

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 869**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0735** (2010.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2009** **PCT/US2009/068274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2010** **WO10077955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009** **E 09836895 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2373784**

54 Título: **Generación y mantenimiento de células madre**

30 Prioridad:

**17.12.2008 US 138407 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2017**

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:

**LI, WENLIN;**  
**ZHOU, HONGYAN y**  
**DING, SHENG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

### Observaciones :

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

ES 2 645 869 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

Generación y mantenimiento de células madre

## Antecedentes de la invención

Aunque las células madre embrionarias (ESC) se han establecido a partir de ratones desde 1981, los intentos de obtener sus homólogos de otros mamíferos, incluidas las ratas, no han tenido éxito. Recientemente, se obtuvieron células madre pluripotentes de la etapa de cilindro de huevo después de la implantación de Epiblastos de ratón y rata (Brons et al., *Nature* 448, 191-195 (2007); Tesar et al., *Nature* 448, 196-199 (2007)). Estas nuevas células madre fueron denominadas células madre de Epiblasto (EpiSC). Las EpiSC parecen corresponder muy estrechamente a las células madre embrionarias humanas (hESC) en la morfología de la colonia y en los requerimientos de cultivo/señalización para el mantenimiento de la pluripotencia, pero muestran una gama de diferencias significativas de respuesta fenotípica y de señalización de las células ES de ratón (mESC).

El factor inhibidor de leucemia (LIF) es esencial para mantener la pluripotencia de las mESC en presencia de suero a través de la ruta JAK-STAT3 (Niwa et al., *Genes Dev* 12, 2048-2060 (1998)). Sin embargo, en medio libre de suero, también se requiere BMP4, junto con LIF, para sostener la auto-renovación de las mESC induciendo la expresión de la proteína de inhibición de la diferenciación (Id) (Ying et al., *Cell* 115, 281-292 (2003)) e inhibiendo la activación de ERK (Qi et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6027-6032 (2005)). A diferencia de las mESC, LIF no puede soportar las EpiSC/hESC, que típicamente requieren factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)/Activina A para la auto-renovación a largo plazo. Las hESC indiferenciadas muestran una actividad basal de alto nivel de ERK a través de la señalización de bFGF (Dvorak et al., *Stem Cells* 23, 1200-1211 (2005)). BMP4 no apoya la auto-renovación de EpiSC/hESC tampoco, sino que induce a que las EpiSC/hESC se diferencien en trofoblastos o endodermo primitivo (Brons et al., *Nature* 448, 191-195 (2007); Tesar et al., *Nature* 448, 196-199 (2007); Xu et al., *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264 (2002)). Además de bFGF, se ha demostrado que la señalización de Activina A/Nodal apoya el estado indiferenciado de las hESC/EpiSC (Brons et al., *Nature* 448, 191-195 (2007); Sato et al., *Dev Biol* 260, 404-413 (2003); Tesar et al., *Nature* 448, 196-199 (2007)), mientras que es dispensable para las mESC. Estos resultados apoyan firmemente la noción de que las EpiSC y las hESC son intrínsecamente similares y plantean una hipótesis atractiva acerca de que las mESC y las EpiSC/hESC representan dos estados pluripotentes distintos: el estado de tipo mESC que representa la masa celular interna (MCI) pre-implantación y el estado de tipo EpiSC que representa células epiblasticas tardías, respectivamente.

Las mESC se pueden obtener usualmente de ciertas cepas de ratón utilizando condiciones de cultivo celular basadas en capas alimentadoras (Martin, G. R., *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7634-7638 (1981)). Sin embargo, se ha demostrado que es difícil obtener células ES auténticas de ratas en condiciones similares. Se ha descrito el establecimiento de células de tipo ESC de rata (Demers et al., *Cloning Stem Cells* 9, 512-522 (2007); Ruhnke et al., *Stem Cells* 21, 428-436 (2003); Schulze et al., *Methods Mol Biol* 329, 45-58 (2006); Ueda et al., *PLoS ONE* 3, e2800 (2008)), pero estas células tampoco podían mantenerse establemente o carecían de verdadera pluripotencia *in vivo* (p. ej., no logran formar teratoma o contribuyen nada/poco al quimerismo). De forma similar, aunque se habían obtenido EpiSC de rata pluripotentes (*in vitro*), las EpiSC tanto de rata como de ratón muestran poca o ninguna capacidad de ser reincorporadas al embrión antes de la implantación y contribuir a las quimeras (Brons et al., *Nature* 448, 191-195 (2007); Tesar et al., *Nature* 448, 196-199 (2007)).

Recientemente, las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) generadas a partir de células somáticas tanto de ratón como humanas mediante transducción genética definida han atraído un enorme interés (Dimos et al., *Science* 321, 1218-1221 (2008); Han, J. y Sidhu, K. S *Curr Stem Cell Res Ther* 3, 66-74 (2008); Takahashi et al., *Cell* 131, 861-872 (2007); Takahashi, K., y Yamanaka, S., *Cell* 126, 663-676 (2006); Yu et al., *Science* 318, 1917-1920 (2007)).

## Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos para cultivar células pluripotentes humanas a través de al menos una célula divisional. Las células pluripotentes humanas son células madre pluripotentes inducidas (hiPSC) o células madre embrionarias humanas (hESC). Los métodos comprenden cultivar células pluripotentes humanas en presencia de una cantidad suficiente de:

a. un inhibidor de ALK5, y

b. un inhibidor de MEK, y

c. un inhibidor de GSK3 $\beta$ , y

d. Factor inhibidor de leucemia (LIF); y

e. nutrientes suficientes durante un tiempo suficiente, para permitir al menos una división celular mientras se mantiene la pluripotencia celular.

En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK3 $\beta$  es CHIR99021.

En algunas realizaciones, el inhibidor de MEK es PS0325901.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ALK5 es A-83-01. En algunas realizaciones, el inhibidor de ALK5 es SB431542.

- 5 En algunas realizaciones, las células pluripotentes se cultivan a través de al menos cinco divisiones celulares manteniendo al mismo tiempo la pluripotencia celular.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la introducción de un ácido nucleico heterólogo en las células pluripotentes y el cultivo de las células resultantes para permitir al menos una división celular adicional mientras se mantiene la pluripotencia. En algunas realizaciones, se introduce un ácido nucleico heterólogo en células animales, después se induce la pluripotencia, y a continuación se someten a la etapa de cultivo.

10

La célula es una célula humana.

En algunas realizaciones, las células pluripotentes son células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas.

15

La presente invención también proporciona cultivos de células humanas pluripotentes. Los cultivos comprenden una cantidad suficiente de:

- a. LIF, y
- b. un inhibidor de ALK5, y
- b. un inhibidor de MEK, y
- d. un inhibidor de GSK3 $\beta$ ;

20

para permitir al menos una división celular mientras se mantiene la pluripotencia celular.

En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK3 $\beta$  es CHIR99021.

En algunas realizaciones, el inhibidor de MEK es PD0325901.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ALK5 es A-83-01. En algunas realizaciones, el inhibidor de ALK5 es SB431542.

25

La célula es una célula humana. Las células son células madre pluripotentes inducidas o células madre embrionarias.

La presente invención también proporciona un medio de cultivo celular que comprende una cantidad suficiente de:

- a. LIF, y
- b. un inhibidor de ALK5, y
- c. un inhibidor de MEK, y
- d. un inhibidor de GSK3 $\beta$ ;

30

para permitir al menos una división celular mientras se mantiene la pluripotencia celular cuando se cultivan células humanas pluripotentes en el medio, en donde las células pluripotentes humanas son células madre pluripotentes inducidas o células madre embrionarias humanas.

35

En algunas realizaciones, el inhibidor de GSK3 $\beta$  es CHIR99021.

En algunas realizaciones, el inhibidor de MEK es PD0325901.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ALK5 es A-83-01. En algunas realizaciones, el inhibidor de ALK5 es SB431542.

40

En algunas realizaciones, el medio está en un envase sellado envasado previamente. En algunas realizaciones, el medio comprende DMEM u otros medios compatibles para el crecimiento de células humanas, de rata, de ratón u otras células animales.

La presente invención también proporciona células animales pluripotentes aisladas que replican y mantienen la pluripotencia en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína morfogénica ósea (BMP), o bajo inhibición de la ruta de señalización de TGF $\beta$  y activina, inhibición de la ruta de señalización de MAPK, y opcionalmente

inhibición de la ruta de FGF. La célula animal pluripotente aislada puede no ser una célula madre embrionaria murina (mESC). La célula puede ser una célula humana. La célula puede ser una célula madre embrionaria humana. La célula puede ser una célula iPS humana. La célula puede ser una célula de rata. La célula puede ser una célula madre embrionaria de rata. La célula puede ser una célula iPS de rata. La célula puede mantener la pluripotencia bajo la inhibición de ALK5 y MEK. La célula puede comprender un casete de expresión heterólogo, que incluye pero no se limita a un casete de expresión que codifica un marcador seleccionable o detectable (p. ej., fosfatasa alcalina).

La célula pluripotente aislada expresa un nivel más alto de E-cadherina en comparación con hESC cultivadas convencionalmente, células madre de epiblastos y células pluripotentes inducidas humanas. Por ejemplo, la célula animal pluripotente aislada expresa un nivel 2 veces mayor de E-cadherina en comparación con hESC, EpiSC y células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente. La célula animal pluripotente aislada puede expresar un nivel más alto de marcadores en comparación con hESC, células madre de epiblastos y células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente, en donde los marcadores incluyen Gbx2, Dppa3, Klf4, y Rex 1.

La célula pluripotente aislada de la presente descripción se puede cultivar en presencia de un inhibidor de ALK5, un segundo compuesto seleccionado entre un inhibidor de MEK, un inhibidor de Erk, un inhibidor de p38 y un inhibidor del receptor de FGF. La célula pluripotente aislada de la presente descripción se puede obtener o es obtenible cultivando una célula en presencia de un inhibidor de ALK5, y un segundo compuesto seleccionado entre uno o más de un inhibidor de MEK, un inhibidor de Erk, un inhibidor de p38, y un inhibidor del receptor de FGF. Por ejemplo, la célula pluripotente aislada de la presente descripción se obtiene o es obtenible cultivando hESC, EpiSC, ESC de rata, o ESC de primate cultivadas convencionalmente.

La presente invención también proporciona métodos para aumentar la pluripotencia de una célula de mamífero parcialmente pluripotente a una célula plenamente pluripotente. Los métodos comprenden,

(a) poner en contacto la célula parcialmente pluripotente con un modificador epigenético seleccionado entre un inhibidor de histona desacetilasa, un inhibidor de desmetilación de histona H3K4 o un activador de la metilación de H3K4;

(b) después de la etapa (a), cultivar la célula con (i) un inhibidor de ALK5, (ii) un inhibidor de MEK, y (iii) un inhibidor del receptor de FGF, y (iv) LIF y en ausencia del modificador epigenético, generando de ese modo una célula más plenamente pluripotente en comparación con la célula de mamífero parcialmente pluripotente.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente

(c) cultivar la célula de mamífero parcialmente pluripotente después de la etapa (b) con un inhibidor de GSK3.

En algunas realizaciones, las etapas de cultivo (a) y/o (c) comprenden adicionalmente el cultivo de la célula de mamífero parcialmente pluripotente en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF).

La célula parcialmente pluripotente es una célula madre de Epiblasto (EpiSC).

En algunas realizaciones, la célula parcialmente pluripotente no expresa al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en Oct4, Nanog, SSEA-I y REX-I y la célula más plenamente pluripotente expresa uno o más o todos los marcadores.

En algunas realizaciones, la célula parcialmente pluripotente no expresa ALP-1 y la célula más plenamente pluripotente expresa ALP-1.

En algunas realizaciones, el modificador epigenético es ácido valpróico o parnate.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Se podrían generar riPSC de tipo mESC a partir de células WB-F344 de rata después de transducirlas con *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* por medio de retrovirus y capturarlas/mantenerlas combinadas con LIF, PD0325901 0,5  $\mu$ M, A-83-01 0,5  $\mu$ M, y CHIR99021 3  $\mu$ M. Las colonias de tipo ESC se observaron 10 días después de la transducción (A), pero no se pudieron mantener en las condiciones de cultivo de mESC convencionales (B). En presencia de PD0325901 0,5  $\mu$ M y CHIR99021 3  $\mu$ M, las riPSC se pueden mantener a corto plazo en cultivo pero muestran una intensa diferenciación espontánea (C). Con la combinación de PD0325901 0,5  $\mu$ M, CHIR99021 3  $\mu$ M y A-83-01 0,5  $\mu$ M, las riPSC se pueden auto-renovar a largo plazo y homogéneamente (D) y formar colonias abovedadas de tipo mESC en cultivo (E). La inmunocitoquímica reveló que las riPSC expresan marcadores de ESC típicos, tales como *Oct4* (F), *Sox2* (G), SSEA-I (H, Green) y *Nanog* (H, rojo). El análisis por RT-PCR de cuatro líneas de riPSC clonales confirmó la expresión de marcadores de pluripotencia típicos endógenos (I), pero los genes transducidos viralmente se silenciaron en gran parte. El promotor *Oct4* de clones riPSC exhibió un patrón de desmetilación y es distinto del de las células parentales WB-F344 (J).

Figura 2. Las riPSC tienen un potencial de desarrollo pluripotente *in vitro* e *in vivo*. La inmunotinción mostró que las riPSC se podían diferenciar *in vitro* en derivados de endodermo (Albúmina y Pdx1) (A y B), neuroectodermo (tubulina

βIII, Tuj1) (C) y mesodermo (Brachyury) (D). Asimismo, las riPSC pueden formar teratoma en ratones SCID, que consiste en las tres capas germinales (EH). Adicionalmente, después de ser inyectadas en blastocistos de rata Brown-Norway, las riPSCs con fondo de WB F344 eran capaces de producir ratas quiméricas (I). Aumento relativo: A~E (100x), F~H y J~Q (200x).

5 Figura 3. Generación de hiPSC "de tipo mESC" novedosas. Los fibroblastos humanos IMR90 se transdujeron con *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* por medio de lentivirus. Las colonias de hiPSC se observaron tres semanas después de la transducción (A), se recogieron a la cuarta semana después de la transducción y se mantuvieron establemente en un cóctel de hLIF, PD0325901 0,5 μM, A-83-01 0,5 μM y CHIR99021 3 μM. Tales hiPSC formaron colonias abovedadas similares a mESC (B). Bajo tales condiciones, las hiPSC eran positivas para ALP (C) y otros marcadores de pluripotencia típicos (D-I). El análisis por RT-PCR de cuatro líneas clonales de hiPSC confirmó la expresión de genes de pluripotencia endógenos (J), pero los genes transducidos viralmente se silenciaron en gran parte. El promotor *Oct4* de los clones de hiPSC exhibió un patrón de desmetilación similar a las células ES humanas cultivadas convencionalmente, pero es distinto del de los fibroblastos parentales IMR90 (K). Se proporciona un análisis del cariotipo de las hiPSC (L).

15 Figura 4. La inmunotinción mostró que las hiPSC se podrían diferenciar eficazmente a derivados de endodermo (Albúmina) (A), neuroectodermo (tubulina βIII, Tuj1) (B) y mesodermo (Brachyury) (C) *in vitro*. Después de trasplantarlas a los ratones SCID, las hiPSC podían formar teratoma, que consistía en las tres capas germinales incluyendo la estructura de tipo neuroepitelio (ectodermo) (D), estructura de tipo tubular (endodermo) (D), estructura de tipo cartílago (mesodermo) E). Aumento relativo: A (100X), B~E (200X).

20 Figura 5. Efectos de diferentes combinaciones de moléculas pequeñas sobre el mantenimiento de la pluripotencia de las riPSC en cultivo. Las riPSC se trataron con tripsina en células individuales y se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 103 células por pocillo y se trataron con diferentes combinaciones de inhibidores. Cinco días después, se realizó la tinción con ALP para visualizar las colonias de riPSC (A). Las colonias positivas para ALP para cada condición se contaron a partir de diez campos visuales aleatorios 40 x y el número relativo de colonias se resumió en B.

Figura 6. Las EpiSC se diferencian en condiciones de crecimiento de mESC y no se convierten fácilmente en un estado de tipo MCI/mESC. (A) Las ESC R1 murinas crecieron como colonias compactas y abovedadas en medio de crecimiento de mESC convencional con un suplemento de LIF, y las colonias mostraron actividad positiva para ALP (superior izquierda). Las EpiSC crecieron como colonias grandes y planas en medio de cultivo de hESC convencional con un suplemento de bFGF, y las colonias mostraron actividad negativa para ALP (arriba a la derecha). Las EpiSC se diferenciaron en medio de crecimiento de mESC convencional con un suplemento de LIF (parte inferior izquierda); las EpiSC se diferenciaron en medio de crecimiento de mESC convencional con un suplemento de LIF e inhibidor de MEK PD0325901 0,5 μM, inhibidor de FGFR PD173074 0,1 μM e inhibidor de GSK3 CHIR99021 3 μM (m/MFGi) (abajo a la derecha). (B) Esquema para la generación de células convertidas. Las EpiSC se trataron con tripsina en células individuales y se cultivaron en placa sobre células alimentadoras bajo la condición de auto-renovación de mESC con suplementos de los compuestos químicos indicados durante aproximadamente 4 días para inducir la conversión, seguido de otros 4 días de selección. El cultivo se volvió a cultivar en placa con posterioridad y se seleccionó y se expandió adicionalmente durante otras dos semanas, tiempo durante el cual se escogieron los clones estables. (C) La inhibición de la señalización de TGFβ por un inhibidor selectivo de ALK4/5/7 A-83-01 (0,5 μM) indujo la formación por parte de las EpiSC de colonias más compactas y abovedadas que expresaban ALP. (D) Estas colonias se pudieron expandir aún más de forma estable en medio de crecimiento de mESC con un suplemento de LIF y A-83-01 0,5 μM, PD0325901 0,5 μM, PD173074 0,1 μM y CHIR99021 3 μM (mAMFGi). (E) El inhibidor de LSD parnate indujo la formación por parte de las EpiSC de colonias más compactas y abovedadas que expresaban ALP. Estas colonias pudieron expandirse aún más establemente en condiciones mMFGi o (F) mAMFGi. Obsérvense las colonias abovedadas tipo mESC y las actividades positivas para ALP. Barra de escala, 50 μm.

Figura 7. Las EpiSC se convierten en un estado de tipo MCI/mESC por medio de tratamiento con parnate e inhibidores de ALK4/5/7, MEK, FGFR y GSK3. (A) Eficacia en la producción de quimerismo a partir de tres tipos de células tratadas con compuestos. (B) Las células de tipo mESC estables convertidas a partir de EpiSC por la condición de parnate/mAMFGi contribuyeron al quimerismo en ratones adultos después de que los embriones agregados se trasplantaran a ratones pseudo-preñados. El color de la capa Agouti se originó a partir de las células Parnate/mAMFGi. (C) Genotipificación por PCR para determinar la presencia de la integración de GFP en múltiples tejidos adultos. (D) Se examinó un embrión E13.5 mediante fluorescencia para determinar la contribución de las células parnate/mAMFGi que se habían marcado con GFP, y se observaron células positivas para GFP en múltiples tejidos del embrión (se muestran imágenes de mayor aumento en la Figura 10A). (E) Las células dobles positivas para GFP/SSEA-1 en la gónada fueron aisladas por medio FACS y examinadas por medio de PCR en tiempo real para los marcadores de la línea germinal. Los resultados demostraron la expresión específica de los marcadores de la línea germinal *Blimp1* y *Stella* en el linaje de la línea germinal que contribuía a las células Parnate/mAMFGi. Barra. ± DT.

60 Figura 8. Caracterizaciones moleculares de las células Parnate/mAMFGi convertidas. (A) La inmunocitoquímica mostró una expresión homogénea de marcadores de pluripotencia, Oct4 (Verde), Nanog (Rojo) y SSEA-I (Rojo) en

células Parnate/mAMFGi. (B) Expresión de genes marcadores MCI específicos (*Rex-1*, *Pecam1*, *Dax 1*, *Dppa5*, *Esrrb*, *Fgf4* y *Fbxo15*), los genes marcadores asociados a competencia de líneas germinales (*Stella* y *Stra8*) y gen de Epiblasto (*fgf5*) en mESC, EpiSC, y las células parnate/mAMFGi se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó GAPDH como control. (C) El análisis de transcriptoma de mESC, EpiSC y células parnate/mAMFGi mostró que las células Parnate/mAMFGi son mucho más similares a las mESC que las EpiSC. Se utilizaron dos réplicas biológicas para los tres tipos de células. (D) Análisis de metilación de promotores *Stella* y *Fgf4* mediante secuenciación genómica con bisulfito. Los círculos abiertos y cerrados indican CpG no metilados y metilados, respectivamente. (E) Análisis ChIP-QPCR de las modificaciones de histonas indicadas en el locus *stella* en varias células. Los ADN genómicos se inmunoprecipitaron a partir de EpiSC, RI-mESC y células Parnate/mAMFGi cultivadas sin alimentación, con anticuerpos como se indica, seguido de análisis de Q-PCR utilizando un conjunto de cebadores específico para el locus genómico endógeno que codifica *Stella*. Los niveles de las modificaciones de histonas se representaron como porcentaje de entrada. La IgG sirvió como control sin anticuerpos.

Figura 9. Caracterización funcional de las células Parnate/mAMFGi convertidas. (A) Las células Parnate/mAMFGi tienen una tasa de crecimiento similar a la de las mESC. Las células R1-mESC y Parnate/mAMFGi se pasaron cada 3 días, y se contó el número de células cada 24 h. (B) Las células Parnate/mAMFGi se pueden diferenciar eficazmente in vitro a células de las tres capas germinales, incluyendo células neuronales características (positivas para tubulina  $\beta$ III y MAP2ab), cardiomiocitos (positivos para troponina cardíaca y MHC) y células endodérmicas (positivas para Sox 17 o Albúmina). Los núcleos se tiñeron con DAPI. (D) La BMP4 tiene un efecto diferencial sobre la inducción de la expresión del marcador de mesodermo (*Brachyury*), el marcador de trofoblastos (*Cdx2*) y el marcador de endodermo primitivo (*Gata6*) en las EpiSC, mESC y células parnate/mAMFGi. (E) La diferenciación de cardiomiocitos por etapas dirigida en condiciones monocapa y químicamente definidas demostró que las células Parnate/mAMFGi comparten una respuesta de diferenciación similar a la de las RI-mESC y son diferentes de las de las EpiSC. Las células se caracterizaron con tinción CT3 y fenotipo de latido.

Figura 10. Las células Parnate/mAMFGi contribuyeron eficazmente a ratones quiméricos. (A) Tejidos de embriones quiméricos. Se observaron células positivas para GFP aportadas a partir de células de Parnate/mAMFGi en gónadas, cerebro, corazón, intestino, pulmón y riñón. (B) Genotipificación GFP de ratones adultos quiméricos. Se recolectaron al azar cinco ratones, y se analizó la integración de GFP en cinco diferentes tejidos, a saber, corazón, pulmón, hígado, cerebro y bazo, por medio de PCR genómica. La detección positiva de la integración de GFP en los cinco tejidos de 2 ratones adultos, en cuatro tejidos de 3 ratones, confirmó que las células parnate/mAMFGi podrían contribuir a las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo) *in vivo*.

Figura 11. Expresión homogénea de marcadores de pluripotencia en células parnate/mAMFGi convertidas bajo células alimentadoras o condiciones de cultivo libres de alimentadores. (A) Las células parnate/mAMFGi se marcaron con GFP, y se propagaron sobre alimentadores. Los resultados de inmunotinción mostraron una expresión homogénea de GFP y marcadores de pluripotencia Oct4 (Rojo), Nanog (Rojo) y SSEA-1 (Rojo). (B) Las colonias positivas para Oct4 no diferenciadas se desarrollaron a partir de células parnate/mAMFGi únicas tan eficazmente como a partir de células OG2-ES únicas. Las colonias se expandieron durante varios pases después de la siembra de células individuales en una condición libre de alimentadores y definida químicamente en N2B27. Barra de escala, 50  $\mu$ m. (C) Las células Parnate/mAMFGi se diferenciaron y perdieron la expresión de Oct4 en ausencia de LIF. Las células Parnate/mAMFGi se expandieron después de la siembra de células individuales en una condición libre de alimentadoras y químicamente definida en N2B27; se indicó el suplemento del factor de crecimiento.

Figura 12. La expresión de STELLA se detectó en células parnate/mAMFGi convertidas y células R1-mESC, pero no en EpiSC. Los resultados de inmunotinción mostraron la expresión de STELLA, y DAPI.

## Definiciones

El término "pluripotente" o "pluripotencia" se refiere a células con la capacidad de dar origen a una progenie que puede experimentar diferenciación, en las condiciones apropiadas, a tipos celulares que muestran colectivamente características asociadas con linajes celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre pluripotentes pueden contribuir a muchos o a todos los tejidos de un animal prenatal, postnatal o adulto. Se puede utilizar una prueba convencional aceptada en la técnica, tal como la capacidad para formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad, para establecer la pluripotencia de una población celular, sin embargo, la identificación de diversas características de las células madre pluripotentes también se puede utilizar para detectar células pluripotentes. La pluripotencia celular es un continuo, que abarca desde la célula plenamente pluripotente que puede formar todas las células del embrión propiamente dicho, p. ej., las células madre embrionarias y las iPSC, hasta la célula incompleta o parcialmente pluripotente que puede formar células de las tres capas germinales pero que pueden no exhibir todas las características de las células plenamente pluripotentes, tales como, por ejemplo, la transmisión de la línea germinal o la capacidad de generar un organismo completo. En realizaciones particulares, la pluripotencia de una célula se incrementa desde una célula incompleta o parcialmente pluripotente a una célula más pluripotente o, en ciertas realizaciones, una célula plenamente pluripotente. La pluripotencia se puede evaluar, por ejemplo, mediante la formación de teratomas, la transmisión de líneas germinales y la complementación de embriones tetraploides. En algunas realizaciones, se puede utilizar la expresión de genes de pluripotencia o marcadores de pluripotencia como se comenta en otra parte de la presente memoria para evaluar la pluripotencia de una célula.

Las "características de las células madre pluripotentes" se refieren a las características de una célula que distingue las células madre pluripotentes de otras células. La capacidad de dar origen a una progenie que pueda experimentar diferenciación, en las condiciones apropiadas, a tipos de células que colectivamente demuestran características asociadas con 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 opcionalmente todos, los marcadores de la siguiente lista no limitante: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox2, E-cadherina, UTF-1, Oct4, Rex1 y Nanog. Las morfologías celulares asociadas con células madre pluripotentes también son características de las células madre pluripotentes.

El término "biblioteca" se utiliza de acuerdo con su uso común en la técnica, para designar una colección de moléculas, opcionalmente organizada y/o catalogada de tal manera que se puedan identificar miembros individuales. Las bibliotecas pueden incluir, pero no se limitan a, bibliotecas químicas combinatorias, bibliotecas de productos naturales y bibliotecas de péptidos.

