

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 058**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/407 (2015.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2011 PCT/JP2011/000621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11096223**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2011 E 11739572 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2532741**

54 Título: **Célula madre hepática inducida y procedimiento para su producción, y aplicaciones de la célula**

30 Prioridad:

03.02.2010 JP 2010022600

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

09.05.2018

73 Titular/es:

**ISHIKAWA, TETSUYA (100.0%)
11-1-309, Momoi 3-chome, Suginami-ku
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**ISHIKAWA, TETSUYA;
HAGIWARA, KEITARO y
OCHIYA, TAKAHIRO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 667 058 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

Célula madre hepática inducida y procedimiento para su producción, y aplicaciones de la célula5 **Campo técnico**

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Más detalladamente, la presente invención se refiere a una célula madre hepática inducida como se define por las reivindicaciones, una prueba que usa esta célula madre hepática inducida como se define en las reivindicaciones, y esta célula madre hepática inducida para su uso en un método terapéutico de tratamiento de un mamífero como se define en las reivindicaciones. En general, en la presente memoria se describen células madre hepáticas inducidas útiles en pruebas de seguridad, pruebas de toxicidad, pruebas de metabolismo, pruebas de interacción farmacológica, pruebas de actividad antiviral, pruebas de detección para productos farmacéuticos tales como terapias hiperlipidémicas, medicamentos hipertensivos, medicamentos de compuestos de bajo peso molecular y medicamentos de anticuerpos, escrutinio de dianas en el descubrimiento de fármacos, preparación de modelos animales, producción de proteínas producidas por hepatocitos y en medicina regenerativa; en particular, se describen células madre hepáticas inducidas que tienen propiedades de hepatocitos, que expresan un grupo de genes marcadores para células madre embrionarias en cantidades comparables a las células madre embrionarias, y que pueden ser sometidas a cultivo de expansión y cultivo de pases a lo largo de un período prolongado; también se describen en la presente memoria procedimientos para producir tales células madre hepáticas inducidas y aplicaciones de tales células.

Técnica anterior

La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos por parte de las compañías farmacéuticas no solo se ven afectados por la prolongación del período de I + D, sino también por los crecientes costes de I + D. Además, a pesar de la cantidad de candidatos que se espera sean nuevos en el futuro, surgirán problemas en términos de eficacia y seguridad a medida que prosigan las actividades de I + D y se abandone el desarrollo de la mayoría de los candidatos.

El desarrollo de nuevos fármacos generalmente requiere de un largo plazo que oscila de 9 a 17 años y enormes cantidades de costes de I + D del orden de mil millones a diez mil millones, por lo que una herramienta de descubrimiento de fármacos capaz de reducir los compuestos candidatos en una etapa temprana como una etapa preclínica conduciría a un menor costo de desarrollo.

Sin embargo, en las pruebas no clínicas actuales, es necesario realizar pruebas en animales para evaluar la seguridad, la toxicidad y otras características del fármaco bajo prueba, y este es uno de los factores que conduce a un coste de desarrollo vertiginoso. Lo que es más, la cinética *in vivo* del fármaco puede diferir debido a las diferencias de especie entre seres humanos y otros animales, lo que dificulta la evaluación suficiente de la seguridad, por lo que solo en la etapa de prueba clínica se encuentra que el compuesto candidato tiene toxicidad, y esto nuevamente hace que se abandone el esfuerzo de desarrollo.

Si bien existe una gran necesidad de establecer un sistema por el cual la cinética *in vivo* y similares de un compuesto candidato en seres humanos puedan predecirse y evaluarse en una etapa temprana de los procedimientos de investigación y desarrollo; ahora se están realizando esfuerzos para construir un sistema de evaluación que utilice hepatocitos humanos para reemplazar los experimentos con animales que están limitados por la "barrera de las diferencias de especies". Al utilizar este sistema de evaluación, los compuestos candidatos para los fármacos en desarrollo pueden limitarse con precisión a fármacos candidatos altamente seguros en una etapa temprana del desarrollo, por lo que las compañías farmacéuticas tienen una demanda particularmente grande para el sistema.

En pruebas no clínicas convencionales que utilizan células cultivadas en seres humanos, se han empleado hepatocitos cultivados primarios o líneas celulares existentes de personas no japonesas. Sin embargo, los hepatocitos cultivados primarios tienen los problemas de una abrumadora escasez de donantes y diferencias de lotes excesivamente grandes. En particular, los hepatocitos de cultivo primario de los japoneses, que implican cuestiones éticas y están regulados por la ley, son extremadamente difíciles de obtener y su suministro constante es imposible.

Además, las enzimas metabolizadoras de fármacos que se expresan en el tejido hepático desempeñan un papel importante en la catálisis del metabolismo de muchos productos farmacéuticos. Sin embargo, debido a que están presentes los polimorfismos que las acompañan, y a que la cantidad de su expresión y su actividad se ven afectadas por importantes diferencias individuales, estos factores hacen que el problema mencionado anteriormente con las pruebas no clínicas sea aún más grave.

Para hacer frente a las diferencias presentes entre un gran número de individuos, es deseable que los hepatocitos

cultivados primarios derivados de una pluralidad de donantes que cubren tales diferencias puedan utilizarse repetidamente como células representativas en varios tipos de pruebas. Sin embargo, los hepatocitos de cultivo primario difícilmente pueden expandirse en una placa de cultivo y esto presenta un problema debido a que es prácticamente difícil realizar un cultivo de pase del mismo hepatocito y utilizarlo repetidamente en diversas pruebas.

En contraste, muchas de las líneas celulares establecidas existentes son aquellas células que han experimentado anomalías cariotípicas y no hay suficientes líneas celulares para cubrir las diferencias entre una gran cantidad de individuos. Además, las líneas celulares establecidas existentes sometidas a un cultivo de pases prolongado mediante métodos convencionales no muestran la misma actividad enzimática metabolizadora del fármaco o la capacidad inductora del transportador que los hepatocitos de cultivo primario, por lo que dado este resultado, es imposible predecir la seguridad, el metabolismo y otras características en seres humanos en aplicaciones clínicas.

En estas circunstancias, se desean células que tengan propiedades de hepatocitos y que puedan someterse a cultivo de pases durante un período prolongado. Sin embargo, nunca ha habido ningún informe que demuestre que tales células se descubrieron a partir de una pluralidad de donantes que cubren las diferencias entre un gran número de personas.

Con respecto a las células madre para el hígado, se supone la existencia de células madre hepáticas que tienen la capacidad de diferenciarse a hepatocitos. Nuevamente, sin embargo, nunca ha habido ningún informe que demuestre que se hayan descubierto células madre hepáticas que tengan una naturaleza tal que expresen genes autoreplicantes como células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas y puedan ser sometidas a cultivo de pases *ex vivo* durante un período prolongado.

Por lo tanto, se están realizando investigaciones para determinar si las células madre embrionarias (células ES) que retienen la pluripotencia para diferenciarse a células somáticas de todos los tejidos y células germinales y que aún son capaces de autorreplicarse casi ilimitadamente en un estado indiferenciado podrían ser aplicables no solo en medicina regenerativa sino también en el campo del descubrimiento de fármacos. Las células madre embrionarias se refieren a una línea de células madre preparada a partir de masas de células internas que pertenecen a una parte del embrión en una etapa de blastocisto que es una etapa de desarrollo temprano de un animal y a veces reciben el nombre de células ES.

Para establecer las células madre embrionarias, se requiere un óvulo fertilizado o un embrión temprano en cualquiera de las fases hasta un blastocisto que esté más desarrollado que el óvulo fertilizado. En el caso de los seres humanos, se utiliza un óvulo fertilizado como material de partida y se reconoce que la pérdida resultante del potencial emergente de la vida humana plantea un problema ético. Por esta razón, algunos países prohíben realizar ningún estudio, incluida la preparación, de células madre embrionarias humanas; incluso en países que permiten la investigación en células madre embrionarias humanas con el reconocimiento de su potencial para tratar enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de Parkinson) y lesión de la médula espinal, es decir, las enfermedades cuya terapia radical aún no se ha establecido, se imponen limitaciones estrictas en el manejo de las células madre embrionarias humanas. Por lo tanto, los problemas éticos constituyen grandes barreras para la investigación fundamental y aplicada sobre las células madre embrionarias.

Además, las células madre embrionarias necesitan diferenciarse a ciertas células específicas antes de que puedan ponerse en aplicación práctica, y se desarrollan cada vez más métodos para diferenciarlas a hepatocitos, células nerviosas, cardiomiocitos, células beta pancreáticas y similares. Sin embargo, la diferenciación a estas células específicas es difícil de realizar y la diferenciación inducida a hepatocitos es particularmente difícil. Hasta el presente, no se ha establecido ningún método que permita la inducción altamente eficiente de la diferenciación a células madre hepáticas maduras que tenga una calidad suficientemente alta para ser utilizada en la investigación de descubrimiento de fármacos. Todos los métodos que hasta el momento se ha informado que son capaces de inducir la diferenciación requieren hasta tres semanas para inducir la diferenciación. Sin embargo, las células de tipo hepatocito en las que se ha inducido altamente diferenciación alcanzando un coste considerable, mucho trabajo y un tiempo prolongado difícilmente pueden aumentar en número.

Recientemente se ha informado de que al introducir el gen OCT3/4 (OCT3/4 es el nombre de un gen y algunas veces se designa OCT3 u OCT4 pero en lo sucesivo se denomina gen POUF1), el gen SOX2, el gen KLF4 y el gen c-MYC (Documento de Patente 1) o al introducir el gen POU5F1, el gen SOX2 y el gen KLF4 en presencia de un factor de crecimiento de fibroblastos básico (Documento No Relacionado con Patentes 1), se indujeron células madre pluripotentes que son células indiferenciadas, ya que las células madre embrionarias pueden prepararse a partir de células somáticas en seres humanos y similares (Documento de Patente 2). Se sabe que las células madre pluripotentes inducidas por el ser humano (células iPS) tienen dos características: (1) pluripotencia para la diferenciación en tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) que pueden convertirse en todas las células que forman un cuerpo (2) capacidad de autorreplicación mediante la cual las células pueden someterse a un cultivo de pases ilimitadamente en una placa de cultivo en condiciones especificadas mientras permanecen en estado indiferenciado. También se ha informado de que tales células madre pluripotentes inducidas

por seres humanos son muy similares a las células madre embrionarias humanas en términos de morfología, expresión génica, antígeno de superficie celular, capacidad autoreplicante a largo plazo y capacidad de formación de teratoma (tumor benigno) (Documentos No Relacionados con Patentes 2 y 3), así como también que los genotipos de las HLA son idénticos a los de las células somáticas que son células derivadas (Documento No Relacionado con Patentes 3).

En la preparación de tales células madre pluripotentes inducidas, se sostiene que una célula somática diferenciada puede "restablecerse o reprogramarse" a una célula madre pluripotente indiferenciada simplemente introduciendo cuatro genes (es decir, el gen POUF1, el gen SOX2, el gen KLF4 y gen c-MYC) o tres genes (es decir, el gen POU5F1, el gen SOX2 y el gen KLF4) en la célula. Sin embargo, en células humanas, las células madre pluripotentes inducidas se preparan a partir de células somáticas con una eficacia del 0,1%-0,01% en el caso de la transfección de cuatro genes, y con una eficacia del 0,01%-0,001% en la transfección de tres genes. Esto significa que de 99,9% a 99,999% de las células no se reprogramarán a una célula madre pluripotente inducida mediante transferencia génica.

Además, el gen NANOG, el gen POU5F1, el gen SOX2, el gen ZFP42, el gen SALL4, el gen LIN28 y el gen TERT, y similares que se expresan de forma característica en células madre embrionarias se consideran factores importantes para que las células madre pluripotentes permanezcan indiferenciadas, lo que sirve para suprimir la diferenciación celular. Por lo tanto, en una célula diferenciada, la expresión del gen NANOG, el gen POUF1, el gen SOX2, el gen ZFP42, el gen SALL4, el gen LIN28 y el gen TERT que se consideran factores importantes en el mantenimiento de un estado indiferenciado desaparecerán a medida que los genes de diferenciación (propiedades de la célula diferenciada) se expresen.

En otras palabras, se ha considerado imposible preparar una célula en la que no solo el gen NANOG, el gen POUF1, el gen SOX2, el gen ZFP42, el gen SALL4, el gen LIN28 y el gen TERT se consideren factores importantes en el mantenimiento de un estado indiferenciado, sino también se expresen muchas propiedades de una célula diferenciada (muchos genes de diferenciación).

Lista de referencias

Documentos de patente

Documento de patente 1: JP 2008-283972 A
Documento de patente 2: JP 2008-307007

Documentos no relacionados con patentes

Documento no relacionado con patentes 1: Nakagawa M et al., Nat Biotechnol., 2008, 26.101-6
Documento no relacionado con patentes 2: Takahashi K, Yamanaka S et al., Cell, 2007, 131, 861-872
Documento no relacionado con patentes 3: Masaki H, Ishikawa T et al., Stem Cell Res., 2008, 1, 105-115.

En estas circunstancias, los autores de la presente invención llevaron a cabo un estudio exhaustivo para saber si era posible preparar células que tuvieran los genes importantes para el mantenimiento de un estado indiferenciado y muchas propiedades de los hepatocitos; como resultado, descubrieron que era posible preparar células madre hepáticas inducidas que expresaban genes característicos de las células madre embrionarias y que aún expresaban genes característicos de los hepatocitos; Además, encontraron que estas células madre hepáticas inducidas fueron útiles en pruebas de seguridad, pruebas de toxicidad, pruebas de metabolismo, pruebas de interacción con fármacos, pruebas de actividad antiviral, pruebas de detección para productos farmacéuticos tales como terapias hiperlipidémicas, terapias hipertensivas, medicamentos de compuestos de bajo peso molecular, y medicamentos de anticuerpos, detección de dianas en el descubrimiento de fármacos, preparación de modelos animales, producción de proteínas producidas por hepatocitos y en medicina regenerativa; por consiguiente se ha completado la presente invención.

Compendio de la invención

Problemas técnicos

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención es proporcionar una célula madre hepática inducida que expresa genes característicos de una célula madre embrionaria y que aún expresa genes característicos de un hepatocito.

Un segundo objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar una célula madre hepática inducida que exprese genes característicos de una célula madre embrionaria y que aún exprese genes característicos de un hepatocito.

Un tercer objeto de la presente invención es proporcionar métodos que utilizan la célula madre hepática inducida de la presente invención, incluyendo métodos de prueba de seguridad, métodos de prueba de toxicidad, métodos de prueba de metabolismo, métodos de prueba de interacción con fármacos, métodos de prueba de actividad antiviral, métodos de prueba de detección para productos farmacéuticos tales como agentes terapéuticos hiperlipidémicos, productos terapéuticos para la hipertensión, medicamentos de compuestos de bajo peso molecular y medicamentos de anticuerpos, métodos para seleccionar dianas en el descubrimiento de fármacos, métodos para la preparación de modelos animales, métodos para la producción de proteínas producidas por hepatocitos y métodos de medicina regenerativa.

10 Solución a los problemas

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una célula madre hepática inducida obtenida mediante un procedimiento que comprende una etapa de inducir una célula de mamífero a una célula madre hepática inducida, en donde la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una célula derivada de adulto, una célula derivada de neonato, célula derivada de piel y una célula de un individuo canceroso, en donde dicha etapa de inducción comprende introducir el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 en la célula de mamífero con la ayuda de vectores de expresión para llevar el célula de mamífero a tal estado que los productos génicos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida estarán presentes para asegurar que la abundancia relativa intracelular del producto génico del gen POU5F1 es mayor que la del producto génico del gen SOX2, donde la razón de uso entre el gen POUF1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida es 4:2:1 en ese orden, y en donde la célula madre hepática inducida se caracteriza por satisfacer al menos los siguientes requisitos (1)-(3):

(1) expresa al menos 15 genes seleccionados del grupo de los genes enumerados en la siguiente Tabla 1 que son genes marcadores para una célula madre embrionaria;

25

[Tabla 1]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank
ACVR2B	NM_001106
CD24	L33930
CDH1	NM_004360
CYP26A1	NM_057157
DNMT3B	NM_175850
DPPA4	NM_018189
EDNRB	NM_003991
FLT1	NM_002019
GABRB3	NM_000814
GATA6	NM_005257
GDF3	MM_020634
GRB7	NM_005310
UN28	NM_024674
NANOG	NM_024865
NODAL	NM_018055
PODXL	NM_005397
POU5F1	NM_002701
SALL4	NM_020436
SOX2	NM_003106
TDGF1	NM_003212
TERT	NM_198253
ZFP42	NM_174900
ZIC3	NM_003413

ES 2 667 058 T3

(2) tiene propiedades de un hepatocito en donde al menos 15 genes seleccionados del grupo de genes en la Tabla 2 siguiente se expresan como genes asociados con las propiedades de un hepatocito del apartado (2) anterior.

[Tabla 2]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
AFP	NM_001134	FGA	NM_021871	PDK4	NM_002612
AGT	NM_000029	FGA	NM_000508	PDZK1	NM_002614
AHSG	NM_001622	FGB	NM_005141	PLA2G12B	NM_032562
AK027294	AK027294	FGG	NM_000509	PLG	NM_000301
AK074614	AK074614	FLRT3	NM_198391	PRG4	NM_005807
AK124281	AK124281	FMOD	NM_002023	PSMAL	NM_153696
AK126405	AK126405	FOXA1	NM_004496	PTGDS	NM_000954
ALB	NM_000477	FTCD	NM_206965	PTHR1	NM_000316
ALDH1A1	NM_000689	GATA4	NM_002052	RASD1	NM_016084
ANXA8	NM_001630	GATM	NM_001482	RBP4	NM_006744
APCDD1	NM_153000	GDF10	NM_004962	RNF43	NM_017763
APOA1	NM_000039	GJB1	NM_000166	RRAD	NM_004165
APOA2	NM_001643	GLT1D1	NM_144669	S100A14	NM_020672
APOA4	NM_000482	GPRC5C	NM_022036	SEPP1	NM_005410
APOB	NM_000384	GSTA3	NM_000847	SERPINC2	NM_178865
AREG	NM_001657	GUCY1A3	NM_000856	SERPINA1	NM_001002236
ART4	NM_021071	H19	NR_002196	SERPINA3	
ASGR2	NM_080912	HHEX	NM_002729	SERPINA5	
ATAD4	NM_024320	HKDC1	NM_025130	SH3TC1	NM_018986
BC018589	BC018589	HMGCS2	NM_005518	SLC13A5	NM_177550
BMP2	NM_001200	HP	NM_005143	SLC40A1	NM_014585
BX097190	BX097190	HPR	NM_020995	SLC5A9	
C11orf9	NM_013279	HPX	NM_000613	SLCO2B1	MM_007256
C13orf15	NM_014059	HSD17B2	NM_002153	SLP1	NM_003064
C15orf27	NM_152335	HTRA3	NM_053044	SPARCL1	
C3	NM_000064	IGF2	NM_001007139	SPON1	NM_006108
C5	NM_001735	IL32	NM_001012631	ST8SIA1	NM_003034

ES 2 667 058 T3

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
CA414006	CA414006	INHBB	NM_002193	STARD10	NM_006645
CD163	NM_004244	ISX	NM_001008494	STMN2	S82024
CD1D	NM_001766	KCNJ16	NM_170741	TD02	NM_005651
CDX2	NM_001265	KYNU	NM_003937	TF	NM_001063
CILP	NM_003613	LAMC2	NM_005562	TMC6	NM_007267
CMKLR1	NM_004072	LGALS2	NM_006498	TMEM16D	NM_178826
COL4A6	NM_033841	LHX2	NM_004789	TSPAN15	NM_012339
COLEC11	NM_199235	LOC132205	AK091178	TTR	NM_000371
CXCL14	NM_004887	LOC285733	AK091900	UBD	NM_006398
CXCR4	NM_001008540	M27126	M27126	UGT2B11	NM_001073
CXCR7	NM_020311	MAF	AF055376	UGT2B7	NM_001074
DACH1	NM_080759	MFAP4	NM_002404	UNC93A	NM_018974
DENND2A	NM_015689	MMP10	NM_002425	VCAM1	NM_001078
DIO3	NM_001362	MTTP	NM_000253	VIL1	NM_007127
DLK1	NM_003836	NGEF	NM_019850	VTN	
DUSP6	NM_001946	NGFR	NM_002507	WFDC1	

(3) puede ser sometido a un cultivo de expansión o cultivo de pases durante al menos 3 días.

