducida mediante el transporte de la proteína de fusión a una célula madre derivada de pulpa dental humana que comprende las etapas de:
 - 15 (a) cultivar una célula madre derivada de pulpa dental humana en un medio que contiene la proteína de fusión de la reivindicación 1, induciendo así la reprogramación de la célula madre derivada de pulpa dental humana y
 - (b) recuperar una célula madre pluripotente inducida en la que se induce la reprogramación de la célula madre derivada de pulpa dental humana.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la célula madre derivada de pulpa dental humana en la que se induce la reprogramación de la etapa (a) y una célula alimentadora, se cocultivan directamente.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la célula madre derivada de pulpa dental humana en la que se induce la reprogramación de la etapa (a) y una célula alimentadora, se cocultivan indirectamente.

FIG. 1

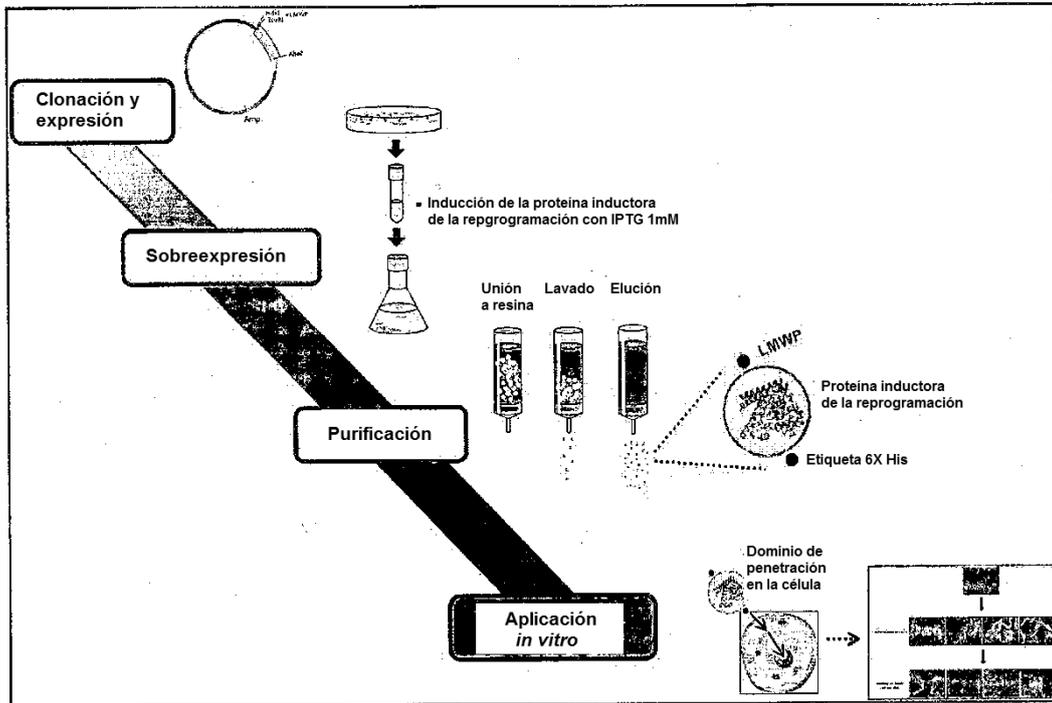


FIG. 2

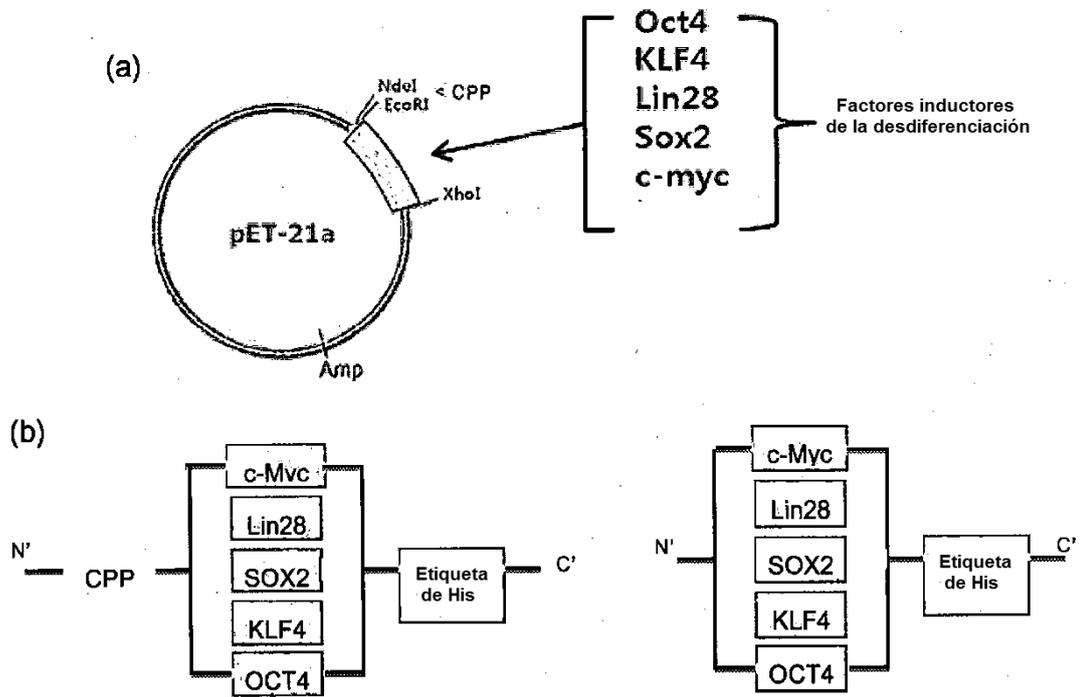


FIG 3. MODIFICADA

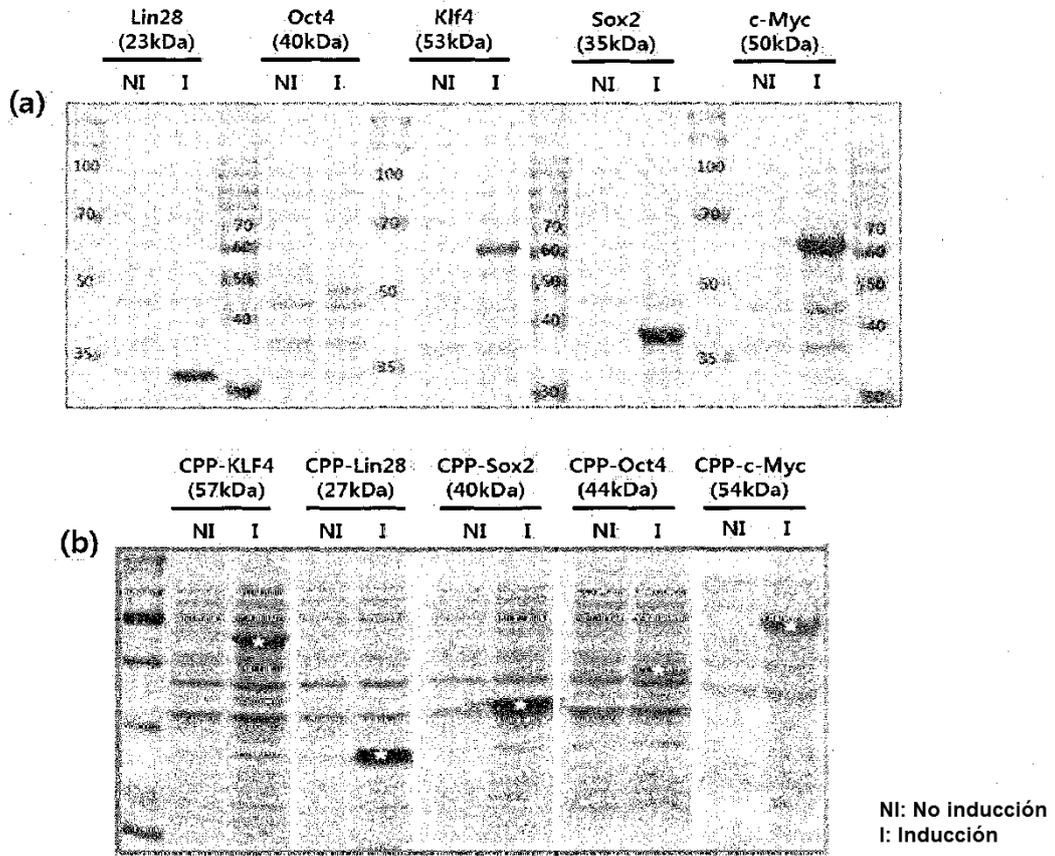


Fig. 4

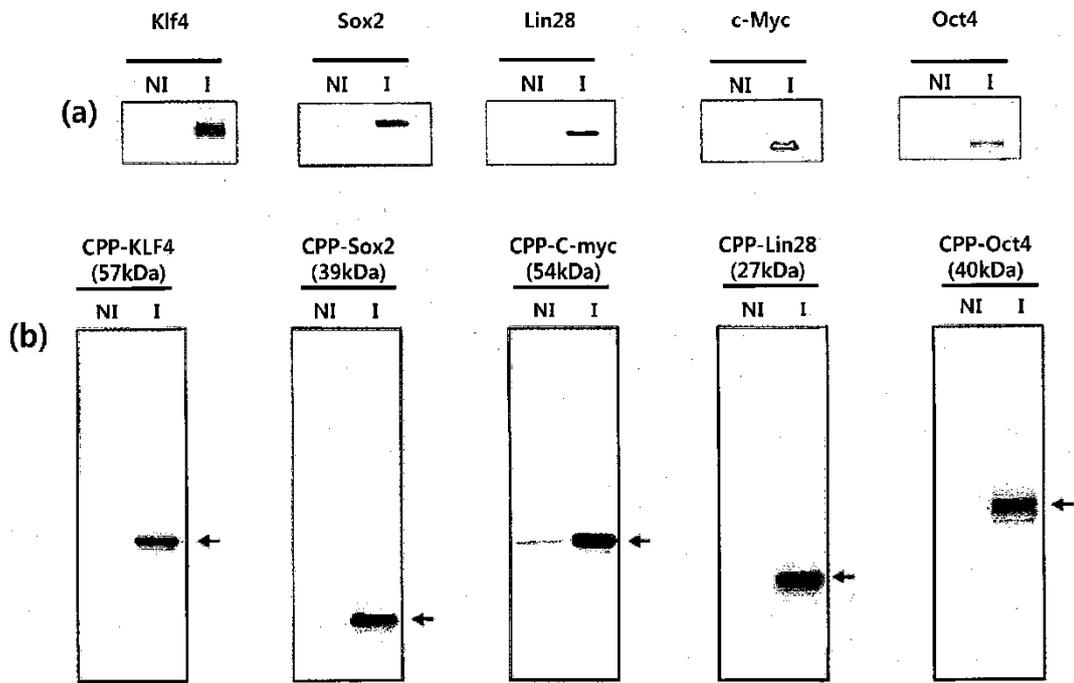