Un polinucleótido "recombinante" es un polinucleótido que no está en su estado nativo, p. ej., el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos no encontrada en la naturaleza, o el polinucleótido está en un contexto distinto de aquél en el que se encuentra naturalmente, p. ej., separado de las secuencias de nucleótidos a las que se encuentra típicamente en proximidad en la naturaleza, o secuencias de nucleótidos adyacentes (o contiguas) a las que no está próximo típicamente. Por ejemplo, la secuencia en cuestión se puede clonar en un vector, o se puede recombinar de otra manera con uno o más ácidos nucleicos adicionales.

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

Los términos "promotor" y "secuencia de control de la expresión" se utilizan en la presente memoria para hacer referencia a una matriz de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Según se utiliza en la presente memoria, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor del tipo de polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden localizarse a 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 de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. El término "conectado operablemente" hace referencia a una conexión funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión al factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", según se utiliza en la presente memoria, es aquella que se origina a partir de una fuente foránea con respecto a la célula anfitriona particular, o, si es de la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. De ese modo, un casete de expresión heterólogo en una célula, es un casete de expresión que no es endógeno con respecto a la célula anfitriona particular, por ejemplo, que está unido a secuencias de nucleótidos de un vector de expresión en lugar de a ADN cromosómico, que está unido a un promotor heterólogo, que está unido a un gen informador, etc.

Los términos "agente" o "compuesto de ensayo" se refieren a cualquier compuesto útil en los análisis de selección descritos en la presente memoria. Un agente puede ser, por ejemplo, un compuesto orgánico, un polipéptido (p. ej., un péptido o un anticuerpo), un ácido nucleico (p. ej., ADN, ARN, de doble hebra, de hebra sencilla, un oligonucleótido, ARN antisentido, ARN inhibidor pequeño, micro ARN, ribozima, etc.), un oligosacárido, un lípido. Por lo general, los agentes utilizados en los presentes métodos de escrutinio tienen un peso molecular de menos de 10.000 dalton, por ejemplo, menos de 8000, 6000, 4000, 2000 dalton, p. ej., entre 50-1500, 500-1500, 200-2000, 500-5000 dalton. El compuesto de ensayo puede estar en forma de una biblioteca de compuestos de ensayo, tal como una biblioteca combinatoria o aleatorizada que proporcione un intervalo suficiente de diversidad. Los compuestos de ensayo están opcionalmente unidos a un compañero de fusión, p. ej., compuestos de direccionamiento, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizantes, compuestos direccionables y otros radicales funcionales. Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles identificando un compuesto de ensayo (denominado "compuesto principal") con alguna propiedad o actividad deseable, p. ej., capacidad para inducir pluripotencia bajo ciertas condiciones tales como las descritas en la presente memoria, creando variantes del compuesto principal y evaluando la propiedad y actividad de dichos compuestos variantes. A menudo, se emplean métodos de escrutinio de alto rendimiento (HTS) para dicho análisis.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de una hebra sencilla o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la de los nucleótidos de

referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metil-fosfonatos quirales, ribonucleótidos 2-O-metilados, ácidos péptidonucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca las variantes conservativamente modificadas de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, se pueden lograr sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) los codones seleccionados está sustituida con residuos 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)).

Se utilizan "inhibidores", "activadores" y "moduladores" de la expresión o de la actividad para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas utilizando análisis in vitro e in vivo para la expresión o actividad de una proteína diana descrita (o polinucleótido codificante), p. ej., ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, p. ej., inhiben la expresión o se unen, bloquean parcial o totalmente la estimulación o la actividad inhibitora de la proteasa, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan a la baja la actividad de la proteína diana descrita, p. ej., los antagonistas. Los activadores son agentes que, p. ej., inducen o activan la expresión de una proteína diana descrita o se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación o la actividad inhibitora de proteasa, sensibilizan o regulan al alza la actividad de la proteína diana descrita (o polinucleótido codificante), p. ej., los agonistas. Los moduladores incluyen ligandos, antagonistas y agonistas de origen natural y sintético (p. ej., moléculas químicas pequeñas, anticuerpos y similares que funcionan como agonistas o antagonistas). Tales análisis para inhibidores y activadores incluyen, p. ej., la aplicación de supuestos compuestos moduladores a células que expresan la proteína diana descrita y luego la determinación de los efectos funcionales sobre la actividad de proteína diana descrita, como se ha descrito anteriormente. Las muestras o análisis 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 alcance del efecto. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor de actividad relativa de 100%. La inhibición de una proteína diana descrita se logra cuando el valor de actividad relativo al control es aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25, 10%, 5% o 1%. La activación de la proteína diana descrita se logra cuando el valor de actividad relativo al control es 110%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200, 300%, 400%, 500%, o 1000-3000% o más alto.

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 (dentro de al menos 50%, 80% o 90% de actividad) en comparación con el miembro de la familia de origen natural más próximo, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN del miembro de la familia de origen natural, y pueden comprender adicionalmente 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, p. ej., Oct3/4 (denominado en la presente memoria "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. & Rosenfeld, M.G. *Genes Dev.* 11, 1207-1225 (1997). En algunas realizaciones, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85%, 90% o 95% en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Oct de origen natural, tal como los enumerados anteriormente o tal como los enumerados en el número de acceso Genbank NP\_002692.2 (Oct4 humano) o NP\_038661.1 (Oct4 de ratón). Los polipéptidos Oct (p. ej., Oct3/4) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. Generalmente, se utilizará la misma especie de proteína que la especie de células que se estén manipulando.

Un "polipéptido Klf" se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de la familia de factores de tipo Krüppel (Klf), proteínas de dedo de zinc que contienen secuencias de aminoácidos similares a las del regulador del patrón embrionario de *Drosophila* Krüppel, o variantes de los miembros de origen natural que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de una actividad de al menos 50%, 80% o 90%) en comparación con el miembro de la familia de origen natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN de miembro de la familia de origen natural, y puede comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Véase, Dang, D.T., Pevsner, J. y Yang, V.W. *Cell Biol.* 32, 1103-1121 (2000). Los miembros de la familia de Klf ilustrativos incluyen Klf1, Klf2, Klf3, Klf-4, Klf5, Klf6, Klf7, Klf8, Klf9, Klf10, Klf11, Klf12, Klf13, Klf14, Klf15, Klf16, y Klf17. Se encontró que Klf2 y Klf-4 eran factores capaces de generar células iPS en ratones, y los genes relacionados Klf1y Klf5 también, aunque con una eficacia reducida. Véase, Nakagawa, et al., *Nature Biotechnology* 26: 101-106 (2007). En algunas realizaciones, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85%, 90% o 95% en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Klf de origen natural tal como los enumerados anteriormente o tal como los enumerados en el número de acceso de Genbank CAX16088 (Klf4 de ratón) o CAX 14962 (Klf4 humano). Los polipéptidos Klf (por ejemplo, Klf1, Klf4 y Klf5) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. Generalmente, se utilizará la misma especie de proteína con las especies de células que se estén manipulando. En la medida en la que se describe en la presente memoria un polipéptido Klf, éste puede ser reemplazado por un polipéptido receptor beta relacionado con estrógeno (Essrb). Por lo tanto, se pretende que para cada realización de polipéptido Klf descrita en la presente memoria, se describa igualmente una realización correspondiente que utilice Essrb en lugar de un polipéptido Klf4.



Un "polipéptido Myc" se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de la familia Myc (véase, p. ej., Adhikary, S. & Eilers, M. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* 6:635-645 (2005)) o sus variantes que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de una actividad de al menos 50%, 80%, o 90%) en comparación con el miembro de la familia de origen natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN del miembro de la familia de origen natural, y puede comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Los polipéptidos Myc ilustrativos incluyen, p. ej., c-Myc, N-Myc y L-Myc. En algunas realizaciones, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85%, 90% o 95% en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Myc de origen natural, tal como los enumerados anteriormente o como los enumerados en el número de acceso de Genbank CAA25015 (Myc humano). Los polipéptidos Myc (p. ej., c-Myc) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. Generalmente, se utilizará la misma especie de proteína que la especie de las células que se estén manipulando.

[0063] Un "polipéptido Sox" se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de los factores de transcripción de la caja HMG relacionada con SRY (Sox), que se caracteriza por la presencia del dominio del grupo de alta movilidad (HMG), o variantes del mismo que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de una actividad de al menos 50%, 80% o 90%) en comparación con el miembro de la familia de origen natural más cercano relacionado, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión a ADN del miembro de la familia de origen natural, y pueden comprender adicionalmente un dominio de activación transcripcional. Véase, p. ej., Dang, D.T., et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1103-1121 (2000). Los polipéptidos Sox ilustrativos incluyen, p. ej., Sox1, Sox-2, Sox3, Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, Sox8, Sox9, Sox10, Sox11, Sox12, Sox13, Sox14, Sox15, Sox17, Sox18, Sox-21 y Sox30. Se ha demostrado que Sox1 produce células iPS con una eficacia similar a la de Sox2, y también se ha demostrado que los genes Sox3, Sox15 y Sox18 generan células iPS, aunque con algo menos de eficacia que Sox2. Véase, Nakagawa, et al., *Nature Biotechnology* 26:101-106 (2007). En algunas realizaciones, las variantes tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85%, 90% o 95% a lo largo de toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia del polipéptido Sox de origen natural, tal como los enumerados anteriormente o tal como se enumera en el número de acceso de Genbank CAA83435 (Sox2 humano). Los polipéptidos Sox (p. ej., Sox1, Sox2, Sox3, Sox15 o Sox18) pueden ser de ser humano, de ratón, de rata, bovinos, porcinos o de otros animales. Generalmente, se utilizará la misma especie de proteína que la especie de células que se esté manipulando.

## Descripción detallada de la invención

### I. Introducción

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que los inhibidores de ALK5 mejoran significativamente el mantenimiento, y opcionalmente, la inducción de pluripotencia en las células. La combinación de un inhibidor de ALK5 con un inhibidor de MAPK (p. ej., un inhibidor de MEK, un inhibidor de Erk o un inhibidor de p38) o una combinación de un inhibidor de ALK5 con un inhibidor de la ruta de FGF (p. ej., un inhibidor del receptor de FGF) permite:

el mantenimiento de la pluripotencia en células con nuevas propiedades funcionales que se definen a continuación y son significativamente diferentes de las células madre embrionarias humanas convencionales o células madre pluripotentes inducidas descritas anteriormente (p. ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.843; 6.200.806; y 7.029.913) y más similares a las características de mESC; y

mejora considerablemente la eficacia y la estabilidad de las células en comparación, por ejemplo, con los métodos para mantener la pluripotencia conocidos previamente (p. ej., que implican a los inhibidores de GSK3 y MEK - véase, el documento WO2008/015418). De hecho, es sorprendente que un inhibidor de ALK5 sea eficaz para mejorar el mantenimiento de la pluripotencia en parte debido a que la técnica hasta la fecha se ha centrado en suscitar un efecto agonístico, no antagonístico, de la ruta de TGFβ para estimular la pluripotencia. Véase, p. ej., el documento WO 2008/056173.

La descripción proporciona en parte cultivos de células que comprenden un inhibidor de ALK5 (u otro inhibidor de la ruta de TGFβ/activina) y un inhibidor de MAPK o un inhibidor de ruta de señalización de FGF, que comprende opcionalmente una célula de mamífero que ya es pluripotente o en la que debe ser inducida, o se ha inducido pluripotencia en presencia de los inhibidores. Opcionalmente, los cultivos celulares también pueden incluir un inhibidor de GSK3β y/o un Factor Inhibidor de Leucemia (LIF). Otros componentes y condiciones de los medios pueden ser como los conocidos generalmente en la técnica y pueden incluir, p. ej., componentes de medios basales, vitaminas, minerales, etc.

La capacidad para mantener células en pluripotencia permite el estudio y uso de tales células de muchas maneras que de otro modo sería imposible. Por ejemplo, muchas células madre pluripotentes se diferencian o mueren rápidamente en cultivo y por lo tanto no permiten análisis de escrutinio, ingeniería genética y otros usos donde es necesario o conveniente mantener la pluripotencia durante un cierto periodo de tiempo o a través de múltiples pases celulares (p. ej., divisiones celulares). La presente invención permite eludir tales problemas.

## II. Cultivos

Se proporcionan cultivos celulares que incluyen un inhibidor de ALK5 (u otro inhibidor de la ruta de TGFβ/activina), opcionalmente con un inhibidor de la ruta de señalización de MAPK (p. ej., un inhibidor de MEK o Erk o p38) o FGF (p. ej., un inhibidor del receptor de FGF) y, para inducir o mantener la pluripotencia de una célula de mamífero. En algunas realizaciones, las células cultivadas con tales inhibidores tienen las características descritas en los ejemplos, incluyendo, pero sin limitación, la formación de colonias abovedadas en cultivos, la expresión de marcadores ESC (p. ej., Oct4, Sox2 y Nanog), que tienen una desmetilación casi completa del promotor Oct4, que expresan Rex-1 y ALP (p. ej., los marcadores de las ESC y Epiblastos tempranos que están ausentes en los Epiblastos y las EpiSC después de la fase de implantación), la capacidad de diferenciarse *in vitro* en endodermo, neuroectodermo, y mesodermo, así como características de pluripotencia *in vivo*, tales como la capacidad de formar teratoma (p. ej., en ratones SCID) y para células no humanas, la capacidad de formar una progenie quimérica cuando se inyectan en blastocistos y se implantan en un útero receptivo. Además, en algunas realizaciones, las células de los cultivos conservan tales características durante múltiples pases celulares, p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30 o más, mientras están en las mismas condiciones de cultivo.

Los cultivos celulares pueden opcionalmente incluir también uno o ambos de un inhibidor de GSK3β y LIF. Como se explica en los ejemplos, la presencia de LIF puede mejorar el mantenimiento a largo plazo de células pluripotentes (p. ej., en más de 10 pases) y, por lo tanto, se puede incluir una cantidad suficiente de LIF en los cultivos para permitir la conservación a largo plazo de la pluripotencia. Adicionalmente, con o sin LIF, también se puede incluir una cantidad suficiente de un inhibidor de GSK3β. En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de GSK3β es suficiente para mejorar la eficacia del cultivo, es decir, el número de colonias pluripotentes positivas que se forman.

La cantidad de cada inhibidor puede variar y se puede determinar para una ventaja óptima dependiendo de las condiciones de cultivo precisas, de los inhibidores específicos utilizados y del tipo de células cultivadas. En algunas realizaciones, los cultivos de la invención incluyen 0,05-10 μM, p. ej., 0,1-1 μM, p. ej., 0,5 μM de un inhibidor de ALK5 (p. ej., A-83-01 y 0,1-20 μM, por ejemplo, 2-10 μM de SB431542). Los autores de la presente invención han encontrado que se puede utilizar un inhibidor II de TGF-β RI quinasa [2-(3-(6-metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina] como inhibidor de ALK5, como se describe en la presente memoria, por ejemplo a concentraciones de aproximadamente 1,5 μM. Así, en algunas realizaciones, los cultivos de la invención incluyen 0,05-20 μM, p. ej., 0,1-10 μM de inhibidor II de TGF-β RI Quinasa. En algunas realizaciones, los cultivos de la invención incluyen 10 nM-5 μM, por ejemplo, 50 nM-1 μM de un inhibidor de la ruta de FGF (p. ej., PD173074). En algunas realizaciones, los cultivos de la invención incluyen 0,05-50 μM, p. ej., 0,1- 5 μM, p. ej., 0,5 μM de un inhibidor de MEK (p. ej., PD0325901). En algunas realizaciones, los cultivos de la invención incluyen 0,05-20 μM, por ejemplo 0,5-5 μM, p. ej., 3 μM de un inhibidor de GSK3β (p. ej., CHIR99021).

Los inhibidores del receptor TGFβ (p. ej., ALK5) pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a receptores de TGFβ (p. ej., ALK5). Los inhibidores del receptor de TGFβ/ALK5 incluyen, pero no se limitan a, SB431542 (véase, p. ej., 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)-1H-pirazol-1-carbotioamida (véase, p. ej., Tojo et al., *Cancer Science* 96(11): 791-800 (2005), y comercialmente disponible, por ejemplo, de Toicris Bioscience); Inhibidor II de TGFβ RI quinasa [2-(3-(6-Metilpiridin-2-il) -1H-pirazol-4- il)-1,5-naftiridina]; 2-(3-(6-Metilpiridin-2-il) -1H-pirazol- 4-il) -1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, p. ej., Dalton, et al., documento WO2008/094597 incorporado como referencia a la presente memoria), BMP4 (véase, Dalton, más arriba), GW788388 (-{4-[3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]piridin-2-il}-N-(tetrahidro-2H-piran-4-il)benzamida) (véase, p. ej., Gellibert, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* 49(7):2210-2221 (2006)), SM16 (véase, p. ej., Suzuki et al., *Cancer Research* 67(5): 2351-2359 (2007)), IN-1130 (3-((5,6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1H-imidazol-2-il)metil)benzamida (véase, p. ej., Kim, et al., *Xenobiotica* 38 (3): 325-339 (2008)), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)piridina) (véase, p. ej., Gouville et al., *Drug News Perspective* 19(2): 85-90 (2006)), SB-505124 (hidrocloruro de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (véase, p. ej., DaCosta et al., *Molecular Pharmacology* 65(3):744-752 (2004)) y derivados de pirimidina (véanse, p. ej., los enumerados en Stiefl et al., documento WO2008/006583, incorporado a la presente memoria como referencia). Sin pretender limitar el alcance de la invención, se cree que los inhibidores de ALK5 afectan al proceso de conversión/transición mesenquimal a epitelial (MET). La ruta de TGFβ/activina es un conductor para la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Por lo tanto, la inhibición de la ruta de TGFβ/activina puede facilitar el proceso MET (es decir, la reprogramación).

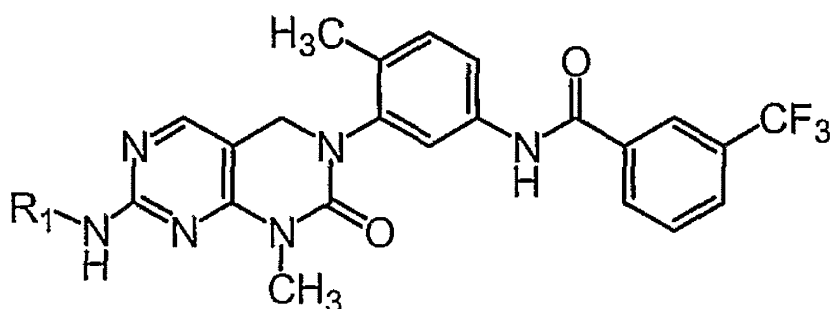
En vista de los datos de la presente memoria que muestran el efecto de inhibición de ALK5, se cree que la inhibición de la ruta de TGFβ/activina tendrá efectos similares. Por lo tanto, cualquier inhibidor (p. ej., aguas arriba o aguas abajo) de la ruta de TGFβ/activina se puede utilizar combinado con, o en lugar de, inhibidores de ALK5 como se describe en cada párrafo de la presente memoria. Los inhibidores de la ruta de TGFβ/activina ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: 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 SMAD 6 y SMAD 7. Además, las categorizaciones descritas a continuación son meramente para propósitos de organización y un experto en la técnica sabría que los compuestos pueden afectar a uno o más puntos dentro de una ruta 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 a variantes dominantes negativas de ácidos

- nucleicos antisentido dirigidos a receptores de TGF $\beta$ . Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero no se limitan a, SU5416; hidrocloreto de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124); lerdelimumab (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;
- 5 Gleevec; 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin); activina-M108A; P144; TBR2-Fc soluble; y células tumorales transfectadas antisentido que dirigen receptores de TGF $\beta$ . (Véase, p. ej., 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)).
- Los inhibidores de la fosforilación SMAD 2/3 pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de ácidos nucleicos antisentido dirigidos a SMAD2 o SMAD3. Los ejemplos específicos de los inhibidores incluyen
- 10 PD169316; SB203580; SB-431542; LY364947; A77-01; y 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin). (Véanse, p. ej., Wrzesinski, más arriba, Kaminska, más arriba, Shimanuki, et al., *Oncogene* 26:3311-3320 (2007); y Kataoka, et al., EP1992360.
- Los inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y smad4 pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de 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 no se limitan a Trx-SARA, Trx-xFoxH1b y Trx-Lef1. (Véanse, p. ej., Cui et al., *Oncogene* 24:3864-3874 (2005) y Zhao et al., *Molecular Biology of the Cell*, 17:3819-3831 (2006)).
- Los inhibidores de MEK pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a MEK. Los ejemplos específicos de inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, PD0325901, (véase, p. ej., Rinehart et al., *Journal of Clinical Oncology* 22: 4456-4462 (2004)), PD98059 (disponible, p. ej., en Cell Signaling Technology), U0126 (disponible, p. ej., en Cell Signaling Technology), SL 327 (disponible, p. ej., en Sigma Aldrich), ARRY-162 (disponible, p. ej., en Array Biopharma), PD184161 (véase, p. ej., Klein, et al., *Neoplasia* 8:1-8 (2006)), PD184352 (CI-1040) (véase, p. ej., Mattingly, et al., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:456-465 (2006)), sunitinib (véase, p. ej., Voss, et al., documento US2008004287 incorporado a la presente memoria como referencia), sorafenib (véase, Voss más arriba), Vandetanib (véase, Voss más arriba), pazopanib (véase, p. ej., Voss más arriba), Axitinib (véase, Voss más arriba) y PTK787 (véase, Voss más arriba).
- 25 Actualmente, varios inhibidores de MEK están experimentando evaluaciones en pruebas clínicas. CI-1040 se ha evaluado en ensayos clínicos de fase I y II para el cáncer (véase, p. ej., Rinehart, et al., *Journal of Clinical Oncology* 22(22):4456-4462 (2004)). Otros inhibidores de MEK que se están evaluando en pruebas clínicas incluyen PD184352 (véase, p. ej., English, et al., *Trends in Pharmaceutical Sciences* 23(1):40-45 (2002)), BAY 43-9006 (véase, p. ej., Chow, et al., *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46:72-78 (2001)), PD-325901 (también PD0325901), GSK1120212, ARRY-438162, RDEA119, AZD644 (También ARRY-142886 o ARRY-886), RO5126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704). (Véase, p. ej., información de *National Institutes of Health* localizada en [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) así como la información del *Nation Cancer Institute* localizada en la Red en [cancer.gov/clinicaltrials](http://cancer.gov/clinicaltrials).
- Los inhibidores de p38 (también conocidos como CSBP, mHOG1, RK y SAPK2) pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a p38. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero no se limitan a, SB203580 (4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil) 1H-imidazol); SB202190 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5 (4-piridil)-1H-imidazol); SB 220025; N-(3-terc-butil-1-metil-5-pirazolil)-N'-(4-(4-piridinilmetil)fenil)urea; RPR 200765A; UX-745; UX-702; UX-850; SC10-469; RWJ-67657 (R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute); RDP-58 (SangStat Medical Corp., adquirido por Genzyme Corp.); Scios-323 (SCIO 323, Scios Inc.); Scios-469 (SCIO-469; Scios Inc.); inhibidores de MKK3/MKK6 (Signal Research Division);
- 40 moduladores de p38/MEK (Signal Research Division); análogos SB-210313; SB-238039; HEP-689 (SB 235699); SB-239063; SB-239065; SB-242235 (SmithKline Beecham Pharmaceuticals); VX-702 y VX-745 (Vertex Pharmaceuticals Inc.); AMG-548 (Amgen Inc.); inhibidores de la quinasa p38 Astex (Astex Technology Ltd.); análogos de RPR-200765 (Aventis SA); inhibidores de la quinasa p38 Bayer (Bayer Corp.); BIRB-796 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.); inhibidor de la quinasa MAP p38 Celltech (Celltech Group pic); FR-167653 (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd.); SB-681323 y SB-281832 (GlaxoSmithKline pic); inhibidores de la MAP quinasa de LEO Pharmaceuticals (LEO Pharma A/S); inhibidores de la quinasa MAP p38 de Merck Co. (Merck Research Laboratories); SC-040 y SC-XX906 (Monsanto Co.); antagonistas de adenosina A3 (Novartis AG); inhibidores de la quinasa MAP p38 (Novartis Pharma AG); CNI-1493 (Picower Institute for Medical Research); RPR-200765A (Rhône-Poulenc Rorer Ltd.); e inhibidores de la quinasa MAP p38 de Roche (p. ej., RO3201195 y RO4402257, Roche Bioscience). Véanse, p. ej., Roux, et al., *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2):320-344 (2004); Engelman et al., *Journal of Biological Chemistry* 273(48):32111-32120 (1998); Jackson, et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284(2):687-692 (1998); Kramer et al., *Journal of Biological Chemistry* 271(44):27723-27777 (1996); y Menko et al., documento US20080193504.
- [0078] Otros inhibidores adicionales de p38 incluyen, pero no se limitan a, compuestos de pirazol sustituidos en 1,5-diarilo y de pirazol sustituidos (documentos US6509361 y US6335336); compuestos de piridilo sustituidos (documento US20030139462); derivados de quinazolina (documentos US6541477, US6184226, US6509363 y
- 60

US6635644); aril ureas y análogos de heteroarilo (documento US6344476); ureas heterocíclicas (documento WO 1999/32110); otros compuestos de urea (documentos WO1999/32463, WO1998/52558, WO1999/00357 y WO 1999/58502); y compuestos de imidazol sustituidos y compuestos de triazol sustituidos (documentos US6560871 y US6599910).

- 5 [0079] Los inhibidores de Erk pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a Erk. Los ejemplos específicos de los inhibidores de Erk incluyen, pero no se limitan a PD98059 (véase, p. ej., Zhu, et al., *Oncogene* 23:4984-4992 (2004)), UO 126 (véase, Zhu, más arriba), FRI 80204 (véase, p. ej., Ohori, *Drug News Perspective* 21(5):245-250 (2008)), sunitinib (véase, p. ej., Ma, et al., documento US2008004287), sorafenib (véase, Ma, más arriba), Vandetanib (véase, Ma, más arriba), pazopanib (véase, Ma, más arriba), Axitinib (véase, Ma, más arriba) and PTK787 (véase, Ma, más arriba). Los inhibidores de Erk pueden incluir moléculas que inhiben Erk solo o que inhiben también una segunda diana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor de Erk es:



en la que:

- 15 R<sub>1</sub> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, aril(C<sub>6-10</sub>)alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>, heteroaril(C<sub>5-10</sub>)-alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquil(C<sub>3-C10</sub>)alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> y heterocicloalquil(C<sub>3-C10</sub>)alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>; en donde cualquier alquilo o alqueno de R<sub>1</sub> está opcionalmente sustituido con uno a tres radicales seleccionados independientemente entre halo, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y -NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>; en donde cualquier arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de R<sub>1</sub> está opcionalmente sustituido con uno a tres radicales seleccionados entre halo, hidroxilo, ciano, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo sustituido con halo, alcoxi sustituido con halo, -XNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XOXNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XNR<sub>2</sub>S(O)<sub>0-2</sub>R<sub>3</sub>, -XC(O)NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XNR<sub>2</sub>C(O)XOR<sub>2</sub>, -XNR<sub>2</sub>C(O)NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XNR<sub>2</sub>XNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XC(O)NR<sub>2</sub>XNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XNR<sub>2</sub>XOR<sub>2</sub>, -XOR<sub>2</sub>, -XNR<sub>2</sub>C(=NR<sub>2</sub>)NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XS(O)<sub>0-2</sub>R<sub>4</sub>, -XNR<sub>2</sub>C(O)R<sub>2</sub>, -XNR<sub>2</sub>C(O)XNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XNR<sub>2</sub>C(O)R<sub>4</sub>, -XC(O)R<sub>4</sub>, -X-R<sub>4</sub>, -XC(O)OR<sub>3</sub> y -XS(O)<sub>0-2</sub>NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>; en donde X es un enlace o alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>; y R<sub>4</sub> es heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido con 1 a 3 radicales seleccionados entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -XNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, -XNR<sub>2</sub>XNR<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, XNR<sub>2</sub>XOR<sub>2</sub> y -XOR<sub>2</sub>; en donde X, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se describen como antes; y los derivados N-óxido, derivados de profármacos, derivados protegidos, isómeros individuales y mezclas de isómeros de los mismos; y las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables (p. ej., hidratos) de tales compuestos o como se describe de otro modo en el documento WO 06/135824.