5 Preferiblemente, los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior se expresan en la célula madre hepática inducida en cantidades que varían de 1/8-8 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria (reivindicación 2). Más preferiblemente, los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior se expresan en la célula madre hepática inducida en cantidades que varían de 1/4 a 4 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria (reivindicación 3).

10

[Tabla 2]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A2M	NM_000014	ERP27	NM_152321	NRCAM	NM_005010
ACE2	NM_021804	EVA1	NM_144765	NTF3	NM_002527
ACVRL1	NM_000020	F10	NM_000504	OLFML2A	NM_182487

ES 2 667 058 T3

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
ADAMTS9	NM_182920	F2	MM_000506	PAG1	NM_018440
AFAP1L2	NM_001001936	FABP1	NM_001443	PCSK6	NM_002570
AFP	NM_001134	FGA	NM_021871	PDK4	NM_002612
AGT	NM_000029	FGA	NM_000508	PDZK1	NM_002614
AHSG	NM_001622	FGB	NM_005141	PLA2G12B	NM_032562
AK027294	AK027294	FGG	NM_000509	PLG	NM_000301
AK074614	AK074614	FLRT3	NM_198391	PRG4	NM_005807
AK124281	AK124281	FMOD	NM_002023	PSMAL	NM_153696
AK126405	AK126405	FOXA1	NM_004496	PTGDS	NM_000954
ALB	NM_000477	FTCD	NM_206965	PTHR1	NM_000316
ALDH1A1	NM_000689	GATA4	NM_002052	RASD1	NM_016084
ANXA8	NM_001630	GATM	NM_001482	RBP4	NM_006744
APCDD1	NM_153000	GDF10	NM_004962	RNF43	NM_017763
APOA1	NM_000039	GJB1	NM_000186	RRAD	NM_004165
APOA2	NM_001643	GLT1D1	NM_144669	S100A14	NM_020672
APOA4	NM_000482	GPRC5C	NM_022036	SEPP1	NM_005410
APOB	NM_000384	GSTA3	NM_000847	SERINC2	NM_178865
AREG	NM_001657	GUCY1A3	NM_000856	SERPINA1	NM_001002236
ART4	NM_021071	H19	NR_002196	SERPINA3	NM_001085
ASGR2	NM_080912	HHEX	NM_002729	SERPINA5	NM_000624
ATAD4	NM_024320	HKDC1	NM_025130	SH3TC1	NM_018986
BC018589	BC018589	HMGCS2	NM_005518	SLC13A5	NM_177550
BMP2	NM_001200	HP	NM_005143	SLC40A1	NM_014585
SX097190	BX097190	HPR	NM_020995	SLC5A9	NM_001011547
C11orf9	NM_013279	HPX	NM_000813	SLCO2B1	NM_007256
C13orf15	NM_014059	HSD17B2	NM_002153	SLPI	NM_003064
C15orf27	NM_152335	HTRA3	NM_053044	SPARCL1	NM_004684
C3	NM_000064	IGF2	NM_001007139	SPON1	NM_006108
C5	NM_001735	IL32	NM_001012631	ST8SIA1	NM_003034
CA414006	CA414006	INHBB	NM_002193	STARD10	NM_006645

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
CD163	NM_004244	ISX	NM_001008494	STMN2	S82024
CD1D	NM_001766	KCNJ16	NM_170741	TD02	NM_005651
CDX2	NM_001265	KYNU	NM_003937	TF	NM_001063
CILP	NM_003613	LAMC2	NM_005562	TMC6	NM_007267
CMKLR1	NM_004072	LGALS2	NM_006498	TMEM16D	NM_178826
COL4A6	NM_033641	LHX2	NM_004789	TSPAN15	NM_012339
COLEC11	NM_199235	LOC132205	AK091178	TTR	NM_000371
CXCL14	NM_004887	LOC285733	AK091900	UBD	NM_006398
CXCR4	NM_001008540	M27126	M27126	UGT2B11	NM_001073
CXCR7	NM_020311	MAF	AF055376	UGT2B7	NM_001074
DACH1	NM_080759	MFAP4	NM_002404	UNC93A	NM_018974
DENND2A	NM_015689	MMP10	NM_002425	VCAM1	NM_001078
DIO3	NM_001362	MTTP	NM_000253	VIL1	NM_007127
DLK1	NM_003836	NGEF	NM_019850	VTN	NM_000638
DUSP6	NM_001946	NGFR	NM_002507	WFDC1	NM_021197

- 5 El gen NANOG, el gen POUF1, el gen SOX2, el gen ZFP42 y el gen SALL4 se expresan preferiblemente como los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior (reivindicación 4). El gen AFP, el gen TTR, el gen TF, el gen APOA2, el gen APOA4, el gen AHSB, el gen FGA, el gen AGT, el gen FABP1, el gen SERPINA1 y el gen RBP4 se expresan preferiblemente como genes asociados con las propiedades de un hepatocito del apartado (2) anterior (reivindicación 5). En otra realización, el gen APOA1, el gen APOA2, el gen APOA4, el gen APOB, el gen FABP1, el gen AGT se expresan preferiblemente como genes asociados con las propiedades de un hepatocito del apartado (2) anterior (reivindicación 6).
- 10 Preferiblemente, la célula madre hepática inducida de la presente invención expresa adicionalmente al menos un gen seleccionado entre el gen SOX17, el gen FOXA2, el gen GSC, el gen EOMES y el gen TCF2 que son característicos de células madre mesodérmicas y/o células madre endodérmicas (reivindicación 7). También se describe en la presente memoria que al menos un gen seleccionado del grupo de genes en la Tabla 3 siguiente tiene su expresión suprimida o inducida, o tiene la actividad de un producto génico de dicho gen promovida o inhibida, por
- 15 una sustancia de prueba.

[Tabla 3]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
ABCB1	NM_000927	GSTA1	NM_145740	SLC22A6	NM_153277
ABCB11	NM_003742	GSTA2	NM_000846	SLC22A7	NM_153320
ABCB4	NM_018850	GSTA3	NM_000847	SLC22A8	NM_004254
ABCC1	NM_019862	GSTA4	NM_001512	SLC22A9	NM_080866
ABCC2	NM_000392	GSTA5	NM_153699	SLCO1A2	NM_005075
ABCC3	NM_003786	GSTM1	NM_146421	SLCO1A2	NM_134431

ES 2 667 058 T3

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
ACTB	NM_001101	GSTM2	NM_000848	SLCO1B1	NM_008446
AHR	NM_001621	GSTM3	NM_000849	SLCO1B3	NM_019844
ARNT	NM_001688	GSTM4	NM_147148	SLCO1C1	NM_017435
BAAT	NM_001701	GSTM5	NM_000851	SLCO2A1	NM_005630
COMT	NM_000754	GSTP1	NM_000852	SLCO2B1	NM_007256
CYP1A1	NM_000499	GSTT1	NM_000853	SLCO3A1	XM_001132480
CYP1A2	NM_000761	GSTT2	NM_000854	SLCO3A1	NM_013272
CYP1B1	NM_000104	GSTZ1	NM_145870	SLCO4A1	NM_016354
CYP2A13	NM_000766	NAT1	NM_000662	SLCO4C1	NM_180991
CYP2A6	NM_000762	NAT2	NM_000015	SULT1A1	NM_177529
CYP2A7	NM_000764	NR1H4	NM_005123	SULT1A2	NM_177528
CYP2B6	NM_000767	NR1I2	NM_003889	SULT1A3	AK094769
CYP2C18	NM_000772	NR1I3	NM_005122	SULT1A4	NM_001017389
CYP2C19	NM_000769	PPARA	NM_005036	SULT1B1	D89479
CYP2C8	NM_000770	PPARA	L02932	SULT1B1	NM_014465
CYP2C9	NM_000171	PPARD	NM_006238	SULT1C2	NM_176825
CYP2D6	NM_000106	PPARG	NM_138711	SULT1C4	NM_006588
CYP2E1	NM_000773	RPL13	NM_033251	SULT1E1	NM_005420
CYP2F1	NM_000774	RPS18	NM_022551	SULT2A1	NM_003167
CYP2J2	NM_000775	RXRA	NM_002957	SULT2B1	NM_004605
CYP3A4	NM_017460	RXRB	NM_021976	SULT4A1	NM_014351
CYP3A5	NM_000777	RXRG	NM_008917	TPMT	NM_000367
CYP3A5	AF355801	SLC10A1	NM_003049	UGT1A6	NM_001072
CYP3A7	NM_000765	SLC10A2	NM_000452	UGT1A8	NM_019076
CYP4A11	NM_000778	SLC16A1	NM_003051	UGT2A1	NM_006798
CYP4B1	NM_000779	SLC17A1	NM_005074	UGT2B10	NM_001075
CYP4F11	NM_021187	SLC22A1	NM_153187	UGT2B11	NM_001073
CYP4F12	NM_023944	SLC22A10	NM_001039752	AGT2815	NM_001076
CYP4F2	NM_001082	SLC22A11	AK075127	UGT2B17	NM_001077
CYP4F3	AB002454	SLC22A11	NM_018484	UGT2B28	NM_053039

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
CYP4F8	NM_007253	SLC22A2	NM_003058	UGT2B4	NM_021139
EEF1A1	NM_001402	SLC22A3	NM_021977	UGT2B7	NM_001074
ENDOG	NM_004435	SLC22A4	NM_003059		
GAPDH	NM_002046	SLC22A5	NM_003060		

También se describe en la presente memoria que la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede someterse a cultivo de expansión o cultivo de pases durante al menos un mes.

5 También se describe en la presente memoria un procedimiento para producir una célula madre hepática inducida que comprende una etapa de inducir una célula de mamífero a una célula madre hepática inducida, llevando la etapa a la célula de mamífero a tal estado que los productos genéticos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida estarán presentes para asegurar que la abundancia relativa intracelular del producto génico del gen POU5F1 sea mayor que la del producto génico del gen SOX2. La etapa puede ser tal que utiliza el gen POUF1, el gen KLF4 y el gen SOX2, que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida o los productos génicos de estos genes, y que la proporción en uso del gen POUF1 o el producto génico de este gen con respecto al gen SOX2 o al producto génico de este gen es mayor que uno.

15 De acuerdo con la presente invención, la razón de uso entre el gen POUF1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida satisface la razón de gen POU5F1 > gen KLF4 > gen SOX2, más concretamente con la razón de 4:2:1 en ese orden (reivindicación 1).

20 Las células de mamífero anteriores para su uso en la presente invención son una célula derivada de adulto, una célula derivada de neonato, una célula derivada de la piel o una célula de un individuo canceroso (reivindicación 1), siendo el mamífero preferiblemente un ser humano (reivindicación 8).

25 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método de prueba que utiliza la célula madre hepática inducida de la presente invención y el método de prueba es un método de prueba de seguridad, un método de prueba de toxicidad, un método de prueba de metabolismo, un método de prueba de interacción con fármacos, un método de prueba de actividad antiviral, o un método de prueba de selección para productos farmacéuticos tales como agentes terapéuticos hiperlipidémicos, productos terapéuticos para la hipertensión, medicamentos de compuestos de bajo peso molecular y medicamentos de anticuerpos (reivindicación 9). También se describen en la presente memoria un método para seleccionar dianas en el descubrimiento de fármacos, un método para la preparación de un modelo animal y un método para la producción de una proteína producida en hepatocitos. Un séptimo aspecto se refiere a un uso terapéutico dirigido a un mamífero (reivindicación 10).

Efecto ventajoso de la invención

35 De acuerdo con la presente invención, las células madre hepáticas inducidas humanas se pueden preparar a partir de donantes de diferentes razas, sexos, edades o antecedentes genéticos, por lo que la presente invención es eficaz en pruebas no clínicas con nuevos fármacos, tal como una prueba de seguridad, una prueba de toxicidad, una prueba de metabolismo y una prueba de interacción con fármacos, que se realizan antes de las pruebas clínicas. Además, las pruebas no clínicas que utilizan células madre hepáticas inducidas humanas proporcionan herramientas de descubrimiento de fármacos que contribuyen a un desarrollo más eficaz de nuevos fármacos.

Descripción

45 En las páginas que siguen, se describen en detalle la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, el procedimiento para su producción y las aplicaciones de esa célula.

La célula madre hepática inducida que se describe en la presente memoria se caracteriza por satisfacer al menos los siguientes tres requisitos (1) a (3):

- 50 (1) expresa al menos 15 genes seleccionados del grupo de genes enumerados en la Tabla 1 anterior, que son genes marcadores para una célula madre embrionaria;
- (2) tiene propiedades de un hepatocito;
- (3) puede ser sometido a un cultivo de expansión o cultivo de pases durante al menos 3 días.

A continuación, en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, la expresión de los genes

5 marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior que se conocen como genes marcadores para una célula madre embrionaria sirve para especificar que la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria es una célula que tiene una naturaleza tal que teóricamente se autorreplica de forma ilimitada y que puede someterse a un cultivo de pases prolongado mientras permanece sustancialmente como una célula madre hepática inducida. Es necesario que al menos 15 genes seleccionados del grupo de genes enumerados en la Tabla 1 precedente se expresen necesariamente en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

10 La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria no está particularmente limitada siempre que los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior se expresen en ella, pero los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior pueden expresarse en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria en cantidades que varían de 1/16 a 16 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria, prefiriéndose el intervalo de 1/8-8 veces. Con el fin de mantener el estado de la célula madre hepática inducida o desde el punto de vista del cultivo de pases prolongado, los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior pueden expresarse en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria en cantidades casi comparables, a saber, cantidades que varían de 1/4 a 4 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria, siendo preferido el intervalo de 1/2-2.

20 La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria es tal que, desde el punto de vista del mantenimiento de un estado indiferenciado, al menos 15 genes seleccionados del grupo de los genes enumerados en la Tabla 1 anterior como genes marcadores de una célula madre embrionaria en el apartado (1) anterior se expresan en la célula madre hepática inducida en cantidades dentro del intervalo de 1/2-2 las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria, y puesto que el número de genes marcadores para una célula madre embrionaria en el apartado (1) anterior que se expresan dentro de este intervalo aumenta a 20, 25 o incluso más, el resultado se vuelve mejor.

30 La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria es tal que, de los genes enumerados en la Tabla 1 anterior como genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior, son expresados preferiblemente cinco y más, o diez y más, o incluso veinte y más en la célula madre hepática inducida en cantidades dentro del intervalo de 1/2-2, de 1/4-4 veces, y de 1/8-8 veces, respectivamente, las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria.

35 La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria es tal que, entre los genes enumerados en la Tabla 1 anterior como genes marcadores de una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior, cinco genes que incluyen el gen NANOG, el gen POUF1 y SOX2 pueden expresarse en la célula madre hepática inducida en cantidades dentro del intervalo de 1/4-4 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria; preferiblemente, cinco genes (es decir, el gen NANOG, el gen POU5F1, el gen SOX2, el gen ZFP42 y el gen SALL4) se expresan en cantidades dentro del intervalo de 1/4-4 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria; más preferiblemente, diez genes (es decir, el gen NANOG, el gen POU5F1, el gen SOX2, el gen TDGF1, el gen DNMT3B, el gen ZFP42, el gen TERT, el gen GDF3, el gen SALL4 y el gen GABRB3) se expresan en cantidades dentro del intervalo de 1/4-4 veces las cantidades de los genes que se expresan en la célula madre embrionaria.

45 La célula madre embrionaria antes mencionada que se utilizará como referencia para la comparación es cualquiera de hES_H9 (GSM194390), hES_BG03 (GSM194391) y hES_ES01 (GSM194392). Se puede acceder a los datos relevantes para la expresión génica desde la base de datos Gene Expression Omnibus [GEO] ("Gene Expression Omnibus [GEO], [en línea], [búsqueda el 28 de enero de 2010], Internet <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>>).

50 Se requiere que la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria tenga las propiedades de un hepatocito del apartado (2) anterior. Las propiedades de un hepatocito en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria no están particularmente limitadas siempre que sean propiedades características del hepatocito, pero un ejemplo típico es la producción de proteínas (productos génicos) que son características de los hepatocitos. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, la producción de proteínas séricas (p.ej., AFP, TTR, TF, APOA2, APOA4, AHSG, FGA, AGT, FABP1, SERPINA1 y RBP4), la producción de enzimas asociadas al metabolismo de los sacáridos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo lipídico y metabolismo del hierro, así como la producción de enzimas y transportadores metabolizadores de fármacos.

60 La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede expresar genes del apartado (2) anterior asociados con las propiedades de un hepatocito. Estos genes pueden ser los que se expresan de forma característica en los hepatocitos y que están asociados a las propiedades del hepatocito; pueden ilustrarse mediante genes que están asociados a, por ejemplo, la producción de proteínas características de los hepatocitos. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, genes asociados a la producción de proteínas séricas, la producción de enzimas asociadas al metabolismo de sacáridos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de

5 lípidos y metabolismo del hierro, así como la producción de enzimas y transportadores metabolizadores de fármacos, etc. En particular, los genes asociados a la producción de enzimas y transportadores que metabolizan fármacos incluyen, por ejemplo, el grupo de genes enumerados en la Tabla 3 anterior. Dichos genes asociados a la producción de enzimas y transportadores que metabolizan fármacos exhiben expresión génica, inducción, supresión y similares en respuesta a sustancias de ensayo tales como compuestos candidatos para productos farmacéuticos que han sido absorbidos por la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

10 En un ejemplo de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, al menos 15 genes que son genes asociados al hígado seleccionados del grupo de genes en la Tabla 2 anterior pueden expresarse como genes del apartado (2) anterior asociados a las propiedades de un hepatocito. Estos genes son los que son característicos de los hepatocitos y que se expresan en un cultivo primario humano de hepatocitos.

15 Los números de acceso de GenBank correspondientes a los respectivos símbolos genéticos se detallan en la Tabla 2 anterior. Se puede acceder a la información genética relevante desde el sitio web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

20 Con respecto a los genes del apartado (2) anterior asociados a las propiedades de un hepatocito, 50 o más de los genes enumerados en la Tabla 2 anterior pueden expresarse desde el punto de vista de la posibilidad de proporcionar células que exhiban propiedades características de los hepatocitos, y se prefiere que se expresen 80 o más de tales genes. En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, el gen AFP se puede expresar entre los genes enumerados en la Tabla 2 anterior, y se prefiere que se expresen el gen AFP, el gen TTR, el gen TF, el gen APOA2, el gen APOA4, el gen AHSG, el gen FGA, el AGT gen, el gen FABP1, el gen de SERPINA1 y el gen RBP4.

25 Los genes mencionados anteriormente generalmente se expresan abundantemente en hepatocitos; por otro lado, se sabe que muchos de estos genes no se expresan sustancialmente en células que no son hepatocitos, incluidas las células madre embrionarias.

30 En otro ejemplo de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, los siguientes genes se pueden expresar como genes del apartado (2) anterior asociados a las propiedades de un hepatocito.

35 En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, se pueden expresar el gen GSTM3, el gen SLC22A1, el gen GSTA5, el gen ALDH1A1, el gen CYP27A1, el gen CYP1B1, el gen ALDH2, el gen GSTA2, el gen GSTA3, el gen GSTA5, el gen CYP4A2 y el gen UGT2B11. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce proteínas asociadas a la cinética del fármaco, por lo que es particularmente útil en un método de prueba de toxicidad.

40 En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, se pueden expresar el gen GSTM3, el gen SLC22A1, el gen GSTA5, el gen ALDH1A1, el gen CYP27A1, el gen CYP1B1, el gen ALDH2, el gen GSTA2, el gen GSTA3, el gen GSTA5, el gen CYP4A2 y el gen UGT2B11. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce proteínas asociadas a enzimas asociadas al metabolismo de fármacos, por lo que es particularmente útil en un método de prueba de metabolismo.