FIG. 5

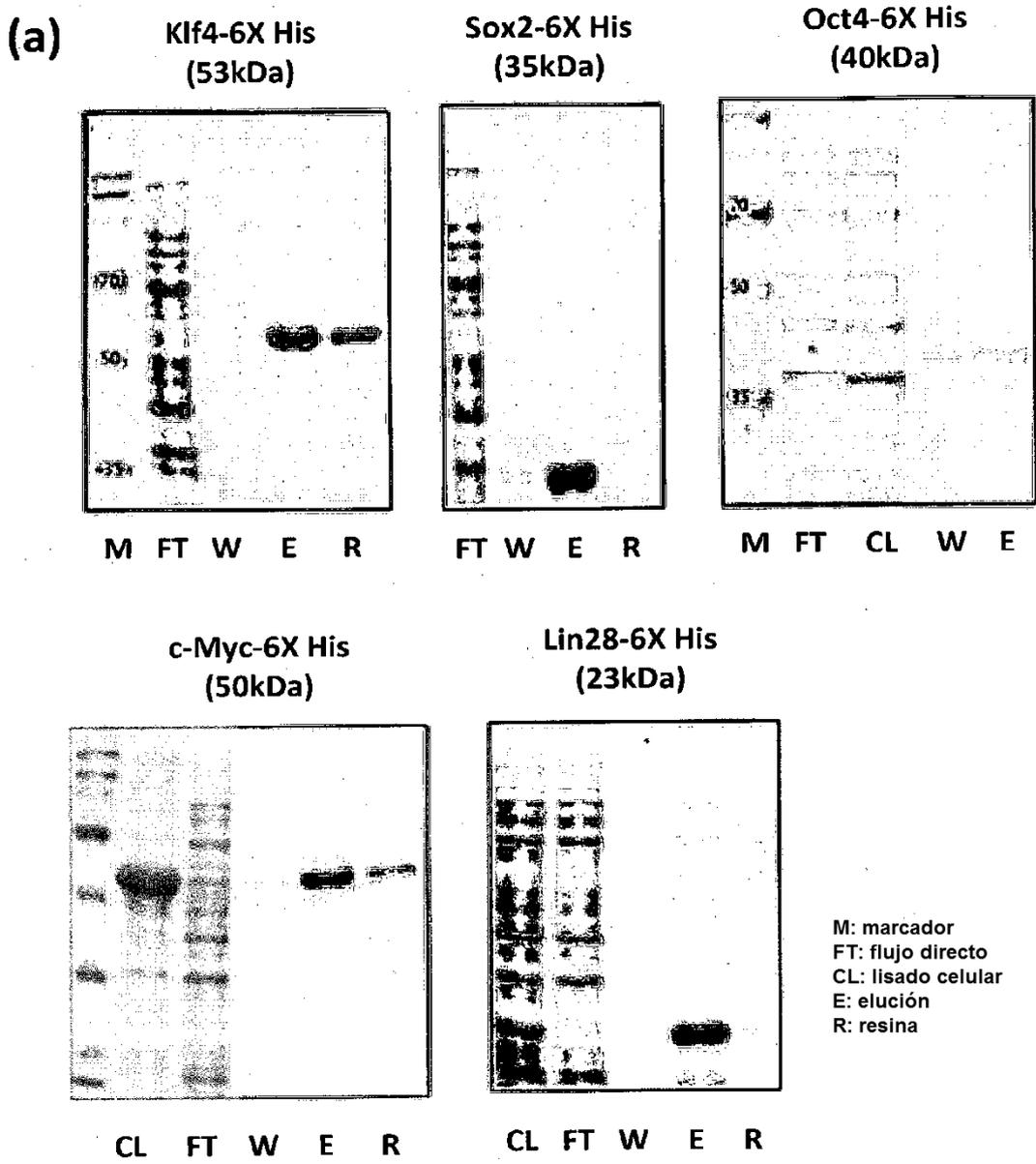


FIG. 5

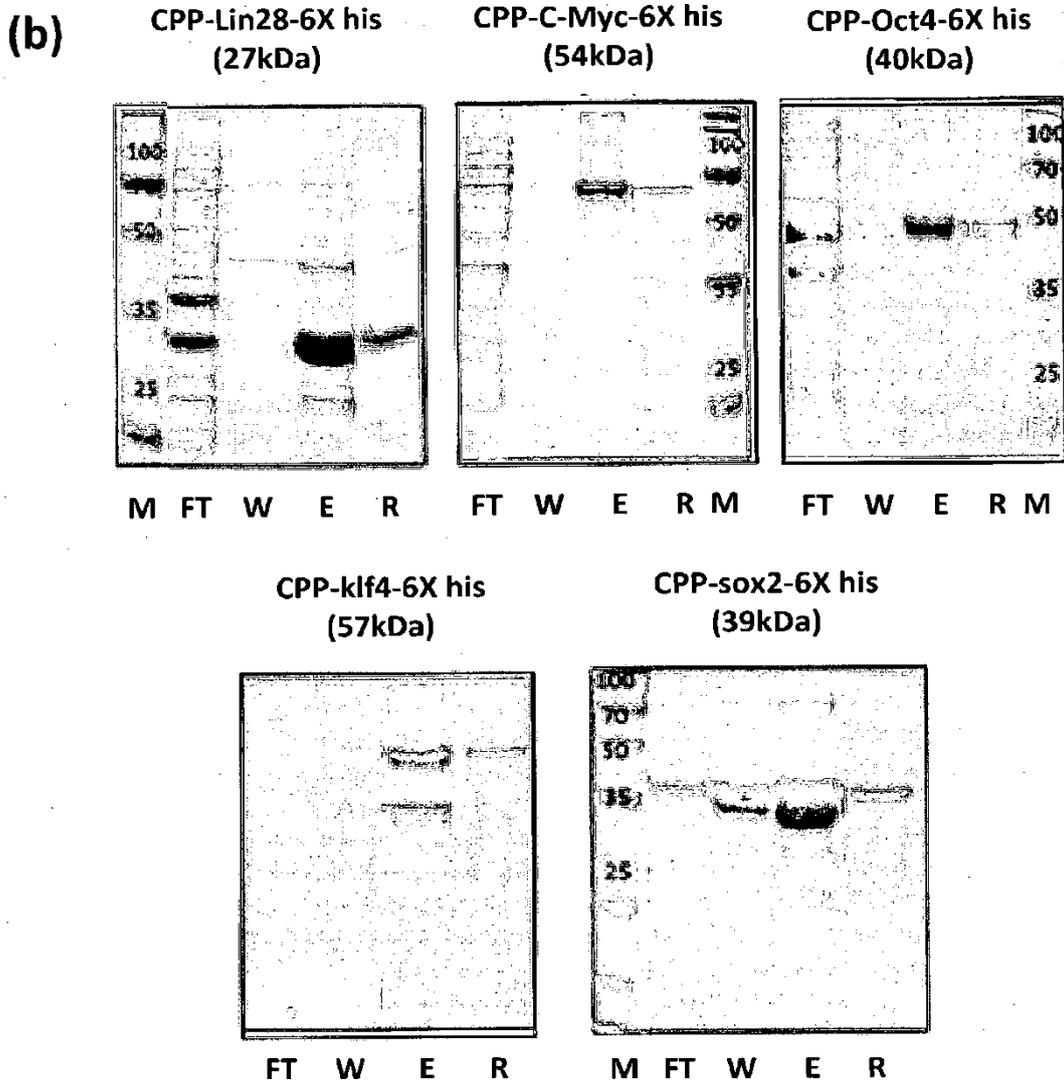


FIG. 6

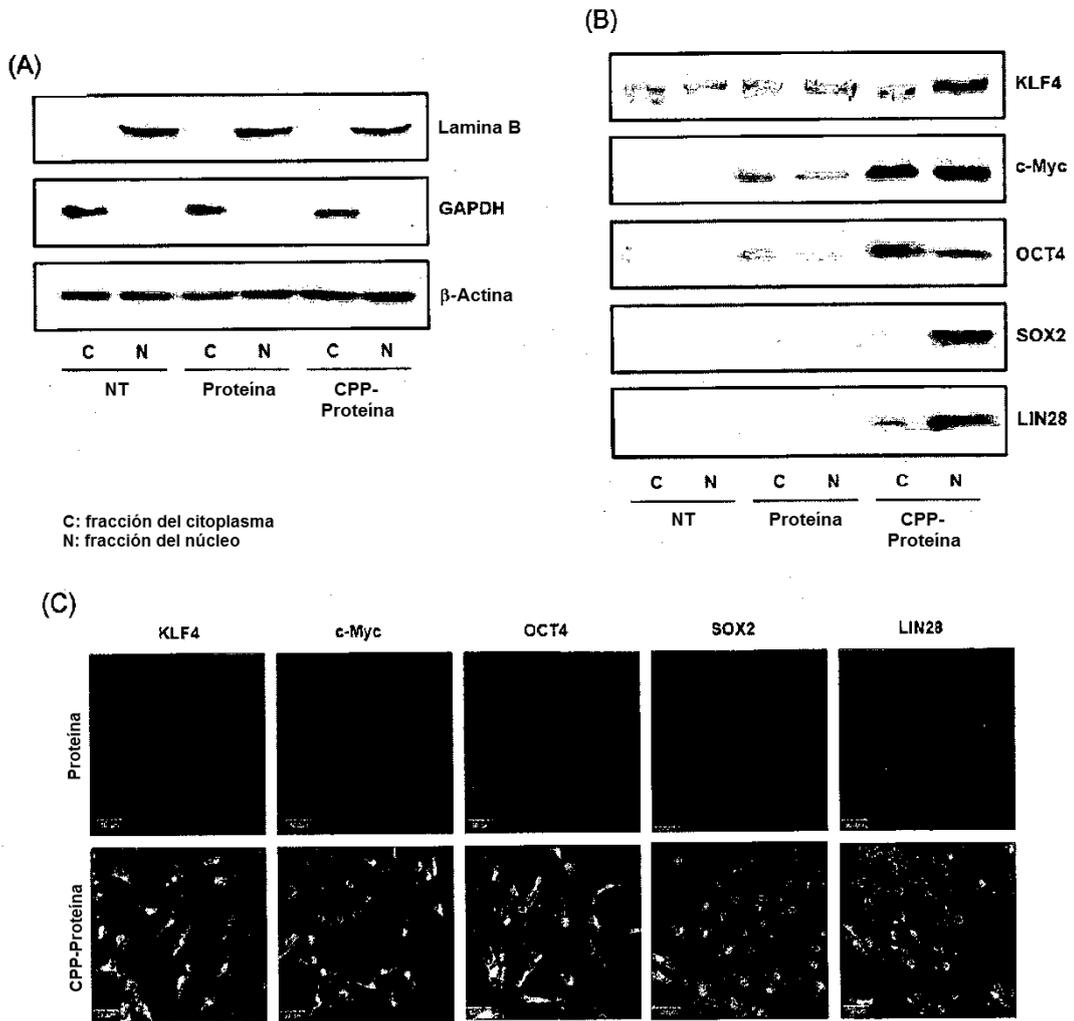


FIG. 7

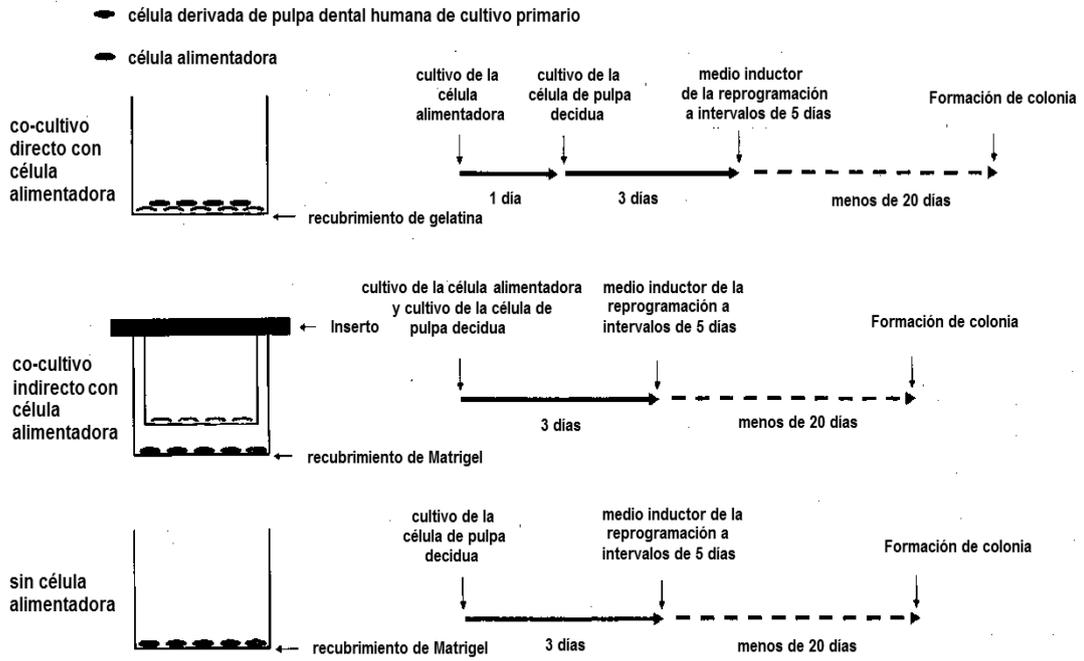


FIG. 8