- 30 Los inhibidores de la ruta de señalización de FGF incluyen, pero no se limitan a inhibidores del receptor de FGF. Los inhibidores del receptor de FGF (FGFR) pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a FGFR. Los ejemplos específicos de inhibidores de FGFR incluyen, pero no se limitan a, SU6668 (véase, p. ej., Klenke, *BMC Cancer* 7:49 (2007)), SU5402 (3-[3-(2-Carboxietil)-4-metilpirrol-2-metilidenil]-2-indolinona) y PD 173074 (véase, p. ej., Bansal et al., *J. Neuro. Res.* 74(4):486-493 (2003)).

- 35 Los inhibidores de GSK3 pueden incluir anticuerpos frente a variantes negativas dominantes de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a GSK3. Los ejemplos específicos de inhibidores de GSK3 incluyen, pero no se limitan a, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418 (véase, p. ej., Gould et al., *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 7:387-390 (2004)), CT 99021 (véase, p. ej., Wagman, *Current Pharmaceutical Design* 10:1105-1137 (2004)), CT 20026 (véase Wagman, más arriba), SB216763 (véase, p. ej., Martin et al., *Nature Immunology* 6:777-784 (2005)), AR-A014418 (véase, p. ej., Noble et al., *PNAS* 102:6990-6995 (2005)), litio (véase, p. ej., Gould et al., *Pharmacological Research* 48:49-53 (2003)), SB 415286 (véase, p. ej., Frame et al., *Biochemical Journal* 359:1-16 (2001)) y TDZD-8 (véase, p. ej., Chin et al., *Molecular Brain Research*, 137(1-2):193-201 (2005)). Otros ejemplos de inhibidores de GSK3 disponibles de Calbiochem (véase, p. ej., Dalton et al., documento WO2008/094597), incluyen, pero no se limitan a, BIO (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxima (inhibidor IX de GSK3); BIO-Acetoxima (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxima (Inhibidor X de GSK3); (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina (Inhibidor XIII de GSK3); Complejo de piridocarbazol-ciclopenadienilrutenio (Inhibidor XV de GSK3); TDZD-8 4-Bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidino-3,5-diona (Inhibidor I de GSK3beta); 2-Tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol (Inhibidor II de GSK3beta); OTDZT 2,4-Dibencil-5-oxotiadiazolidino-3-tiona (Inhibidor III de GSK3beta); alfa-4-Dibromoacetofenona (Inhibidor VII de GSK3beta); AR-AO 14418 N-(4-Metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea (Inhibidor VIII de GSK3beta); 3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol-2-il)-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona (Inhibidor XI de GSK3beta) TWSI 19 compuesto de pirrolopirimidina (Inhibidor XII de GSK3beta), L803 H-KEAPPAPPQSp-NH2 o su forma Miristoilada (Inhibidor XIII de GSK3beta); 2-Cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-

il)-etanona (Inhibidor VI de GSK3 $\beta$ ); AR-AO144-18; SB216763; y SB415286. Se han identificado residuos de GSK3 $\beta$  que interaccionan con inhibidores. Véase, p. ej., Bertrand et al., *J. Mol Biol.* 333(2):393-407 (2003).

Cuando se describen en la presente memoria inhibidores de un producto génico particular, se debe entender que el inhibidor puede ser reemplazado por un ARNip que se dirige al gen que codifica el producto génico. Por ejemplo, la presente invención proporciona el uso de un ARNip que inhibe la expresión de ALK5 en lugar de un inhibidor de ALK5. De forma similar, los inhibidores de MEK, los inhibidores de Erk, los inhibidores de p38, los inhibidores del receptor de FGF y los inhibidores de GSK3 $\beta$  pueden ser reemplazados por un ARNip de MEK, ARNip de Erk, ARNip de p38, ARNip del receptor de FGF y ARNip de GSK3 $\beta$ , respectivamente. Adicionalmente, se puede utilizar un anticuerpo inhibidor (p. ej., un anticuerpo humanizado o quimérico) como inhibidor de ALK5, MEK, Erk, p38, receptor de FGF y GSK3 $\beta$ .

Las células se pueden cultivar inicialmente con un modificador epigenético seguido de una etapa de cultivo que carece del modificador, pero que incluye los inhibidores descritos en la presente memoria (p. ej., inhibidor de ALK5, inhibidores MEK, inhibidores de Erk, inhibidores de p38, inhibidores del receptor de FGF e inhibidores de GSK3 $\beta$ , Factor inhibidor de la Leucemia (LIF), etc.). Los moduladores epigenéticos ilustrativos incluyen un inhibidor de la desmetilación de la histona H3K4 o un activador de la metilación de H3K4. Los ejemplos de modificadores epigenéticos incluyen, p. ej., inhibidores de histona desmetilasa tales como inhibidores de LSD1 (p. ej., parnate) o inhibidores de MAO.

Los términos "inhibidor de la histona desacetilasa", "inhibidor de histona desacetilasa" e "inhibidor de HDAC" se refieren a un compuesto capaz de interaccionar con una histona desacetilasa e inhibir su actividad enzimática. "Inhibición de la actividad enzimática de la histona desacetilasa" representa la reducción de la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. En algunas realizaciones, semejante reducción de la actividad de la histona desacetilasa es de al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90%. En otras realizaciones preferidas, la actividad de la histona desacetilasa se reduce en al menos 95% y más preferiblemente en al menos 99%.

Algunos inhibidores representativos de HDAC incluyen ácido butírico, MS-27-275, SAHA, Tricostatina A, apicidina, oxanflatina, FK228 y trapoxina. Estos inhibidores se pueden dividir en varias clases basadas en sus estructuras, incluyendo ácidos grasos de cadena corta (butiratos y ácido valproico), ácidos hidroxámicos (Tricostatina A y SAHA), tetrapéptidos cíclicos (depsipéptido), benzamidas (MS 27-275) y agentes que contienen epóxido (trapoxina). La mayoría de ellos inhiben las HDAC de una manera reversible, excepto la trapoxina, que posee un grupo epóxido capaz de alquilar irreversiblemente las HDAC. Los inhibidores reversibles generalmente tienen una cola alifática larga que contiene un extremo nucleófilo, tal como -SH u -OH, que interacciona con el centro de cinc activo situado en la parte inferior del bolsillo de unión a HDAC. Otros inhibidores de HDAC están surgiendo basándose en la modificación de las estructuras enumeradas. La mayoría de los nuevos agentes son derivados de ácidos hidroxámicos, incluyendo análogos de amida de Tricostatina A (TSA) y SAHA basado en tio/fósforo. El reemplazo del enlace amida en la estructura de MS-27-275 por una sulfonamida condujo al descubrimiento de una nueva clase de potentes inhibidores de HDAC. Los inhibidores HDAC prometedores que han entrado en pruebas clínicas incluyen derivados de ácido hidroxámico LAQ824, derivado de ácido butírico Titan, ácido valproico, MS-27-275, SAHA y depsipéptido FK228.

Los inhibidores de histona desmetilasa incluyen inhibidores de la desmetilasa I específica de lisina (LSD1, también conocida como histona desmetilasa específica de lisina, BHC110 y KIAA0601). La Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2006/071608 está dirigida a un método para controlar la actividad de la histona desmetilasa eucariótica, a métodos para regular al alza y regular a la baja genes activados con histona metilada, y a un método para tratar o prevenir una enfermedad (p. ej., una enfermedad hiperproliferativa tal como cáncer) modulando el nivel de proteína o la actividad de una histona desmetilasa. En vista de la importancia de la regulación génica, y de la capacidad para afectar a la regulación génica mediante la inhibición o modulación de LSD1, los inhibidores de la enzima pueden tener un potencial terapéutico significativo; Bi, X. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:3229-3232 (2006) y las Solicitudes de Patente Internacional Núm. WO2007/021839 y WO2008/127734 describen ciertos compuestos útiles como inhibidores de LSD1.

La presente invención también proporciona un medio de cultivo para mantener la pluripotencia de las células. Los medios de cultivo celular no incluyen opcionalmente una célula. El medio de cultivo puede comprender el contenido del medio de cultivo descrito anteriormente, aunque con las células. Dichos medios son células de cultivo útiles como se describen en la presente memoria.

Tal como se dispone en otra parte de la presente memoria, las células de los cultivos se pueden seleccionar entre células madre embrionarias (p. ej., células madre embrionarias humanas (hESC), células madre embrionarias de primate, células madre embrionarias de rata o células madre embrionarias de otros animales, opcionalmente células madre embrionarias no de ratón). Alternativamente, las células incluyen células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSC pueden ser de seres humanos, primates, ratas, ratones u otros animales que no sean ratones. Las iPSC se pueden generar a partir de células no pluripotentes tan recientemente como dentro de la división celular anterior o, alternativamente, las células se pueden haber mantenido durante 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, o más divisiones

celulares o pases anteriores como iPSC. En otras palabras, los cultivos celulares pueden contener iPSC que se crearon previamente (p. ej., una semana, un mes o más anteriormente). Un beneficio de las combinaciones de moléculas pequeñas proporcionadas en la presente memoria es que además, y separadas de su uso en la reprogramación, permiten mantener una pluripotencia deseada durante lo que parece ser un período de tiempo indefinido.

La presente descripción proporciona células pluripotentes en una mezcla con uno o más inhibidores como se describe en la presente memoria. El compuesto puede estar mezclado a una concentración suficiente para inducir o mejorar la eficacia de inducción de pluripotencia. Por ejemplo, los compuestos pueden estar a una concentración de al menos 0,1 nM, p. ej., al menos 1, 10, 100, 1000, 10000 o 100000 nM, p. ej., entre 0,1 nM y 100000 nM, p. ej., entre 1 nM y 10000 nM, p. ej., entre 10 nM y 10000 nM, entre 0,01  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, entre 0,1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M. Por ejemplo, A-83-01 se puede utilizar a una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu$ M a aproximadamente 0,5  $\mu$ M, p. ej., de 0,25  $\mu$ M a aproximadamente 0,5  $\mu$ M. La concentración de A-83-01 puede ser de 0,25  $\mu$ M. La concentración de A-83-01 puede ser de 0,5  $\mu$ M. Se puede utilizar CHIR99021 a una concentración de aproximadamente 3  $\mu$ M. Se puede utilizar PD325901 a una concentración de aproximadamente 0,5  $\mu$ M. Se puede utilizar PD173074 a una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu$ M. Las mezclas pueden estar en un recipiente sintético (p. ej., un tubo de ensayo, una placa de Petri, etc.). Así, las células pueden ser células aisladas (no parte de un animal). Las células se pueden aislar de un animal (ser humano o no humano), colocar en un recipiente, poner en contacto con uno o más compuestos como se describe en la presente memoria. Las células se pueden cultivar posteriormente y opcionalmente, volver a insertarse en el mismo animal o en un animal diferente, opcionalmente después de que las células hayan sido estimuladas para que se vuelvan de un tipo o linaje de célula concretos.

En algunas realizaciones, las células comprenden un casete de expresión para la expresión heteróloga de al menos uno o más de un polipéptido Oct, un polipéptido Myc, un polipéptido Sox y un polipéptido Klf. En algunas realizaciones, las células no incluyen un casete de expresión para expresar ninguno de los polipéptidos Oct, Myc, Sox o Klf. Las células con o sin tales casetes de expresión son útiles, por ejemplo, en métodos de escrutinio como se describe en la presente memoria.

### III. Células

Las células pueden ser pluripotentes antes del contacto inicial con los inhibidores de la invención o las células se pueden poner en contacto con uno o más de los inhibidores de la invención y después se pueden inducir la pluripotencia (p. ej., mediante la introducción de los factores de transcripción apropiados y/o por contacto con las moléculas pequeñas apropiadas para inducir pluripotencia).

Se puede utilizar cualquier célula animal en los métodos de la descripción. Así, por ejemplo, las células pueden ser células de mamífero. Las células de mamífero ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, células humanas o células no humanas, incluyendo pero no limitadas a, de rata, de ratón (p. ej., SCID u otros ratones), de cerdo, bovinas, ovinas, caninas, felinas y de primates (p. ej., mono rhesus, chimpancé, etc.).

Las células pluripotentes utilizadas de acuerdo con los métodos de la descripción pueden ser células madre de origen natural o pueden ser células pluripotentes inducidas. Las células madre de origen natural ilustrativas incluyen, p. ej., células madre embrionarias. Los métodos de aislamiento de células madre embrionarias son bien conocidos. Véase, p. ej., Matsui et al., *Cell* 70:841, 1992; Thomson et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.843.780; Thomson et al., *Science* 282:114, 1998; Shambloott et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998; Shambloott et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.622; Reubinoff et al., *Nat. Biotech.* 18:399, 2000; documento PCT WO00/27995, Iannaccone et al., *Dev. Biol.* 163:288, 1994; Loring et al., documento PCT WO99/27076, Pain et al., *Development* 122: 2339, 1996; Patente de los Estados Unidos 5.340.740; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.656.479, de Wheeler et al., *Reprod. Fertil. Dev.* 6:563, 1994; Shim et al., *Biol. Reprod.* 57:1089, 1997. Las células madre descritas en la presente memoria pueden derivar de un blastocisto (p. ej., obtenido de un blastocisto) que se cultiva posteriormente en presencia de al menos un inhibidor de ALK5 y un inhibidor de Erk o MEK, opcionalmente con otros inhibidores como se describe en la presente memoria.

Se ha informado actualmente de numerosas maneras para inducir la pluripotencia en las células. La pluripotencia se puede inducir, por ejemplo, mediante la introducción de factores de transcripción o se puede inducir o imitar de otra manera la expresión de ciertos factores de transcripción. En algunas realizaciones, se expresan uno o más de los siguientes factores de transcripción de forma endógena o recombinante (p. ej., mediante la introducción de casetes de expresión heterólogos que expresan uno o más factores de transcripción). Las tecnologías ilustrativas para la inducción de pluripotencia incluyen, pero no se limitan a la introducción de al menos uno o más casetes de expresión para la expresión de al menos uno de Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (véase, p. ej., Takahashi, *Cell* 131(5): 861-872 (2007) *Cell Stem Cell* 2, 10-12 (2008)), opcionalmente con una o más moléculas pequeñas, incluyendo pero sin limitarse a, un agente que inhibe la metilación de H3K9, p. ej., una histona metiltransferasa G9a tal como BIX01294. Véase, p. ej., Kubicek, et al., *Mol. Cell* 473-481 (2007).

Las células pluripotentes de la descripción se pueden caracterizar por varios criterios. Además de la expresión génica, la metilación y las características *in vitro* e *in vivo* descritas en la presente memoria, las células pluripotentes de la descripción mantendrán la pluripotencia a lo largo de al menos una (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, etc.) divisiones

celulares en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína morfogénica ósea (BMP) o, alternativamente, bajo inhibición de la ruta de señalización de TGF $\beta$  y activina, inhibición de la ruta de señalización de MAPK y opcionalmente inhibición de la ruta de FGF. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, las células animales (p. ej., células humanas y de rata) en contacto con un inhibidor de ALK5 y un inhibidor de MEK se mantuvieron en pluripotencia a través de divisiones múltiples. Adicionalmente, como se describe en la presente memoria, la inhibición de la ruta de señalización de TGF $\beta$  y activina (p. ej., la señalización de TGF $\beta$ ) junto con la inhibición de MEK, FGFR y GSK3 tiene una fuerte actividad de reprogramación y puede promover la conversión parcial de EpiSC a un estado similar al de las mESC. Por el contrario, las hESC convencionales, las células madre de epiblasto (EpiSC) y las células pluripotentes inducidas humanas cultivadas en condiciones convencionales se diferencian cuando se ponen en contacto con un inhibidor de ALK5. Véase, p. ej., Saha et al., *Biophys. J.* 94:4123-4133 (2008). Se ha informado de que las hESC convencionales, las EpiSC y las células pluripotentes inducidas humanas cultivadas en condiciones convencionales, parecen depender de la actividad de la ruta de MAPK, FGF y TGF $\beta$ /Activina/Nodal para la auto-renovación y se diferencian rápidamente cuando se tratan con inhibidores de MEK, FGFR y/o ALK4/5/7 (Brons et al., *Nature* 448, 191-195, 2007; Li et al., *Differentiation* 75, 299-307, 2007; Peerani et al., *EMBO J* 26, 4744-4755, 2007; Tesar et al., *Nature* 448, 196-199, 2007). Adicionalmente, los autores de la presente invención han encontrado que las células de la descripción (p. ej., células humanas o de rata cultivadas como se describe en los ejemplos) mantienen la pluripotencia (es decir, no se diferencian) en presencia de un inhibidor de la ruta de señalización de FGF (p. ej., PD173074). En contraste, las hESC, EpiSC y las células pluripotentes inducidas humanas cultivadas en condiciones convencionales se diferencian cuando se ponen en contacto con PD173074. Particularmente, las mESC no se diferencian cuando se ponen en contacto con PD173074. Por lo tanto, las células de la presente descripción (p. ej., cultivadas como se describe en la presente memoria) están en un estado más similar al de las mESC que las hESC, EpiSC y células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente. Como las mESC, las células de la presente descripción tienen una morfología de colonias más compacta y abovedada, mientras que las hESC, las EpiSC y las células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente tienen una morfología de colonia plana. Al igual que las mESC, las células de la presente descripción tienen la capacidad de dar lugar a todos los tipos de células *in vitro*, y contribuyen a un animal completo *in vivo*, incluyendo la línea germinal, cuando se colocan de nuevo en blastocitos. Por el contrario, las hESC, EpiSC y las células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente son incapaces de incorporarse a la masa celular interna (MCI) y contribuir al quimerismo. Se apreciará que se pueden generar otras células animales aparte de la rata y el ser humano con características similares utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Las células animales adicionales ilustrativas incluyen, p. ej., perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, monos y chimpancés.

Ciertos marcadores son útiles para distinguir las células de la presente invención de las hESC, EpiSC y células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente. Por ejemplo, Stra8, Dppa3, Gbx2, Pecaml y Klf4 se expresan a un nivel más alto en las células humanas de la presente invención en comparación con sus niveles de expresión en hESC, epiSC y células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente. Por el contrario, muchos genes específicos del linaje, por ejemplo, Foxa2, Otx2, Lefty 1, Gata6, Sox17, Cer1, se expresan a un nivel más alto en epiSC y células ES humanas convencionales, en comparación con sus niveles de expresión en las células de la presente invención. Las células iPSC o ESC humanas cultivadas de forma convencional se diferencian cuando se tratan con los inhibidores de MEK, FGFR y/o ALK4/5/7 (Brons et al., *Nature* 448, 191-195, 2007; Li et al., *Differentiation* 75, 299-307, 2007; Peerani et al., *EMBO J* 26, 4744-4755, 2007; Tesar et al., *Nature* 448, 196-199, 2007).

En particular, Gbx2, Dppa3 y Klf4 son marcadores útiles para caracterizar las células animales pluripotentes de la invención. Estos marcadores están altamente expresados en las células pluripotentes de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células de la presente invención expresan estos marcadores a un nivel que es al menos 2 veces su nivel en las hESC, EpiSC y células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente, p. ej., células Hues9 (instalación de hES, Universidad de Harvard, <http://mcb.harvard.edu/melton/hues/>). En algunas realizaciones, los niveles de expresión de estos marcadores en las células pluripotentes de la invención son al menos 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más. Otros marcadores útiles incluyen un marcador Rex1 de MCI.

En algunas realizaciones, Gbx2 se expresa en las células pluripotentes de la invención a un nivel que es al menos 5 veces el de las células Hues9. En algunas realizaciones, Klf4 se expresa en las células pluripotentes de la invención a un nivel que es al menos 2,5 veces mayor que el de las células Hues9. En algunas realizaciones, Dppa3 se expresa en las células pluripotentes de la invención a un nivel que es al menos 2 veces mayor que el de las células Hues9.

Otro marcador útil para las células pluripotentes de la invención es la E-cadherina. Sin pretender limitar el alcance de la invención, se cree que la E-cadherina desempeña un papel en la pluripotencia de las células de la invención. En algunas realizaciones, la E-cadherina se expresa en las células pluripotentes de la invención a un nivel que es 2 veces superior al de las células Hues9.

Se pueden utilizar otros marcadores pluripotentes típicos para la caracterización de las células de la invención, p. ej., Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, SSEA4, TRA-1-61, TRA-1-81 y fosfatasa alcalina (ALP). Estos marcadores pluripotentes típicos, o un subconjunto de ellos, pueden ser útiles para distinguir las células pluripotentes de la

invención de hESC, EpiSC y células pluripotentes inducidas humanas convencionalmente cultivadas.

Se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica para caracterizar las células de la invención. Los niveles de expresión génica se pueden detectar mediante, p. ej., mediante PCR en tiempo real o RT-PCR en tiempo real (p. ej., para detectar ARNm), y/o mediante transferencia Western u otra técnica de detección de proteínas.

- 5 Las células pluripotentes de la invención se diferencian hacia los linajes del mesodermo en respuesta al tratamiento con BMP. Por el contrario, las hESC, las EpiSC y las células pluripotentes inducidas humanas cultivadas convencionalmente generan trofoblastos o células endodérmicas primitivas (Brons et al., *Nature* 448, 191-195, 2007, D'Amour et al., *Nat Biotechnol* 23, 1534-1541, 2005, Xu et al., *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264, 2002).

#### IV. Transformación

- 10 Cuando se desean células transformadas (p. ej., para generar iPSC o para expresar una proteína o ácido nucleico deseados), las células que se han puesto en contacto con los inhibidores de la descripción (p. ej., inhibidores de ALK5, inhibidores de MAPK, inhibidores de la ruta de FGF y opcionalmente inhibidores de GSK3 $\beta$ ) se pueden transformar antes del contacto y/o se pueden transformar después del contacto. Por ejemplo, una ventaja de la presente invención es que permite el mantenimiento de células pluripotentes a través de múltiples pases de células y por lo tanto permite manipulaciones y la selección subsiguiente de la progenie mientras se mantienen las características pluripotentes de las células. Esto es útil, entre otras cosas, para la generación de animales transgénicos, incluyendo la generación de animales con un gen desactivado ("knockout") por medio de eventos de recombinación específicos de la secuencia como se describe en la presente memoria.

- 20 Esta invención se basa en técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al, eds., 1994)).

- 25 En algunas realizaciones, en las que se desea una expresión positiva de una proteína, la especie de célula y proteína que se va a expresar es la misma. Por ejemplo, si se utiliza una célula de ratón, se introduce un ortólogo de ratón en la célula. Si se utiliza una célula humana, se introduce un ortólogo humano en la célula.

Se apreciará que cuando dos o más proteínas se han de expresar en una célula, se pueden utilizar uno o múltiples casetes de expresión. Por ejemplo, cuando un casete de expresión es para expresar múltiples polipéptidos, se puede utilizar un casete de expresión policistónico.

#### A. Vectores plasmídicos

- 30 En ciertas realizaciones, se contempla un vector plasmídico para su uso para transformar una célula anfitriona. En general, se utilizan vectores plasmídicos que contienen replices y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula anfitriona en conexión con estos anfitriones. El vector puede llevar un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas.

#### B. Vectores Virales

- 35 La capacidad de ciertos virus para infectar células o penetrar en las células a través de la endocitosis mediada por receptores, e integrarse en el genoma de la célula anfitrionas y expresar genes virales de manera estable y eficiente, los han convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos foráneos a células (p. ej., células de mamífero). A continuación se describen ejemplos no limitantes de vectores de virus que se pueden utilizar para suministrar un ácido nucleico de la presente invención.

- 40 i. Vectores adenovirales

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

- 50 ii. Vectores de AAV

El ácido nucleico se puede introducir en la célula utilizando la transfección asistida por adenovirus. Se han descrito incrementos en las eficacias de transfección en sistemas celulares utilizando sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994; Cotten et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-6098, 1992, Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64, 1994). El virus adeno-asociado (AAV) es un sistema vector atractivo porque tiene



una alta frecuencia de integración y puede infectar células que no se dividen, haciéndolo por lo tanto útil para el suministro de genes en células de mamífero, por ejemplo, en cultivo de tejidos (Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129, 1992) o in vivo. Los detalles relativos a la generación y uso de vectores de rAAV se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.139.941 y 4.797.368.

### 5                   iii. Vectores retrovirales

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

10       Con el fin de construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico (p. ej., un gen codificante de interés) en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que tiene una replicación defectuosa. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin la LTR y los componentes de empaquetamiento (Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento se introduce  
15       en una línea celular especial (p. ej., por precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante sea empaquetado en partículas virales, que a continuación se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubinstein, En: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodríguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, págs. 494-513, 1988; Temin, En: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), Nueva York: Plenum Press, págs. 149-188, 1986; Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983). Los medios que contienen los retrovirus recombinantes se recogen después, opcionalmente se concentran, y se utilizan para la transferencia génica. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable implican típicamente la división de las células anfitrionas (Paskind et al., *Virology*, 67:242-248, 1975).

25       Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., 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; Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los Virus de Inmunodeficiencia Humana: VIH-1, VIH-2 y el Virus de la Inmunodeficiencia de Simios: VIS. Se han generado vectores lentivirales por atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, se eliminan los genes env, vif, vpr, vpu y nef haciendo que el vector sea biológicamente seguro.

35       Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden utilizar para la transferencia de genes tanto in vivo y ex vivo como para la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, el lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide en donde una célula anfitriona adecuada es transfectada con dos o más vectores que llevan las funciones de empaquetamiento, a saber gag, pol y env, así como rev y tat se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.136. Se puede dirigir el virus recombinante por enlace de la proteína de la envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para el direccionamiento a un receptor de un tipo de célula particular. Mediante la inserción de una secuencia (que incluye una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor sobre  
40       una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de la diana.

### iv. Suministro utilizando virus modificados

Un ácido nucleico que se va a suministrar se puede alojar dentro de un virus infeccioso que ha sido modificado genéticamente para expresar un ligando de unión específico. La partícula del virus se unirá así específicamente a los receptores cognados de la célula diana y suministrará el contenido a la célula. Se desarrolló un nuevo enfoque  
45       diseñado para permitir el direccionamiento específico de los vectores de retrovirus basándose en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la envoltura viral. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos a través de receptores de sialoglicoproteína.

Se diseñó otro enfoque para dirigir retrovirus recombinantes en el que se utilizaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envuelta retroviral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través  
50       de los componentes de biotina mediante el uso de estreptavidina (Roux et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989). Utilizando anticuerpos contra antígenos de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad, demostraron la infección de una variedad de células humanas que portaban esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico in vitro (Roux et al., 1989).