45 En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, pueden expresarse el gen CD81, el gen SCARB1, el gen OCLN, el gen CLDN1 y similares. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce proteínas asociadas a la replicación del VHC, por lo que es particularmente útil en un método de prueba de actividad antiviral.

50 En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, pueden expresarse el gen APOA1, el gen APOA2, el gen APOA4, el gen APOB, el gen FABP1, el gen AGT y similares. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce proteínas asociadas al metabolismo lipídico y la presión sanguínea, por lo que es particularmente útil en una prueba de selección para productos farmacéuticos tales como agentes terapéuticos hiperlipidémicos y agentes terapéuticos para la hipertensión.

55 En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, pueden expresarse el gen CCL2, el gen CDKN1A, el gen ICAM1, el gen JUNB, el gen RGS2, el gen CCND1 y similares. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce transportadores y proteínas asociadas al receptor metabólico, por lo que es particularmente útil en una prueba de selección para productos farmacéuticos tales como compuestos de bajo peso molecular y anticuerpos.

60 En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, se pueden expresar el gen ALB, el gen TTR, el gen TF, el gen RBP4, el gen FGA, el gen FGB, el gen FGG, el gen AHSG, el gen AFP, el gen FN1, el gen SERPINA1, el gen PLG y similares. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce proteínas séricas, por lo que es particularmente útil en un método para la

preparación de modelos animales.

En la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, se pueden expresar el gen ALB, el gen TTR, el gen TF, el gen RBP4, el gen FGA, el gen FGB, el gen FGG, el gen AHSG, el gen AFP, el gen FN1, el gen SERPINA1, el gen PLG y similares. La célula madre hepática inducida que expresa estos genes muestra una propiedad de un hepatocito que produce proteínas séricas, por lo que es particularmente útil en un método terapéutico dirigido a animales no humanos.

La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede tener propiedades características de células madre mesendodérmicas y/o células madre endodérmicas, y también pueden haber expresado en ella al menos uno de los siguientes genes que se expresan en células madre mesendodérmicas y/o células madre endodérmicas. a saber, el gen SOX17, el gen FOXA2, el gen GSC, el gen EOMES y el gen TCF2. Un ejemplo concreto es uno que expresa todo el gen SOX17, el gen FOXA2, el gen GSC, el gen EOMES y el gen TCF2.

Además, la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede ser tal que al menos un gen seleccionado de los genes enumerados en la Tabla 3 anterior que están asociados a la producción de enzimas y transportadores que metabolizan fármacos tiene su expresión suprimida o inducida, o tiene el actividad de un producto génico de dicho gen promovido o inhibido por una sustancia de prueba. La sustancia de prueba tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sustancias candidatas para productos farmacéuticos y cuando la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria incorpora tal sustancia de prueba, los genes asociados a la producción de enzimas y transportadores metabolizadores de fármacos se suprimen o se inducen para su expresión en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria y la actividad de los productos génicos de estos genes se promueve o inhibe. Tales células son útiles en aplicaciones de descubrimiento de fármacos tales como una prueba de metabolismo de fármacos. Se sabe que la expresión de los genes del metabolismo de los fármacos, incluidos los genes transportadores y los genes del receptor nuclear, tiene diferencias individuales. Dado que la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede ser inducida a partir de varias células, es posible obtener un número suficientemente grande de células madre inducidas para cubrir estas diferencias individuales. Por lo tanto, si, en la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, se suprime o se induce la expresión de los genes enumerados en la Tabla 3 anterior, y se induce o inhibe la actividad de los productos génicos de dichos genes, mediante una sustancia de prueba, esto resultaba útil como una herramienta para el descubrimiento de fármacos. Por consiguiente, la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria es útil en una prueba de cinética de fármacos, una prueba de seguridad, una prueba de toxicidad, una prueba de metabolismo, una prueba de interacción de fármacos y similares.

Puesto que la célula madre hepática inducida descrita en la presente muestra diversas propiedades de los hepatocitos, es muy útil para analizar el metabolismo y el mecanismo de acción de diversos compuestos farmacéuticos y para buscar y analizar moléculas que controlan la formación y las funciones del hígado. Por lo tanto, se puede utilizar en pruebas de seguridad, pruebas de toxicidad, pruebas de metabolismo, pruebas de interacción farmacológica, pruebas de actividad antiviral (especialmente en hepatitis de tipo B o C), pruebas de detección para productos farmacéuticos como terapias hiperlipidémicas, compuestos terapéuticos para la hipertensión, medicamentos de compuestos de bajo peso molecular, y medicamentos de anticuerpos, detección de dianas en el descubrimiento de fármacos (p.ej., fibrosis hepática, cirrosis, hígado graso, hepatitis, síndrome metabólico y hematopoyesis), producción de proteínas producidas por hepatocitos, preparación de modelos animales, medicina regenerativa, y similares.

La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede someterse a cultivo de expansión o cultivo de pases durante al menos 3 días. Más específicamente, una célula madre hepática inducida puede proliferar durante al menos un mes, medio año o incluso un año o más; esto significa que es teóricamente capaz de auto-replicarse ilimitadamente.

Los medios de cultivo para cultivo de expansión o cultivo de pases de la célula madre hepática inducida descritos en la presente memoria no están particularmente limitados siempre que permitan el cultivo de expansión o cultivo de pases de células madre embrionarias, células madre pluripotentes, y similares; se utilizan preferiblemente medios adecuados para el cultivo de células madre embrionarias, células madre pluripotentes y similares. Ejemplos de tales medios incluyen, pero no se limitan a, un medio ES [40% de medio de Eagle modificado por Dulbecco (EMEM), 40% de medio F12 (Sigma), L-glutamina o GlutaMAX (Sigma) 2 mM, 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), β -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma), 15-20% de knockout Serum Replacement (Invitrogen), 10 μ g/ml de gentamicina (Invitrogen) y 4-10 ng/ml de factor FGF2]; un medio acondicionado que es el sobrenadante de un cultivo de 24 horas de fibroblastos embrionarios de ratón (en lo sucesivo denominado MEF) en un medio ES que carece de β -mercaptoetanol 0,1 mM y que se complementa con β -mercaptoetanol 0,1 mM y 10 ng/ml de FGF2 (este medio se denomina en lo sucesivo medio ES con acondicionamiento MEF), un medio óptimo para células iPS (iPSellon), un medio óptimo para células alimentadoras (iPSellon), StemPro (marca registrada) hESC SFM (Invitrogen), mTeSR1 (STEMCELL Technologies/VERITAS), un medio libre de proteína animal libre de suero para el mantenimiento de células ES/iPS humanas, llamado TeSR2 [ST-05860] (STEMCELL Technologies /VERITAS), un medio para células

ES/iPS de primates (ReproCELL), ReproStem (ReproCELL) y ReproFF (ReproCELL). Para células humanas, pueden utilizarse medios adecuados para cultivar células madre embrionarias humanas.

Las técnicas para efectuar cultivo de expansión o cultivo de pases de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria no están particularmente limitadas si son métodos comúnmente utilizados por el experto en la técnica para cultivar células madre embrionarias, células madre pluripotentes y similares. Por ejemplo, después de eliminar el medio de cultivo de las células cultivadas y eliminar las células con PBS(-), se añade una solución de disociación y, después de reposar durante un período determinado, se retira la solución de disociación y después de agregar un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, se realiza la centrifugación y se elimina el sobrenadante; después de eso, se añaden 1X antibiótico/antimicótico, mTeSR e Y-27632 y la suspensión celular se siembra en una placa recubierta con gelatina o colágeno sembrada con MEF para efectuar el cultivo de pases.

Con el fin de asegurar que la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria no se diferenciará aunque se cultive durante más de un mes después de la transferencia génica, se pueden agregar al medio diversos inhibidores o anticuerpos que inhibirán o neutralizarán la actividad de TGF-beta y similares, HGF, factores de crecimiento de fibroblastos tales como FGF1 - FGF21, activina y similares; Los factores de crecimiento de fibroblastos que se utilizan preferiblemente incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos ácido FGF1 (también denominado FGF y denominado en lo sucesivo FGF1), así como el factor de crecimiento de fibroblastos básico FGF2 (también denominado bFGF y denominado en lo sucesivo FGF2), FGF4 y FGF7. Los anticuerpos ilustrativos son anticuerpos neutralizadores policlonales o monoclonales contra estos factores de crecimiento. Si se desea, pueden utilizarse microARN, ARNip y ARN antisentido para suprimir la expresión de genes tales como TGF-beta. También es posible utilizar inhibidores como compuestos de bajo peso molecular que actúan contra TGF-beta y similares. Los inhibidores de señalización de TGF-beta ilustrativos incluyen un inhibidor de ALK (p.ej., A-83-01), un inhibidor de TGF-beta RI y un inhibidor de TGF-beta RI quinasa. Debe observarse que los factores de crecimiento de fibroblastos mencionados anteriormente se seleccionan dependiendo del tipo de célula somática que se vaya a inducir y se pueden utilizar factores de crecimiento de fibroblastos derivados de seres humanos, ratones, vacas, caballos, cerdos, peces cebra, etc.

Además, también se pueden añadir al medio inhibidores de quinasa asociada a Rho (bobina en espiral asociada a Rho que contiene proteína quinasa), tales como Y-27632 (Calbiochem, soluble en agua) y Fasudil (HA1077: Calbiochem).

Otros inhibidores que se pueden agregar al medio incluyen: tres inhibidores de bajo peso molecular de la tirosina quinasa receptora de FGF, MEK (proteína quinasa activada por mitógeno)/ERK (quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2) y GSK (Glicógeno Quinasa Sintasa) 3 [SU5402, PD184352 y CHIR99021], dos inhibidores de bajo peso molecular de la vía MEK/ERK y GSK3 [PD0325901 y CHIR99021], un compuesto de bajo peso molecular como inhibidor de la enzima metilante de histonas G9a [BIX-01294 (BIX)], azacitidina, tricostatina A (TSA), 7-hidroxi-flavona, etilamida del ácido lisérgico, kenpaulona, un inhibidor de la quinasa del receptor I de TGF-β/quinasa tipo activina 5 (ALK5) [EMD 616452], inhibidores del receptor de TGF-β 1 (TGFB1) quinasa [E-616452 y E-616451], un inhibidor de la quinasa de la familia Src [E1-275], tiazovivina, PD0325901, CHIR99021, SU5402, PD184352, SB431542, anticuerpo neutralizador anti-TGF-β, A- 83-01, Nr5a2, un compuesto inhibidor de p53, ARNip contra p53, un inhibidor de la ruta de p53, etc.

Además, la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede congelarse o descongelarse mediante métodos conocidos. Un método ilustrativo de congelación que puede utilizarse es el siguiente: después de eliminar el medio de cultivo de las células cultivadas y lavar las células con PBS(-), se añade una solución de disociación y después de reposar durante un período determinado, se retira la solución de disociación y después de añadir un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, se realiza la centrifugación y se retira el sobrenadante; a continuación, se añade un fluido de crioconservación y la mezcla se distribuye en viales criogénicos, se congela durante la noche a -80°C y después se almacena en nitrógeno líquido. Un método ilustrativo de descongelación es el siguiente: la muestra congelada se descongela en un baño de agua a 37°C y luego se suspende en un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10% antes de su uso.

Un segundo aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un procedimiento para producir una célula madre hepática inducida que comprende una etapa de inducir una célula de mamífero a una célula madre hepática inducida, y el mamífero que se debe tratar no está particularmente limitado siempre que sea un mamífero y pueda ser ilustrado mediante rata, ratón, cobaya, conejo, perro, gato, cerdos tales como minicerdos, vaca, caballo, primates tales como monos incluyendo un cinomolgo, y ser humano, prefiriéndose rata, ratón, cobaya, perro, gato, minicerdos, caballo, cinomolgo y ser humano, y el ser humano se utiliza con particular preferencia.

Cualquiera de las células de los mamíferos mencionados anteriormente puede utilizarse siempre que sean células de mamífero. Los ejemplos que se pueden utilizar incluyen, entre otros, células de órganos como el cerebro, hígado,

esófago, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, colon, páncreas, riñón y pulmón, así como células del fluido de la médula ósea, músculo, tejido adiposo, sangre periférica, piel y músculo esquelético. Entre estas, se prefieren células derivadas de hígado endodérmico, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, colon, páncreas, pulmón, etc., utilizándose con preferencia particular células derivadas del estómago y el colon. Estas células también son preferidas porque están fácilmente disponibles como desechos médicos durante la operación en terapia contra el cáncer.

También es posible utilizar células derivadas de tejidos y fluidos corporales que acompañan al parto, tales como las células derivadas de los tejidos del cordón umbilical (cordón umbilical y sangre umbilical), amnios, placenta y líquido amniótico; en particular, pueden utilizarse células derivadas de tejidos inmediatamente después del nacimiento, tales como diversos tejidos de neonatos (p.ej., piel neonatal). También es posible utilizar células de animales fetales.

Las células de los mamíferos mencionados anteriormente que se pueden utilizar incluyen células derivadas de adultos, células derivadas de neonatos, células derivadas de la piel neonatales, células individuales cancerosas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células diferenciadas de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas.

Los tipos de cánceres en individuos cancerosos no están particularmente limitados y se puede utilizar cualquiera de los cánceres tales como tumor maligno, cáncer sólido, carcinoma, sarcoma, tumor cerebral, cáncer de órgano hematopoyético, leucemia, linfoma y mieloma múltiple. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer oral, cáncer de garganta, cáncer de vías aéreas superiores, cáncer de pulmón, cáncer de células pulmonares, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer duodenal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de piel, melanoma maligno, tumor cerebral, sarcoma óseo y cáncer de sangre. Entre otras, se utilizan preferiblemente células derivadas de tejidos no cancerosos o cancerosos en individuos con cánceres endodérmicos del estómago, mama, colon e intestino.

En el procedimiento de producción descrito en la presente memoria, las células recogidas de mamíferos también se pueden utilizar como las células de mamífero mencionadas anteriormente. Las células cosechadas a partir de mamíferos pueden utilizarse inmediatamente o pueden utilizarse después de almacenarse y cultivarse por métodos conocidos. En el caso del cultivo, el número de pases no está particularmente limitado, pero se prefieren las células de un cultivo primario a un cultivo de cuarto pase, siendo particularmente preferido el uso de células de un cultivo primario a un cultivo de segundo pase. El cultivo primario según se utiliza en la presente memoria significa un cultivo que sigue inmediatamente a una cosecha de células de mamíferos y un cultivo de un pase del cultivo primario da como resultado un cultivo de segundo pase y un cultivo de más pases da como resultado un cultivo de tercer pase.

La etapa de inducción de una célula de mamífero a una célula madre hepática inducida en el procedimiento de producción descrito en la presente memoria debe ser un paso en el que la célula de mamífero llegue a tal estado que los productos genéticos del gen POU5F1, gen KLF4 y gen SOX2 sean necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida estará presente para asegurar que la abundancia relativa intracelular del producto génico del gen POU5F1 sea mayor que la del producto génico del gen SOX2. El término "llevar la célula de mamífero a tal estado" es un concepto amplio que incluye no solo el caso de ajustar la célula para tener dicho estado sino también el caso de seleccionar una célula que ha llegado a tal estado y acondicionar la misma.

El procedimiento de producción descrito en la presente memoria también requiere que los productos génicos de esos genes estén presentes en proporciones especificadas dentro de la célula de mamífero cuando se induce para que dé lugar a la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria. Si se aplica esta condición, los genes marcadores para la célula madre embrionaria del apartado (1) anterior que son endógenos a la célula de mamífero se expresan, dando lugar finalmente a la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

En el procedimiento de producción descrito en la presente memoria, las abundancias relativas intracelulares de los productos genéticos del gen POU5F1, gen KLF4 y gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida anterior pueden satisfacer la relación del gen POU5F1 > gen KLF4 > gen SOX2 y, desde el punto de vista de la inducción altamente eficaz a la célula madre hepática inducida, las abundancias relativas intracelulares del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 se pueden ajustar a la razón 4:2:1 en ese orden.

En el procedimiento de producción descrito en la presente memoria, la célula de mamífero anterior es suficiente para causar un estado tal que los productos genéticos del gen POU5F1, gen KLF4 y gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida estarán presentes para asegurar que la abundancia relativa intracelular del producto génico del gen POU5F1 es mayor que la del producto génico del gen SOX2; los métodos para hacer esto se ilustran pero no se limitan a los que se conocen como técnicas de inducción para dar lugar a células madre pluripotentes inducidas.

Los métodos ilustrativos que pueden emplearse incluyen un método en el que los genes capaces de elevar la intensidad de expresión del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción de la célula madre hepática inducida anterior se introducen en la célula de mamífero anterior, con lo que estos genes se expresan fuertemente para que los productos genéticos previstos se produzcan en la célula, así como un método en el que las proteínas, el ARNm o similares que son productos genéticos de los genes capaces de elevar la intensidad de expresión de los genes identificados anteriormente se introducen en la célula de mamífero anterior. Cuando sea necesario, las cantidades de vectores o genes que se introducirán en la célula de mamífero anterior, las cantidades de productos genéticos que se deben añadir a los medios y otros factores se pueden ajustar para asegurar que la abundancia relativa intracelular del producto génico del gen POU5F1 sea mayor que la del producto génico del gen SOX2.

En el procedimiento de producción descrito en la presente memoria, los genes que se pueden utilizar para elevar la intensidad de expresión del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción de la célula madre hepática inducida anterior son el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 per se. Si el gen POU5F1, el gen KLF4 o el gen SOX2 mencionados anteriormente se expresan solo en cantidad insuficiente en la célula de mamífero anterior, el gen o producto génico insuficientes se pueden introducir en la misma célula, y si el gen POU5F1, el gen KLF4 o el gen SOX2 mencionado anteriormente se expresan en la célula anterior, se puede introducir otro gen o un producto del mismo en lugar del gen POU5F1, el gen KLF4 o el gen SOX2 mencionado anteriormente. Los genes que pueden utilizarse como tales otros genes son aquellos que se sabe que inducen las células madre pluripotentes inducidas y pueden ser ilustrados por el gen NANOG, el gen LIN28, el gen TBX3, el gen PRDM14, el gen L-MYC, el gen c-MYC, el gen N-MYC, el gen SALL1, el gen SALL4, el gen UTF1, el gen ESRRB, el gen NR5A2, el gen REM2 GTPasa, el gen TCL-1A, el gen de la proteína asociada a Yes (YAP), el gen de E-cadherina, el gen mutante negativo dominante p53, el gen p53shRNA etc. Los genes capaces de elevar la intensidad de expresión del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción de la célula madre hepática inducida anteriormente pueden utilizarse independientemente o combinando dos o más tipos.

El gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida anterior pueden utilizarse combinados con genes que son sustitutos de estos genes.

Por ejemplo, en el caso en que una célula que expresa fuertemente el gen POU5F1, el gen KLF4, el gen c-MYC o el gen SOX2, la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria puede inducirse sin utilizar el gen POU5F1, el gen KLF4, el gen c-MYC, o el gen SOX2 pero utilizando el gen mutante negativo dominante p53, el gen p53shRNA, etc. combinados.

Los métodos mediante los cuales las proteínas, los ARNm o similares que son productos genéticos del gen POU5F1, gen KLF4 y gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida anterior o genes que son sustitutos de estos genes pueden introducirse en la célula de mamífero anterior incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se conocen como técnicas de inducción para dar lugar a células madre pluripotentes inducidas. Por ejemplo, se pueden añadir a los medios las proteínas, los ARNm o similares que son productos genéticos de estos genes.