### C. Suministro de vectores y transformación de células

55       Se cree que los métodos adecuados para el suministro de ácido nucleico para la transformación de una célula, un tejido o un organismo para su uso con la presente invención incluyen virtualmente cualquier método mediante el cual un ácido nucleico (p. ej., ADN) pueda ser introducido en una célula, un tejido o un organismo, como se describe en la presente memoria o como sería conocido por un experto en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a,

el suministro directo de ADN, por ejemplo mediante transfección ex vivo (Wilson et al., *Science*, 244:1344-1336, 1989, Nabel y Baltimore, *Nature* 326:711-713, 1987), opcionalmente con Fugene6 (Roche) o Lipofectamine (Invitrogen), por inyección (Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, *J Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.789.215, incorporada a la presente memoria como referencia); por electroporación (Patente de Estados Unidos Núm. 5.384.253, Tur-Kaspa et al., *Mol Cell Biol.*, 6:716-718, 1986, Potter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984); por precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973, Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990); utilizando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987; Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980; Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989; Kato et al., *J Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, *J. Biol Chem.*, 262:4429-4432, 1987); y cualquier combinación de tales métodos.

#### V. Cultivo de células

Las células pluripotentes, incluyendo las células madre embrionarias y las células en las que se ha inducido, o se va a inducir, pluripotencia se pueden cultivar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Como se describe en la presente memoria, las células pluripotentes se pueden cultivar con un inhibidor de ALK5 y uno de un inhibidor de MEK o Erk, opcionalmente con un inhibidor de GSK3 $\beta$  y/o LIF. Los medios de cultivo pueden incluir cualquier otro componente de los medios de cultivo como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, los medios de cultivo incluyen componentes de medios basales para la supervivencia celular (p. ej., vitaminas y minerales, opcionalmente en una condición isotónica). Un medio basal ilustrativo es DMEM o una variación del mismo, tal como DMEM Knockout. El cultivo se puede suplementar adicionalmente con reemplazo de suero Knockout (KSP). Los cultivos de la invención pueden incluir una o más fuentes de carbono. En algunas realizaciones, los cultivos comprenden L-alanil-L-glutamina. Los cultivos pueden incluir suero o pueden estar libres de suero.

En algunas realizaciones, las células se cultivan en contacto con células alimentadoras. Las células alimentadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, p. ej., fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), o células alimentadoras CF1 inactivadas por rayos X. Los métodos de cultivo de células sobre células alimentadoras son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, las células se cultivan en ausencia de células alimentadoras. Las células, por ejemplo, se pueden anclar directamente a una superficie de cultivo sólida (p. ej., una placa de cultivo), p. ej., a través de una traba molecular. Los autores de la presente invención han descubierto que cultivar células en las que se ha inducido pluripotencia tiene una eficacia mucho mayor de inducción de pluripotencia (es decir, una mayor porción de células alcanza la pluripotencia) cuando las células se anclan directamente a la superficie de cultivo sólida en comparación con la eficacia de células tratadas de forma idéntica que se cultivan sobre células alimentadoras. Las trabas moleculares ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, matrigel, una matriz extracelular (ECM), análogos de ECM, laminina, fibronectina o colágeno. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que esta es una lista no limitante y que se pueden utilizar otras moléculas para anclar células a una superficie sólida. Los métodos para el anclaje inicial de las trabas a la superficie sólida son conocidos en la técnica.

#### VI. Usos de células pluripotentes

La presente invención permite el estudio y desarrollo adicionales de tecnologías de células madre, incluyendo, pero sin limitarse a, usos profilácticos o terapéuticos. Por ejemplo, las células de la descripción (células pluripotentes cultivadas en los inhibidores de la invención) o células derivadas de tales células e inducidas para que se diferencien a lo largo de un destino celular deseado) se pueden introducir en individuos que lo necesiten, incluyendo, pero sin limitarse a, individuos que necesitan la regeneración de un órgano, tejido o tipo celular. Las células se pueden obtener originalmente en una biopsia de un individuo; inducir pluripotencia como se describe en la presente memoria, inducir opcionalmente su diferenciación (por ejemplo en una célula progenitora deseada particular) y a continuación trasplantar de nuevo al individuo. Las células pueden ser modificadas genéticamente antes de su introducción en el individuo.

En algunas realizaciones, las células pluripotentes generadas de acuerdo con los métodos de la invención son inducidas subsiguientemente a formar, por ejemplo, células hematopoyéticas (madre/progenitoras), células neurales (madre/progenitoras) (y opcionalmente, células más diferenciadas, tales como neuronas de subtipos específicos, oligodendrocitos, etc.), células pancreáticas (p. ej., células progenitoras endocrinas o células que expresan hormonas pancreáticas), hepatocitos, células cardiovasculares (madre/progenitoras) (p. ej., cardiomiocitos, células endoteliales, células del músculo liso), células de la retina, etc.

Se conoce una diversidad de métodos para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en tipos de células deseados. Una lista no limitante de publicaciones de patentes recientes que describen métodos para inducir la diferenciación de células madre en varios destinos celulares es la siguiente: Publicación de Patente de los

Estados Unidos Núm. 2007/0281355; 2007/0269412; 2007/0264709; 2007/0259423; 2007/0254359; 2007/0196919; 2007/0172946; 2007/0141703; 2007/0134215.

Una variedad de enfermedades puede ser mejorada mediante la introducción, y opcionalmente el direccionamiento, de células pluripotentes de la invención a un tejido o tejido dañado particular en los que las células pluripotentes generarán un beneficio. Los ejemplos de enfermedades que resultan de la lesión tisular incluyen, pero no se limitan a, 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, quemaduras, heridas suturadas, laceración, heridas incisas, heridas por mordedura, dermatitis, queloides cicatriciales, queloides, úlcera diabética, úlcera arterial y úlcera venosa.

Se pueden generar animales transgénicos no humanos a partir de células pluripotentes incubadas con los inhibidores de la invención. Tales células pueden ser células transgénicas, líneas con un gen desactivado (p. ej., que comprenden uno o más genes desactivados que introducen un marcador seleccionable a través de recombinación específica del sitio). Las células pluripotentes no humanas incubadas con los inhibidores descritos en la presente memoria se pueden introducir en un blastocisto de un animal no humano compatible y posteriormente se pueden introducir en un útero receptivo de un animal y la progenie resultante se puede seleccionar para determinar células derivadas de las células pluripotentes (p. ej., a través de un marcador seleccionable u otras características fenotípicas tales como el color de la piel). Se puede identificar la progenie quimérica y se pueden establecer líneas que pasen las características (p. ej., un transgén) de las células pluripotentes a la progenie. Se pueden establecer líneas de animales homocigotos cruzando animales hermanos.

La descripción proporciona la generación de cualquier tipo de animal transgénico no humano de acuerdo con los presentes métodos. Los animales ilustrativos incluyen mamíferos no humanos y primates no humanos. Los animales ilustrativos incluyen, p. ej., ratones (incluyendo ratones SCID), ratas, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, monos y chimpancés.

El cultivo de células con los inhibidores de la invención, y por lo tanto el mantenimiento de la pluripotencia de las células, permite convenientemente el escrutinio de fenotipos celulares, respuestas a fármacos y también permite el escrutinio de bibliotecas de compuestos u otros agentes (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, o anticuerpos) para determinar la capacidad de modular el fenotipo de una célula pluripotente o para inducir una respuesta celular deseada. Los escrutinios de bibliotecas se pueden diseñar para escrutar la capacidad de un miembro de la biblioteca de afectar esencialmente a cualquier fenotipo deseado. Los fenotipos ilustrativos pueden incluir, por ejemplo, diferenciación celular, apoptosis u otra muerte celular, supervivencia celular, muerte u otro fenotipo en presencia de un compuesto o fármaco adicionales de interés, etc.

Los agentes de la biblioteca pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los agentes de ensayo serán pequeñas moléculas químicas y péptidos. Esencialmente, se puede utilizar cualquier compuesto químico como agente potencial en los análisis de la descripción, aunque muy a menudo se utilizan compuestos que se puedan disolver en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente con una base de DMSO). Los análisis están diseñados para escrutar bibliotecas químicas grandes automatizando las etapas del análisis y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente a los análisis, los cuales típicamente se ejecutan en paralelo (p. ej., en formatos de microtitulación sobre placas de microtitulación en análisis robóticos). Se apreciará que hay muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza).

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica, combinando una serie de "bloques de construcción" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, se forma una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos combinando un conjunto de bloques de construcción químicos (aminoácidos) en todas las formas posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos de un compuesto polipeptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de tal mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos.

La preparación y el escrutinio de bibliotecas químicas combinatorias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37: 487-493 (1991) y Houghton et al., *Nature* 354:84-88 (1991)). También se pueden usar otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (p. ej., Publicación PCT Núm. WO 91/19735), péptidos codificados (p. ej., publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (p. ej., Publicación PCT Núm. WO 92/00091), benzodiazepinas (p. ej., Patente de los Estados Unidos 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga de

bibliotecas de compuestos pequeños (Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., *Science* 261:1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook, todos más arriba), bibliotecas de ácidos peptidonucleicos (véase, p. ej., 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, p. ej., Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, p. ej., Liang et al., *Science*, 274:1520-1522 (1996) y Patente de los Estados Unidos 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, p. ej., benzodiazepinas, Baunn C&EN, 18 Enero, página 33 (1993); isoprenoides, Patentes de los Estados Unidos 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de los Estados Unidos 5.549.974; pirrolidinas, Patentes de los Estados Unidos 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de los Estados Unidos 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles comercialmente (véase, p. ej., 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están disponibles comercialmente (véase, p. ej., ComGenex, Princeton, NJ, Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.)

### EJEMPLOS

RESUMEN: Aquí, los autores de la presente invención informaron del establecimiento satisfactorio de iPSC de rata novedosas (riPSC), que podían mantenerse homogéneamente mediante LIF y un cóctel de inhibidor de ALK5, inhibidor de GSK3 e inhibidor de MEK. Las riPSC comparten las características de las ESC de ratón y lo más importante pueden contribuir ampliamente a las quimeras. Los autores de la presente invención también generaron iPSC humanas novedosas (hiPSC) con características de tipo "ESC de ratón", que podían mantenerse sorprendentemente en cultivo en presencia de inhibidor de MEK e inhibidor de ALK5. Los autores de la presente invención proponen que sus experimentos proporcionarán un marco para generar células madre pluripotentes mediante la reprogramación a partir de rata u otras especies, cuyas auténticas células madre embrionarias aún no están disponibles.

Ejemplo 1:

Este ejemplo demuestra la generación y mantenimiento de células pluripotentes de rata.

Generación de riPSC novedosas a partir de células WB-F344 por transducción viral de *Oct4/Klf4/Sox2* y cócteles químicos. Se transdujo WB-F344, una línea celular progenitora de hígado de rata diploide (Grisham et al., *Proc Soc Exp Biol Med* 204, 270-279 (1993)) con *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* por medio de retrovirus y a continuación se dividieron sobre células alimentadoras MEF en medio para mESC convencional. Se observaron colonias de tipo ESC compactas y positivas para fosfatasa alcalina (ALP) 10 días después de la transducción (la eficacia es de aproximadamente 0,4%) (Figura 1A). Sin embargo, cuando se recolectaron las colonias de tipo ESC y se subcultivaron en el mismo medio, rápidamente se diferenciaron y perdieron la morfología de las ESC (Figura 1B), lo que sugiere que las condiciones del medio para mESC convencional no son suficientes para mantener la pluripotencia de las riPSC. Dada la noción de que las moléculas pequeñas pueden inhibir las rutas clave de inducción de la diferenciación, los autores de la presente invención y otros han identificado previamente y utilizado pequeñas moléculas para apoyar la auto-renovación de las mESC de una manera más robusta (Schugar et al., *Gene Ther* 15, 126-135), Xu et al., *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264 (2002)). Basándose en dicha estrategia química y en las diferencias de señalización para el mantenimiento de la auto-renovación de las mESC y las EpiSC/hESC, los autores de la presente invención seleccionaron el inhibidor de MEK PD0325901, el inhibidor de ALK5 (el principal receptor de tipo I de la señalización de TGF $\beta$ ) A-83-01, el inhibidor de GSK3 $\beta$  CHIR99021, y el inhibidor de FGFR PD173074, y se sometieron a ensayo los efectos de diferentes combinaciones de moléculas pequeñas sobre el mantenimiento de la pluripotencia de las riPSC. Utilizando una combinación de PD0325901 0,5  $\mu$ M y CHIR99021 3  $\mu$ M, las riPSC se pueden mantener a corto plazo en el cultivo, pero mostrando amplia diferenciación espontánea (Figura 1C). Después de pases seriados, las células crecidas en estas condiciones proliferaron más lentamente y el cultivo se deterioró debido a la proliferación de células diferenciadas. Estudios recientes demostraron que PD0325901 combinado con CHIR99021 e inhibidor de FGFR PD173074 pueden mantener la pluripotencia de las mESC de una manera independiente de LIF (Ying et al., *Cell* 115, 281-292 (2003)). Sin embargo, de un modo similar a la combinación de PD0325901 y CHIR99021, con la inclusión de PD173074 (0,1  $\mu$ M) en el medio no mostró ningún beneficio adicional. Debido a que la señalización de Activina A/Nodal es importante para mantener el estado indiferenciado de las hESC y las EpiSC, pero prescindible para la auto-renovación de las mESC, los autores de la presente invención sometieron a ensayo si la combinación de PD0325901, CHIR99021 y el inhibidor de TGF- $\beta$  A-83-01 podía suprimir la diferenciación y promover la auto-renovación de las riPSC. Curiosamente, con la combinación de PD0325901 0,5  $\mu$ M, CHIR99021 3  $\mu$ M y A-83-01 0,5  $\mu$ M, las riPSC crecían como una población más homogénea y la diferenciación espontánea se inhibía sustancialmente (Figura 1D). En estas condiciones, la eficacia de expansión clonal también aumentó significativamente en comparación con la combinación de PD0325901 y CHIR99021 (Figura 5). Por otra parte, aunque LIF en sí no era suficiente para sostener la auto-renovación de riPSC, sólo se observaron colonias muy pequeñas positivas para ALP y no se podían mantener a largo plazo en ausencia de LIF (Figura 5). Por otra parte, se requería el único cóctel de inhibidores químicos para la auto-renovación a largo plazo de las riPSC. Las riPSC se han cultivado en presencia de LIF, PD0325901, A-83-01 y CHIR99021 durante más

de 30 pases sin diferenciación obvia ni disminución de la proliferación, pero pierden la morfología ESC y se diferencian en un pase después de que los inhibidores químicos se eliminen del medio. En estas condiciones, las riPSC son similares a las mESC convencionales en la formación de colonias abovedadas típicas en cultivo (Figura 1E). La inmunocitoquímica reveló que las riPSC expresaban marcadores típicos de mESC, tales como *Oct4* (Figura 1F), *Sox2* (Figura 1G), SSEA-I (Figura 1H, Verde), *Nanog* (Figura 1H Rojo), pero eran negativos para los marcadores de hESC, tales como SSEA3, SSEA4 y TRA-1-81. El análisis de RT-PCR de cuatro líneas de riPSC clonales utilizando cebadores de genes de rata confirmó la expresión de *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *Rex-1*, *TDGF2*, *FGF4* y *Eras* (Figura 1I) endógenos de rata. Utilizando los cebadores específicos para transgenes, el análisis de RT-PCR reveló que los genes *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* de ratón transducido fueron en gran medida silenciados (Figura 1I). El análisis del estado de metilación del promotor *Oct4* de rata mostró metilación diferencial entre las riPSC y las células WB-F344. Los clones de riPSC exhibieron un patrón de desmetilación casi completo y es distinto del de las células WB-F344 parentales (Figura 1J). En particular, las riPSC comparten características moleculares comunes con las mESC, especialmente expresan Rex-1 y ALP, marcadores de ESC y de epiblastos tempranos que están ausentes en los epiblastos en fase de post-implantación y EpiSC.

Las riPSC son células madre pluripotentes *in vitro* e *in vivo*. Para examinar el potencial de desarrollo de las riPSC, se realizó un análisis de diferenciación *in vitro*. La inmunotinción mostró que las riPSC podían diferenciarse en derivados de endodermo (Albumina y Pdx1) (Figura 2A, 2B), neuroectodermo (tubulina  $\beta$ III, Tuj1) (Figura 2C) y mesodermo (Brachyury) (Figura 2D) a partir de los métodos de diferenciación convencionales del cuerpo embrioide. A continuación, los autores de la presente invención examinaron el potencial de desarrollo de las riPSC *in vivo*. Después del trasplante a ratones con Inmunodeficiencia Severa Combinada (*SCID*), las riPSC formaban teratoma, que consistía en las tres capas germinales incluyendo la estructura de tipo neuroepitelio (ectodermo), epitelio de las vías respiratorias (endodermo), estructura de tipo cartilago (mesodermo) y músculo liso (mesodermo) (Figura 2E ~ 2H). Más notablemente, después de haber sido inyectados en blastocistos de rata Brown-Norway (piel negra) (n = 18), nacieron tres ratas y todas mostraron quimerismo extensivo de color de capa (Figura 2I). Sin embargo, no se ha detectado todavía ninguna transmisión de línea germinal. Tomados en conjunto, los resultados anteriores definieron las riPSC de los autores de la presente invención, distintas de las EpiSC de rata, como una línea de células madre de rata de tipo mESC pluripotente.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra medios de cultivo para inducir y mantener células pluripotentes humanas en un estado análogo al de las células madre embrionarias de ratón.

A diferencia de las mESC, la señalización de bFGF y TGF $\beta$ /Activina/Nodal es esencial para mantener la auto-renovación de las hESC y EpiSC convencionales. La inhibición de las señales de TGF $\beta$ /Activina/Nodal o FGFR provoca una diferenciación drástica y rápida de las hESC y EpiSC en las condiciones convencionales de cultivo de hESC. Recientemente, se han generado células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) a partir de fibroblastos mediante la expresión de *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* o *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* en condiciones de cultivo de bFGF (Dimos et al., *Science*, 321, 1218-1221 (2008), Lowry et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2883-2888 (2008); Nakagawa et al., *Nat Biotechnol* 26, 101-106 (2008); Takahashi et al., *Cell* 131, 861-872 (2007); Yu et al., *Science* 318, 1917-1920 (2007)). Tales hiPSC se parecen mucho a las hESC y EpiSC convencionales en los requisitos de señalización para la auto-renovación y la morfología celular. Basándose en los estudios con ratas, los autores de la presente invención exploraron si se podría capturar y mantener un estado de pluripotencia similar al de las mESC para las células madre pluripotentes humanas. Sorprendentemente, los autores de la presente invención encontraron que las hiPSC podían ser eficazmente generadas a partir de fibroblastos humanos IMR90 por medio de la expresión viral de *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* en el medio de mESC que contenía hLIF con un calendario y una eficacia similares (Figura 3 A, 15~20 colonias de células iPS de  $1 \times 10^5$  células transducidas de promedio) a la de las condiciones convencionales (Yu et al., *Science* 318, 1917-1920 (2007)), y se seleccionaron y expandieron posteriormente mediante la adición del cóctel químico de inhibidores de ALK5, GSK3 y MEK. Tales hiPSC se renuevan a largo plazo y de forma homogénea (> 20 pases) bajo hLIF y el cóctel químico de PD0325901, A-83-01 y CHIR99021 (Figura 3B). En contraste con las hESC convencionales, estas hiPSC formaron colonias abovedadas positivas para ALP similares a mESC (Figura 3C), eran resistentes al inhibidor de MEK y al inhibidor de ALK5, mientras que la línea de hESC convencional H1 se diferenciaba rápidamente en las mismas condiciones. Estas hiPSC expresan de forma homogénea los marcadores de pluripotencia típicos, tales como *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, TRA-1-81, SSEA3 y SSEA-4 (Figura 3D-3I). El análisis mediante RT-PCR de cuatro líneas clonales de hiPSC en tales condiciones confirmó la expresión de *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, Rex-1, TDGF2 y FGF4 humanos endógenos (Figura 3J). Mediante el uso de los cebadores específicos para transgenes, el análisis de RT-PCR reveló que los genes *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* transducidos eran silenciados en gran parte (Figura 3J). Por otra parte, estas hiPSC mostraron patrones de metilación del ADN similares en el promotor *Oct4* como las ESC humanas H1 y eran distintos de los de fibroblastos IMR90 parentales (Figura 3K). De un modo similar a las riPSC, el cóctel inhibitor fue necesario para mantener la morfología de las colonias abovedadas y la auto-renovación *in vitro* a largo plazo de las hiPSC. La eliminación del cóctel inhibitor utilizado hizo que las células perdieran la morfología de las colonias en un pase. La eliminación de hLIF del medio no mostró efectos inmediatos/drásticos sobre las células. Sin embargo, hLIF parece ser útil para el cultivo a largo plazo de las hiPSC. Cuando se cultiva en medio que contiene los inhibidores químicos pero sin hLIF, el cultivo de hiPSC se deteriora gradualmente y no se puede pasar homogéneamente más allá de 10 pases. Sin embargo, queda por determinar el mecanismo de señalización exacto en la auto-renovación de estas

nuevas hiPSC.

Es importante destacar que la inmunocitoquímica confirmó que tales nuevas hiPSC podrían diferenciarse *in vitro* en derivados de endodermo (Albúmina) (Figura 4A), neuroectodermo (tubulina  $\beta$ III, Tuj1) (Figura 4B) y mesodermo (Brachyury) (Figura 4C). Además, después de ser transplantadas a los ratones SCID, tales hiPSC formaron teratoma, que consistía en las tres capas germinales incluyendo estructura de tipo neuroepitelio (ectodermo) (Figura 4D), estructura de tubo epitelial (endodermo) (Figura 4D) y estructura similar a cartílago (mesodermo) (Figura 4E). Tomados en conjunto, los resultados anteriores sugieren que una célula madre pluripotente humana de tipo mESC puede ser capturada y mantenida a largo plazo.

#### Discusión

Aunque se han establecido células madre embrionarias a partir de ratones desde 1981 (Martin, G. R., *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7634-7638 (1981)), los intentos de derivar sus contrapartes a partir de otros animales tales como rata, no han tenido éxito completo (Demers et al., *Cloning Stem Cells* 9, 512-522 (2007); Ruhnke et al., *Stem Cells* 21, 428-436 (2003), 2003; Schulze et al., *Methods Mol Biol* 329, 45-58 (2006); Ueda et al., "Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats", *PLoS ONE* 3, e2800 (2008)). Al combinar la reprogramación genética y el enfoque químico, los autores de la presente invención han sido capaces de generar nuevas células pluripotentes de rata y humanas de tipo mESC que comparten características clave de las mESC convencionales en la morfología de las colonias y los requisitos de cultivo/respuestas de señalización. Bajo el singular cóctel de pequeñas moléculas, las riPSC estables de los autores de la presente invención fueron capaces de contribuir ampliamente al quimerismo *in vivo*. Las ratas son más adecuadas para estudios fisiológicos y de comportamiento y son un excelente modelo para enfermedades humanas multigénicas. Sin embargo, la utilización de este modelo inestimable se vio obstaculizada debido a la indisponibilidad de células madre de rata que sean pluripotentes *in vivo*. El establecimiento por parte de los autores de la presente invención de células pluripotentes de rata y la estrategia de utilizar los cócteles químicos adecuados allanará el camino para generar ratas dirigidas por genes para investigaciones biomédicas. Las hiPSC de los autores de la presente invención crecieron de forma más robusta y parecían representar un nuevo estado pluripotente que era similar al de las mESC convencionales y diferente del de las hESC convencionales.

Tomados en conjunto, tales hallazgos subrayan la ventaja única del enfoque químico, y señalan la importancia de inhibir la vía de TGF- $\beta$  para mantener el estado pluripotente de tipo mESC de células de rata y de ser humano. Los estudios de los autores de la presente invención proporcionan colectivamente un marco para generar células madre pluripotentes mediante la reprogramación o derivar ESC de la fase de MCI temprana de ratas u otras especies, cuyas células madre embrionarias todavía no están disponibles.

#### Procedimientos experimentales

Cultivo celular y transducción viral: Se transdujeron células WB-F344 de rata diploides (Grisham et al., *Proc Soc Exp. Biol. Med.* 204, 270-279 (1993)), una amable donación del Profesor William B. Coleman de la Universidad de Carolina del Norte, en el pase 7 por medio de retrovirus basados en pMX para *Oct4*, *Klf4* y *Sox2* (Addgene) de ratón como se describe (Takahashi, K. y Yamanaka, S., *Cell* 126, 663-676 (2006)). A las 24 horas, se sembraron  $1 \times 10^5$  células WB-F344 transducidas sobre MEF de CF1 inactivados con rayos X en una placa de 100 mm y se incubaron con medio de crecimiento para mESC: DMEM Knockout<sup>TM</sup>, sustitución de suero Knockout al 20%, Glutamax al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM y  $10^3$  U/ml mLIF (Millipore). Después de 10 días, las colonias de riPSC se recolectaron para determinar la expansión sobre células alimentadoras de MEF en medio de crecimiento para mESC, y se trataron con el inhibidor de MEK PD0325901 (Stemgent, 0,5  $\mu$ M), el inhibidor de ALK5 A-83-01 (Tocris Bioscience, 0,5  $\mu$ M) y el inhibidor de GSK3 $\beta$  CHIR99021 (Stemgent, 3  $\mu$ M).

Se cultivaron fibroblastos humanos IMR90 (ATCC Núm. CCL-186) y se transdujeron por medio de lentivirus basados en pSin-EF2-Puro para *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* (Addgene) humanos como se ha descrito (Yu et al., *Science* 318, 1917-1920 (2007)). A las 24 horas, se sembraron  $1 \times 10^5$  células IMR-90 transducidas sobre las células alimentadoras de MEF de CF1 inactivadas por rayos X en una placa de 100 mm. A las 24 horas, el medio se cambió por medio para mESC con un suplemento de  $10^3$  U/ml de hLIF (Millipore). Después de tres semanas, se observaron las colonias de hiPSC y se recogieron en la cuarta semana después de la infección para determinar expansión sobre células alimentadoras en el mismo medio que contenía el inhibidor de MEK PD0325901 (0,5  $\mu$ M), el inhibidor de ALK5 A-83-01 (0,25  $\mu$ M) y GSK3 $\beta$  inhibidor CHIR99021 (3  $\mu$ M).

Inyección de blastocistos: Los blastocistos se recuperaron del útero de hembras Brown-Norway (BN) a los 4,5 días después del coito. Los blastocistos se colocaron en una gota de HEPES bajo aceite mineral. Se inyectaron 8-15 riPSC en la cavidad del blastocisto utilizando una pipeta de microinyección. Después de la inyección, los blastocistos se transfirieron a hembras receptoras pseudo-prefiadas. Todos los procedimientos con animales estaban de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud.

#### Datos suplementarios

Los datos suplementarios incluyen los procedimientos experimentales suplementarios, una tabla y una figura.

## Procedimientos experimentales suplementarios:

Diferenciación de iPSC *in vitro*: La diferenciación *in vitro* de riPSC o hiPSC se llevó a cabo mediante los métodos convencionales de diferenciación de cuerpos embrioides. Las riPSC o hiPSC se disociaron con tripsina-EDTA al 0,05% y se cultivaron en una placa de 100 mm de anclaje ultrabajo en medio DMEM con un suplemento de FBS al 10% para formar los cuerpos embrioides (EB). El medio se cambió cada dos días. Una semana más tarde, se recogieron los EB y se transfirieron a una placa de 6 pocillos recubierta con Matrigel en medio DMEM con FBS al 10%. Tres a siete días después, las células se fijaron para el análisis inmunocitoquímico. Todos los productos de cultivo celular fueron de Invitrogen/Gibco BRL excepto cuando se menciona.

Análisis citoquímico y de inmunofluorescencia: Se realizó tinción con fosfatasa alcalina de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando el kit de Detección de Fosfatasa Alcalina (Millipore). Para el análisis de inmunofluorescencia, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich). Las células fijas se incubaron a continuación en tampón de bloqueo, Triton X-100 al 0,1% y suero de burro normal al 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) en PBS (Invitrogen/Gibco BRL) durante 30 min a temperatura ambiente (RT). Las células se incubaron después con anticuerpo primario durante la noche a 4°C en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% durante una hora a RT. Se utilizaron anticuerpo anti-Oct4 de ratón (1:250) (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-Sox2 de conejo (1:2000) (Chemicon), anticuerpo anti-SSEA1 de ratón (1:250) (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-Nanog de conejo (1:500) (Abcam), anticuerpo anti-SSEA3 de rata (1:1000) (Chemicon), anticuerpo anti-SSEA4 de ratón (1:1000) (Chemicon), anticuerpo anti-TRA-1-81 de ratón (1:1000) (Chemicon), anti-Pdx1 de conejo (1:5000), una donación del Dr. C. Wright (Vanderbilt University, TN), anticuerpo anti-tubulina  $\beta$ III (Tuj1) de ratón (1:1000) (Covance Research Products), anticuerpo anti-albúmina de conejo (1:1000) (DAKO) como anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 486/555 de burro anti-IgG de ratón, anti-IgG de rata, anti-IgG de cabra o anti-IgG de conejo (1:500) (Invitrogen). Los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (Sigma-Aldrich). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

Análisis de RT-PCR: Se extrajo ARN de las riPSC e hiPSC utilizando el RNeasy Plus Mini Kit combinado con QIAshredder (Qiagen). La transcripción inversa se realizó con 1  $\mu$ g de ARN utilizando iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit (BioRad). La amplificación de genes específicos se realizó utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 1. Las condiciones de la PCR fueron 95°C durante 5 minutos, 94°C durante 30 segundos, temperatura de reasociación durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, 25-35 ciclos y después 72°C durante 10 minutos. Para el estudio de metilación del promotor Oct4 utilizando secuenciación de bisulfito, se aislaron los ADN de las células WB-F344, riPSC, IMR90, e hiPSC utilizando el Kit de Aislamiento de ADN No Orgánico (Millipore). Los ADN se trataron a continuación con el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research Corp., Orange, CA). Los ADN tratados se utilizaron después como moldes para amplificar secuencias de interés. Los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento del promotor Oct4 se mostraron en la Tabla 1. Los fragmentos resultantes se clonaron utilizando el Kit TOPO TA Cloning para la secuenciación (Invitrogen) y se secuenciaron.

Formación de teratoma: Se recolectaron las riPSC o hiPSC pasadas en serie utilizando tripsina-EDTA al 0,05%. Se inyectaron entre tres y cinco millones de células bajo la cápsula renal de ratones SCID (n = 3). Después de 4-5 semanas, todos los ratones desarrollaron teratomas, que se retiraron y luego se analizaron histológicamente.

Tabla 1: Lista de información de los cebadores para la PCR

| Genes                                | Cebador directo               | Cebador inverso               | Tamaño (pb) |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| <i>Para RT-PCR (células rata)</i>    |                               |                               |             |
| Oct4 rata                            | TACTGCCCCGCCCCAGCG            | GCTGCTTGGCAATGCTAGT           | 449         |
| Sox2 rata                            | AAGGCCGTGCACGCCGA<br>CGA      | ACCACACCATGAAGGCATTC<br>AT    | 285         |
| Nanog rata                           | TAGCCCTGATTCTTCTA<br>GCA      | TTTGCTGCAACGGCACATAA          | 617         |
| Rex-1 rata                           | AAATCATGACGAGGCA<br>AGGC      | TGAGTTCGCTCCAACAGTCT          | 350         |
| Klf4 rata                            | CAGACCTGGAAAGTGGT<br>GG       | ACCTGTGTTGCCCCGAGCC           | 283         |
| TDGF2 rata                           | AACACCAACAATATTTT<br>ATGTGGCC | TCATTTCTAGGAAAAGGCAG<br>ATGC  | 511         |
| FGF-4 rata                           | TGTGGTGAGCATCTTCG<br>GAGTGG   | CCTTCTTGGTCCGCCCCGTTC<br>TTA  | 198         |
| Eras rata                            | GCTGCCCCTCAGCCGAC<br>TGCTACT  | CACTGCCITTGTACTCCGGTA<br>GCTG | 210         |
| Oct4 transgénico                     | GGGGTGGACCATCCTCT<br>A        | CCTCCGCAGAACTCGTAT            | 271         |
| Sox2 transgénico                     | CCCACCGCCCTCAAAGT<br>A        | GGACCATAACCATGAAGGCG<br>TT    | 278         |
| Klf4 transgénico                     | CCCACCGCCCTCAAAGT<br>A        | GCTGGACGCAGTGTCTTCT           | 190         |
| GADPH                                | CCTTCATTGACCTCAAC<br>TAC      | GGAAGGCCATGCCAGTGAG<br>C      | 594         |
| <i>Para RT-PCR (células humanas)</i> |                               |                               |             |
| Oct4 endógeno                        | AGTTTGTGCCAGGGTTT<br>TTG      | ACTTCACCTTCCCTCCAACC          | 113         |
| Nanog                                | TTTGGAAGCTGCTGGGG             | GATGGGAGGAGGGGAGAGG           | 194         |



| Genes                            | Cebador directo              | Cebador inverso              | Tamaño (pb) |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------|
| endógeno                         | AAG                          | A                            |             |
| Sox2 endógeno                    | CAAAAATGGCCATGCAG GTT        | AGTTGGGATCGAACAAAAG CTATT    | 162         |
| Rex-1                            | CAGATCCTAAACAGCTC GCAGAAT    | GCGTACGCAAATTAAAGTCC AGA     | 307         |
| FGF-4                            | CTACAACGCCTACGAGT CCTACA     | GTTGCACCAGAAAAGTCAG AGTTG    | 369         |
| TDGF2                            | CTGCTGCCTGAATGGGG GAACCTGC   | GCCACGAGGTGCTCATCCAT CACAAGG | 242         |
| Oct4 transgénico                 | CAGTGCCCGAAACCCAC AC         | AGAGGAACTGCTTCCTTCAC GACA    | 656         |
| Sox2 transgénico                 | TACCTCTTCTCCCACTC CA         | AGAGGAACTGCTTCCTTCAC GACA    | 467         |
| Nanog transgénico                | CAGAAGGCCTCAGCACC TAC        | AGAGGAACTGCTTCCTTCAC GACA    | 732         |
| GADPH                            | GTGGACCTGACCTGCCG TCT        | GGAGGAGTGGGTGTCGCTG T        | 152         |
| Para secuenciación con bisulfito |                              |                              |             |
| Oct4 rata                        | ATGGGATTTTGGAGGAT TTTTAG     | CTCAAACCCAAATACCCCTA CTT     | 206         |
| Oct4 humano                      | GGATGTTATTAAGATGA AGATAGTTGG | CCTAAACTCCCCTTCAAAT CTATT    | 406         |

#### Ejemplo de Referencia 3 Obtención de células madre embrionarias de rata

Para obtener células ES de rata a partir de blastocistos, se siembran blastocistos de rata con la zona pelúcida retirada (E4.5) sobre células alimentadoras CF1 inactivadas con rayos X con el medio DMEM Knock-out con un  
 5 remplazo de suero Knock-out al 20% (KSR), aminoácidos no esenciales al 1%, 1000 U/ml de LIF de ratón, Glutmax al 1%, CHIR99021 3 µM, PD0325901 0,5 µM, A-83-01 0,25 µM (o SB431542 2 µM). Después de 3-5 días, los grupos de células derivadas de MCI se disociaron por medio de Accutase y se transfirieron a nuevos alimentadores. Se recogieron colonias con morfología de células ES típicas, se disociaron con Accutase y a continuación se sembraron en nuevos alimentadores. Las células ES de rata establecidas se cultivaron con el medio anterior y se pasaron  
 10 aproximadamente cada 3 días (1:6). Tanto las células ES de rata como las riPSC requieren la presencia de LIF y cóctel de inhibidores (CHIR99021, PD0325901, A-83-01) para la auto-renovación a largo plazo. Las células ES de rata y las riPSC expresan los marcadores pluripotentes de células ES de ratón, tales como Oct4, Sox2, Nanog y SSEA-1, etc., pero no los marcadores, tales como SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-61 y TRA-1-81, que fueron expresados por células ES humanas cultivadas convencionalmente. Tanto las células ES de rata como las riPSC expresan los  
 15 marcadores de MCI Rex-1 y ALP, que no se expresan en EpiSC de ratón.

#### Ejemplo de referencia 4 Obtención de células madre embrionarias humanas y de mono

Para convertir células ES humanas y de mono a un estado pluripotente similar al de las células ES de ratón (MCI temprana), se cultivaron células ES humanas (Hues9) y células ES de mono (R366.4) con el medio DMEM/F-12 con un  
 20 suplemento de sustitutivo de suero Knock-out (KSR) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, Glutmax al 1%, 10 ng/ml de bFGF. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 50%, los medios se cambiaron a DMEM/F-12 Advance, 1 x N2, 1 x B27, Glutmax al 1%, 50 µg/ml de medio BSA con un suplemento de inhibidor de Desmetilasa-1 Específica de Lisina (Parnate) 2 µM. Después de tres días, las células se cultivaron con el mismo medio que contenía 10 µg/ml de LIF humano, CHIR99021 3 µM, PD0325901 0,5 µM y SB431542 2 µM, pero sin Parnate. A  
 25 pesar de la intensa diferenciación, se visualizaron colonias de tipo células ES de ratón compactas aproximadamente a una semana de tratamiento. Las células ES humanas/de mono convertidas se cultivaron con el medio anterior y se pasaron aproximadamente cada 4 ~ 5 días (1:6). Las células expresan los marcadores pluripotentes, tales como Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-61, TRA-1-81 y también los marcadores de MCI Rex-1 y ALP.

Ejemplo 5 Conversión de células madre de epiblasto en células madre embrionarias por medio de pequeñas moléculas

Las células madre embrionarias murinas convencionales (ESC) derivan de y representan células pluripotentes de la masa celular interna (MCI) de blastocistos antes de la implantación. Se pueden auto-renovar indefinidamente y tienen la capacidad de dar lugar a todos los tipos de células *in vitro*, y lo más importante, contribuyen a un animal entero *in vivo*, incluyendo la línea germinal, cuando se colocan de nuevo en blastocistos. Más recientemente, se obtuvo un tipo diferente de células pluripotentes a partir de epiblastos de la fase posterior a la implantación, denominadas células madre de epiblastos (EpiSC) (Brons et al., Nature 448, 191-195, 2007; Tesar et al., Nature 448, 196-199, 2007). Si bien las EpiSC se pueden auto-renovar a largo plazo y parecen ser pluripotentes tanto *in vitro* como *in vivo* en los análisis de teratoma, en contraste con las mESC, son incapaces de incorporarse a la MCI y contribuir al quimerismo, confirmando que las EpiSC proceden de y representan una fase más avanzada/tardía de desarrollo de la pluripotencia que las ESC derivadas de MCI y sugiriendo que no podrían ser "reprogramadas" de nuevo a células pluripotentes en fase MCI, incluso en el entorno *in vivo*. Las ESC humanas convencionales, aunque deriven de blastocistos, parecen corresponder muy estrechamente a las EpiSC con respecto a muchas características, incluyendo cierta expresión génica, morfología de las colonias (es decir, colonias planas) y las respuestas de señalización en auto-renovación y diferenciación. Las EpiSC/hESC también son funcionalmente y mecánicamente distintas de las mESC (que tienen una morfología de colonias más compacta y abovedada) en muchas otras maneras. Por ejemplo, mientras que las mESC se auto-renuevan bajo el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la proteína morfogénica ósea (BMP) (Ying et al., Cell 115, 281-292, 2003) o bajo la inhibición de MEK y/o FGFR (Ying et al., Nature 453, 519-523, 2008), las EpiSC/hESC dependen de la actividad de la ruta de MAPK, FGF y TGFβ/Activina/Nodal para la auto-renovación, y se diferencian rápidamente cuando se tratan con inhibidores de MEK, FGFR y/o ALK4/5/7 (Brons et al., Nature 448, 191-195, 2007; Li et al., Differentiation 75, 299-307, 2007; Peerani et al. EMBO J 26, 4744-4755, 2007; Tesar et al., Nature 448, 196-199, 2007). Además, en respuesta al tratamiento con BMP bajo condiciones de diferenciación definidas, las mESC se diferencian hacia los linajes de mesodermo mientras que las EpiSC/hESC generan trofoblastos o células de endodermo primitivas (Brons et al., Nature 448, 191-195, 2007; D'Amour et al. Nat Biotechnol 23, 1534-1541, 2005; Xu et al., Nat Biotechnol 20, 1261-1264, 2002). Estas observaciones apoyan firmemente la idea de que las EpiSC y las hESC son intrínsecamente similares, y plantean una hipótesis atractiva: como las mESC y las EpiSC/hESC representan dos estados de pluripotencia distintos: el estado de tipo mESC representa la MCI de blastocistos pre-implantación y el estado de tipo EpiSC representa los epiblastos post-implantación, si el estado de epiblasto (incluyendo las hESC convencionales) puede ser convertido de nuevo al estado MCI. Debido a la clara diferencia en su capacidad de contribuir al quimerismo de las mESC o las mEpiSC (que ofrecería una confirmación definitiva de la conversión funcional de las EpiSC en mESC), el sistema murino representa una plataforma ideal para estudiar un proceso tan intrigante, y proporciona una base para generar tal vez un nuevo tipo de células pluripotentes humanas de tipo MCI/mESC a partir de las hESC convencionales.

Las EpiSC expresan genes de pluripotencia maestros, incluyendo *Oct4*, *Sox2*, y *Nanog*. Se ha demostrado que la expresión en exceso de *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* induce la reprogramación de las células somáticas murinas para que se conviertan en células pluripotentes competentes en la línea germinal (Nakagawa et al., Nat Biotechnol 26, 101-106, 2008). Además, se ha demostrado que las células madre de la línea germinal, que expresan menos genes de pluripotencia (p. ej., carecen de expresión de *Nanog*), se pueden convertir en células de tipo mESC en cultivo (Chambers et al., Nature 450, 1230-1234, 2007; Kanatsu-Shinohara et al., Cell 119, 1001-1012, 2004). Además, recientemente se obtuvo un tipo de células no pluripotentes (llamado FAB-SC) a partir de blastocitos, y se mostró que generaba células de tipo mESC pluripotentes simplemente bajo condiciones de LIF y BMP (Chou et al., Cell 135, 449-461, 2008). Además, estudios recientes sugirieron que subpoblaciones de células dentro de las colonias de mESC exhibían una expresión dinámica de varios factores de transcripción clave (p. ej., *Nanog*, *Rex1* y *Stella*) que los hace fluctuar continuamente entre estados diferentes (p. ej., entre fenotipos de tipo ESC y epiblasto) (Chambers et al., Nature 450, 1230-1234, 2007; Hayashi et al., Cell Stem Cell 3, 391-401, 2008; Singh et al., Stem Cells 25, 2534-2542, 2007; Toyooka et al., Development 135, 909-918, 2008). Estos estudios plantean la posibilidad de que las EpiSC existentes en un estado de pluripotencia menos "estable" que las mESC de MCI pueden tener la capacidad de regresar de nuevo a un estado de mESC "espontáneamente" bajo la fluctuación del cultivo *in vitro*. Para someter a ensayo esta hipótesis, las EpiSC se trataron con tripsina en células individuales y se cultivaron en placa bajo condiciones de auto-renovación de mESC, basándose en la noción de que células de tipo mESC "convertidas" dentro de las colonias de EpiSC serían capturadas/seleccionadas y expandidas bajo condiciones que promoverían la auto-renovación de las mESC pero inducirían la diferenciación de las EpiSC. Los autores de la presente invención encontraron EpiSC se diferenciaban (p. ej., células diseminadas/emigradas fuera de las colonias) en el primer pase y no se pudieron identificar colonias a lo largo de varios pases cuando se cultivaron bajo condiciones convencionales de crecimiento de mESC con células alimentadoras y con un suplemento de LIF (Fig. 6A). Dado que la conversión "espontánea" de las EpiSC a mESC podría ser muy ineficiente, podrían requerirse unas condiciones de promoción de la auto-renovación diferencial y de la diferenciación más rigurosas para seleccionar/capturar y expandir aquellas células de tipo mESC convertidas "raras" a partir de EpiSC (p. ej., lograr una distinción fenotípica más limpia y minimizar el crecimiento en exceso de las EpiSC diferenciadas). Basándose en las respuestas de señalización diferencial (auto-renovación vs. diferenciación) entre las mESC y las EpiSC en el contexto de las rutas de señalización de FGF y MAPK, así como la observación de que la inhibición de la señalización MEK-ERK promueve la reprogramación de las células hacia un estado más primitivo (Chen et al., Proc

Natl Acad Sci USA 104, 10482-10487, 2007; Shi et al., Cell Stem Cell 2, 525-528, 2008; Silva et al., PLoS Biol 6, e253, 2008), los autores de la presente invención trataron a continuación las EpiSC con una combinación de inhibidor de FGFR selectivo PD173074 (0,1 µM) e inhibidor de MEK PD0325901 (0,5 µM) en condiciones de auto-renovación de mESC regulares. En estas condiciones 2PD/LIF que promueve el crecimiento clonal robusto de las mESC e inhibe el crecimiento de células diferenciadas, los autores de la presente invención observaron una diferenciación acelerada de las EpiSC y una disminución del crecimiento del cultivo celular total. La mayoría de las células murieron cuando se mantuvieron en cultivo en el medio 2PD/LIF y no se identificó ninguna colonia de tipo mESC en pases seriados. De manera similar, la adición de CHIR99021 (3 µM) a las condiciones 2PD/LIF para un mejor crecimiento/supervivencia de mESC no promovió ni capturó la conversión de las EpiSC a un estado de tipo mESC (Figura 6A). Estos resultados sugieren que las EpiSC representan un estado de pluripotencia "estable" que no se convierte fácilmente en un estado de tipo ESC de manera espontánea en condiciones que promueven la auto-renovación de las mESC. Esto es también coherente con un estudio más reciente en el que se demostró que la conversión de las EpiSC en un estado de tipo mESC sólo se podría lograr por medio de la expresión en exceso de *Klf4* junto con el uso de inhibidores químicos de MEK y GSK3 (Guo et al., Development 136, 1063-1069, 2009).

La actividad TGFβ/Activina/Nodal se regula dinámicamente de manera temporal y espacial durante la embriogénesis de ratón y se requiere durante la implantación para controlar el destino de las células progenitoras tempranas en los epiblastos (Mesnard et al., Development 133, 2497-2505, 2006). La obtención de EpiSC que requiere actividades de la ruta de FGF y TGFβ/Activina/Nodal sugiere que TGFβ/Activina/Nodal proporciona una señal de anti-diferenciación para las EpiSC (Brons et al., Nature 448, 191-195, 2007; Tesar et al., Nature 448, 196-199, 2007). Adicionalmente, se informó de que la E-cadherina se expresa en embriones desde la etapa de una célula y la regulación a la baja de la E-cadherina por la señalización facilita la implantación de blastocisto (Li et al., J Biol Chem 277, 46447-46455, 2002). Por otra parte, las actividades de TGFβ/Activina/Nodal también promueven la transición epitelial-mesenquimal (EMT) regulando a la baja la E-cadherina durante la gastrulación (Derynck y Akhurst, Nat Cell Biol 9, 1000-1004, 2007; Gadue et al., Proc Natl Acad Sci USA 103, 16806-16811, 2006; Sirard et al., Genes Dev 12, 107-119, 1998). Basándose en estos estudios, los autores de la presente invención especularon que la inhibición de la señalización TGFβ/Activina/Nodal podría promover el proceso de transición mesenquimal-epitelial (MET) y, por tanto, la conversión de las EpiSC en un estado de tipo mESC. A-83-01 es un inhibidor selectivo de ALK4/5/7, que no tiene efecto inhibitor cruzado sobre los receptores de BMP (Tojo et al., Cancer Sci 96, 791-800, 2005). De acuerdo con los informes anteriores, el bloqueo de la señalización de TGFβ/Activina/Nodal por A-83-01 0,5 µM indujo una rápida diferenciación de las EpiSC en condiciones de cultivo de EpiSC/hESC con un suplemento de bFGF. En contraste drástico, en condiciones de cultivo de mESC que se complementaba con LIF, A-83-01 indujo a la población total de EpiSC para formar colonias más compactas y abovedadas que se asemejaban a la morfología de las colonias de mESC y expresaban ALP (un marcador de pluripotencia altamente expresado en mESC, pero no en EpiSC) (Fig. 6C). Otro inhibidor de ALK4/5/7 específico ampliamente utilizado SB431542 tiene un efecto similar sobre las EpiSC. Cuando las colonias tratadas con A-83-01 se expusieron a las condiciones de 2PD/LIF para la selección, más de 50% de las colonias se podían auto-renovar y mantener la actividad de ALP, lo que sugiere que las células adquirirían ciertas propiedades de mESC. Aquellas colonias positivas para ALP abovedadas se mantuvieron adicionalmente y se expandieron en medio de crecimiento de mESC con un suplemento de inhibidores de ALK5, MEK, FGFR y GSK3 (denominadas condiciones mAMFGi). Estas células se pueden auto-renovar a largo plazo en las condiciones mAMFGi, tienen una morfología de colonias de mESC indistinguible (Fig. 6D), y expresan los marcadores de pluripotencia tales como Oct4, Nanog, SSEA-1, así como recuperan el marcador de MCI Rex-1. Sin embargo, cuando estas células fueron marcadas con un GFP constitutivamente activo por lentivirus, y agregadas con mórulas, los autores de la presente invención no obtuvieron animales quiméricos después de que los embriones resultantes fueron trasplantados a ratones (Figura 7A). Estos resultados indicaron que la inhibición de la señalización de TGFβ junto con la inhibición de MEK, FGFR y GSK3 tiene una fuerte actividad de reprogramación y puede promover la conversión parcial de las EpiSC en un estado de tipo mESC.

Se han establecido modificaciones de histonas, tales como acetilación y metilación, para desempeñar papeles importantes en la regulación génica. Se ha indicado que *Stella* es un gen importante en la competencia de mESC con la línea germinal, y es transcripcionalmente silenciosa en EpiSC y células de tipo epiblasto dentro de las mESC. Además, la modificación de las histonas regula la expresión de *Stella* en las mESC (Hayashi et al., Cell Stem Cell 3, 391-401, 2008; Tesar et al., Nature 448, 196-199, 2007). Los autores de la presente invención especularon que una desrepresión de los loci de los genes silenciados responsables de la verdadera pluripotencia *in vivo* puede promover las EpiSC para superar la restricción/umbral epigenética hacia un estado de tipo mESC. En consecuencia, los autores de la presente invención eligieron la molécula pequeña parnate, que se ha demostrado que aumenta la metilación global de H3K4 inhibiendo la histona desmetilasa LSD1 que desmetila específicamente la histona H3K4 mono- y di-metilada (Lee et al., Chem Biol 13, 563-567, 2006). Sorprendentemente, después de cuatro días de tratamiento con parnate 2 µM, hasta 70-80% de las EpiSC formaron colonias pequeñas y compactas en las condiciones de crecimiento de mESC. Cuando las células tratadas con parnate se seleccionaron a continuación con 2PD/LIF, aproximadamente 20% de las células sobrevivieron a la selección en forma de colonias abovedadas y positivas para ALP. Estas colonias se expandieron adicionalmente con inhibidores de MEK, FGFR y GSK3 (denominadas condiciones mMFGi) o con las condiciones mAMFGi. Ambas condiciones dieron lugar a un cultivo celular estable (> 80 pases a lo largo de 8 meses), que es morfológicamente indistinguible de mESC (Fig. 6E, F). A continuación los autores de la presente invención examinaron células parnate/mMFGi y células parnate/mAMFGi marcadas con GFP *in vivo* por agregación de la mórula y trasplante de los embriones resultantes. De forma notable,

los autores de la presente invención obtuvieron 7 quimeras adultas (de 9 crías nacidas) a partir de células parnate/mAMFGi según se determinó por el color de la capa y la genotipificación por PCR para determinar la presencia de integración de GFP en múltiples tejidos adultos (Fig. 7A, B, C). De forma consistente, se observaron células GFP positivas diseminadas en múltiples tejidos (es decir, tres capas germinales, incluyendo gónadas) de embriones E13.5 procedentes del trasplante de las mórulas agregadas de células parnate/mAMFGi (Fig. 7A, D, 10A). Para examinar la contribución de la línea germinal de células parnate/mAMFGi, se aislaron las células dobles positivas para GFP/SSEA-1 de la gónada por medio de FACS y se confirmó que expresaban los marcadores de línea germinal *Blimp1* y *Stella* por medio de PCR en tiempo real (Fig. 7E). Estos datos sugieren que las células parnate/mAMFGi convertidas a partir de EpiSC recuperan una verdadera pluripotencia *in vivo*. Por el contrario, las células positivas para GFP sólo se encontraron en el saco vitelino de embriones E13.5 recuperados del trasplante de morulas agregadas de células parnate/mAMFGi (figura 7A).