En el procedimiento de producción descrito en la presente memoria, para aumentar la eficacia de la inducción a la célula madre hepática inducida, los compuestos que se sabe que inducen células madre pluripotentes inducidas pueden añadirse adicionalmente a los medios utilizados para inducir la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, y estos compuestos están ilustrados por inhibidores que incluyen: tres inhibidores de bajo peso molecular de tirosina quinasa de tipo receptor de FGF, MEK (proteína quinasa activada por mitógeno)/ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2), y GSK (Glicógeno Sintasa Quinasa) 3 [SU5402, PD184352 y CHIR99021], dos inhibidores de bajo peso molecular de la vía MEK/ERK y GSK3 [PD0325901 y CHIR99021], un compuesto de bajo peso molecular como inhibidor de la enzima de metilación de histonas G9a [BIX-01294 (BIX)], azacitidina, trichostatina A (TSA), 7-hidroxi-flavona, etilamida del ácido lisérgico, kenpaulona, un inhibidor de quinasa del receptor I de TGF- β /quinasa tipo activina 5 (ALK5) [EMD 616452], inhibidores de quinasa del receptor 1 de TGF- β (TGFB1) [E-616452 y E-616451], un inhibidor de la quinasa de la familia Src [EI-275], tiazovivina, PD0325901, CHIR99021, SU5402, PD184352, SB431542, anticuerpo neutralizante anti-TGF- β , A-83-01, Nr5a2, un compuesto inhibidor de p53, ARNip contra p53 y un inhibidor de la ruta de p53, etc.

También es posible utilizar un microARN para aumentar la eficiencia de la inducción a la célula madre hepática inducida. Específicamente, se pueden llevar a cabo métodos comunes para el experto en la técnica, por ejemplo introduciendo un microARN en la célula de mamífero anterior con un vector o añadiendo un microARN al medio.

Los ejemplos del microARN que se pueden utilizar para aumentar la eficacia de la inducción a la célula madre hepática inducida incluyen miR-154, miR-200, miR-368, miR-371, miR-291-3p, miR-294, miR-295, miR-302, etc. Si se utiliza una célula humana como célula de mamífero, se puede utilizar un microARN humano. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, hsa-miR-372 [MI0000780], hsa-miR-373 [MI0000781], hsa-miR-302b [MI0000772], hsa-miR-302c [MI0000773], hsa-miR-302a [MI0000738], hsa-miR-302d [MI0000774], hsa-miR-367

[MI0000775] y hsa-miR-520 [MI0003158]. Estos microARN se pueden utilizar de forma independiente o combinando dos o más tipos.

5 Se puede acceder a la información sobre estos microRNAs desde el sitio web de miRBase (<http://www.mirbase.org/>). En cada designación, un número de acceso miRBase está entre paréntesis y el símbolo hsa- representa humano.

10 La etapa de inducir la célula de mamífero anterior a una célula madre hepática inducida puede implicar el uso de diversos inhibidores o anticuerpos que inhibirán o neutralizarán la actividad de TGF-beta y similares, factores de crecimiento de fibroblastos tales como FGF1-FGF21 y similares, que se van a agregar al medio para cultivar la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria. Los factores de crecimiento de fibroblastos que se pueden utilizar son FGF1, FGF2, FGF4 y FGF7. Los ejemplos de inhibidores de TGF-beta incluyen inhibidores de señalización de TGF-beta tales como un inhibidor de ALK (p.ej., A-83-01), un inhibidor de TGF-beta RI y un inhibidor de TGF-beta RI quinasa.

15 Estos componentes se añaden preferiblemente al medio para utilizar en la etapa de inducir la célula de mamífero anterior a una célula madre hepática inducida.

20 La etapa mencionada anteriormente para la inducción a una célula madre hepática inducida puede ser tal que ésta utilice el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida o productos génicos de estos genes, y que la razón de uso del gen POU5F1 o un producto génico de este gen con respecto al gen SOX2 o un producto génico de este gen es mayor que uno. La razón de uso entre el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida o entre productos génicos de estos genes puede satisfacer la razón de gen POU5F1 > gen KLF4 > gen SOX2, y desde el punto de vista de inducción altamente eficaz para la célula madre hepática inducida, la razón de uso entre el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 o entre los productos génicos de estos genes puede ser 4:2:1 en ese orden. Los símbolos génicos para el gen POU5F1 (OCT3/4), el gen KLF4 y el gen SOX2, así como los números de acceso de Genbank correspondientes se proporcionan en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank
KLF4	NM_004235
POU5F1	NM_002701
SOX2	NM_003106

30 Si se utilizan el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida anteriormente en el procedimiento de producción descrito en la presente memoria, se pueden utilizar métodos comunes para el experto en la técnica, por ejemplo introduciendo estos genes en la célula de mamífero anterior con la ayuda de vectores de expresión. Si se utilizan productos génicos tales como proteínas o ARNm del gen POU5F1, gen KLF4 y gen SOX2 anteriores que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida, se pueden utilizar métodos comunes para el experto en la técnica, por ejemplo mediante la adición de los productos génicos al medio utilizado para la inducción.

40 Como se describió anteriormente, además del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida anterior, así como sus productos génicos, los siguientes que se han indicado anteriormente pueden utilizarse típicamente para mejorar la eficacia de la inducción a la célula madre hepática inducida anterior: genes tales como el gen NANOG, el gen LIN28, el gen TBX3, el gen PRDM14, el gen L-MYC, el gen c-MYC, el gen N-MYC, el gen SALL1, el gen SALL4, el gen UTF1, el gen ESRRB, el gen NR5A2, el gen REM2 GTPasa, el gen TCL-1A, el gen de la proteína asociada a Yes (YAP), el gen de E-cadherina, el gen mutante negativo dominante p53, el gen p53shRNA, así como productos génicos y compuestos de los mismos; factores de crecimiento de fibroblastos tales como FGF1 a FGF12; así como el inhibidor de ALK (p.ej., A-83-01), el inhibidor de TGF-beta RI y el inhibidor de quinasa TGF-beta RI.

50 Para producir células madre hepáticas inducidas a partir de la célula de mamífero anterior, los genes pueden introducirse en la célula de mamífero anterior por cualquier método conocido sin ninguna limitación concreta, y los vectores que pueden utilizarse incluyen vectores virales, plásmidos, cromosomas artificiales (HAC), vectores episomales (EBV), vectores minicirculares, vectores de expresión policistrónicos, vectores como una aplicación del sistema Cre/loxP, vectores que utilizan una integrasa de fago y un transposón tal como un piggyback.

55 Los vectores virales que pueden utilizarse para introducir genes en la célula de mamífero anterior pueden ser de cualquier tipo conocido. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vectores lentivirales, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios (DNAVC Corporation), vectores virales

adenoasociados (DNAVC Corporation), vectores del virus Sendai que no tienen genes exógenos residuales en el genoma (DNAVC Corporation, y MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.), minivectores Sendai (DNAVC Corporation) y HVJ. Los vectores retrovirales incluyen vectores retrovirales derivados de la leucemia murina de Moloney.

5 Los plásmidos vectoriales virales que se pueden utilizar pueden ser de cualquier tipo conocido de plásmidos virales de vectores. Por ejemplo, como plásmidos vectores retrovirales, se prefieren pMXs, pMXs-IB, pMXs-puro y pMXs-neo (siendo pMXs-IB el mismo vector que pMXs-puro excepto que porta un gen de resistencia a blasticidina en lugar del gen de resistencia a puomicina) [Toshio Kitamura et. al., "Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics", *Experimental Hematology*, 2003, 31(11):1007-14], y otros ejemplos incluyen MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)], pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)], LL-CG, CL-CG, CS-CG, CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)], etc. Adenoviral vector plasmids incluyen pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)], etc.

15 Los medios que pueden utilizarse en la etapa de inducción de la célula de mamífero anterior a células madre hepáticas inducidas no se limitan a ningún tipo concreto, siempre que permitan el cultivo de células madre embrionarias, células madre pluripotentes, y similares, pero el cultivo se puede realizar utilizando medios adecuados para cultivar células madre embrionarias, células madre pluripotentes, y similares. Los ejemplos de tales medios incluyen, pero no están limitados a, un medio ES, un medio ES acondicionado con MEF, un medio óptimo para células iPS, un medio óptimo para células alimentadoras, StemPro (marca registrada) hESC SFM, mTeSR1, un medio libre de suero libre de proteína animal para el mantenimiento de células ES/iPS humanas, denominado TeSR2 [ST-05860], un medio para células ES/iPS de primates, ReproStem y ReproFF. Para células humanas, se utilizan preferiblemente medios adecuados para cultivar células madre embrionarias humanas.

25 Si la célula derivada no es un fibroblasto, por ejemplo, en caso de utilizar una célula epitelial tal como una derivada de un paciente con cáncer de estómago o colon, preferiblemente se co-cultiva con una célula alimentadora después de la transferencia génica.

30 Un tercer aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un método de prueba caracterizado por el uso de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria. El método de prueba descrito en la presente memoria puede utilizarse ventajosamente como un método de prueba de seguridad, un método de prueba de toxicidad, un método de prueba de metabolismo, un método de prueba de interacción con fármacos, un método de prueba de actividad antiviral o un método de prueba de detección para productos farmacéuticos tales como agentes terapéuticos hiperlipidémicos, agentes terapéuticos para la hipertensión, medicamentos de compuestos de bajo peso molecular y medicamentos de anticuerpos.

35 En un método de prueba de interacción de fármacos ilustrativo que utiliza la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, las células madre hepáticas inducidas humanas se preparan a partir de donantes de diferentes razas, sexos, edades, antecedentes genéticos (p.ej., polimorfismos), etc., se cultivan con un compuesto candidato farmacéutico, y se examina la expresión de genes para diversas enzimas en las subfamilias del citocromo P450 (CYP) en estas células utilizando micromatrices de ADN (KURABO INDUSTRIES LTD.) o un GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter, Inc.) expresador de genes multifuncional para revelar así la interacción entre cada una de las enzimas de la subfamilia del citocromo P450 (CYP) y el compuesto candidato farmacéutico probado. La interacción entre una enzima de la subfamilia del citocromo P450 (CYP) y un compuesto candidato farmacéutico también puede examinarse mediante un método para utilizar un sustrato que produce un producto fluorescente después de que se metaboliza por una enzima del citocromo P450.

40 Las enzimas del citocromo P450 son catalizadores importantes que metabolizan oxidativamente una amplia gama de sustancias químicas hidrófobas y dado que el metabolismo de estas enzimas está involucrado en el aclaramiento, la toxicidad y la activación del fármaco, se sabe que tienen una influencia potencial sobre las interacciones dañinas entre fármacos. Por lo tanto, el desarrollo de productos terapéuticos de bajo peso molecular y similares requiere un estudio detallado de la interacción enzima-fármaco.

45 En un método de prueba de actividad antiviral ilustrativo que utiliza la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, un medio de cultivo en el que la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria está siendo cultivada se infecta con virus de hepatitis A, B o C añadidos y a continuación se añade un compuesto farmacéutico candidato para un medicamento antiviral para evaluar su eficacia.

50 En un método de prueba de escrutinio terapéutico hiperlipidémico ilustrativo que utiliza la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria, se añade un compuesto candidato terapéutico hiperlipidémico a una placa en la que se cultiva la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria y después de cultivo continuo, las lipoproteínas y lípidos secretados al sobrenadante del cultivo se analizan para evaluar la eficacia del compuesto candidato terapéutico hiperlipidémico añadido.

En un método de prueba ilustrativo para analizar las lipoproteínas y lípidos secretados en el sobrenadante del cultivo, proteínas como CM (quilomicrones), VLDL (lipoproteína de muy baja densidad), LDL (lipoproteína de baja densidad) y HDL (lipoproteína de alta densidad), así como lípidos tales como FC (colesterol libre), PL (fosfolípidos) y TC (colesterol total) se analizan mediante HPLC por penetración en gel (LipoSEARCH; Skylight Biotech, Inc.)

Las mediciones también son posibles por los métodos descritos en Usui S, Hara Y, Hosaki S, Okazaki M, "A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC", J. Lipid Res., 2002;43:805-14, y Mitsuyo Okazaki, Shinichi Usui, Masato Ishigami, Naohiko Sakai, Tadashi Nakamura, Yuji Matsuzawa, Shizuya Yamashita, "Identification of Unique Lipoprotein Subclasses for Visceral Obesity by Component Analysis of Cholesterol Profile in High-Performance Liquid Chromatography", Arterioscler Thromb Vasc Biol. March 2005.

Un cuarto aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un método de escrutinio de dianas en el descubrimiento de fármacos que se caracteriza por el uso de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

Un quinto aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un método para la preparación de modelos animales que se caracteriza por utilizar la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

Un sexto aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un método para la producción de proteínas producidas por hepatocitos que se caracteriza por el uso de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

La célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria tiene propiedades de un hepatocito, por lo que puede producir proteínas características de diversos hepatocitos. Por lo tanto, un método ilustrativo de acuerdo con el sexto aspecto descrito en la presente memoria comprende cultivar una célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria que produce una proteína específica para un hepatocito particular y que produce una proteína característica de ese hepatocito.

Un séptimo aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un método terapéutico dirigido a mamíferos que se caracteriza por el uso de la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria.

En el método terapéutico descrito en la presente memoria, la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria como inducida a partir de una célula de mamífero puede trasplantarse en el hígado del mamífero. Por ejemplo, la célula madre hepática inducida descrita en la presente memoria como inducida a partir de una célula canina puede trasplantarse en el hígado del perro.

La presente invención se ilustra más específicamente por medio de los siguientes ejemplos, pero debe entenderse que el alcance de la presente invención no está de ningún modo limitado por esos ejemplos.

Ejemplo 1

1. Preparación de un vector retroviral pantrópico

Se introdujeron tres plásmidos vectores retrovirales para tres genes, POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs y SOX2-pMXs, en células de empaquetamiento para preparar un vector retroviral pantrópico, células Plat-GP, utilizando Fugene HD (Roche; Cat. No. 4709691) para de este modo preparar una solución de vector retroviral. Los plásmidos vectores POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs, y SOX2-pMXs se utilizaron a una razón de 4:2:1 en ese orden. La razón de 4:2:1 se puede lograr cuando los genes se introducen en células de empaquetamiento o se puede lograr preparando soluciones de vectores retrovirales separadas para POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs, y SOX2-pMXs, y mezclando estas soluciones a una razón de 4:2:1 en ese orden. Los detalles del procedimiento son los que se describen a continuación.

<Preparación de una solución de vector retroviral para introducir los genes en células derivadas de tejidos cutáneos neonatales>

Los vectores POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs y SOX2-pMXs fueron suministrados por Addgene (Tabla 5 siguiente).

Las cantidades de los respectivos vectores fueron las siguientes: 2 µg de POU5F1-pMXs (Addgene), 1 µg de KLF4-pMXs (Addgene), 0,5 µg de SOX2-pMXs (Addgene), 0,5 µg de Venus-pCS2 (Nagai T et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol 2002; 20: 87-90), 2 µg de VSV-G-pCMV (Cell Biolab) y 18 µL de FuGENE HD (Roche).

<Preparación de una solución de vector retroviral para introducir los genes en células derivadas de tejidos cancerosos de paciente con cáncer de estómago>

Los vectores POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs, y SOX2-pMXs fueron los vectores construidos (Tabla 5).

Las cantidades de los vectores respectivos fueron las siguientes: 5 µg de POU5F1-pMX, 2,5 µg de KLF4-pMX, 1,25 µg de SOX2-pMX, 1,25 µg de Venus-pCS2, 5 µg de VSV-G-pCMV, 1,25 µg de GFP-pMXs (Cell Biolab) y 45 µL de FuGENE HD.

<Preparación de una solución de vector retroviral para introducir genes en células derivadas de tejidos no cancerosos de paciente con cáncer de estómago>

Los vectores POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs, y SOX2-pMXs fueron los vectores construidos (Tabla 5).

Las cantidades de los vectores respectivos fueron las siguientes: 5 µg de POU5F1-pMX, 2,5 µg de KLF4-pMX, 1,25 µg de SOX2-pMX, 1,25 µg de Venus-pCS2, 5 µg de VSV-G-pCMV, 1,25 µg de GFP-pMXs, y 45 µL de FuGENE HD.

<Preparación de una solución de vector retroviral para introducir los genes en células derivadas de tejidos cutáneos adultos>

Los vectores POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs, y SOX2-pMXs fueron los vectores construidos (Tabla 5).

Las cantidades de los vectores respectivos fueron las siguientes: 5 µg de POU5F1-pMX, 2,5 µg de KLF4-pMX, 1,25 µg de SOX2-pMX, 1,25 µg de Venus-pCS2, 5 µg de VSV-G-pCMV, 1,25 µg de GFP-pMXs, y 45 µL de FuGENE HD.

<Preparación de una solución de vector retroviral para introducir los genes en células derivadas de tejidos cancerosos de paciente con cáncer de colon>

Los vectores POU5F1-pMXs, KLF4-pMXs, y SOX2-pMXs fueron los vectores construidos (Tabla 5).

Las cantidades de los vectores respectivos fueron las siguientes: 5 µg de POU5F1-pMX, 2,5 µg de KLF4-pMX, 1,25 µg de SOX2-pMX, 1,25 µg de Venus-pCS2, 5 µg de VSV-G-pCMV, 1,25 µg de GFP-pMXs, y 45 µL de FuGENE HD.

Las células Plat-GP en las que se habían introducido los plásmidos del vector retroviral se cultivaron durante al menos 48 horas; después de eso, el sobrenadante se recolectó tres veces cada 24 horas, y la filtración se realizó utilizando la unidad Steriflip-HV Filter (filtro de tamaño de poro 0,45 µm, Millipore, Núm. Cat SE1M003M00). El procedimiento mencionado anteriormente produjo una solución de vector retroviral pantrópico que contenía los tres genes (POU5F1, KLF4 y SOX2 a una razón de 4:2:1 en ese orden). El vector retroviral pantrópico, que permite la transfección génica a varias células, también introdujo eficazmente los genes en las células humanas.

[Tabla 5]

Detalles de plásmidos vectoriales retrovirales construidos y los distribuidos por Addgene						
Gen	NCBI No.	Vector	5' enzima de restricción	3' enzima de restricción	Identificación del clon	Proveedor
POU5F1 humano	BC117435	pMXs	EcoRI	EcoRI	40125986	Abra Biosystems
KLF4 humano	BC029923	pMXs	EcoRI	EcoRI	5111134	Abra Biosystems
SOX2 humano	BC013923	pMXs	EcoRI	XhoI	2823424	Abra Biosystems
POU5F1 humano	RT-PCR y clonación	pMXs	EcoRI	EcoRI	17217	Addgene
KLF4 humano	RT-PCR y clonación	pMXs	attB1	attB2	17219	Addgene
SOX2 humano	RT-PCR y clonación	pMXs	attB1	attB2	17218	Addgene

Ejemplo 2

2. Preparación de células madre hepáticas humanas inducidas a partir de células derivadas de tejidos cutáneos neonatales

5 Las células madre hepáticas humanas inducidas se prepararon a partir de células derivadas de tejidos cutáneos humanos neonatales que son tejidos posparto (nombre comercial: fibroblastos de piel humana neonatal normal, cultivo primario, Núm. de lote 7F3956).

10 Un vial de células criopreservadas derivadas de tejidos cutáneos humana neonatal (cultivo primario; Lonza; CC-2511; Núm. de Lote 7F3956) se descongeló en un baño de agua a 37°C y se suspendió en un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y FBS al 10% para obtener de este modo 10 mL de una suspensión celular.

15 A continuación, la suspensión celular obtenida se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante y, a continuación, las células restantes se resuspendieron en 12 mL de Fibroblast Growth Medium Kit-2 (2% FBS) (en lo sucesivo denominado FGM-2 BulletKit™) (Lonza; Núm. Cat. CC-3132) para obtener de este modo una suspensión celular. La suspensión celular obtenida se añadió a un volumen de 2 mL por pocillo en una placa de plástico de 6 pocillos (Nunc; Núm. Cat. 140675) cuyos fondos de los pocillos se habían recubierto con matrigel (Becton, Dickinson; Núm. Cat. 356230) en una concentración de 20 µg/cm² durante al menos 30 minutos, durante los cuales se sembraron las células.