Por lo tanto, las células parnate/mAMFGi se caracterizaron adicionalmente. La inmunocitoquímica confirmó la expresión homogénea de los marcadores asociados a la pluripotencia en las células parnate/mAMFGi expandidas a largo plazo, incluyendo Oct4, Nanog, SSEA1 y STELLA (Figura 8A, 11A, 12). Además, el análisis semi-cuantitativo por RT-PCR demostró la restauración de la expresión génica de marcadores específicos de MCI y de competencia con la línea germinal (expresados en mESC, pero ausentes en EpiSC) en células parnate/mAMFGi, incluyendo *Rex1*, *Pecam1*, *Stella*, *Stra8*, *Dax1*, *Fbxo15*, *Esrrb* y *Fgf4* (Figura 8B). Por el contrario, los transcritos de genes asociados con el epiblasto y las primeras capas germinales tales como *Fgf5* y *Brachyury* (T) se redujeron o fueron indetectables en células parnate/mAMFGi (Fig. 8B, 9C). Además, el análisis del transcriptoma por micromatrices demostró que las células parnate/mAMFGi convertidas son mucho más similares a las mESC (valor de correlación de Pearson: 0,87), mientras que las EpiSC originales están más distantes de las mESC (valor de correlación de Pearson: 0,74) (Figura 8C) conforme a los informes anteriores. Para analizar más a fondo los cambios epigenéticos específicos asociados con la conversión, los autores de la presente invención examinaron la metilación del ADN promotor de *Stella* y *Fgf4*, cuyas expresiones están estrechamente asociadas con las propiedades de MCI (Hayashi et al., Cell Stem Cell 3, 391-401, 2008; Imamura et al., BMC Dev Biol 6, 34, 2006), utilizando secuenciación genómica con bisulfito. Se reveló que las regiones promotoras de *Stella* y *Fgf4* estaban en gran medida no metiladas en células parnate/mAMFGi y mESC, pero estaban hipermetiladas en EpiSC (Fig. 8D). Para examinar más a fondo el estado epigenético de *Stella*, que se limita al estado de tipo mESC, los autores de la presente invención realizaron un análisis ChIP-QPCR de su región promotora en las EpiSC, células parnate/mAMFGi convertidas, y mESC. Los autores de la presente invención encontraron que el patrón de metilación de H3K4 y H3K27 de *Stella* en células parnate/mAMFGi era similar al observado en mESC, pero era distinto del de las EpiSC, lo que confirma que el estado epigenético de *Stella* en las células parnate/mAMFGi convertidas había cambiado al estado de tipo mESC (Fig. 8E).

Las células parnate/mAMFGi también fueron examinadas para determinar sus propiedades funcionales *in vitro*. Se encontró que tenían una tasa de crecimiento similar a la de las mESC (Fig. 9A). Cuando las células parnate/mAMFGi se diferenciaron a través de cuerpos embrioides en suspensión, eran capaces de generar eficazmente derivados de células en las tres capas germinales primarias como se muestra mediante inmunocitoquímica, incluyendo células neuronales características (tubulina  $\beta$ III y MAP2ab positivas), cardiomiocitos que laten (troponina cardíaca y MHC positivos), y células de endodermo (Sox17 o Albúmina positivas) (Fig. 9B). Debido a que las mESC y las EpiSC/hESC tienen diferentes respuestas a las entradas de señalización (p. ej., factores de crecimiento) en auto-renovación y diferenciación, condiciones que se desarrollaban y funcionaban eficazmente para la diferenciación de mESC podían a menudo ser ineficaces en la inducción de la correspondiente diferenciación de las EpiSC/hESC. Una de las ventajas de convertir EpiSC/hESC en un estado de tipo mESC es que las condiciones de diferenciación se pueden traducir más fácilmente de trabajo de mESC en trabajo de EpiSC/hESC. La respuesta diferencial al tratamiento con BMP4 representa un análisis funcional para distinguir entre mESC y EpiSC. De acuerdo con los estudios anteriores (Beddington y Robertson, Development 105, 133-131, 1989; Cxyz y Wobus, Differentiation 68, 167-174, 2001; Qi et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 6027-6032, 2004; Winnier et al., Genes Dev 9, 2105-2116, 1995), los autores de la presente invención encontraron que las células parnate/mAMFGi eran inducidas a expresar el gen marcador específico de mesodermo *Brachyury* (T) cuando se trataban con BMP4 como las mESC, pero en las mismas condiciones no podían dar lugar a trofotodermo (sin inducción del marcador de trofoblastos *Cdx2*) o a células endodérmicas primitivas (*Gata6*) como las EpiSC, lo que sugiere un potencial similar de diferenciación/respuesta *in vitro* de las células parnate/mAMFGi a mESC (Figura 9C). Para demostrar aún más esto, los autores de la presente invención intentaron y compararon las EpiSC, las células parnate/mAMFGi convertidas, y las mESC en un proceso de diferenciación cardíaca por etapas dirigido definido químicamente en monocapa. En este proceso de múltiples etapas, donde la actividad de BMP desempeña un papel esencial en las primeras etapas de la diferenciación del mesodermo, los autores de la presente invención encontraron que las células parnate/mAMFGi se diferenciaban en cardiomiocitos que latían tan eficazmente como las mESC, pero la diferenciación de las EpiSC en las mismas condiciones apenas producía células que expresaran marcadores cardíacos apropiados o tuvieran un fenotipo de latido característico (Fig. 9D), confirmando de nuevo que las células parnate/mAMFGi son funcionalmente similares a las mESC. Por otra parte, un único análisis de supervivencia celular también demostró que las células parnate/mAMFGi se expandían clonalmente como colonias positivas para Oct4 con la misma eficacia que las mESC en condiciones libres de alimentación y N2/B27 químicamente definidas, mientras que las EpiSC apenas sobrevivían a partir de células individuales bajo las mismas condiciones (Fig. 11B). Estos datos demostraron adicionalmente que las EpiSC se podrían convertir funcionalmente al estado de tipo mESC

por medio de manipulación farmacológica que dirige las modificaciones epigenéticas y las rutas de señalización diferenciales requeridas por las mESC o las EpiSC.

En concordancia con los estudios de los autores de la presente invención, recientemente se ha informado que las células EpiSC se convierten a un estado de tipo mESC mediante la expresión en exceso de genes de reprogramación (es decir, Klf4) junto con compuestos químicos (Guo et al., *Development* 136, 1063-1069, 2009). En este estudio, los autores de la presente invención idearon un tratamiento químicamente definido para convertir EpiSC estables a un estado de pluripotencia similar al de las mESC, de desarrollo anterior, sin ninguna manipulación genética. A pesar de los estudios que proporcionan pruebas de que existen células de tipo epiblasto que evolucionan o reversionan dentro de la colonia de mESC convencionales (Hayashi et al., *Cell Stem Cell* 3, 391-401, 2008); las mESC y las EpiSC comparten un conjunto sustancial de factores transcripcionales de pluripotencia, incluyendo *Oct4*, *Sox2* y *Nanog*; y las mESC son más estables en cultivo, en el presente estudio los autores de la presente invención encontraron que las EpiSC se diferenciaban rápidamente en las condiciones de cultivo de mESC convencionales y no se podían identificar ni aislar fácilmente mESC convertidas "espontáneamente" a lo largo de pases en serie a nivel de población o clonal. Sorprendentemente, los autores de la presente invención encontraron que el bloqueo de la ruta de TGF  $\beta$  o la inhibición de la H3K4 desmetilasa LSD1 con inhibidores de molécula pequeña inducía cambios morfológicos drásticos de las EpiSC hacia los fenotipos de tipo mESC con la activación de cierta expresión génica específica de MCI. Sin embargo, la conversión completa de las EpiSC en un estado de tipo mESC con competencia para la contribución quimérica sólo se puede generar fácilmente con una combinación de inhibidores de LSD1, ALK5, MEK, FGFR y GSK3. Estas observaciones subrayan una poderosa y directa inducción de la reprogramación desde las EpiSC en fase tardía de desarrollo a las mESC en fase MCI por una sinergia de señalización y modulaciones epigenéticas directas. También pone de relieve un papel importante para la inhibición de la ruta de TGF $\beta$  en la promoción de reprogramación y el mantenimiento de la verdadera pluripotencia, lo que apoya aún más los estudios recientes de los autores de la presente invención en la generación de células pluripotentes de rata competentes en el quimerismo (Li et al., *Cell Stem Cell* 4, 16-19, 2009). Colectivamente, los estudios de los autores de la presente invención proporcionan una demostración de prueba de concepto de que las EpiSC de pluripotencia restringida se pueden convertir fácilmente en un estado de tipo mESC en ausencia de cualquier manipulación genética por medio del control farmacológico preciso de las rutas de señalización que distinguen los dos estados de pluripotencia y una diana epigenética simultáneamente, y ofrecen un conveniente sistema experimental para seguir estudiando el mecanismo. Tal método y concepto también pueden proporcionar una vía para generar un nuevo tipo de célula pluripotente humana de tipo mESC.

#### Procedimientos Experimentales

Cultivo celular: La línea de EpiSC murina fue una donación del Dr. Paul Tesar (Case Western Reserve University). Las EpiSC (línea EpiSC-5, macho) se mantuvieron en MEF CF1 irradiados en medio de ESC humanas con un suplemento de 10 ng/ml de bFGF como se describió anteriormente (Tesar et al., *Nature* 448, 196-199, 2007). Las EpiSC se pasaron cada 3-4 días con 1 mg/ml de collagenasa tipo IV (Invitrogen). Las R1 mESC se cultivaron sobre MEF CF1 irradiados con medios de crecimiento de mESC convencionales, que consistían en DMEM Knockout (Invitrogen) con un suplemento de KSR al 20% (Invitrogen), 2-ME 0,1 mM (Sigma- Aldrich), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), NEAA 0,1 mM (Invitrogen), y  $10^3$  unidades/ml de factor inhibidor de leucemia murina recombinante (LIF) (ESGRO, Millipore). Las mESC y las células convertidas se pasaron cada 3 días como una suspensión de células individuales utilizando tripsina al 0,05%/EDTA y se sembraron a  $1,0 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  para el cultivo de rutina. Para cultivo libre de alimentador, las células se hicieron crecer sobre placas de cultivo de tejidos recubiertas de gelatina en medios químicamente definidos, que consistían en DMEM Knockout con un suplemento de 1XN2 (Invitrogen), 1XB27 (Invitrogen), 2-ME 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, NEA 0,1 mM, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fracción V de BSA (GIBCO),  $10^3$  unidades/ml de LIF y 10 ng/ml de BMP4 (R & D). Para el experimento de curva de crecimiento, las células se cultivaron en condiciones libres de alimentador en placas de 12 pocillos recubiertas con gelatina. Las muestras duplicadas de células se cultivaron en placa a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo. Para cada punto de tiempo (24 horas de diferencia), las células de los pocillos duplicados se trataron con tripsina y se contaron utilizando un hemocitómetro. Estos recuentos se promediaron y se trazaron. El inhibidor de ALK A-83-01, SB431542, el inhibidor de MEK PD0325901, el inhibidor de GSK3, CHIR99021 y el inhibidor del receptor de FGF, PD173074 se adquirieron de Stemgent Inc. Parnate se adquirió de Sigma (P8511).

RT-PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real: El ARN total se extrajo utilizando RNeasy plus mini kit (Qiagen), sometido a transcripción inversa con el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) utilizando cebadores oligo dT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se resolvieron sobre geles de agarosa (1,5%) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Las imágenes fueron tomadas utilizando el sistema de documentos Bio-Rad Gel. Se utilizó ADNc diluido en cada una de las PCR cuantitativas duplicadas en un sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad con IQ SYBR Green (Bio-Rad). Los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 2 Suplementaria.

Análisis de secuenciación con bisulfito: Se aislaron ADN de células R1 mESC, EpiSC y Parnate/mAMFGi utilizando el Kit de Aislamiento de ADN No Orgánico (Millipore). A continuación, los ADN se trataron para la secuenciación con bisulfito con el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research Corp., Orange, CA). Los ADN tratados se utilizaron a continuación para amplificar secuencias de interés. Los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento promotor fueron los publicados previamente (Hayashi et al., *Cell Stem Cell* 3, 391-401, 2008; Imamura et al., BMC

Dev Biol 6, 34, 2006) y se enumeran en la Tabla 2 Suplementaria. Los fragmentos resultantes se clonaron utilizando el kit de Clonación TOPO TA para la secuenciación (Invitrogen) y se secuenciaron.

Citometría de flujo y clasificación de células: Las células adherentes se lavaron dos veces en PBS y después se incubaron durante 20 minutos a 37°C en Tampón de Disociación Celular (Invitrogen). Se disociaron las células y se volvieron a suspender en PBS + suero de cabra normal al 3% (tampón de bloqueo). Las células se incubaron durante 40 minutos a 4°C con anticuerpo anti-SSEA1 (1:50, Santa Cruz) y después se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario seguido de etapas de lavado. Las células se analizaron y clasificaron utilizando un clasificador de células FACSaria y el soporte lógico FACSDiva (BD Biosciences). Utilizando un láser de 488 nm para la excitación, se determinó la positividad para GFP de acuerdo a la intensidad de fluorescencia en el canal GFP. La positividad para SSEA-1 se determinó de acuerdo con la fluorescencia en el canal rojo.

Diferenciación *in vitro*: Las células Parnate/mAMFGi se trataron con tripsina en células individuales y se cultivaron en suspensión para formar cuerpos embrioides/EB en placas de baja adherencia (Corning) en medio DMEM con un suplemento de FBS al 10%. Los medios se renovaron cada dos días y se permitió que los EB crecieran durante 6 días en suspensión. Los EB fueron cultivados en placa de nuevo sobre placas recubiertas con gelatina al 0,1%. Las diferenciaciones espontáneas se examinaron mediante inmunotinción de marcadores específicos de linaje representativos con los anticuerpos indicados en diferentes puntos temporales (3 a 16 días). Para la diferenciación cardíaca dirigida, las células se cultivaron sobre placas revestidas con Matrigel a  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ . A las 24 horas del cultivo en placa, las células se cambiaron a medio definido químicamente (CDM) [que consistía en RPMI 1640, 0,5x N2, 1x B27 (sin Vitamina A), 0,5x Glutamax, beta-mercaptoetanol 0,55 mM y 1x aminoácidos no esenciales], y se trataron con BIO 3  $\mu\text{M}$  (Calbiochem) y 20 ng/ml de BMP-4 (R & D) durante cinco días. A continuación, el medio se cambió a CDM que contenía 100 ng/ml de Dkk-1 y las células se cultivaron durante cinco días adicionales. El día 11, las células se trataron/desprendieron con tripsina brevemente (tripsina al 0,05%) y se volvieron a cultivar en placa sobre placas de 6 pocillos recubiertos con gelatina en CDM sin factores de crecimiento adicionales, y se cultivaron durante 4-6 días adicionales cuando el fenotipo de latido aparecía en la mayoría de las colonias cardíacas.

Análisis de caracterización: La tinción con ALP se realizó utilizando el Kit de Detección de Fosfatasa Alcalina (Chemicon) según instrucciones del fabricante.

La inmunocitoquímica se realizó utilizando un protocolo convencional. En resumen, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich), se lavaron tres veces con PBS y a continuación se incubaron en PBS que contenía TritonX-100 al 0,3% (Sigma-Aldrich) y suero de burro normal al 5% (Jackson Immuno Research) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron a continuación con anticuerpo primario a 4°C durante una noche: Albúmina (Abcam, AB 19188, 1:200); *Brachyury* (Santa Cruz, C-19, 1:200); anticuerpo contra troponina t cardíaca (CT3) (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:700); MAP2ab (Abcam, ab5392, 1:1000); MF20 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:200); Nanog (Abcam, ab 21603, 1:500); Oct4 (Santa Cruz, sc-5279, 1:100); Sox17 (R&D Systems, AF1924, 1:300); SSEA1 (Santa Cruz, sc-21702, 1:100); Stella (Millipore, MAB4388, 1:200); Tuj-1 (Covance, MMS-435P, 1:1000). Después de lavar tres veces con PBS, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor apropiados (Invitrogen) durante 2 h a RT. Los núcleos se detectaron mediante tinción con DAPI (Sigma). Las imágenes fueron capturadas por medio de Zeiss HXP 120.

Formación de quimeras: Las células convertidas se marcaron de forma estable mediante GFP utilizando lentivirus. Las células se agregaron con embriones de ratón de la fase de 8 células, y a continuación se trasplantaron al útero de ratones CD1 pseudo-preñados de 2,5 dpc.

Análisis de micromatriz: Se utilizó Illumina Sentrix BeadChip Array MouseRef-8 v2 (Illumina, CA, USA) para las hibridaciones de micromatrices para examinar la expresión génica global de células ES murinas, células EpiSC y células Parnate/mAMFGi. El ARNc marcado con Biotina-16-UTP se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total con el kit de Amplificación de ARN Illumina TotalPrep (Ambion AMIL 1791, Foster City, CA, USA). La mezcla de hibridación que contenía 750 ng de ARNc amplificado marcado se preparó de acuerdo con el Illumina BeadStation 500X System Manual (Illumina, San Diego, CA, USA) utilizando los reactivos suministrados y la solución de tinción GE Healthcare Streptavidin-Cy3. La hibridación a Illumina Array MouseRef-8 v2 fue durante 18 horas a 55°C sobre una BeadChip Hyb Wheel. La matriz se escaneó utilizando el Illumina BeadArray Reader. Todas las muestras se prepararon en dos réplicas biológicas. El procesamiento y análisis de los datos de la micromatriz se realizaron con el soporte lógico Illumina BeadStudio. Los datos de las micromatrices de las células R1-mESC fueron los de los estudios anteriores GEO DataSet (GSM402334 y GSM402335) de los autores de la presente invención. Todos los datos sin procesar fueron substraídos del fondo y normalizados juntos utilizando la opción de rango invariante. Los autores de la presente invención han depositado los datos de las micromatrices de Parnate/mAMFGi y EpiSC en GEO DataSets con el número de acceso (GSM402334 y GSM402335 para células ES de ratón R1, GSE17664 para Parnate/mAMFGi y EpiSC).

PCR en tiempo real para inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-qPCR): Se realizó ChIP utilizando un kit Magna ChIP™ G comercialmente disponible (núm. catálogo 17-611, Millipore). Brevemente,  $1 \times 10^6$  células cultivadas sin alimentador se fijaron con formaldehído al 1%, se lisaron y se sometieron a sonicación para obtener fragmentos de ADN de 200-500 pb conjugados con nucleosomas. Los productos lisados sometidos a sonicación se inmunoprecipitaron con lisina 4 anti-trimetil-histona H3 (Millipore, núm. de Cat. 17-614, 3  $\mu\text{l}$ /reacción) o lisina 27 anti-

trimetil-histona H3 (Millipore, núm. de Cat. 17-622, 4 µg/reacción) que se hicieron reaccionar previamente con anticuerpos secundarios conjugados con esferas magnéticas. Después de la incubación con cada anticuerpo durante 24 horas, se recuperaron los inmunoprecipitantes y se purificaron los fragmentos de ADN contenidos mediante incubación con proteinasa K. Los fragmentos de ADN se sometieron a PCR en tiempo real. Se utilizaron los productos lisados de células enteras antes de la incubación con anticuerpos como entrada. Un microlitro de fragmentos de ADN de productos lisados completos e inmunoprecipitantes se sometió a reacción de PCR en tiempo real. Los inmunoprecipitantes con IgG de conejo normal sirvieron como muestras de control negativo y no mostraron un fondo detectable. Las secuencias de cebadores se enumeran en la Tabla 2.

TABLA 2

Cebadores utilizados para PCR

| Gen                                            | Directo                        | Inverso                       |
|------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>Para RT-PCR</b>                             |                                |                               |
| Blimp1                                         | TCAGCCTCTTCCCTAGGTTGTATC       | AATCTTAAGGATCCATCGGTCAAC      |
| Brachyury                                      | ATGCCAAAGAAAGAAACGAC           | AGAGGCTGTAGAATCATGATT         |
| Cdx2                                           | AGGCTGAGCCATGAGGAGTA           | CGAGGTCCATAATTCCACTCA         |
| Dax1                                           | GTGGCAGGGCAGCATCCTCTACAA       | CAAAAGAAGCGGTACA              |
| Esrrb                                          | CGC CAT CAA ATG CGA GTA CAT GC | GAATCACCATCCAGGCATCTG         |
| Fbxo15/ECAT3                                   | TAGATTCTTGGACTTCCCTTCA         | ACCAAGGTCACCGCATCCAA          |
| Fgf4                                           | CGTGGTGAQCATCTTCGGAGTGG        | CCTTCTTGGTCCGCCCGTTCTTA       |
| Fgf5                                           | CTGTACTGCAGAGTGGGCATCGG        | GACTTCTGCGAGGCTGCGACAGG       |
| GAPDH                                          | GTGTTCTACCCCAATGTGT            | ATTGTCATACCAGGAAATGAGCTT      |
| Gata6                                          | ACCTTATGCGGTAGAAATGCTGAGGGTG   | CTGAATACTTGAGGTCACTGTTCTCGGG  |
| Pecam1                                         | GTCATGGCCATGGTCGAGTA           | AGCAGGACAGGTCCAACAAC          |
| Rex-1                                          | TGAAAGTGAGATTAGCCCGAG          | GTCCCATCCCTTCAATAGCAC         |
| Stella                                         | GAAACTCCTCAGAAGAAA             | CTCTTGTTCTCCACAGGTAC          |
| Stra8                                          | GCAACCAACCCAGTGATGATGG         | CATCTGGTCCAACAGCCTCAG         |
| <b>Para PCR de secuenciación con bisulfito</b> |                                |                               |
| Fgf4                                           | TTTAGGTTTAAAGAGTGTGGGGAGAAGAT  | TACAAAACAAAACATCAAACCCATTCTAA |
| Stella                                         | ATTTTGTGATTAGGGTTGGTTAGAA      | CCAAAACATCCTCTTCATCTTCTTCT    |
| Stella anidado                                 | TTTTTGGAATTGGTTGGGATTG         | CTTCTAAAAAATTTCAAAATCCTTCATT  |
| <b>Para PCR ChIP-Q</b>                         |                                |                               |
| Stella                                         | GATCCAGCTGGTCTGAGCTA           | GTGCAGGGATCATAGGAGTG          |

Ejemplo de referencia 6: Caracterización de una célula animal pluripotente que replica y mantiene la pluripotencia

Para caracterizar las hiPSC recién generadas, se utilizó la PCR en tiempo real para analizar la expresión génica de las hiPSC. Se usó la línea celular ES humana, Hues9 (instalación para hES, Universidad de Harvard, <http://mcb.harvard.edu/melton/hues/>), como control. Los análisis de PCR en tiempo real revelan que, en comparación con las células Hues9, las hiPSC de la presente invención expresan ciertos genes a niveles superiores, tales como Gbx2 (5 veces), Dppa3 (2 veces) y Klf4 (2,5 veces). Estos marcadores también se encuentran altamente expresados en células ES de ratón, pero no en EpiSC de ratón. Los cebadores utilizados en el análisis de PCR en tiempo real son: Dppa3: 5'-CAACCTACATCCAGGGTCT-3'; 5'-TCAACGTCTCGGAGGAGATT-5'; Gbx2: 5'-AAAGGCTTCCTGGCCAAAG-3'; 5'-TTGACTCGTCTTCCCTTGC-5'; Klf4: 5'-AGCCTAAATGATGGTGCTTGGT-3'; 5'-TTGAAAACCTTGGCTTCCTTGTT-3'.

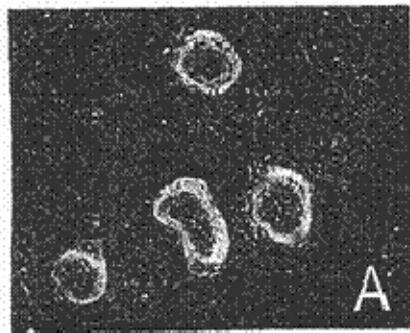
Utilizando análisis de transferencia western, los autores de la presente invención también han analizado la expresión de E-cadherina en hiPSC. La expresión de E-cadherina en hiPSC es el doble que la de las células ES humanas Hues9.

# REIVINDICACIONES

1. Un método de cultivo de células pluripotentes humanas, en donde las células pluripotentes humanas son células madre pluripotentes inducidas (hiPSC) o células madre embrionarias humanas (hESC), por medio de al menos una división celular, comprendiendo el método el cultivo de células en presencia de una cantidad suficiente de:
  - 5 a) un inhibidor de ALK5;
  - b) un inhibidor de MEK;
  - c) un inhibidor de GSK3 $\beta$ ;
  - d) un factor inhibidor de leucemia (LIF); y
  - e) nutrientes suficientes durante un tiempo suficiente, para permitir al menos una división celular mientras se mantiene la pluripotencia celular.
- 10 2. El método de la reivindicación 1:
  - (i) en donde el inhibidor de MEK es PD0325901 o el inhibidor de ALK5 es A-83-01 o SB431542; o
  - (ii) que comprende adicionalmente la introducción de un ácido nucleico heterólogo en las células pluripotentes y el cultivo de las células resultantes para permitir al menos una división celular adicional mientras se mantiene la pluripotencia.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de GSK3 $\beta$  es CHIR99021.
4. El método de la reivindicación 1, en donde las células pluripotentes se cultiva a través de al menos cinco divisiones celulares mientras se mantiene la pluripotencia de la célula.
5. El método de la reivindicación 1, en donde las células madre pluripotentes son hESC.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en donde las células madre pluripotentes son hiPSC.
7. Un cultivo de células humanas pluripotentes, en donde las células humanas pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (hiPSC), o células madre embrionarias humanas (hESC), que comprende una cantidad suficiente de
  - a) LIF;
  - 25 b) un inhibidor de ALK5;
  - c) un inhibidor de MEK; y
  - d) un inhibidor de GSK3 $\beta$ ;para permitir al menos una división celular mientras se mantiene la pluripotencia celular.
- 30 8. El cultivo de la reivindicación 7, en donde el inhibidor de MEK es PD0325901 o el inhibidor de ALK5 es A-83-01 o SB431542.
9. El cultivo de la reivindicación 7, en donde el inhibidor de GSK3  $\beta$  es CHIR99021.
10. El cultivo de la reivindicación 7, en donde las células de mamífero pluripotentes son hESC.
11. El cultivo de la reivindicación 7, en donde las células de mamífero pluripotentes son hiPSC.
12. Un medio de cultivo celular, que comprende una cantidad suficiente de:
  - 35 a) LIF;
  - b) un inhibidor de ALK5;
  - c) un inhibidor de MEK; y
  - d) un inhibidor de GSK3 $\beta$ ;para permitir al menos una división celular mientras se mantiene la pluripotencia celular cuando las células
- 40 humanas pluripotentes se cultivan en el medio, en donde las células pluripotentes humanas son células madre pluripotentes inducidas (hiPSC) o células madre embrionarias humanas (hESC).



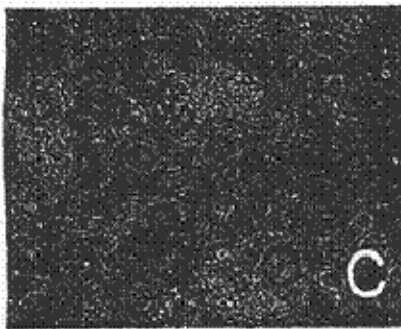
13. El medio de la reivindicación 12, en donde:
- (i) el inhibidor de MEK es PD0325901 o el inhibidor de ALK5 es A-83-01 o SB431542; o
  - (ii) el medio es un recipiente sellado, precargado.
14. El medio de la reivindicación 12, en donde el inhibidor de GSK3 $\beta$  es CHIR99021.
- 5 15. Un método para incrementar la pluripotencia de una célula madre de Epiblasto de mamífero parcialmente pluripotente (EpiSC) a una célula más completamente pluripotente, comprendiendo el método:
- a) poner en contacto la EpiSC con un modificador epigenético seleccionado entre un inhibidor de histona desacetilasa, un inhibidor de la desmetilación de la histonas H3K4 o un activador de la metilación de H3K4; y
  - b) después de la etapa (a) cultivar la EpiSC con (i) un inhibidor de ALK5, (ii) un inhibidor de MEK, (iii) un
- 10 inhibidor del receptor de FGF, y (iv) LIF y en ausencia del modificador epigenético, generando de ese modo la célula más completamente pluripotente en comparación con la EpiSC.
16. El método de la reivindicación 15, que comprende adicionalmente
- c) cultivar la EpiSC después de la etapa (b) con un inhibidor de GSK3.
17. El método de la reivindicación 15, en donde:
- 15 (i) la EpiSC no expresa al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en Oct4, nanog, y REX-1 y la célula más completamente pluripotente expresa uno o más o todos los marcadores;
- (ii) la EpiSC no expresa ALP-I y la célula más completamente pluripotentes expresa ALP-I; o
  - (iii) el modificador epigenético es ácido valproico o parnate.



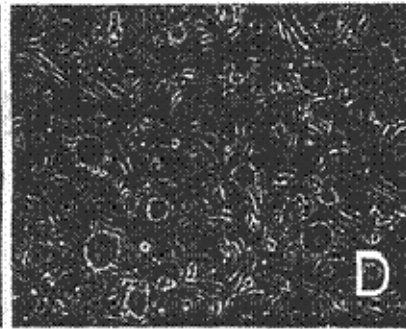
**FIG. 1A**



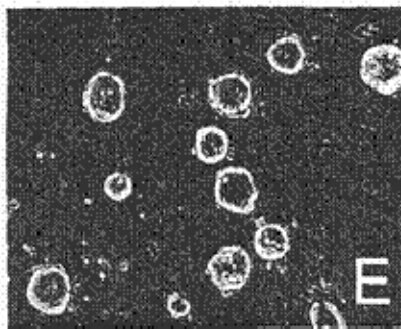
**FIG. 1B**



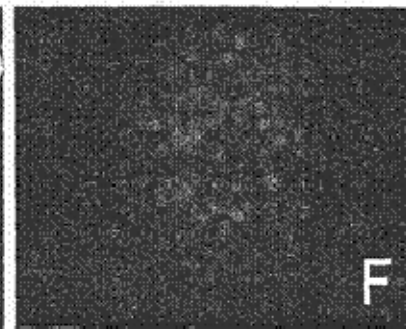
**FIG. 1C**



**FIG. 1D**



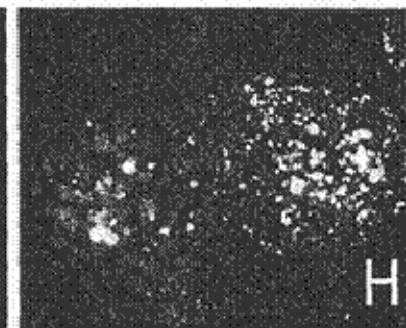
**FIG. 1E**



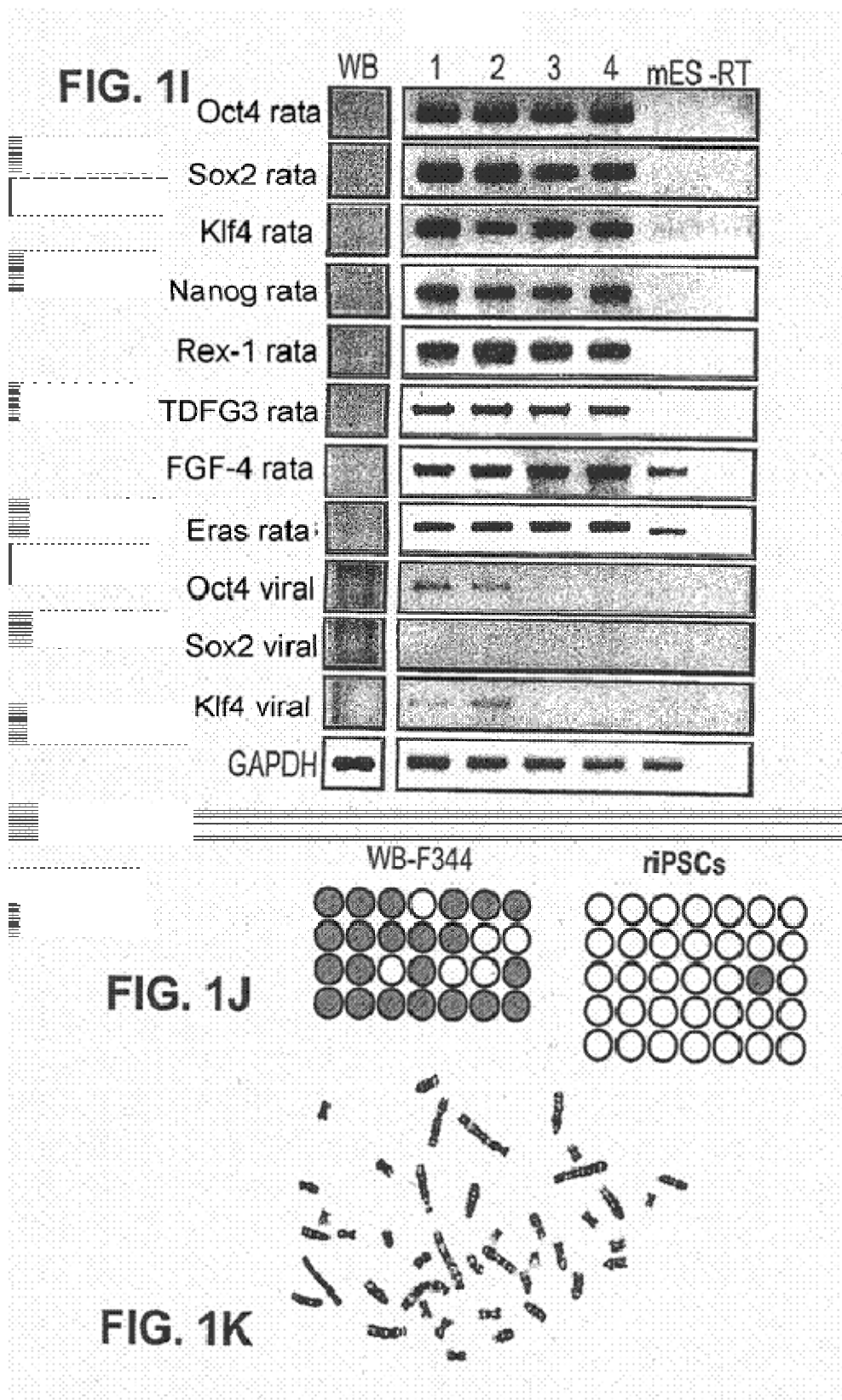
**FIG. 1F**

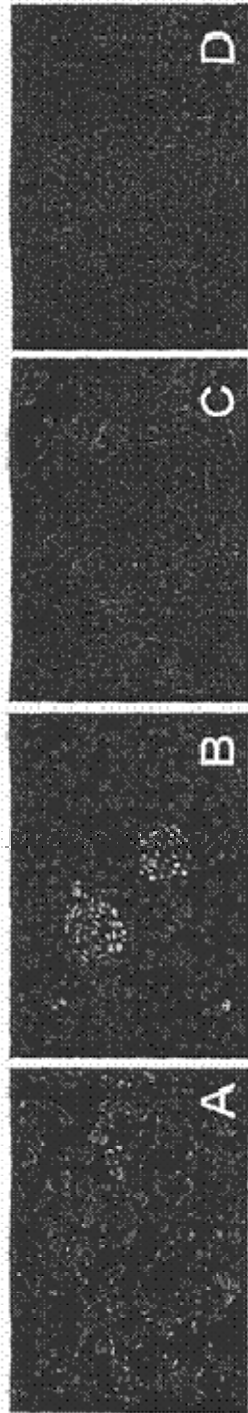


**FIG. 1G**



**FIG. 1H**





**FIG. 2A**

**FIG. 2B**

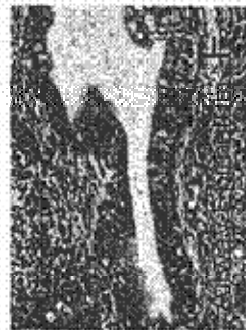
**FIG. 2C**

**FIG. 2D**



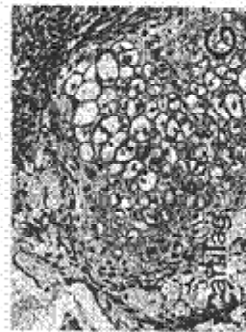
Neuroepitelio

**FIG. 2E**



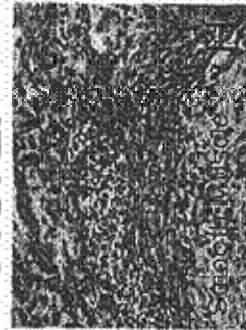
Epitelio vías respiratorias

**FIG. 2F**



Cartilago

**FIG. 2G**

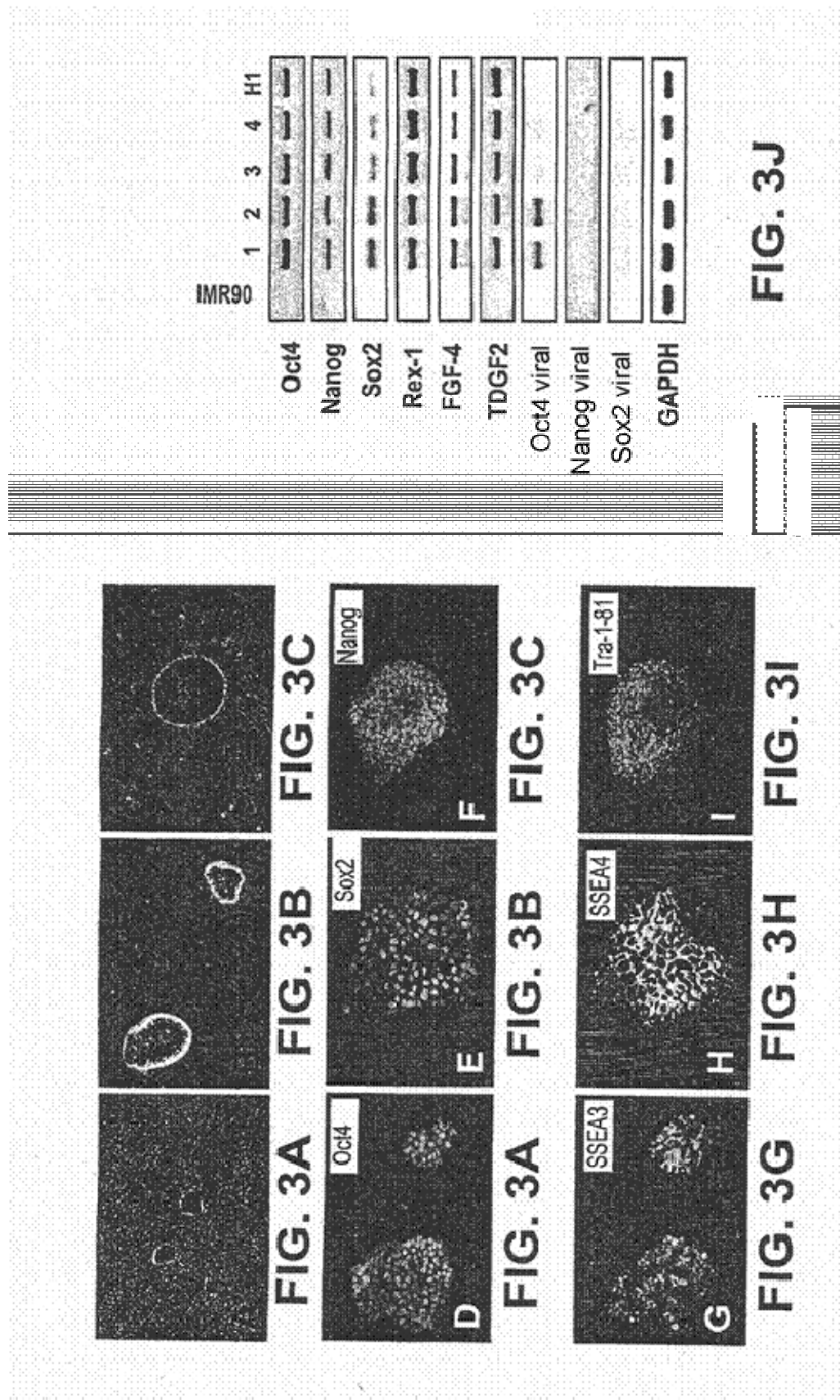


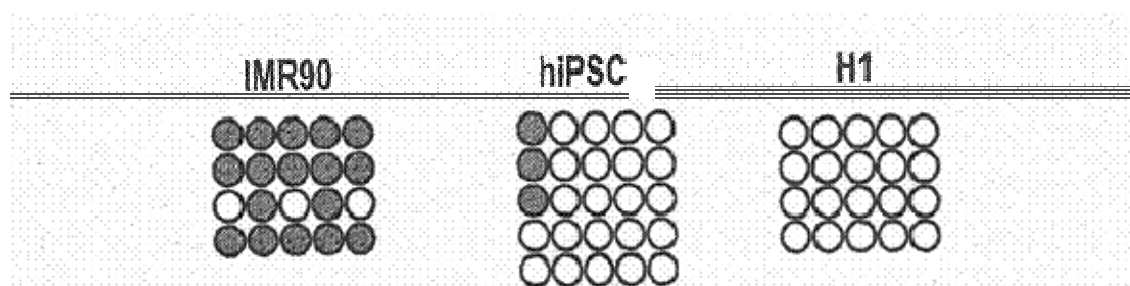
Músculo liso

**FIG. 2H**

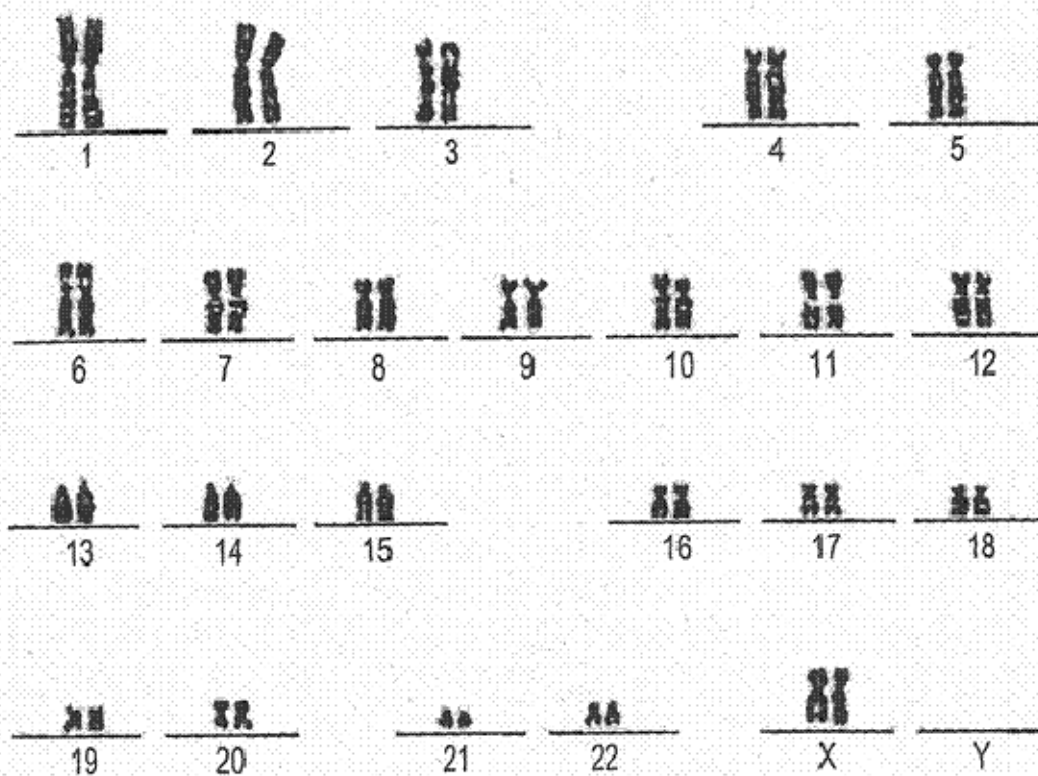


**FIG. 2I**





**FIG. 3K**



**FIG. 3L**





FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

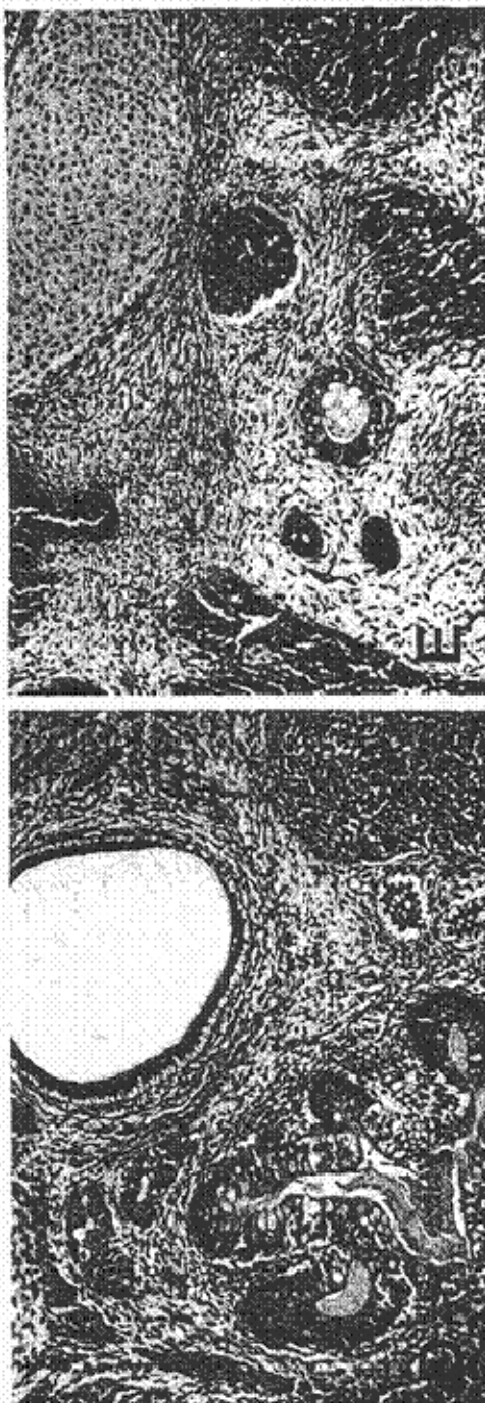


FIG. 4D

FIG. 4E

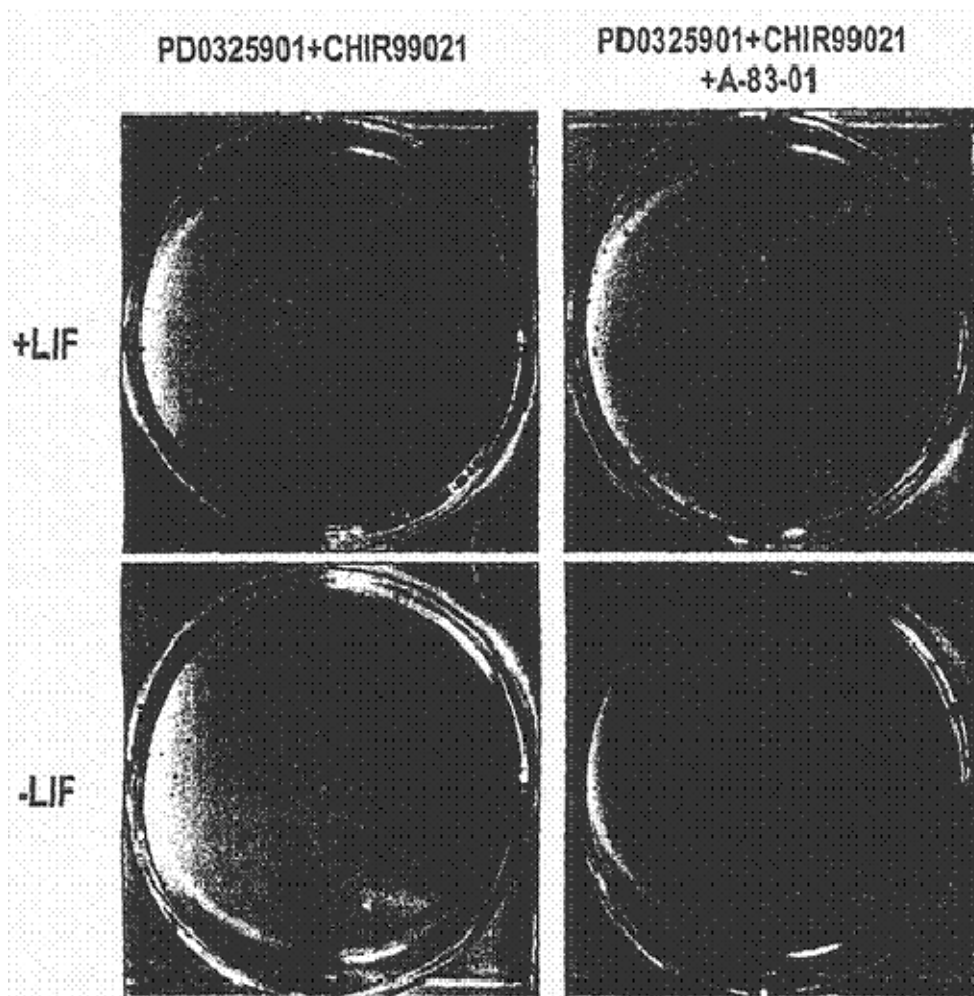


FIG. 5A

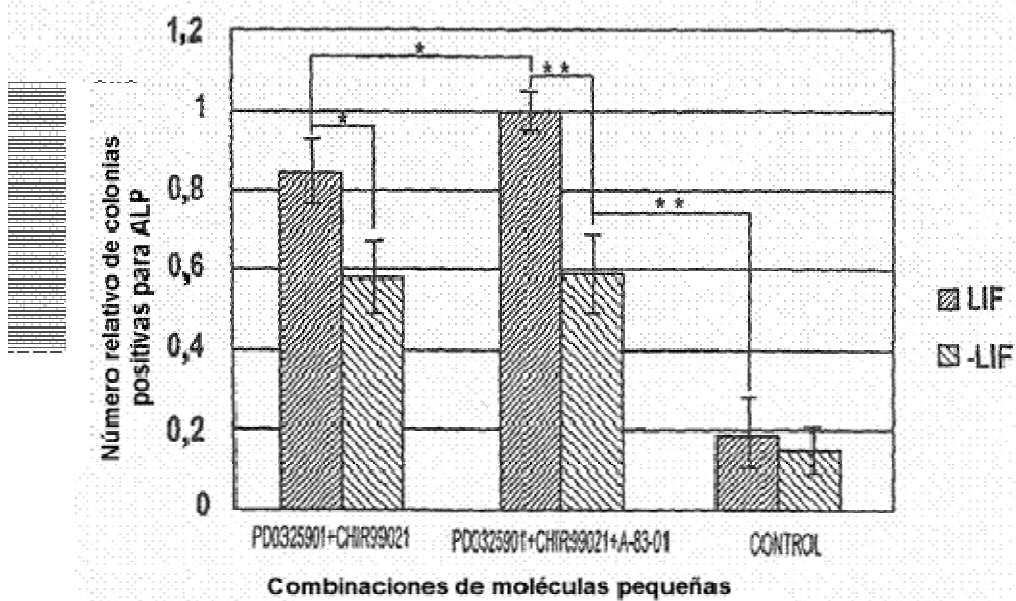
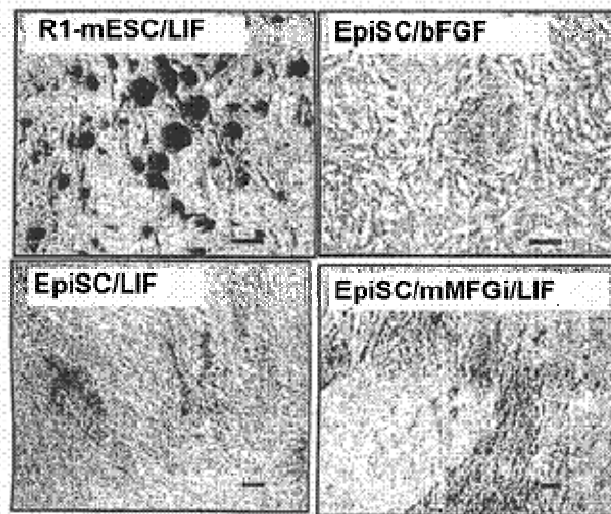


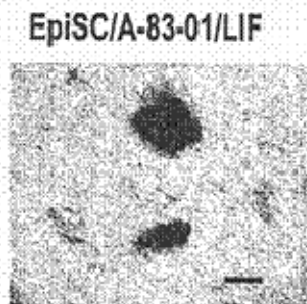
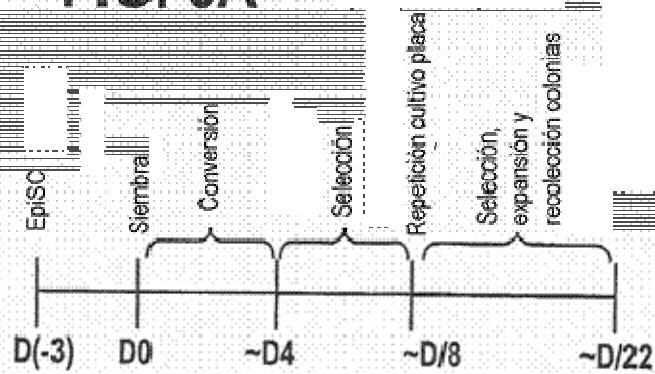
FIG. 5B



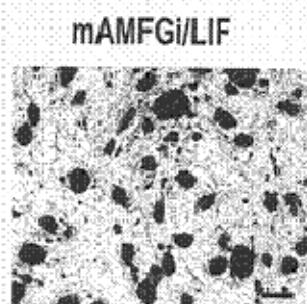


**FIG. 6A**

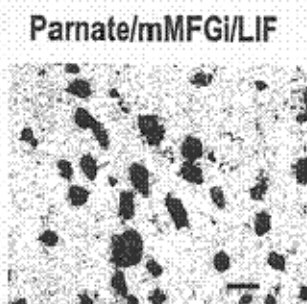
**FIG. 6B**



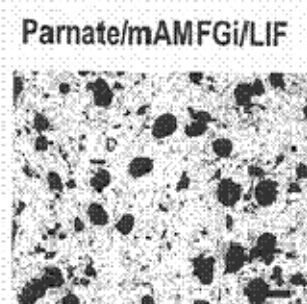
**FIG. 6C**



**FIG. 6D**



**FIG. 6E**



**FIG. 6F**

Eficacia de la generacion de quimeras

| Clon           | Número de embriones transferidos | Número de embriones recuperados/ratón | Número de quimeras |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| mAMFGi         | 32                               | 2 (Embrión)                           | 0                  |
|                | 21                               | 3 (Embrión)                           | 0                  |
| Parnate/mMFGi  | 29                               | 0 (Embrión)                           | 0                  |
|                | 43                               | 4 (Embrión)                           | 2                  |
| Parnate/mAMFGi | 15                               | 3 (adulto vivo)                       | 2                  |
|                | 21                               | 6 (adulto vivo)                       | 5                  |