20 Después de 3 días, se retiró el medio y se añadió una solución de vector retroviral que contenía los tres genes (POU5F1, KLF4 y SOX2 a una proporción de 4:2:1 en ese orden) en un volumen de 2 mL por pocillo para permitir que prosiguiera la infección a 37°C durante 24 horas. Después de la eliminación del sobrenadante viral, se añadió FGM-2 BulletKit en un volumen de 2 mL por pocillo y las células se cultivaron a 37°C durante un día. A continuación, un medio ES acondicionado con MEF se reemplazó repetidamente cada dos días, y un medio ES se reemplazó los días 12, 14 y 17 después de la introducción de los tres genes. Las formulaciones del medio ES acondicionado con MEF y del medio ES utilizados fueron las siguientes.

<Medio ES acondicionado con MEF >

MEF

35 Fibroblastos embrionarios de ratón primarios tratados con Mitomicina C [DS Pharma Biomedical] Núm. Cat. R-PMEF-CF

Medio ES acondicionado

40 Knockout D-MEM (Invitrogen; Núm. Cat. 10829-018), 500 mL
 Knockout Serum Replacement al 20% (Invitrogen; Núm. Cat. 10828-028)
 50 µg/ml de gentamicina (Invitrogen; Núm. Cat. 15750-060)
 1 X Solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen; Núm. Cat. 11140-050)
 10 ng/mL de bFGF (PeproTech; Núm. Cat. 100-18B)
 2-Mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma-Aldrich; Núm. de Cat. M7154)
 GlutaMAX 2 mM o L-glutamina 2 mM

<Medio ES >

50 Knockout D-MEM (Invitrogen; Núm. Cat. 10829-018), 500 mL
 Knockout Serum Replacement al 20% (Invitrogen; Núm. Cat. 10828-028)
 50 µg/ml de gentamicina (Invitrogen; Núm. Cat. 15750-060)
 1X Solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen; Núm. Cat. 11140-050)
 10 ng/mL de bFGF (PeproTech; Núm. Cat. 100-18B)
 10³ U/mL de LIF humano recombinante (Wako Pure Chemical; Núm. Cat. 129-05601)
 2-Mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma-Aldrich; Núm. de Cat. M7154)
 55 Inhibidor de ALK5 0,5 µM (A-83-01) (Sigma-Aldrich; Núm. Cat. A5480)
 PD0325901 0,5 µM (Axon Medchem; Núm. Cat. 1408)
 CHIR99021 3 µM (Axon Medchem; Núm. Cat. 1386)

60 Desde 18 días después de la transfección génica, se reemplazó un medio de mantenimiento sin células alimentadoras para células ES/iPS humanas, mTeSR1 (STEMCELL Technologies; Núm. Cat. 05850) cada día. Treinta días después de la transfección génica, se recogió un clon de una colonia celular (NFB1-3) con fórceps y se transfirió a células alimentadoras. Debe observarse que las células alimentadoras, que eran fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical, Núm. Cat. R-PMEF-CF), se habían sembrado en una placa de 24 pocillos recubierta con gelatina (Iwaki; Núm. Cat. 11-020-012) a 5,0×10⁴ células/cm² el

día antes de la recogida de las células madre hepáticas inducidas.

A continuación se enumeran los números de pases (p) de células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cutáneos neonatales, y los días en que se sometieron a cultivo de pases y se lisaron en un tampón para un kit de recogida de ARN.

<Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cutáneos neonatales>

NFB1-3

Día 52: 24 pocillos (p1) → 6 pocillos (p2)

Día 55: 6 pocillos (p2) → 10 cm (p3)

Día 61: Pase (p4)

Día 62: Tratamiento con un tampón RLT (solución para lisar células antes de la purificación del ARN) (p5)

Ejemplo 3

3. Preparación de células madre hepáticas humanas inducidas a partir de células derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de estómago

Las células se aislaron de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de estómago (progresivo). A las células obtenidas, se les añadió una solución de vector retroviral que contenía los tres genes (POU5F1, KLF4 y SOX2 a una razón de 4:2:1 en ese orden) para la transfección génica para preparar de este modo células madre hepáticas humanas inducidas. Los detalles del procedimiento son los que se describen a continuación.

Parte de los tejidos frescos de cáncer de estómago obtenidos durante la operación (de un paciente japonés de 67 años de edad con cáncer desarrollado) se lavó con solución salina equilibrada de Hank (sin Rojo Fenol) (Invitrogen; Núm. Cat. 14175-095) y se desmenuzó con tijeras en piezas de aproximadamente 1 mm². Las piezas se lavaron adicionalmente con solución salina equilibrada de Hank (libre de fenol rojo) hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente. Después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron al precipitado de tejido 5 mL de una mezcla de colagenasa al 0,01% (Wako Pure Chemical; Núm. de Cat. 034-10533) y 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062). la agitación se realizó a 37°C durante 60 minutos con un agitador.

Después de que se confirmó que el precipitado de tejido se había digerido por completo, se añadieron 35 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que a continuación se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos. A continuación, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 40 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que luego se centrifugó nuevamente a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos. A continuación, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 10 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que luego se sembró en una placa recubierta de colágeno (60 mm) (Iwaki; Núm. Cat. 11-018-004).

Después de 24 horas, se retiró el medio, se añadieron 5 mL de una solución de vector retroviral que contenía los tres genes, y se infectaron a 37°C durante un día. Se retiró el sobrenadante viral y se suspendieron los fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical; Núm. Cat. R-PMEF-CF) a una densidad de 5,0 x 10⁴ células/cm² en 5 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y FBS al 10%; a continuación, se sembró una placa recubierta de colágeno (60 mm) (Iwaki; Núm. Cat. 11-018-004) en la que se habían cultivado las células transfectadas derivadas de los tejidos cancerosos del paciente con cáncer de estómago, y se llevó a cabo el co-cultivo.

Posteriormente, el medio ES acondicionado MEF se reemplazó repetidamente cada tres días, y desde 15 días después de la transfección génica, se reemplazó diariamente un medio de mantenimiento sin células alimentadoras para células ES/IPS humanas, mTeSR1 (STEMCELL Technologies; Núm. Cat. 05850).

Veinticinco días después de la introducción de los tres genes, se recogió un clon de una colonia de células madre hepáticas inducida (GC1-2) y se sometió a cultivo de pases en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina en una placa de 24 pocillos recubierta de gelatina. Debe observarse que las células alimentadoras, que eran fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical, Núm. Cat. R-PMEF-CF), se habían sembrado en una placa de 24 pocillos recubierta con gelatina (Iwaki; Núm. Cat. 11-020-012) a 5,0 x 10⁴ células/cm² el día antes de la recolección de células madre hepáticas inducidas.

A continuación se enumeran los números de pases (p) de células madre hepáticas humanas derivadas de tejidos

cancerosos de un paciente con cáncer de estómago, y los días en que se sometieron a cultivo de pases y se lisaron en un tampón para un kit de recolección de ARN.

5 **<Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de estómago>**

GC1-2

Día 37: 24 pocillos (p1) → 6 pocillos (p2)

Día 43: 6 pocillos (p2) → 10 cm (p3)

Día 56: Pase (p4)

Día 57: Pase y reserva (p5)

Día 60: Tratamiento con un tampón RLT (solución para lisar células antes de la purificación del ARN)

15 **Ejemplo 4**

4. Preparación de células madre hepáticas humanas inducidas a partir de células derivadas de tejidos no cancerígenos de un paciente con cáncer de estómago

20 A las células derivadas de tejidos no cancerosos de un paciente con cáncer de estómago, se les añadieron una solución de vector retroviral que contenía los tres genes (POU5F1, KLF4 y SOX2 a una razón de 4:2:1 en ese orden) para la transfección génica para preparar células madre hepáticas humanas inducidas. Los detalles del procedimiento son los que se describen a continuación.

25 Parte de los tejidos frescos no cancerígenos obtenidos de un paciente con cáncer de estómago durante la operación (un paciente japonés de 67 años con cáncer progresivo) se lavó con solución salina equilibrada de Hank (sin Rojo Fenol) (Invitrogen; Núm. Cat. 14175-095) y se desmenuzó con tijeras en piezas de aproximadamente 1 mm². Las piezas se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (libre de Rojo Fenol) hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente. Después de eso, se retiró el sobrenadante, se añadieron 5 mL de una mezcla de colagenasa al 0,1% (Wako Pure Chemical; Núm. Cat. 034-10533) y 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) al precipitado de tejido, y la agitación se realizó a 37°C durante 60 minutos con un agitador.

35 Después de que se confirmó que el precipitado de tejido se había digerido por completo, se añadieron 35 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que a continuación se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 5 horas. A continuación, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 40 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que luego se centrifugó nuevamente a 1000 rpm a 4°C durante 5 horas. Además, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 10 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que a continuación se sembró en una placa recubierta con colágeno (60 mm) (Iwaki; Núm. Cat. 11-018-004).

45 Después de 24 horas, se retiró el medio, se añadieron 5 mL de una solución de vector retroviral que contenía los tres genes (POU5F1, KLF4 y SOX2 a una razón de 4:2:1 en ese orden), y se infectó a 37°C durante aproximadamente 24 horas. Se eliminó el sobrenadante viral y se suspendieron los fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical; Núm. Cat. R-PMEF-CF) a una densidad de 5,0 x 10⁴ células/cm² en 5 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y FBS al 10%, que luego se sembró en una placa recubierta con colágeno (60 mm) sobre la que se habían cultivado las células transfectadas derivadas de los tejidos no cancerosos del paciente con cáncer de estómago, y se realizó el co-cultivo.

55 A partir de ese momento, se reemplazó repetidamente un medio de ES acondicionado con MEF cada tres días, y 31 días después de la introducción de los tres genes, se reemplazó mTeSR1 todos los días. Cuarenta y seis días después de la transfección génica, se recogió un clon de una colonia celular (NGC1-2) y se sometió a cultivo de pases en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina en una placa de 24 pocillos recubierta de gelatina. Debe observarse que las células alimentadoras, que eran fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical, Núm. Cat. R-PMEF-CF), se habían sembrado en una placa de 24 pocillos recubierta con gelatina (Iwaki; Núm. Cat. 11-020-012) a 5,0 x 10⁴ células/cm² el día antes de la recolección de células madre hepáticas inducidas.

60 A continuación se enumeran los números de pases (p) de células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos no cancerosos de un paciente con cáncer de estómago, y los días en que se sometieron a cultivo de pases y se lisaron en un tampón para un kit de recolección de ARN.

<Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos no cancerosos de un paciente con cáncer de estómago>

NGC1-2

Día 52: 24 pocillos (p1) → 6 pocillos (p2)

Día 58: 6 pocillos (p2) → 10 cm (p3)

Día 65: Pase, reserva y tratamiento con un tampón RLT (solución para lisar células antes de la purificación del ARN) (p4)

Ejemplo 5

5. Preparación de células madre hepáticas humanas inducidas a partir de células derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de colon

A células derivadas de tejidos de cáncer de nueva aportación de un paciente con cáncer de colon sigmoide, se les añadió una solución de vector retroviral que contenía los tres genes (POU5F1, KLF4 y SOX2 a una razón de 4:2:1 en ese orden) para la transfección génica para preparar células madre hepáticas humanas inducidas. Los detalles del procedimiento son los que se describen a continuación.

Parte de los tejidos de cáncer de colon obtenidos durante la operación (de un paciente japonés masculino de 55 años de edad con cáncer de colon sigmoide) se lavó con solución salina equilibrada de Hank (sin Rojo Fenol) (Invitrogen; Núm. Cat. 14175-095) y se trituró con tijeras en piezas de aproximadamente 1 mm². Las piezas se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (libre de Rojo Fenol) hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente. Después de eso, se separó el sobrenadante, se añadieron al precipitado de tejido 5 mL de una mezcla de colagenasa al 0,01% (Wako Pure Chemical; Núm. Cat. 034-10533) y 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y la agitación se realizó a 37°C durante 60 minutos con un agitador.

Después de que se confirmó que el precipitado de tejido se había digerido por completo, se añadieron 35 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que a continuación se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos. A continuación, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 40 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que luego se centrifugó nuevamente a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 10 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico y FBS al 10%, que luego se sembró en una placa recubierta con colágeno (100 mm) (Iwaki; 11-018-006).

Después de 24 horas, se eliminó el medio y se añadieron 10 mL de una solución de vector retroviral que contenía los tres genes. Cinco horas después, se añadieron 5 mL de una solución de vector retroviral Luc-IRES-GFP, y se infectó a 37°C durante aproximadamente 24 horas. Se eliminó el sobrenadante viral y se suspendieron los MEF tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical; Núm. Cat. R-PMEF-CF) a una densidad de $5,0 \times 10^4$ células/cm² en 10 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y FBS al 10%, que se sembró en una placa recubierta con colágeno (60 mm) sobre la que se cultivaron las células transfectadas derivadas de los tejidos cancerosos del paciente con cáncer de colon, y se realizó el co-cultivo.

Después de eso, el medio ES acondicionado MEF se reemplazó repetidamente cada tres días, y desde 22 días después de la transfección génica, se reemplazó mTeSR1 todos los días. Treinta y un días después de la transfección génica, se recogió un clon de una colonia celular (CC1-4) y se sometió a cultivo de pases en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical; Núm. Cat. R-PMEF-CF) en una placa de 24 pocillos recubierta de gelatina. Debe observarse que las células alimentadoras, que eran fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical, Núm. Cat. R-PMEF-CF), se habían sembrado en una placa de 24 pocillos recubierta con gelatina (Iwaki; Núm. Cat. 11-020-012) a $5,0 \times 10^4$ células/cm² el día antes de la recolección de células madre hepáticas inducidas.

A continuación se enumeran los números de pases (p) de células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de colon, y los días en que se sometieron a cultivo de pases y se lisaron en un tampón para un kit de recogida de ARN.

<Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de colon>

CC1-4

Día 40: 24 pocillos (p1) → 6 pocillos (p2)
 Día 45: 6 pocillos (p2) → 10 cm (p3)
 Día 51: Pases y reserva (p4)
 Día 54: Pases y reserva (p5)
 Día 59: Pases y reserva (p5)
 Día 63: Tratamiento con un tampón RLT (solución para lisar células antes de la purificación del ARN) (p5)

Ejemplo 6

6. Preparación de células madre hepáticas humanas inducidas a partir de células derivadas de tejidos cutáneos adultos

Las células madre hepáticas humanas inducidas se prepararon a partir de células derivadas de tejidos cutáneos adultos (nombre del producto: fibroblastos de piel humana adultos normales, cultivo primario, Lonza, Núm. de Lote 76582).

Un vial de fibroblastos crioconservados de piel humana adulta normal (cultivo primario; Lonza; Núm. de Lote 76582) se descongeló en un baño de agua a 37°C y se suspendió en un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y FBS al 10% para obtener de este modo 10 mL de una suspensión celular. A continuación, la suspensión celular obtenida se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante, y después de eso las células restantes se resuspendieron en 20 mL de FGM-2 BulletKit. La suspensión celular se añadió a un volumen de 10 mL por pocillo en una placa de 100 mm (Nunc; Núm. Cat. 172958) cuyos fondos de pocillos se habían recubierto con matrigel (Becton, Dickinson) a una concentración de 20 µg/cm² durante al menos 30 minutos, con lo que se sembraron las células.

Después de aproximadamente 24 horas, se eliminó el medio, y se añadieron 10 mL de una solución de vector retroviral que contenía los tres genes, y se infectaron a 37°C durante 24 horas. Se eliminó el sobrenadante viral y se añadieron 10 mL de un medio ES acondicionado con MEF. Posteriormente, el medio ES acondicionado con MEF se reemplazó repetidamente cada tres días, y a partir de los 18 días posteriores a la transfección génica, se reemplazó mTeSR1 (Tecnologías STEMCELL) todos los días. Durante 6 días a partir de los 28 días posteriores a la transfección génica, se reemplazó diariamente el medio ES acondicionado de MEF. A partir de los 34 días posteriores a la transfección génica, mTeSR1 se reemplazó adicionalmente cada día. Treinta y nueve días después de la transfección del gen, se recogió un clon de una colonia celular (AFB1-1) y se sometió a cultivo de pases en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical; Núm. Cat. R-PMEF-CF) en una placa de 24 pocillos recubierta de gelatina. Debe observarse que las células alimentadoras, que eran fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (DS Pharma Biomedical, Núm. Cat. R-PMEF-CF), se habían sembrado en una placa de 24 pocillos recubierta con gelatina (Iwaki; Núm. Cat. 11-020-012) a 5,0 × 10⁴ células/cm² el día antes de la recolección de células madre hepáticas inducidas.

A continuación se enumeran los números de pases (p) de células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cutáneos adultos, y los días en que se sometieron a cultivo de pases y se lisaron en un tampón para un kit de recogida de ARN.

<Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cutáneos adultos>

AFB1-1

Día 50: 24 pocillos (p1) a 6 pocillos (p2)
 Día 54: 6 pocillos (p2) a 10 cm (p3)
 Día 59: Pase (p4)
 Día 63: Pase (p5)
 Día 67: Pase, reserva y tratamiento con un tampón RLT (solución para lisar células antes de la purificación del ARN) (p5)

El cultivo de pases realizado en los Ejemplos 2-6 descritos anteriormente fue como se describe a continuación.

Después de eliminar el medio de las células cultivadas y lavar las células con PBS (-), se añadió una solución de disociación. Después de dejar reposar a 37°C durante 5 minutos, se retiró la solución de disociación, se añadieron 20 mL de un medio D-MEM (alto contenido de glucosa) (Invitrogen; Núm. Cat. 11965-092) con un suplemento de 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062) y FBS al 10% (Invitrogen; Núm. Cat. 26140-079), que luego se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 5 minutos. A continuación, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 1X antibiótico/antimicótico (Invitrogen; Núm. Cat. 15240-062), mTeSR, y Y-27632 10 µM, y la suspensión celular se sembró en una placa de 100 mm recubierta de gelatina donde se había sembrado

MEF a $1,0 \times 10^6$ células/placa.

Los siguientes dos tipos de soluciones de disociación se utilizaron para el cultivo de pases:

- 5 (1) solución de tripsina al 0,25%/ EDTA 1 mM (Invitrogen, Núm. Cat. 25200-056); y
 (2) una mezcla que contenía:

10 10 mL de Colagenasa de 10 mg/mL (Invitrogen; Núm. Cat. 17104-019),
 1 mL de una solución de cloruro cálcico de 100 mM,
 59 mL de PBS,
 10 10 mL de una solución de tripsina al 2,5% (Invitrogen; Núm. Cat. 15090-046), y
 20 mL de Knockout Serum Replacement (Invitrogen; Núm. Cat. 10828-028).

Ejemplo 7

15 **7. Cultivo a largo plazo de células madre pluripotentes humanas inducidas y células madre hepáticas humanas inducidas**

20 Las células madre hepáticas humanas inducidas (AFB1-1, NGC1-2) se sometieron a cultivo de pases durante seis meses o más. El medio ilustrativo utilizado incluye mTeSR1 (STEMCELL Technologies/VERITAS), un medio con un suplemento de bFGF para células ES/iPS de primates (ReproCELL), o ReproStem con un suplemento de bFGF (ReproCELL). En el caso en el que se utilizó MEF, se usó una placa de cultivo recubierta con colágeno o gelatina, y en caso de no utilizar MEF, se usó una placa de cultivo recubierta con matrigel. Los resultados muestran que la adición de 0,05-0,5 μM de A-83-01 (inhibidor de señalización de TGF- β , ALK5 quinasa del receptor de TGF- β tipo I, inhibidores de ALK4 y ALK7 del receptor de activina/nodal de tipo I) fue útil para la autorreplicación de células madre hepáticas humanas inducidas, y produjo una tasa de proliferación y una morfología muy satisfactorias.

Ejemplo 8

30 **8. Análisis cuantitativo basado en micromatrices de genes marcadores de hepatocitos y genes marcadores de células madre embrionarias**

35 Se analizó la expresión génica de todo el genoma (transcriptoma de ARNm) utilizando el genoma humano completo Oligo DNA Microarray (4X44K) fabricado por Agilent Technologies.

<Muestras>

40 En los Ejemplos 2-6, los ARN totales y los ADN genómicos de células madre hepáticas humanas inducidas (NFB1-3, GC1-2, NGC1-2, AFB1-1 y CC1-4) preparados en los Ejemplos 2-6 se extrajeron de las soluciones que se habían tratado con un tampón RLT (solución para lisar células antes de la purificación del ARN), utilizando el Mini Kit de ADN/ARN AIIPrep (50) (Qiagen; Núm. Cat. 80204).

45 Los ARN totales de células madre hepáticas humanas inducidas (NFB1-3, GC1-2, NGC1-2, AFB1-1 y CC1-4) se utilizaron como muestras.

<Procedimiento de prueba>

(1) Control de calidad

50 Se comprobó la calidad del ARN total en Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) utilizando el kit RNA LabChip (marca registrada de Agilent Technologies), y se descubrió que todas las muestras de ARN eran de buena calidad. Las concentraciones y purezas de ARN también se evaluaron utilizando el NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), y como resultado, se verificó que cada muestra contenía el ARN total en una cantidad requerida para la síntesis de ARNc y a un alto nivel de pureza.

(2) Síntesis de ARNc

60 De acuerdo con el protocolo de Agilent, el ARNc de doble hebra se sintetizó a partir del ARN total (500 ng) de cada muestra utilizando el kit Quick Amp Labeling (Agilent Technologies). A partir del ADNc preparado, el ARNc se sintetizó mediante transcripción *in vitro*. Durante la síntesis, el ARNc se marcó con fluorescencia incorporando CTP marcada con cianina (3-CTP Cianina).

(3) Hibridación

5 Con la ayuda del Kit de hibridación de expresión génica (Agilent Technologies), se añadió el ARNc marcado para la hibridación a un tampón de hibridación para realizar la hibridación durante 17 horas en Whole Human Genome Oligo DNA Microarray (4X44K) fabricado por Agilent Technologies. Después del lavado, las imágenes de las micromatrices de ADN se barrieron con un escáner de micromatrices Agilent, y las señales fluorescentes de cada punto se convirtieron a valores numéricos utilizando Feature Extraction Software (v.9.5.3.1).

<Resultados del análisis genético cuantitativo>

10 La presencia o ausencia de expresión se evaluó tomando como 0 el valor de la mediana del perfil de expresión génica total (distribución de los valores de fluorescencia para las sondas respectivas). Una sonda que mostró un valor de expresión de más de 0 se consideró como una sonda que detectó la expresión de genes, se supuso que había dado lugar a la expresión de genes, y se contó en el número de sondas de expresión.

15 Cabe señalar que el soporte lógico de análisis utilizado fue GeneSpring GX 10.0 (Agilent Technologies, Inc.) y que la normalización se realizó con el método del percentil 50. Los datos de micromatrices para células madre embrionarias humanas (hES_ES01) que se debían utilizar como control se descargaron de GEO.

1. Genes expresados característicamente en hepatocitos

20 La Tabla 6 siguiente enumera los genes que se expresan de forma característica en los hepatocitos y que se expresan en la célula madre hepática humana inducida de la presente invención. Entre las 156 sondas expresadas (144 genes) en el Whole Human Genome Oligo DNA Microarray (4X44K) fabricado por Agilent Technologies, que se expresaron de manera característica en hepatocitos, se contaron las expresadas en células madre hepáticas humanas inducidas, y sus nombres de Sonda, Símbolo de Gen, y los Núm. de Acceso de GenBank se enumeran en las tablas respectivas.

25

[Tabla 6]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Adhesión al Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Adhesión al Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P116898	A2M	NM_000014	A_24_P347431	FOXA1	NM_004496	A_23_P205355	SERPINA5	NM_000624
A_23_P252981	ACE2	NM_021804	A_23_P91552	FTCD	NM_206965	A_23_P41390	SH3TC1	NM_018986
A_24_P324783	ACVRL1	NM_000020	A_23_P384761	GATA4	NM_002052	A_23_P66739	SLC13A5	NM_177550
A_24_P945113	ACVRL1	NM_000020	A_23_P129064	GATM	NM_001482	A_23_P102391	SLC40A1	NM_014585
A_32_P196263	ADAMTS9	NM_182920	A_23_P52227	GDF10	NM_004962	A_24_P242581	SLC5A9	NM_001011547
A_23_P406341	AFAPIL2	NM_001001936	A_23_P250444	GJB1	NM_000166	A_23_P150788	SLCO2B1	NM_007256
A_23_P58205	AFP	NM_001134	A_32_P19294	GLT1D1	NM_144669	A_23_P91230	SLPI	NM_003064
A_23_P115261	AGT	NM_000029	A_32_P109029	GPRC5C	NM_022036	A_23_P113351	SPARCL1	MM_004684 NM_0004684
A_23_P155514	AHSG	NM_001622	A_23_P253495	GSTA3	NM_000847	A_32_P133072	SPON1	NM_006108
A_23_P155509	AHSG	MM_001622	A_23_P69573	GUCY1A3	NM_000856	A_3_P354705	ST8SIA1	NM_003034
A_24_P372189	AK027294	AK027294	A_24_P52697	H19	NR_002196	A_23_P36345	STARD10	MM.006645
A_32_P56661	AK074614	AK074614	A_23_P47034	HHEX	NM_002729	A_23_P399265	STMN2	S82024
A_32_P23525	AK124281	AK124281	A_23_P202427	HKDC1	NM_025130	A_23_P80974	TDO2	NM_005651
A_24_P766716	AK126405	AK126405	A_23_P103588	HMGCS2	NM_005518	A_73_P212500	TF	NM_001063
A_23_P257834	ALB	NM_000477	A_23_P206760	HP	NM_005143	A_23_P212508	TF	NM_001063
A_23_P83098	ALDH1A1	NM_000689	A_23_P421493	HPR	NM_020995	A_23_P101013	TMC6	NM_007267
A_32_P105549	4NXA8	NM_001630	A_23_P161998	HPX	NM_000813	A_23_P409093	TMEM16D	NM_178826
A_23_P337262	APCDD1	NM_153000	A_23_P118065	HSD17B2	NM_002153	A_32_P7015	TSPAN15	NM_012339
A_23_P203191	APOA1	NM_000039	A_23_P395438	HTRA3	NM_053044	A_23_P130333	TTR	NM_000371

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Adhesión Genbank	al	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Adhesión Genbank	al	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_24_P302249	APOA2	NM_001643		A_23_P10542	HTRA3	NM_053044		A_23_P81888	UBD	NM_006398
A_23_P87036	APOA4	NM_000482		A_23_P150609	IGF2	NM_001007139		A_P212968	UGT2B11	NM_001073
A_23_P78591	APOB	NM_000384		A_23_P15146	IL32	NM_001012931		A_23_P136671	UGT2B7	NM_001074
A_23_P259071	AREG	NM_001657		A_23_P153964	INHBB	NM_002193		A_23_P214408	UNC93A	NM_018974
A_23_P116902	ART4	NM_021071		A_32_P217140	ISX	NM_001008494		A_24_P103434	UNC93A	NM_018974
A_23_P130113	ASGR2	NM_080912		A_23_P501193	KCNJ16	NM_170741		A_23_P34345	VCAM1	NM_001078
A_23_P118894	ATAD44	NM_024320		A_23_P56898	KYNU	NM_003937		A_23_P16866	VIL1	NM_007127
A_24_P753592	BC018589	BC018589		A_23_P201638	LAMC2	NM_005562		A_23_P78099	VTN	NM_000638
A_23_P143331	BMP2	NM_001200		A_23_P120902	LGALS2	NM_006498		A_23_P106617	WFDCt	NM_021197
A_32_42224	BX097190	BX097190		A_23_P32165	LHX2	NM_004789				
A_23_P75790	C11orf9	NM_013278		A_24_P178834	LOC132205	AK091178				
A_23_P204937	C13orf15	NM_014059		A_24_P463929	LOC285733	AK091900				
A_24_P10137	C13orf15	NM_014059		A_24_P845223	M27126	M27126				
A_23_P88678	C15orf27	NM_152335		A_24_P258219	MAF	AF055376				
A_23_P101407	C3	NM_000064		A_23_P164057	MFAP4	NM_002404				
A_23_P71855	C5	NM_001735		A_23_P13094	MMP10	NM_002425				
A_32_P213103	CA414006	CA414006		A_23_P213171	MTTP	NM_000253				
A_23_P33723	CD163	NM_004244		A_23_P102364	NGEF	NM_019850				
A_24_P11208	CD1D	NM_001766		A_23_P389897	NGFR	NM_002507				
A_23_P76654	CDX2	NM_001265		A_24_P252364	NRCAM	NM_005010				
A_23_P151895	CILP	NM_003613		A_23_P360797	NTF3	NM_002527				
A_23_P105461	CMKLR1	NM_004072		A_24_P220485	OLFML2A	NM_182487				
A_23_P217379	COL4A6	NM_033641		A_32_P61684	PAG1	NM_018440				
A_23_P120125	COLEC11	NM_199235		A_23_P347070	PAG1	NM_018440				
A_24_P388322	COLEC11	NM_199235		A_23_P151907	PCSK6	NM_002570				
A_23_P213745	CXCL14	NM_004887		A_24_P243748	PDK4	NM_002812				
A_23_P102000	CXCR4	NM_001008540		A_23_P52121	PDZK1	NM_002614				
A_23_P131676	CXCR7	NM_020311		A_23_P388150	PLA2G12B	NM_032562				
A_23_P32577	DACH1	NM_080759		A_32_P206123	PLG	NM_000301				
A_23_P257583	DENND2A	NM_015689		A_23_P30693	PLG	NM_000301				
A_23_P105923	DIO3	NM_001362		A_23_P160286	PRG4	NM_005807				
A_24_P236251	DLK1	NM_003836		A_32_P157391	PSMAL	NM_153696				
A_23_P139704	DUSP6	NM_001946		A_23_P146554	PTGDS	NM_000954				
A_23_P139687	ERP27	NM_152321		A_23_P167030	PTHR1	NM_000316				
A_23_P150379	EVA1	MM_144765		A_23_P118392	RASD1	NM_016084				

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Adhesión Genbank	al	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Adhesión Genbank	al	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P205177	F10	NM_000501		A_23_P75283	RBP4	NM_006744				
A_23_P94879	F2	NM_000506		A_23_P3934	RNF43	NM_017763				
A_23_P79562	FABP1	NM_001443		A_23_P88849	RRAD	NM_004165				
A_23_P375372	FGA	NM_021871		A_24_P262127	RRAD	NM_004165				
A_23_P44274	FGA	NM_000508		A_23_P124619	S100A14	NM_020672				
A_23_P136125	FGB	NM_005141		A_23_P121926	SEPP1	MM.005410				
A_23_P148088	FGG	NM_000509		A_24_P145629	SERINC2	NM_178865				
A_23_P166109	FLRT3	NM_198391		A_23_P218111	SERPINA1	NM_001002236				
A_23_P114863	FMOD	NM_002023		A_23_P2920	SERPINA3	NM_001085				
A_23_P37127	FOXA1	NM_004496		A_24_P321766	SERPINA5	NM_000624				

La Tabla 7 siguiente enumera los genes expresados en células madre hepáticas humanas inducidas (GC1-2) que se obtuvieron de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de estómago y que se indujeron en el Ejemplo 3. Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de estómago: GC1-2

5

El número de sondas expresadas características de los hepatocitos fue 138.

[Tabla 7]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P116898	A2M	NM_000014	A_24_P238251	DLK1	NM_003836	A_23_P102364	NGEF	NM_019850
A_23_P252981	ACE2	NM_021804	A_23_P139704	DUSP6	NM_001946	A_23_P389897	NGFR	NM_002507
A_24_P324783	ACVRL1	NM_000020	A_23_P139687	ERP27	NM_152321	A_23_P380797	NTF3	NM_002527
A_24_P945113	ACVRL1	NM_000020	A_23_P205177	F10	NM_000504	A_24_P220485	OLFML2A	NM_182487
A_32_P196263	ADAMTS9	NM_182920	A_23_P94879	F2	NM_000506	A_32_P61684	PAG1	NM_018440
A_23_P408341	AFAP1L2	NM_001001936	A_23_P79562	FABP1	NM_001443	A_23_P347070	PAG1	NM_018440
A_23_P58205	AFP	NM_001134	A_23_P375372	FGA	NM_021871	A_23_P52121	PDZK1	NM_002914
A_23_P115261	AGT	NM_000029	A_23_P44274	FGA	NM_000508	A_23_P388150	PLA2G12B	NM_032562
A_23_P155514	AHSG	NM_001622	A_23_P138125	FOB	NM_005141	A_32_P208123	PLG	NM_000301
A_23_P155509	AHSG	NM_001622	A_23_P148088	FGG	NM_000509	A_23_P30693	PLG	NM_000301
A_24_P372189	AK027294	AK027294	A_23_P166109	FLRT3	NM_198391	A_23_P160286	PRG4	NM_005807
A_32_P58661	AK074614	AK074614	A_23_P114883	FMOD	NM_002023	A_23_P146554	PTGDS	NM_000954
A_32_P23525	AK124281	AK124281	A_23_P37127	FOXA1	NM_004496	A_23_P167030	PTHR1	NM_000316
A_24_P766716	AK126405	AK126405	A_24_P347431	FOXA1	NM_004496	A_23_P118392	RASD1	NM_016084
A_23_P257834	ALB	NM_000477	A_23_P384761	GATA4	NM_002052	A_23_P75283	RBP4	NM_006744
A_23_P83098	ALDH1A1	NM_000689	A_23_P129064	GATM	NM_001482	A_23_P3934	RNF43	NM_017763
A_32_P105549	ANXA8	NM_001630	A_23_P250444	GJB1	NM_000166	A_23_P88849	RRAD	NM_004165
A_23_P337262	APCDD1	NM_153000	A_32_P19294	GLT1D1	NM_144669	A_24_P282127	RRAD	MM_004165
A_23_P203191	APOA1	NM_000039	A_32_P109029	GPRC5C	NM_022036	A_23_P124819	S100A14	NM_020672

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_24_P302249	APOA2	NM_001643	A_23_P253495	GSTA3	NM_000847	A_23_P121926	SEPP1	NM_005410
A_23_P87036	APOA4	NM_000482	A_23_P69573	GUCY1A3	NM_000856	A_24_P145629	SERINC2	NM_178865
A_23_P79591	APOB	NM_000384	A_24_P52697	H19	NR_002196	A_23_P218111	SERPINA1	NM_001002236
A_23_P259071	AREG	NM_001657	A_23_P47034	HHEX	NM_002729	A_24_P321766	SERPINA5	NM_000624
A_23_P116902	ART4	NM_021071	A_23_P103588	HMGCS2	NM_005518	A_23_P205355	SERPINA5	NM_000624
A_23_P130113	ASGR2	NM_080912	A_23_P206760	HP	NM_005143	A_23_P41390	SH3TC1	NM_018988
A_24_P753592	BC018589	BC018589	A_23_P421493	HPR	NM_020995	A_23_P102391	SLC40A1	NM_014585
A_23_P143331	BMP2	NM_001200	A_23_P161998	HPX	NM_000613	A_24_P242581	SLC5A9	NM_001011517
A_32_P42224	BX097190	BX097190	A_23_P118065	HSD17B2	NM_002153	A_32_P133072	SPON1	NM_006108
A_23_P75790	C11orf9	NM_013279	A_23_P395438	HTRA3	NM_053044	A_23_P354705	ST8SIA1	NM_003034
A_23_P204937	C13orf15	NM_014059	A_23_P10542	HTRA3	NM_053044	A_23_P36345	STARD10	NM_006645
A_24_P10137	C13orf15	NM_014059	A_23_P150609	IGF2	NM_001007139	A_23_P399265	STMN2	S82024
A_23_P88678	C15orf27	NM_152335	A_23_P15146	IL32	NM_0012631	A_23_P212500	TF	NM_001063
A_23_P101407	C3	NM_000064	A_23_P153964	INHBB	NM_002193	A_23_P212508	TF	NM_001063
A_23_P71855	C5	NM_001735	A_32_P217140	ISX	NM_001008494	A_23_P101013	TMC6	NM_007267
A_32_P213103	CA414006	CA414006	A_23_P501193	KCNJ16	NM_170741	A_23_P409093	TMEM16D	NM_178826
A_23_P33723	CD163	NM_004244	A_23_P56898	KYNU	NM_003937	A_32_P7015	TSPAN15	NM_012339
A_23_P151895	CILP	NM_003613	A_23_P201636	LAMC2	NM_005562	A_23_P130333	TTR	NM_000371
A_23_P217379	COL4A6	NM_033641	A_23_P120902	LGALS2	NM_006498	A_23_P81898	UBD	NM_006398
A_23_P120125	COLEC11	NM_199235	A_23_P32165	LHX2	NM_004789	A_23_P212968	UGT2B11	NM_001073
A_24_P388322	COLEC11	NM_199235	A_24_P178834	LOC132205	AK091178	A_23_P138871	UGT2B7	NM_001074
A_23_P213745	CXCL14	NM_004887	A_24_P463929	LOC285733	AK091900	A_23_P214408	UNC93A	NM_018974
A_23_P102000	CXCR4	NM_001008540	A_24_P845223	M27126	M27126	A_24_P103434	UNC93A	NM_018974
A_23_P131676	CXCR7	NM_020311	A_24_P256219	MAF	AF055376	A_23_P34345	VCAM1	NM_001078
A_23_P32577	DACH1	NM_080759	A_23_P164057	MFAP4	NM_002404	A_23_P16866	VIL1	NM_007127
A_23_P257583	DENND2A	NM_015689	A_23_P13094	MMP10	NM_002425	A_23_P78099	VTN	NM_000838
A_23_P105923	DIO3	NM_001362	A_23_P213171	MTTP	NM_000253	A_23_P108817	MFDC1	NM_021197

La Tabla 8 siguiente enumera los genes expresados en células madre hepáticas humanas inducidas (AFB1-1) que se obtuvieron de tejidos cutáneos adultos y que se indujeron en el Ejemplo 6. Células madre hepáticas humanas derivadas de tejidos cutáneos adultos: AFB1-1. El número de sondas expresadas características de los hepatocitos fue 133.