FIG. 7A

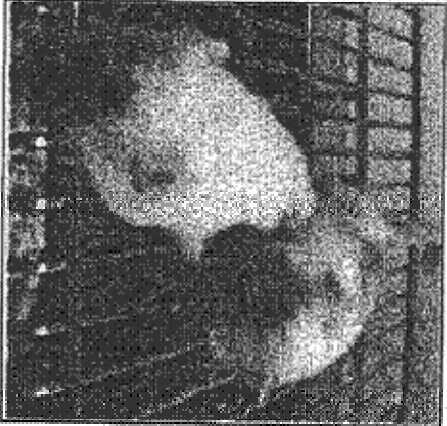


FIG. 7B

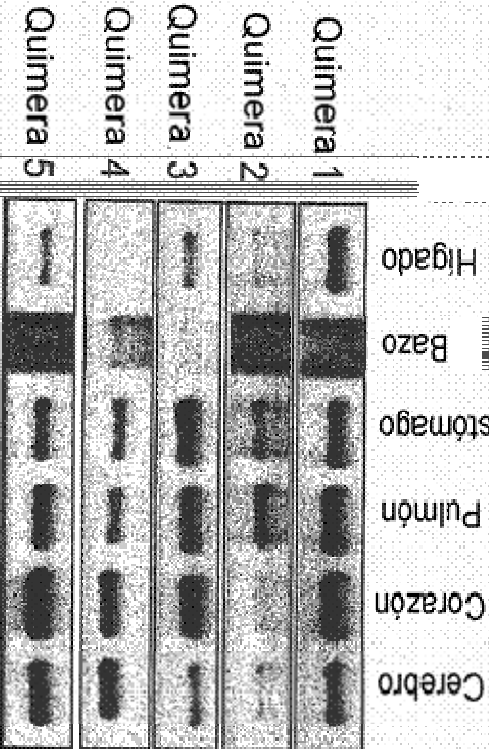


FIG. 7C

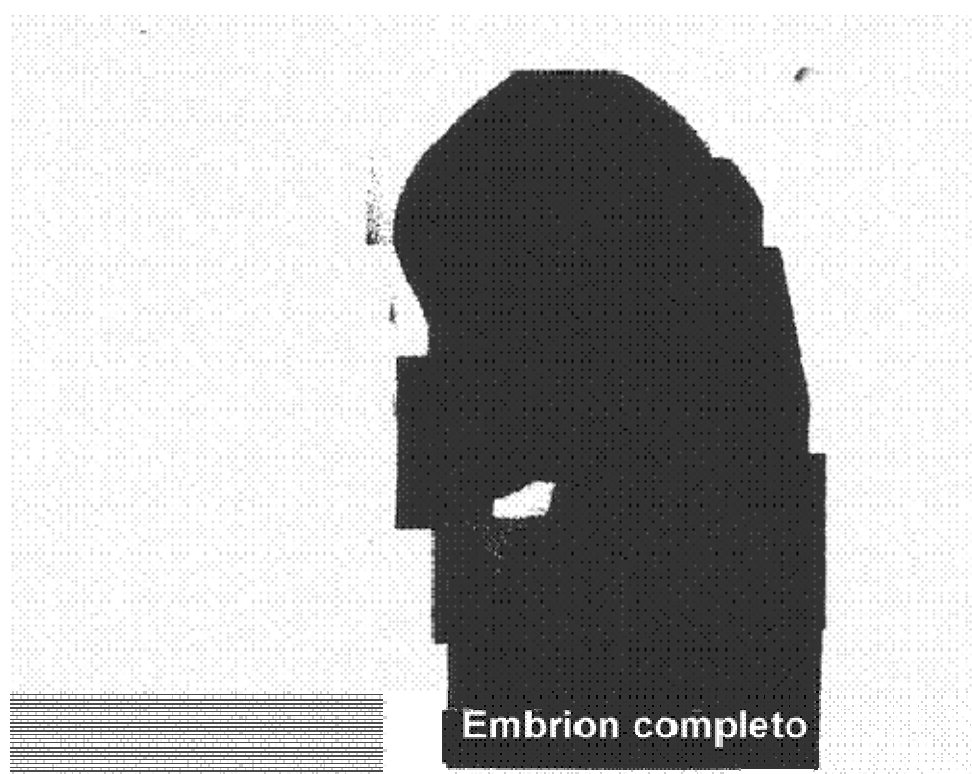


FIG. 7D

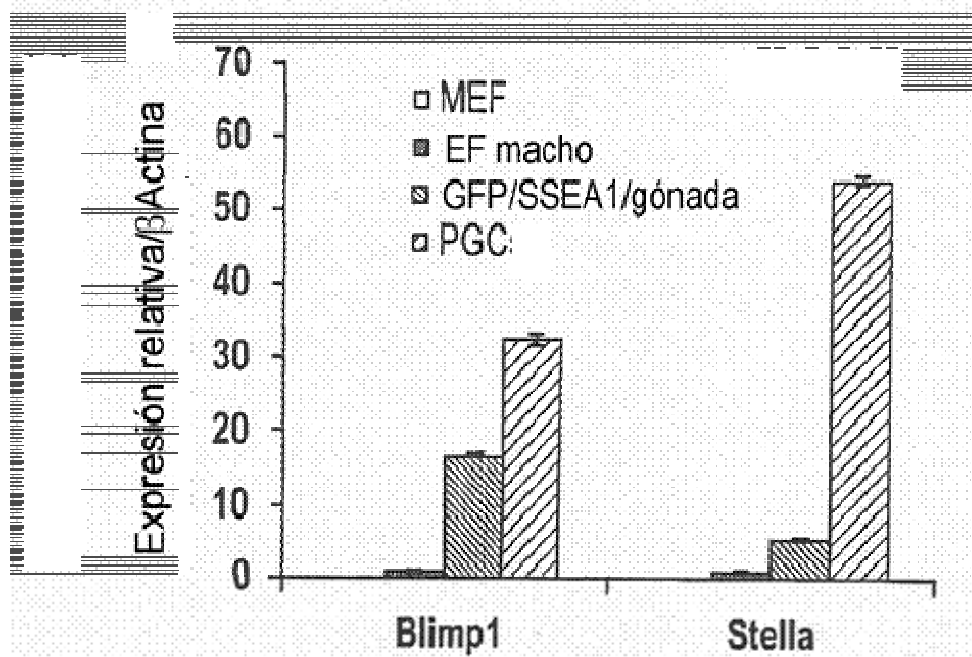
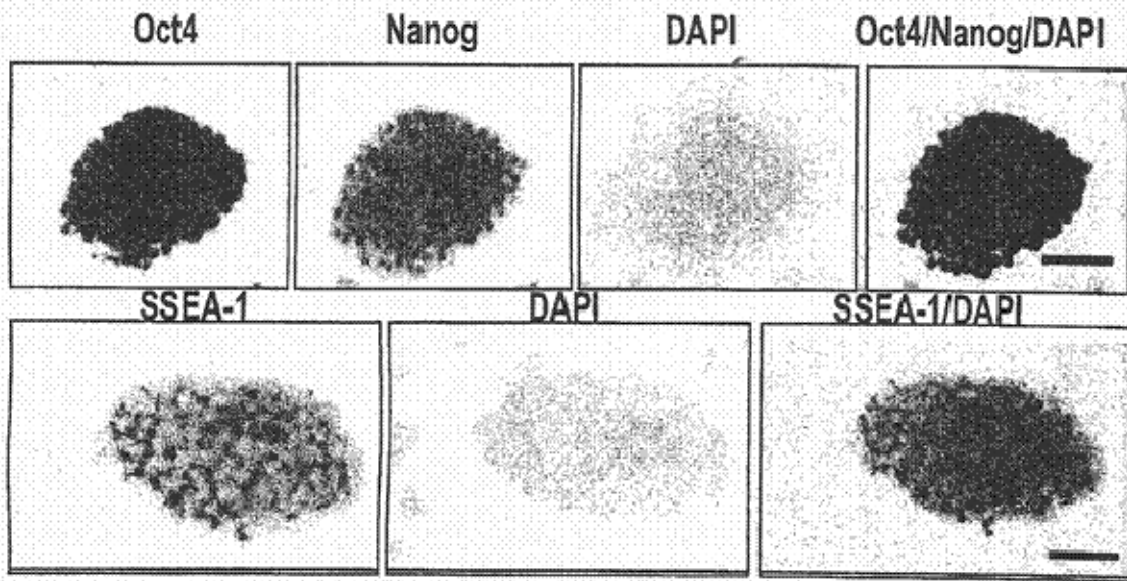
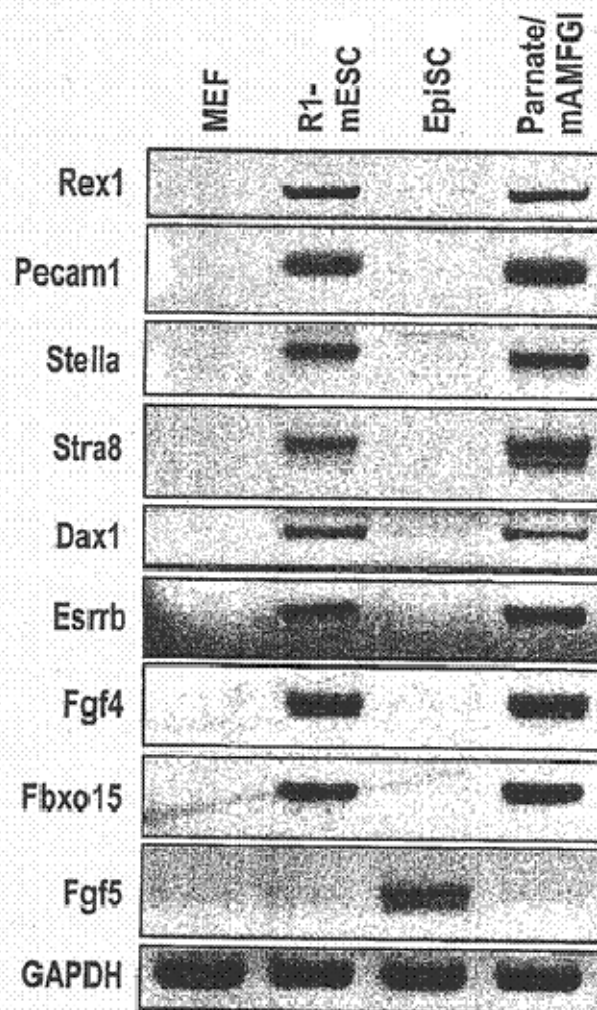


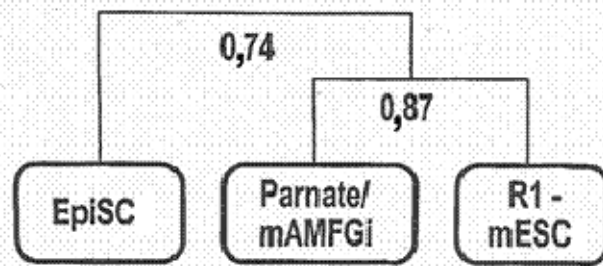
FIG. 7E



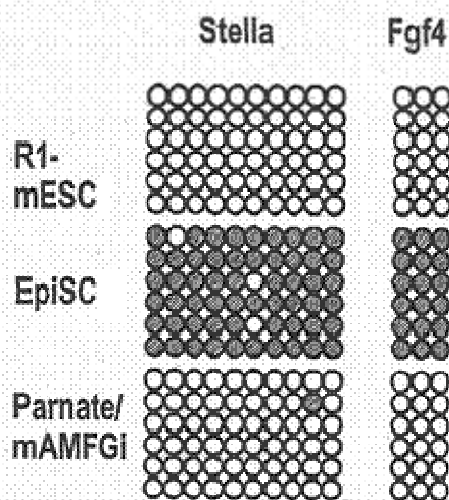
**FIG. 8A**



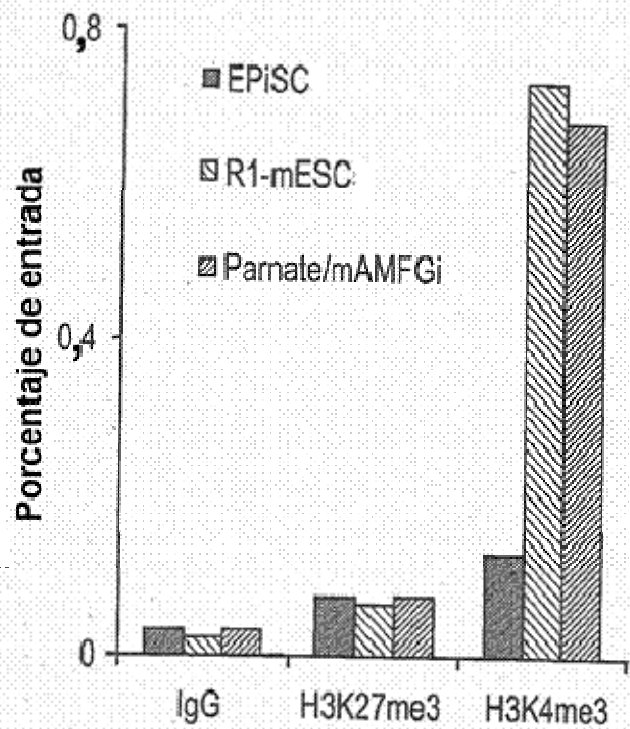
**FIG. 8B**



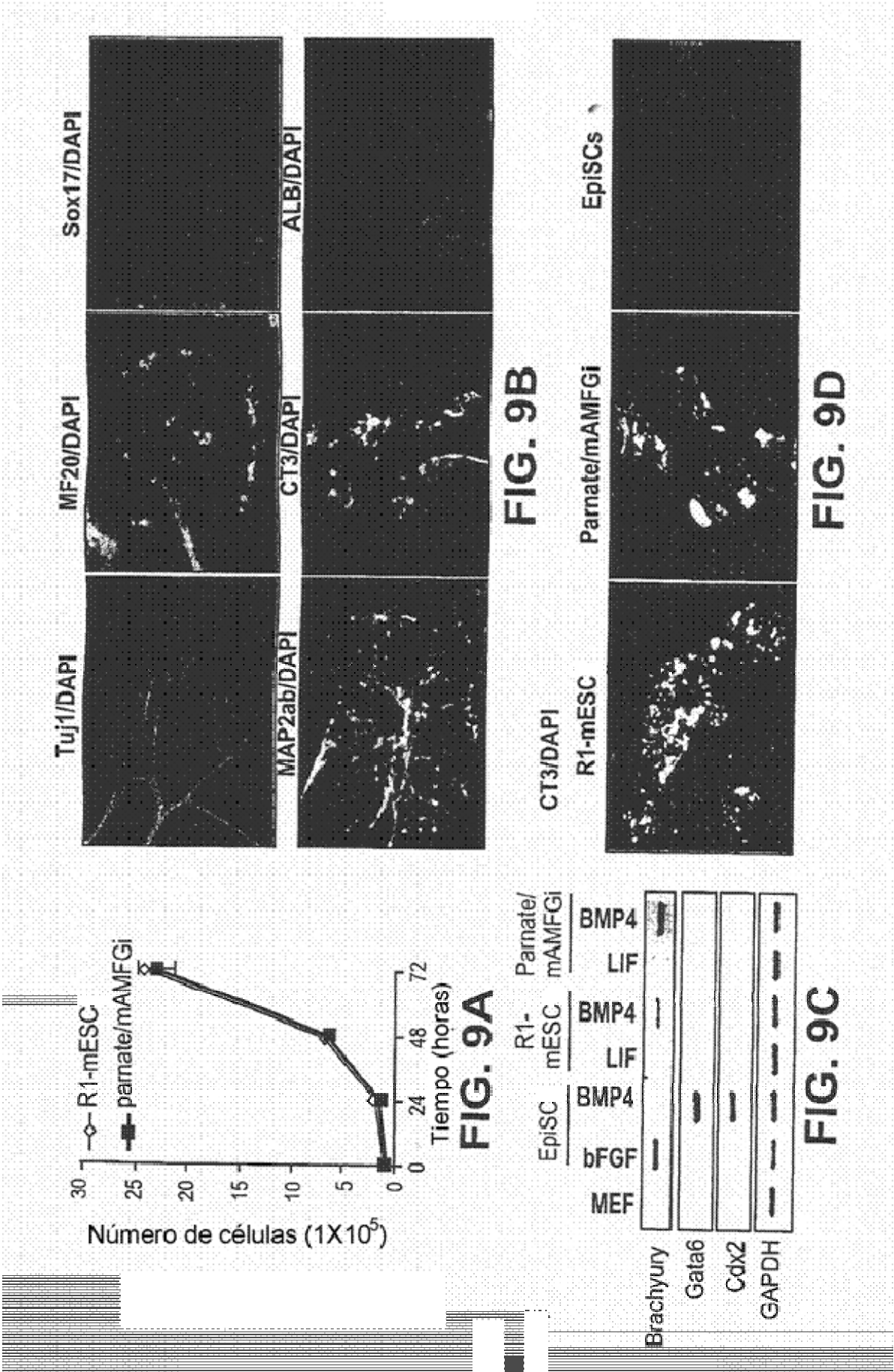
**FIG. 8C**



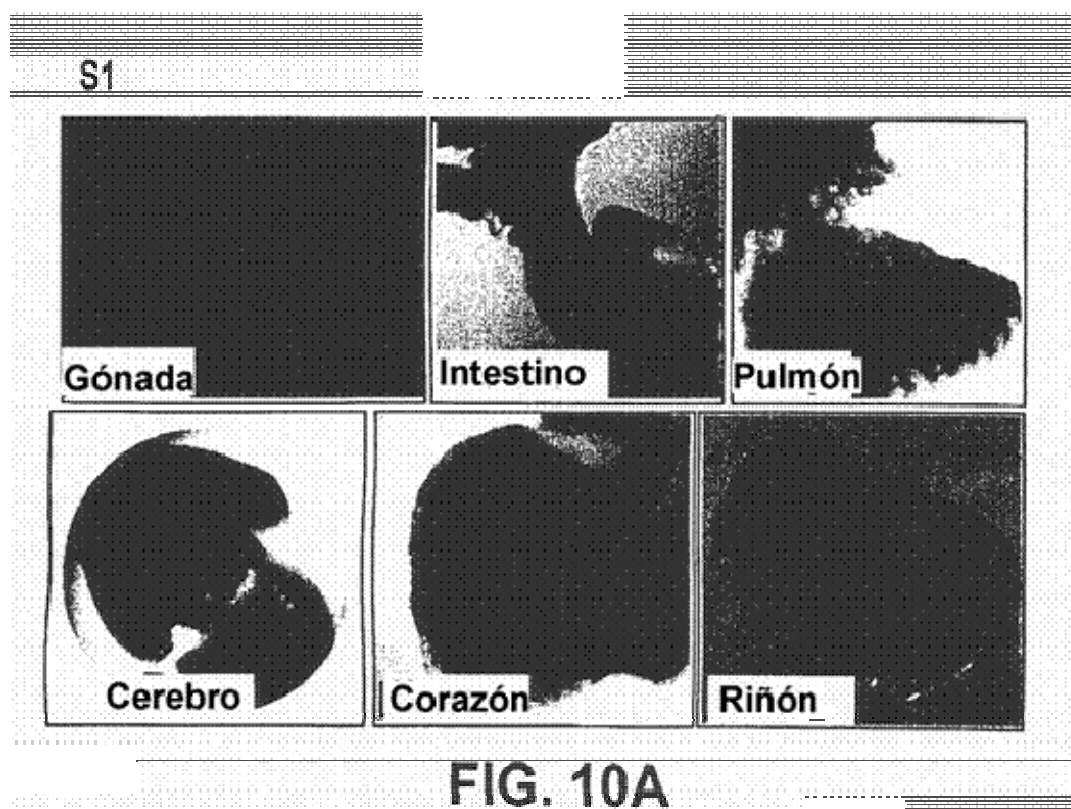
**FIG. 8D**



**FIG. 8E**







Compendio de la genotipificación de GFP

|           | Corazón | Pulmón | Hígado | Cerebro | Bazo |
|-----------|---------|--------|--------|---------|------|
| Quimera-1 | +       | +      | +      | +       | -    |
| Quimera-2 | +       | +      | +      | +       | -    |
| Quimera-3 | +       | +      | +      | +       | +    |
| Quimera-4 | +       | +      | +      | +       | +    |
| Quimera-5 | +       | +      | +      | +       | -    |

**FIG. 10B**

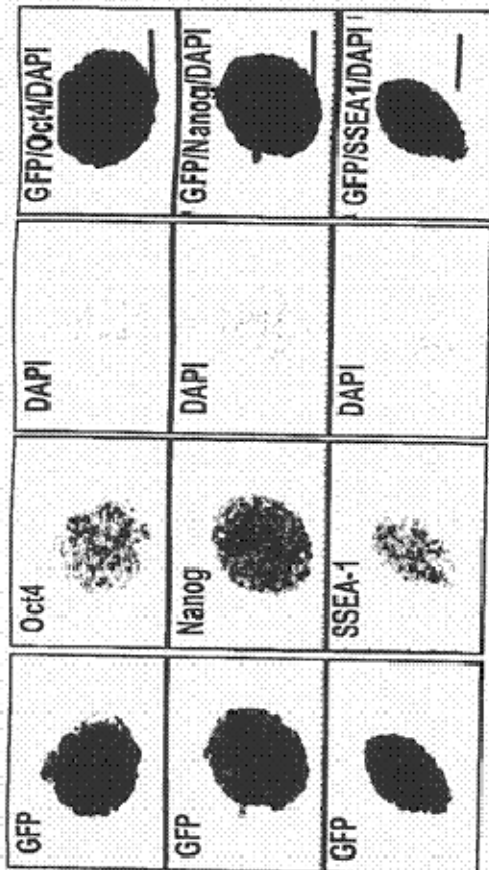


FIG. 11A

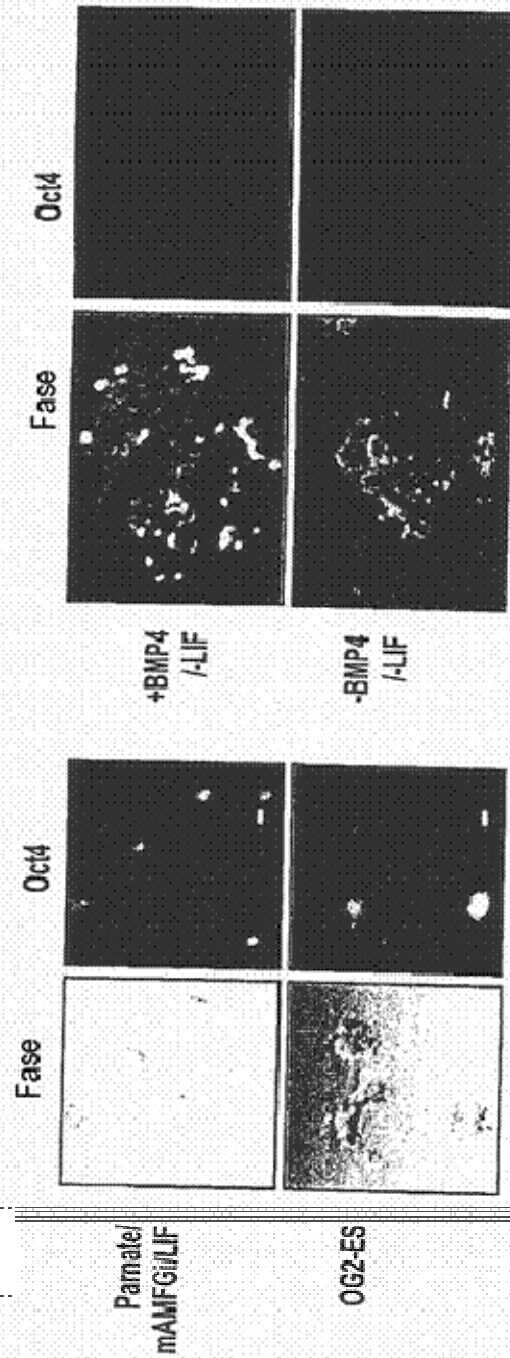
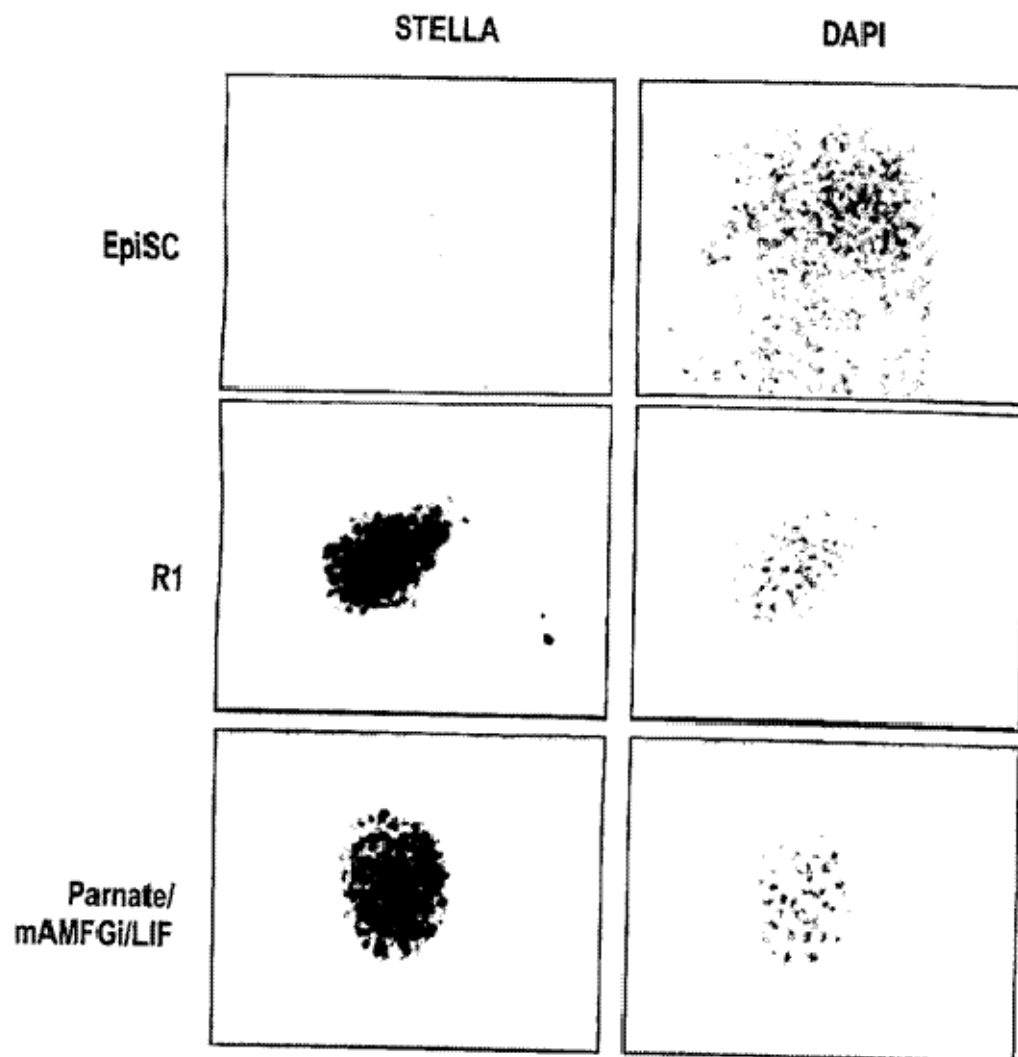


FIG. 11B





**FIG. 12**