5

[Tabla 8]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P118898	A2M	NM_000014	A_23_P150379	EVA1	MM_144765	A_23_P360797	NTF3	NM_002527
A_23_P252981	ACE2	NM_021804	A_13_P205177	F10	NM_000504	A_24_P220485	OLFML2A	NM_182487
A_24_P945113	ACVRL1	NM_000020	A_23_P94879	F2	NM_000506	A_32_P81684	PAG1	NM_018440

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_32_P198283	ADAMTS9	NM_182920	A_23_P79562	FABP1	NM_001443	A_23_P347070	PAG1	NM_018440
A_23_P406341	AFAP1L2	NM_001001936	A_23_P375372	FGA	NM_021871	A_23_P151907	PCSK6	NM_002570
A_23_P58205	AFP	NM_001134	A_23_P44274	FGA	NM_000508	A_24_P243749	PKD4	NM_002612
A_23_P115261	AGT	NM_000029	A_23_P136125	FGB	NM_005141	A_21_P52121	PDZK1	NM_002614
A_23_P155514	AHSG	NM_001622	A_23_P148088	FGG	NM_000509	A_32_P206123	PLG	NM_000301
A_23_P155509	AHSG	NM_001622	A_23_P166109	FLRT3	NM_198391	A_23_P30693	PLG	NM_000301
A_24_P372189	AK027294	AK027294	A_23_PH4893	FMOD	NM_002023	A_23_P160286	PRG4	NM_005807
A_32_P58661	AK074614	AK074614	A_24_P347431	FOXA1	NM_004496	A_23_N148554	PTGDS	NM_000954
A_23_P23525	AK124281	AK124281	A_23_P91552	FTCD	NM_206965	A_23_P187030	PHR1	NM_000316
A_24_P786716	AK128405	AK126405	A_23_P384761	GATA4	NM_002052	A_23_P119392	RASD1	NM_016064
A_23_P257834	ALB	NM_000477	A_23_P129064	3ATM	NM_001482	A_23_P75283	RBP4	NM_008744
A_23_P83098	ALDH1A1	NM_000689	A_23_P52227	GDF10	NM_004982	A_23_P3934	RNF43	NM_017763
A_32_P105549	ANXA8	NM_001630	A_23_P250444	GJB1	NM_000188	A_23_P88849	RRAD	NM_004165
A_23_P337262	APCDD1	NM_153000	A_32_P19294	GLT1D1	NM_144669	A_24_P262127	RRAD	NM_004165
A_23_P203191	APOA1	NM_000039	A_32_P109029	GPRC5C	NM_022036	A_23_P124619	S100A14	NM_020672
A_24_P302249	APOA2	MM_001643	A_23_P253495	GSTA3	NM_000847	A_23_P121926	SEPP1	NM_005410
A_23_P87038	APOA4	NM_000482	A_23_P69573	GUCY1A3	NM_000856	A_24_P145629	SERINC2	NM_178865
A_23_P79591	APOB	NM_000384	A_24_P52697	H19	NR_002196	A_23_P218111	SERPINA1	NM_001002236
A_23_P259071	AREG	NM_001657	A_23_P47034	HHEX	NM_002729	A_23_P205355	SERPINA5	NM_000624
A_23_P130113	ASGR2	NM_080912	A_23_P202427	HKDC1	NM_025130	A_23_P41390	SH3TC1	NM_018988
A_24_P753592	BC018589	BC018589	A_23_P103588	HMGCS2	NM_005518	A_23_P66739	SLC13A5	NM_177550
A_23_P143331	BMP2	NM_001200	A_23_P206760	HP	NM_005143	A_23_P102391	SLC40A1	NM_014585
A_32_P42224	BX097190	BX097190	A_23_P161998	HPX	NM_000613	A_23_P150768	SLCO2B1	NM_007256
A_23_P75790	C11	NM_013279	A_23_P118065	HSD17B2	NM_002153	A_23_P91230	SLPI	NM_003064
A_23_P204937	C13orf15	NM_014059	A_23_P395438	HTRA3	NM_053044	A_23_P113351	SPARCL1	NM_004684
A_24_P10137	C13orf15	NM_014059	A_23_P10542	HTRA3	NM_053044	A_32_P133072	SPON1	NM_006108
A_23_P88678	C15orf27	NM_152335	A_23_P150609	IGF2	NM_001007139	A_23_P38345	STARD10	NM_006645
A_23_P101407	C3	NM_000064	A_23_P15146	IL32	NM_001012631	A_23_P399265	STMN2	S82024
A_23_P71855	C5	NM_001735	A_23_P153964	INHBB	NM_002193	A_23_P212500	TF	NM_001063
A_32_P213103	CA414006	CA414006	A_23_P501193	KCNJ16	NM_170741	A_23_P212508	TF	NM_001063
A_23_P151895	CILP	NM_003613	A_23_P58898	KYNU	NM_003937	A_23_P101013	TMC6	NM_007267
A_23_P217379	COL4A6	NM_033641	A_23_P201636	LAMC2	NM_005562	A_32_P7015	TSPAN15	NM_012339
A_23_P120125	COLEC11	NM_199235	A_23_P120902	LGALS2	NM_006498	A_23_P130333	TTR	NM_000371
A_24_P388322	COLEC11	NM_199235	A_23_P32165	LHX2	NM_004789	A_23_P81898	UBD	NM_006398
A_23_P213745	CXCL14	NM_004887	A_24_P178834	LOC132205	AK091178	A_23_P212968	UGT2B11	NM_001073

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P102000	CXCR4	NM_001008540	A_24_P463929	LOC285733	AK091900	A_23_P136671	UGT2B7	NM_001074
A_23_P131676	CXCR7	NM_020311	A_24_P845223	M27126	M27126	A_23_P34345	VCAM1	NM_001078
A_23_P257583	DENND2A	NM_015689	A_23_P164057	MFAP4	NM_002404	A_22_P16866	VIL1	NM_007127
A_23_P105923	DIO3	NM_001362	A_23_P213171	MTTP	NM_000253	A_23_P78099	VTN	NM_000638
A_24_P236251	DLK1	NM_003836	A_23_P102364	NGEF	NM_019850	A_23_P106617	WFDC1	NM_021197
A_23_P139704	DUSP6	NM_001946	A_23_P389897	NGFR	NM_002507			
A_23_P139687	ERP27	NM_152321	A_24_P252364	NRCAM	NM_005010			

La Tabla 9 siguiente enumera los genes expresados en células madre hepáticas humanas inducidas (NGC1-2) que se obtuvieron de tejidos no cancerosos de un paciente con cáncer de estómago y que se indujeron en el Ejemplo 4. Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos no cancerosos de un paciente con cáncer de estómago: NGC1-2

5

El número de sondas expresadas características de los hepatocitos fue 131.

[Tabla 9]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P116898	A2M	NM_000014	A_23_P1059223	DIO3	NM_001362	A_23_P213171	MTTP	NM_000253
A_23_P252981	ACE2	NM_021804	A_24_P236251	CLK1	NM_003836	A_23_P102384	NGEF	NM_019850
A_24_P945113	ACVRL1	NM_000020	A_23_P139704	DUSP6	NM_001946	A_23_P389897	NGFR	NM_002507
A_32_P196283	ADAMTS9	NM_182920	A_23_P139687	ERP27	NM_152321	A_23_P380797	NTF3	NM_002527
A_23_P408341	AFAP1L2	NM_001001938	A_23_P205177	F10	NM_000504	A_24_P220485	OLFML2A	NM_182487
A_23_P58205	AFP	NM_001134	A_23_P94879	F2	NM_000506	A_32_P61684	PAG1	NM_018440
A_23_P115261	AGT	NM_000029	A_23_P79562	FABP1	NM_001443	A_23_P347070	PAG1	NM_018440
A_23_P155514	AHSG	NM_001822	A_23_P375372	FGA	NM_021871	A_23_P52121	PDZK1	NM_002614
A_23_P155509	AHSG	NM_001622	A_23_P44274	FGA	NM_000508	A_32_P206123	PLG	NM_000301
A_24_P372189	AK027294	AK027294	A_23_P136125	FGB	NM_005141	A_23_P30893	PLG	NM_000301
A_32_P56661	AK074614	AK074614	A_23_P148088	FGG	NM_000509	A_23_P160286	PRG4	NM_005807
A_32_P23525	AK124281	AK124281	A_23_P166109	FLRT3	NM_198391	A_23_P146554	PTGDS	NM_000954
A_24_P706716	AK126405	AK126405	A_23_P114883	FMOD	NM_002023	A_23_P167030	PTHR1	NM_000316
A_23_P257834	ALB	NM_000477	A_23_P37127	FOXA1	NM_004496	A_23_P118392	RASD1	NM_016084
A_23_P83098	ALDH1A1	NM_000889	A_24_P347431	FOXA1	NM_004496	A_23_P75283	RBP4	NM_006744
A_32_P105549	ANXA8	NM_001830	A_23_P91552	FTCD	NM_06965	A_23_P3934	RNF43	NM_017763
A_23_P337262	APCDD1	NM_153000	A_23_P384761	GATA4	NM_002052	A_23_P88849	RRAD	NM_004165
A_23_P203191	APOA1	NM_000039	A_23_P129064	GATM	NM_001482	A_24_P262127	RRAD	NM_004165
A_24_P302249	APOA2	NM_001643	A_23_P250444	GJB1	NM_000166	A_23_P124619	S100A14	NM_020672
A_23_P87036	APOA4	NM_000482	A_32_P19294	GLT1D1	NM_144669	A_23_P121926	SEPP1	NM_005410
A_23_P79591	APOB	NM_000384	A_32_P109029	GPRC5C	NM_022038	A_24_P145629	SERINC2	NM_178885
A_23_P259071	AREG	NM_001657	A_23_P253495	GSTA3	NM_000847	A_23_P218111	SERPINA1	NM_001002236

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P116902	ART4	NM_021071	A_23_P69573	GUCY1A3	NM_000856	A_23_P205355	SERPINA5	NM_000624
A_23_P130113	ASGR2	NM_080912	A_24_P52697	H19	NR_002196	A_23_P66739	SLC13A5	NM_177550
A_23_P118894	ATAD4	NM_024320	A_23_P47034	HHEX	NM_002729	A_23_P102391	SLC40A1	NM_014585
A_24_P753592	BC018589	BC018589	A_23_P103588	HMGCS2	NM_005518	A_23_P91230	SLPI	NM_003064
A_23_P143331	BMP2	NM_001200	A_23_P209760	HP	NM_005143	A_32_P133072	SPON1	NM_006108
A_32_P42224	BX097190	BX097190	A_23_P161998	HPX	NM_00613	A_23_P36345	STARD10	NM_006645
A_23_P75790	C11orf9	NM_013279	A_23_P118065	HSD17B2	NM_002153	A_23_P399265	STMN2	S82024
A_23_P204937	C13orf15	NM_014059	A_23_P395438	HTRA3	NM_053044	A_23_P80974	TDO2	NM_005651
A_24_P10137	C13orf15	NM_014059	A_23_P10542	HTRA3	NM_053044	A_23_P212500	TF	NM_001063
A_23_P88678	C15orf27	NM_152335	A_23_P150609	IGF2	NM_001007139	A_23_P212508	TF	NM_001063
A_23_P101407	C3	NM_000064	A_23_P15146	IL32	NM_001012631	A_23_P101013	TMC6	NM_007267
A_23_P71855	C5	NM_001735	A_23_P153964	INHBB	NM_002193	A_23_P409093	TMEM16D	NM_178826
A_32_P213103	CA414006	C414006	A_32_P217140	ISX	NM_001008494	A_32_P7015	TSPAN15	NM_012339
A_23_P151895	CILP	NM_003613	A_23_P501193	KCNJ16	NM_170741	A_23_P130333	TTR	NM_000371
A_23_P217379	COL4A6	NM_033641	A_23_P56898	KYNU	NM_003937	A_23_P81898	UBD	NM_006398
A_23_P120125	COLEC11	NM_199235	A_23_P201636	LAMC2	NM_005562	A_23_P212968	UGT2B11	NM_001073
A_24_P388322	COLEC11	NM_199235	A_23_P120902	LGALS2	NM_008498	A_23_P136671	UGT2B7	NM_001074
A_23_P213745	CXCL14	NM_006887	A_23_P32165	LHX2	NM_004789	A_23_P214408	UNC93A	NM_018974
A_23_P102000	CXCR4	NM_001008540	A_24_P178834	LOC132205	AK091178	A_23_P16866	VIL1	NM_007127
A_23_P131676	CXCR7	NM_020311	A_24_P463929	LOC285733	AK091900	A_23_P78099	VTN	NM_000638
A_23_P32577	DACH1	NM_080759	A_24_PB845223	M27126	M27126	A_23_P108817	WFDC1	NM_021197
A_23_P257583	DENND2A	NM_015689	A_2_P184057	MFAP4	NM_002404			

La Tabla 10 siguiente enumera los genes expresados en células madre hepáticas humanas inducidas (NFB1-3) que se obtuvieron de tejidos cutáneos neonatales y que se indujeron en el Ejemplo 2. Células madre hepáticas humanas derivadas de tejidos cutáneos neonatales: NFB1-3

5 El número de sondas expresadas características de los hepatocitos fue 96.

[Tabla 10]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P116898	A2M	NM_000014	A_23_P69573	GUCY1A3	NM_000856
A_23_P252981	ACE2	NM_021804	A_24_P52697	H19	NR_002196
A_24_P945113	ACVRL1	NM_000020	A_23_P206760	HP	NM_005143
A_32_P196263	ADAMTS9	NM_182920	A_23_P395438	HTRA3	NM_053044
A_23_P406341	AFAP1L2	NM_001001936	A_23_P150609	IGF2	NM_001007139
A_23_P58205	AFP	NM_001134	A_23_P15146	IL32	NM_001012631
A_23_P155509	AHSG	NM_001622	A_23_P501193	KCNJ16	NM_170741

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P83098	ALDH1A1	NM_000689	A_23_P56898	KYNU	NM_003937
A_32_P105549	ANXA8	NM_001630	A_23_P201636	LAMC2	NM_005562
A_23_P337262	APCDD1	NM_153000	A_23_P120902	LGALS2	NM_006498
A_23_P203191	APOA1	NM_000039	A_23_P32165	LHX2	NM_004789
A_24_P302249	APOA2	NM_001643	A_24_P178834	LOC132205	AK091178
A_23_P87036	APOA4	NM_000482	A_23_P164057	MFAP4	NM_002404
A_23_P116902	ART4	NM_021071	A_23_P13094	MMP10	NM_002425
A_23_P130113	ASGR2	NM_080912	A_23_P213171	MTTP	NM_000253
A_24_P753592	BC018589	BC018589	A_23_P102364	NGEF	NM_019850
A_23_P143331	BMP2	NM_001200	A_23_P389897	NGFR	NM_002507
A_32_P42224	BX097190	BX097190	A_24_P252364	NRCAM	NM_005010
A_23_P75790	C11orf9	NM_013279	A_23_P360797	NTF3	NM_002527
A_23_P204937	C13orf15	NM_014059	A_24_P220485	OLFML2A	NM_182487
A_24_P10137	C13orf15	MM_014059	A_32_P61684	PAG1	NM_018440
A_32_P213103	CA414006	CA414006	A_23_P347070	PAG1	NM_018440
A_23_P76654	CDX2	NM_001265	A_23_P52121	PDZK1	NM_002614
A_23_P217379	COL4A6	NM_033641	A_23_P388150	PLA2G12B	NM_032562
A_23_P120125	COLEC11	NM_199235	A_23_P146554	PTGDS	NM_000954
A_23_P213745	CXCL14	NM_004887	A_23_P167030	PTHR1	NM_000316
A_23_P102000	CXCR4	NM_001008540	A_23_P118392	RASD1	NM_016084
A_23_P131676	CXCR7	NM_020311	A_23_P75283	RBP4	NM_006744
A_23_P32577	DACH1	NM_080759	A_23_P3934	RNF43	NM_017763
A_23_P257583	DENND2A	NM_015689	A_23_P88849	RRAD	NM_004165
A_23_P105923	DIO3	NM_001362	A_23_P124619	S100A14	NM_020672
A_24_P236251	DLK1	NM_003836	A_23_P121926	SEPP1	NM_005410
A_23_P139704	DUSP6	NM_001946	A_24_P321766	SERPINA5	NM_000624
A_23_P205177	F10	NM_000504	A_23_P205355	SERPINA5	NM_000624
A_23_P94879	F2	NM_000506	A_23_P102391	SLC40A1	NM_014585
A_23_P79562	FABP1	NM_001443	A_23_P91230	SLPI	NM_003064
A_23_P136125	FGB	NM_005141	A_32_P133072	SPON1	NM_006108

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P148088	FGG	NM_000509	A_23_P354705	ST8SIA1	NM_003034
A_23_P166109	FLRT3	NM_198391	A_23_P36345	STARD10	NM_006645
A_23_P114883	FMOD	NM_002023	A_23_P399265	STMN2	S82024
A_24_P347431	FOXA1	NM_004496	A_23_P212500	TF	NM_001063
A_23_P384761	GATA4	NM_002052	A_23_P101013	TMC6	NM_007267
A_23_P129064	GATM	NM_001482	A_23_P409093	TMEM16D	NM_178826
A_23_P52227	GDF10	NM_004962	A_32_P7015	TSPAN15	NM_012339
A_23_P250444	GJB1	NM_000166	A_23_P130333	TTR	NM_000371
A_32_P19294	GLT1D1	NM_144669	A_23_P212968	UGT2B11	NM_001073
A_32_P109029	GPRC5C	NM_022036	A_23_P16866	VIL1	NM_007127
A_23_P253495	GSTA3	NM_000847	A_23_P78099	VTN	NM_000638

La Tabla 11 siguiente enumera los genes expresados en células madre hepáticas humanas inducidas (CC1-4) que se obtuvieron de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de colon y que se indujeron en el Ejemplo 5.

Células madre hepáticas humanas inducidas derivadas de tejidos cancerosos de un paciente con cáncer de colon: CC1-4

5

El número de sondas expresadas características de los hepatocitos fue 92.

[Tabla 11]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P116898	A2M	NM_000014	A_24_P52697	H19	NR_002196
A_23_P252981	ACE2	NM_021804	A_23_P47034	HHEX	NM_002729
A_24_P945113	ACVRL1	NM_000020	A_23_P206760	HP	NM_005143
A_32_P196263	ADAMTS9	NM_182920	A_23_P421493	HPR	NM_020995
A_23_P406341	AFAP1L2	NM_001001936	A_23_P161998	HPX	NM_000613
A_23_P58205	AFP	NM_001134	A_23_P395438	HTRA3	NM_053044
A_23_P115261	AGT	NM_000029	A_23_P150609	IGF2	NM_001007139
A_23_P155514	AHSG	NM_001622	A_23_P15146	IL32	NM_001012631
A_23_P155509	AHSG	NM_001622	A_23_P153964	INHBB	NM_002193
A_24_P766716	AK126405	AK126405	A_23_P501193	KCNJ16	NM_170741
A_23_P257834	ALB	NM_000477	A_23_P56898	KYNU	NM_003937
A_23_P83098	ALDH1A1	NM_000689	A_23_P201636	LAMC2	NM_005562
A_32_P105549	ANXA8	NM_001630	A_23_P120902	LGALS2	NM_006498
A_23_P337262	APCDD1	NM_153000	A_24_P178834	LOC132205	AK091178

ES 2 667 058 T3

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_23_P203191	APOA1	NM_000039	A_24_P845223	M27126	M27126
A_24_P302249	APOA2	NM_001643	A_23_P164057	MFAP4	NM_002404
A_23_P87036	APOA4	NM_000482	A_23_P213171	MTTP	NM_000253
A_24_P753592	BC018589	BC018589	A_23_P102364	NGEF	NM_019850
A_23_P143331	BMP2	NM_001200	A_23_P360797	NTF3	NM_002527
A_23_P75790	C11orf9	NM_013279	A_24_P220485	OLFML2A	NM_182487
A_23_P88678	C15orf27	NM_152335	A_23_P347070	PAG1	NM_018440
A_23_P101407	C3	NM_000064	A_23_P52121	PDZK1	NM_002614
A_23_P71855	C5	NM_001735	A_23_P146554	PTGDS	NM_000954
A_23_P33723	CD163	NM_004244	A_23_P167030	PTHR1	NM_000316
A_23_P217379	COL4A6	NM_033641	A_23_P118392	RASD1	NM_016084
A_23_P120125	COLEC11	NM_199235	A_23_P75283	RBP4	NM_006744
A_23_P213745	CXCL14	NM_004887	A_23_P3934	RNF43	NM_017763
A_23_P102000	CXCR4	NM_001008540	A_23_P88849	RRAD	NM_004165
A_23_P131676	CXCR7	NM_020311	A_23_P124619	S100A14	NM_020672
A_23_P257583	DENND2A	NM_015689	A_23_P121926	SEPP1	NM_005410
A_23_P105923	DIO3	NM_001362	A_24_P145629	SERINC2	NM_178865
A_24_P236251	DLK1	NM_003836	A_23_P218111	SERPINA1	NM_001002236
A_23_P139704	DUSP6	NM_001946	A_23_P205355	SERPINA5	NM_000624
A_23_P205177	F10	NM_000504	A_23_P102391	SLC40A1	NM_014585
A_23_P94879	F2	NM_000506	A_24_P242581	SLC5A9	NM_001011547
A_23_P79562	FABP1	NM_001443	A_32_P133072	SPON1	NM_006108
A_23_P166109	FLRT3	NM_198391	A_23_P36345	STARD10	NM_006645
A_23_P114883	FMOD	NM_002023	A_23_P399265	STMN2	S82024
A_23_P37127	FOXA1	NM_004496	A_23_P212500	TF	NM_001063
A_24_P347431	FOXA1	NM_004496	A_23_P212508	TF	NM_001063
A_23_P91552	FTCD	NM_206965	A_23_P101013	TMC6	NM_007267
A_23_P384761	GATA4	NM_002052	A_23_P130333	TTR	NM_000371
A_23_P129064	GATM	NM_001482	A_23_P214408	UNC93A	NM_018974
A_32_P19294	GLT1D1	NM_144669	A_24_P103434	UNC93A	NM_018974

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_32_P109029	GPRC5C	NM_022036	A_23_P16866	VIL1	NM_007127
A_23_P69573	GUCY1A3	NM_000856	A_23_P78099	VTN	NM_000638

2. Genes expresados característicamente en células madre embrionarias humanas

5 Las 31 sondas expresadas (23 genes: Tabla 12) del Whole Human Genome Oligo DNA Microarray (4X44K) elaboradas mediante Agilent Technologies, que se expresaron de manera característica en células madre embrionarias humanas, se expresaron en las células madre hepáticas humanas inducidas de Ejemplos 2-6 en cantidades casi comparables (1/4-4 veces) a las expresadas en células madre embrionarias humanas. Los nombres de las sondas, Símbolos del Gen y Números de Acceso de GenBank para los genes de las células madre embrionarias humanas se enumeran a continuación.

10

[Tabla 12]

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_24_P231132	ACVR2B	NM_001106
A_23_P109950	ACVR2B	NM_001106
A_32_P134209	ACVR2B	NM_001106
A_23_P85250	CD24	L33930
A_23_P206359	CDH1	NM_004360
A_23_P138655	CYP26A1	NM_057157
A_23_P28953	DNMT3B	NM_175850
A_23_P380526	DPPA4	NM_018189
A_23_P2831	EDNRB	NM_003991
A_24_P42755	FLT1	NM_002019
A_23_P14821	GABRB3	NM_000814
A_23_P10966	GABRB3	NM_000814
A_23_P304450	GATA6	NM_005257
A_23_P72817	GDF3	NM_020634
A_23_P163992	GRB7	NM_005310
A_23_P74895	UN28	NM_024674
A_23_P204640	NANOG	NM_024865
A_23_P127322	NODAL	NM_018055
A_23_P215060	PODXL	NM_005397
A_24_P144601	POU5F1	NM_002701
A_23_P59138	POU5F1	NM_002701

Nombre de la Sonda	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A_32_P132563	POU5F1	NM_002701
A_24_P214841	POU5F1	NM_002701
A_23_P109072	SALL4	NM_020436
A_23_P401055	SOX2	NM_003106
A_24_P379969	SOX2	NM_003106
A_32_P135985	TDGF1	NM_003212
A_23_P366376	TDGF1	NM_003212
A_23_P110851	TERT	NM_198253
A_23_P395582	ZFP42	NM_174900
A_23_P327910	ZIC3	NM_003413

Los resultados anteriores verifican experimentalmente que las células madre hepáticas humanas inducidas no solo dieron lugar a la expresión de genes marcadores de hepatocitos que es una propiedad de los hepatocitos, sino que también expresaron genes característicos de las células madre embrionarias en cantidades comparables a las células madre embrionarias humanas.

Un análisis adicional de los resultados de micromatrices mostró que la célula madre hepática inducida de la presente invención tiene propiedades características de células madre mesodérmicas y células madre endodérmicas. Más específicamente, la célula madre hepática inducida expresó el gen SOX17, el gen FOXA2, el gen GSC, el gen EOMES y el gen TCF2, que son genes expresados de forma característica en células madre mesodérmicas y células madre endodérmicas. Entre las células madre hepáticas humanas inducidas (NFB1-3, GC1-2, NGC1-2, AFB1-1 y CC1-4) preparadas en los Ejemplos 2-6, dos células (NFB1-3 y CC1-4) que albergaban y por lo tanto, expresaron cantidades relativamente pequeñas de genes característicos de los hepatocitos expresaron el gen SOX17, el gen FOXA2, el gen GSC, el gen EOMES y el gen TCF2 en mayores cantidades que otras células madre hepáticas humanas inducidas (GC1-2, NGC1-2, y AFB1-1).

Como se describió anteriormente, se confirmó que las células madre hepáticas humanas inducidas (NGC1-2) preparadas a partir de tejidos no cancerígenos derivados del paciente con cáncer de estómago y células madre hepáticas humanas inducidas (AFB1-1) preparadas a partir de tejidos cutáneos adultos no solo expresaban alfa-fetoproteína (AFP), transtiretina (TTR), albúmina (ALB) y alfa 1-antitripsina (AAT) que son genes marcadores de hepatocitos, sino también expresaron el gen POU5F1, el gen SOX2, el gen NANOG y el gen ZFP42 que son genes característicos de las células madre embrionarias en cantidades comparables a las células madre embrionarias humanas. Cabe señalar que AAT a veces se designa como SERPINA1, transtiretina como prealbúmina y ZFP42 como REX1.

Ejemplo 9

9. Detección cuantitativa de marcadores de hepatocitos y marcadores de células madre embrionarias mediante tinción inmunofluorescente

Las células madre hepáticas humanas inducidas (NGC1-2) preparadas a partir de tejidos no cancerosos derivados de pacientes con cáncer de estómago inducidos en el Ejemplo 4, y células madre hepáticas humanas inducidas (AFB1-1) preparadas a partir de tejidos cutáneos adultos inducidos en el Ejemplo 6, se sembraron en el Lab-Tek (marca registrada) Chamber Slide (marca registrada) System (Nunc; Núm. Cat. 177429). Al día siguiente, después de retirar el medio de las células cultivadas y lavar las células dos veces con PBS (-), se añadió una solución de formaldehído al 10% y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, después de eliminar la solución de formaldehído al 10% y lavar tres veces con PBS (-), se añadió una solución de Triton-X100 al 0,1% (ICN Biomedical), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, después de eliminar la solución de Triton-X100 al 0,1% y lavar tres veces con PBS (-), se añadió una solución de bloqueo (en TBS, pH 7,2) (Nacalai Tesque; Núm. Cat. 05151-35) y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. La reacción con un anticuerpo primario diluido 1:50 se realizó a 4°C durante

la noche o a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, después de lavar dos veces con PBS (-), se realizó la reacción con un anticuerpo secundario diluido 1:500 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados son los que se describen a continuación.

5 <Anticuerpos primarios>

Anticuerpo de cabra anti-NANOG humano (R&D Systems; Núm. de Lote KKJ03), anticuerpo de ratón anti-SSEA-4 humano (Millipore; Núm. de Lote LV1488380), anticuerpo de ratón anti-CD9 humano (R&D Systems; Núm. de Lote JOK04), anticuerpo de conejo anti- α -1-fetoproteína humana (Dako; Núm. de Lote A0008), anticuerpo de ratón anti-albúmina humana (Sigma-Aldrich; Núm. de Lote A6684).

15 <Anticuerpos secundarios>

Anticuerpo de burro anti-IgG de cabra marcado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen; Núm. Cat. A11058), anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen; Núm. Cat. A11001), anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen; Núm. Cat. A11005), anticuerpo de burro anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen; Núm. Cat. A21206)

Después de la tinción, se realizó la observación bajo un microscopio fluorescente, y como resultado, se encontró que las células madre hepáticas humanas inducidas preparadas a partir de tejidos no cancerosos derivados del paciente con cáncer de estómago y las células madre hepáticas humanas inducidas preparadas a partir de tejidos cutáneos adultos exhibieron una propiedad de los hepatocitos, concretamente la producción de proteínas alfa-fetoproteína (AFP) y albúmina (ALB), y expresaron glicolípidos, NANOG, SSEA-4 y CD9 que son característicos de las células madre embrionarias (no mostradas).

25 Ejemplo 10

10. Co-expresión del gen CD81, el gen SCARB1, el gen OCLN y el gen CLDN1

30 El gen CD81, el gen SCARB1, el gen OCLN y el gen CLDN1 que son genes importantes para la replicación del virus de la hepatitis C (VHC) se analizaron utilizando Whole Human Genome Oligo DNA Microarray (4X44K) fabricado por Agilent Technologies. El soporte lógico de análisis utilizado fue GeneSpring GX 10.0 (Agilent Technologies, Inc.) y la normalización se realizó utilizando el método del percentil 50. El procedimiento de prueba fue el mismo que en el Ejemplo 8.

35 <Resultados del análisis cuantitativo para genes>

Los datos de micromatrices para tres células madre embrionarias humanas (es decir, hES_H9 (GSM194390), hES_BG03 (GSM194391) y hES_ES01 (GSM194392)) y células madre pluripotentes inducidas (es decir, células iPS 201B7 (GSM241846)) que se utilizaron se descargaron de GEO.

45 Se confirmó y se verificó experimentalmente que las células madre hepáticas humanas inducidas co-expresaron el gen CD81, el gen SCARB1, el gen OCLN y el gen CLDN1, que son genes importantes para la replicación del virus de la hepatitis C (VHC). Por consiguiente, se sugirió que se puede llevar a cabo una prueba para evaluar la eficacia de un compuesto candidato a fármaco antiviral infectando la célula madre hepática inducida de la presente invención con virus de hepatitis C y replicando la célula infectada en presencia del compuesto añadido. La misma aplicación también se sugirió para células madre embrionarias humanas y células madre pluripotentes humanas inducidas.

50 En la inducción de la célula madre hepática inducida de la presente invención, es necesario llevar la célula de mamífero a un estado tal que los productos génicos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida estarán presentes para garantizar que la abundancia relativa intracelular del producto génico del gen POU5F1 sea mayor que la del producto génico del gen SOX2. En la presente invención, las abundancias relativas intracelulares de los productos genéticos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 satisfacen preferiblemente la relación del gen POU5F1 > gen KLF4 > gen SOX2, y desde el punto de vista de la inducción de alta eficacia para la célula madre hepática inducida, las abundancias relativas intracelulares de los productos génicos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 adoptan lo más preferiblemente los valores de 4, 2 y 1 en ese orden.

60 Además, en la presente invención, por ejemplo, el gen NANOG, el gen POU5F1, el gen SOX2, el gen ZFP42, el gen SALL4, el gen LIN28 y el gen TERT que se expresan característicamente en células madre embrionarias sirven como "genes autoreplicantes" que permiten que las células en varios organismos se auto-repliquen *ex vivo*

En la inducción de la célula madre hepática inducida de la presente invención, las abundancias relativas intracelulares de los productos génicos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 se consideraron uno de los

factores importantes para determinar el curso final de la diferenciación, y en la preparación de la célula madre pluripotente, se encontró que las abundancias relativas intracelulares de los productos genéticos del gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 adoptaron valores de 1, 1 y 1 en ese orden, y que la célula madre pluripotente no se diferenciaba.

5

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, es posible preparar células madre hepáticas humanas inducidas a partir de donantes de diferentes razas, sexos, edades o antecedentes genéticos (tales como polimorfismos) y, por lo tanto, evaluar y predecir la eficacia, seguridad, toxicidad e interacción con fármacos de un fármaco candidato en una prueba no clínica antes de evaluar estas características del fármaco candidato administrado a varios pacientes en una prueba clínica. De acuerdo con esto, la célula madre hepática humana inducida de la presente invención es muy útil desde el punto de vista industrial porque sirve como una herramienta para el descubrimiento de fármacos que contribuye a una eficacia mejorada en el desarrollo de fármacos y una carga reducida para los pacientes.

15

La célula madre hepática inducida de la presente invención es muy útil en la búsqueda y análisis de moléculas que controlan la formación y funciones del hígado: por ejemplo, descubrimiento de fármacos para la fibrosis hepática, cirrosis, hígado graso, hepatitis, síndrome metabólico, hematopoyesis y similares; análisis del metabolismo y mecanismo de acción de varios productos farmacéuticos y compuestos; preparación de vacunas y aplicación a biorreactores.

20

REIVINDICACIONES

1. Una célula madre hepática inducida obtenida mediante un procedimiento que comprende una etapa de inducir una célula de mamífero a una célula madre hepática inducida,
 5 en donde la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una célula derivada de un adulto, una célula derivada de neonato, una célula derivada de la piel y una célula de un individuo canceroso,
 en donde dicha etapa de inducción comprende introducir un gen POU5F1, un gen KLF4 y un gen SOX2 en la célula de mamífero con la ayuda de vectores de expresión para llevar la célula de mamífero a un estado tal que los
 10 productos génicos del gen POU5F1, el gen KLF4, y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida estarán presentes para asegurar que la abundancia relativa intracelular del producto del gen POU5F1 sea mayor que la del producto génico del gen SOX2,
 en donde la razón de uso entre el gen POU5F1, el gen KLF4 y el gen SOX2 que son necesarios para la inducción a la célula madre hepática inducida es 4:2:1 en ese orden, y
 15 en donde la célula madre hepática inducida está **caracterizada porque** satisface al menos los siguientes requisitos (1) - (3):

(1) expresa al menos 15 genes seleccionados del grupo de los genes enumerados en la siguiente Tabla 1 que son genes marcadores para una célula madre embrionaria;

[Tabla 1]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank
ACVR2B	NM_001106
CD24	L33930
CDH1	NM_004360
CYP26A1	NM_057157
DNMT3B	NM_175850
DPPA4	NM_018189
EDNRB	NM_003991
FLT1	NM_002019
GABRB3	NM_000814
GATA6	NM_005257
GDF3	NM_020634
GRB7	NM_005310
UN28	NM_024674
NANOG	NM_024865
NODAL	NM_018055
PODXL	NM_005397
POU5F1	NM_002701
SALL4	NM_020436
SOX2	NM_003106
TDGF1	NM_003212

ES 2 667 058 T3

Símbolo del Gen	Acceso Genbank
TERT	NM_198253
ZFP42	NM_174900
ZIC3	NM_003413

(2) tiene propiedades de un hepatocito en donde al menos 15 genes seleccionados del grupo de genes de la Tabla 2 siguiente se expresan como genes asociados a las propiedades de un hepatocito;

[Tabla 2]

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
A2M	NM_000014	ERP27	NM_152321	NRCAM	NM_005010
ACE2	NM_021804	EVA1	NM_144765	NTF3	NM_002527
ACVRL1	NM_000020	F10	NM_000504	OLFML2A	NM_182487
ADAMTS9	NM_182920	F2	NM_000506	PAG1	NM_018440
AFAP1L2	NM_001001936	FABP1	NM_001443	PCSK6	NM_002570
AFP	NM_001134	FGA	NM_021871	PDK4	NM_002612
AGT	NM_000029	FGA	NM_000508	PDZK1	NM_002614
AHSG	NM_001622	FGB	NM_005141	PLA2G12B	NM_032562
AK027294	AK027294	FGG	NM_000509	PLG	NM_000301
AK074614	AK074614	FLRT3	NM_198391	PRG4	NM_005807
AK124281	AK124281	FMOD	NM_002023	PSMAL	NM_153696
AK126405	AK126405	FOXA1	NM_004496	PTGDS	NM_000954
ALB	NM_000477	FTCD	NM_206965	PTHR1	NM_000316
ALDH1A1	NM_000689	GATE4	NM_002052	RASD1	NM_016084
ANXA8	NM_001630	GATM	NM_001482	RBP4	NM_006744
APCDD1	NM_153000	GDF10	NM_004962	RNF43	NM_017763
APOA1	NM_000039	GJB1	NM_000166	RRAD	NM_004165
APOA2	NM_001643	GLT1D1	NM_144669	S100A14	NM_020672
APOA4	NM_000482	GPRC5C	NM_022036	SEPP1	NM_005410
APOB	NM_000384	GSTA3	NM_000847	SERPINC2	NM_178865
AREG	NM_001657	GUCY1A3	NM_000856	SERPINA1	NM_001002236
ART4	NM_021071	H19	NR_002196	SERPINA3	NM_001085
ASGR2	NM_080912	HHEX	NM_002729	SERPINA5	NM_000624

ES 2 667 058 T3

Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank	Símbolo del Gen	Acceso Genbank
ATAD4	NM_024320	HKDC1	NM_025130	SH3TC1	NM_018986
BC018589	BC018589	HMGCS2	NM_005518	SLC13A5	NM_177550
BMP2	NM_001200	HP	NM_005143	SLC40A1	NM_014585
BX097190	BX097190	HPR	NM_020995	SLC5A9	NM_001011547
C11orf9	NM_013279	HPX	NM_000613	SLCO2B1	NM_007256
C13orf15	NM_014059	HSD17B2	NM_002153	SLPI	NM_003064
C15orf27	NM_152335	HTRA3	NM_053044	SPARCL1	NM_004684
C3	NM_000064	IGF2	NM_001007139	SPON1	NM_006108
C5	NM_001735	IL32	NM_001012631	ST8SIA1	NM_003034
CA414006	CA414006	INHBB	NM_002193	STARD10	NM_006645
CD163	NM_004244	ISX	NM_001008494	STMN2	S82024
CD1D	NM_001766	KCNJ16	NM_170741	TD02	NM_005651
CDX2	NM_001265	KYNU	NM_003937	TF	NM_001063
CILP	NM_003613	LAMC2	NM_005562	TMC6	NM_007267
CMKLR1	NM_004072	LGALS2	NM_006498	TMEM16D	NM_178826
COL4A6	NM_033641	LHX2	NM_004789	TSPAN15	NM_012339
COLEC11	NM_199235	LOC132205	AK091178	TTR	NM_000371
CXCL14	NM_004887	LOC285733	AK091900	UBD	NM_006398
CXCR4	NM_001008540	M27126	M27126	UGT2B11	NM_001073
CXCR7	NM_020311	MAF	AF055376	UGT2B7	NM_001074
DACH1	NM_080759	MFAP4	NM_002404	UNC93A	NM_018974
DENND2A	NM_015689	MMP10	NM_002425	VCAM1	NM_001078
DIO3	NM_001362	MTTP	NM_000253	VIL1	NM_007127
DLK1	NM_003836	NGEF	NM_019850	VTN	NM_000638
DUSP6	NM_001946	NGFR	NM_002507	WFDC1	NM_021197

(3) puede ser sometido a un cultivo de expansión o cultivo de pases durante al menos 3 días.

5 2. La célula madre hepática inducida mencionada en la reivindicación 1, en donde los genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior se expresan en la célula madre hepática inducida en cantidades que varían de 1/8-8 veces las cantidades de los genes que son expresado en la célula madre embrionaria.

10 3. La célula madre hepática inducida mencionada en la reivindicación 2, en donde los genes marcadores de una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior se expresan en la célula madre hepática inducida en cantidades que varían de 1/4 a 4 veces las cantidades de los genes que son expresado en la célula madre embrionaria.

4. La célula madre hepática inducida mencionada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el gen NANOG, el gen POU5F1, el gen SOX2, el gen ZFP42 y el gen SALL4 son expresados como genes marcadores para una célula madre embrionaria del apartado (1) anterior.
- 5 5. La célula madre hepática inducida mencionada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el gen AFP, el gen TTR, el gen TF, el gen APOA2, el gen APOA4, el gen AHSG, el gen FGA, el gen AGT, el gen FABP1, el gen SERPINA1 y gen RBP4 son expresados como genes asociados a las propiedades de un hepatocito del apartado (2) anterior.
- 10 6. La célula madre hepática inducida mencionada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el gen APOA1, el gen APOA2, el gen APOA4, el gen APOB, el gen FABP1 y el gen AGT son expresados como genes asociados a las propiedades de un hepatocito del apartado (2) anterior.
- 15 7. La célula madre hepática inducida mencionada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que expresa adicionalmente al menos un gen seleccionado entre el gen SOX17, el gen FOXA2, el gen GSC, el gen EOMES y el gen TCF2 que son característicos de células madre mesendodérmicas y/o células madre endodérmicas.
- 20 8. La célula madre hepática inducida mencionada en la reivindicación 1, en donde la célula de mamífero es una célula humana.
- 25 9. Un método in vitro que utiliza la célula madre hepática inducida mencionada en la reivindicación 1, que se selecciona entre un método de prueba de seguridad, un método de prueba de toxicidad, un método de prueba de metabolismo, un método de prueba de interacción con fármacos, un método de prueba de actividad antiviral y un método de prueba de detección para productos farmacéuticos.
10. La célula madre hepática inducida mencionada en la reivindicación 1 para su uso en un método terapéutico de tratamiento de un mamífero, en donde la célula madre hepática inducida debe trasplantarse al hígado del mamífero.