

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 554**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2009 E 15177122 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2955222**

54 Título: **Enfoques químicos y genéticos combinados para la generación de células madre pluripotentes inducidas**

30 Prioridad:

**17.03.2008 US 69956 P**  
**31.10.2008 US 197986 P**

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

**21.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHI, YAN;**  
**DESPONTS, CAROLINE;**  
**DING, SHENG;**  
**ZHOU, HONGYAN;**  
**LIN, TONGXIANG;**  
**LI, WENLIN y**  
**ZHU, SAIYONG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 690 554 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**

Enfoques químicos y genéticos combinados para la generación de células madre pluripotentes inducidas

**Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de las solicitudes de patente provisional de los Estados Unidos n.º 61/069,956, presentada el 17 de marzo de 2008 y 61/197,986, presentada el 31 de octubre de 2008.

**Antecedentes de la invención**

10 Las células madre a menudo se clasifican como totipotentes o pluripotentes. Una célula madre totipotente tiene un potencial de diferenciación que es total: da lugar a todos los diferentes tipos de células en el cuerpo. Un óvulo fertilizado es un ejemplo de una célula madre totipotente. Las células madre pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo de célula en el cuerpo derivado de las tres capas principales de células germinales o un embrión en sí mismo.

15 Las células madre pluripotentes, como las células madre embrionarias (ESC), proliferan rápidamente al tiempo que mantienen la pluripotencia, es decir, la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células. Las células madre embrionarias son fuentes prometedoras de donantes para terapias de trasplante celular. Sin embargo, las ESC humanas también están asociadas con problemas éticos relacionados con el uso de embriones humanos y reacciones de rechazo después de un trasplante alogénico. Puede ser posible superar estos problemas mediante la generación de células madre pluripotentes directamente de las células somáticas de un paciente. El hecho de que los núcleos de células somáticas adquieran un estado embrionario similar a una célula madre embrionaria mediante fusión con ESC sugiere la existencia de factores "inductores de pluripotencia". Estudios previos han demostrado recientemente que la transfección mediada por retrovirus con cuatro factores de transcripción (Oct-3/4, Sox2, KLF4 y c-Myc), que están altamente expresados en ESC, en fibroblastos de ratón ha resultado en la generación de tallo células madre pluripotentes inducidas (iPS). Véase, Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676 (2006); Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 448, 313-317 (2007); Wernig, M. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature 448, 318-324 (2007); Maherali, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell 1, 55-70 (2007); Meissner, A., Wernig, M. & Jaenisch, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Nature Biotechnol. 25, 1177-1181 (2007); Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861-872 (2007); Yu, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318, 1917-1920 (2007); Nakagawa, M. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts Nature Biotechnol. 26, 101-106 (2007); Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. & Jaenisch, R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell 2, 10-12 (2008). Las células iPS son similares a las ESC en cuanto a morfología, proliferación y pluripotencia, a juzgar por la formación del teratoma y la contribución de la quimera.

35 Un avance reciente en el uso de la manipulación genética definida, es decir, la transducción viral de pocos genes altamente expresados y/o específicamente expresados en células madre embrionarias (ES) humanas o de ratón, en la reprogramación de células somáticas humanas y de ratón a células madre pluripotentes inducidas (iPS) ha abierto enormes oportunidades para generar células madre específicas para el paciente para diversas aplicaciones (p. ej., terapia basada en células o descubrimiento de fármacos) sin las controversias asociadas con las células ES humanas convencionales, así como para estudiar el proceso de reversión epigenética. La aplicación clínica definitiva de un enfoque de células iPS requeriría en gran medida métodos de diferenciación dirigida de células PS humanas para generar poblaciones homogéneas de tipos celulares específicos de linaje, así como para eliminar los riesgos asociados con los inconvenientes actuales de las células iPS de manipulación genética y baja eficiencia/cinética lenta. Estudios recientes han demostrado que uno de los cuatro genes previamente requeridos, cMyc, es prescindible para la sobreexpresión en la generación de células iPS. Véase, Nakagawa, M. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts Nature Biotechnol. 26, 101-106 (2007); Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. & Jaenisch, R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell 2, 10-12 (2008). Sin embargo, la eficiencia de la reprogramación se redujo sustancialmente con una cinética de reprogramación también mucho más lenta en ausencia de cMyc.

**Breve compendio**

50 La presente descripción proporciona métodos para seleccionar agentes que inducen la reprogramación o desdiferenciación de células de mamífero en células madre pluripotentes. En algunos casos, el método comprende

a) introducir al menos uno, pero no todos, de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox en células no pluripotentes para generar células transfectadas;

b) poner en contacto las células transfectadas con una biblioteca de agentes diferentes;

55 c) analizar las células en contacto para determinar las características de las células madre pluripotentes; y

d) correlacionar el desarrollo de las características de las células madre con un agente particular de la biblioteca, identificando de ese modo un agente que estimule la desdiferenciación de las células en células madre pluripotentes.

5 En algunos casos, la etapa a) comprende introducir uno o más casetes de expresión para la expresión de al menos uno, pero no todos, de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox en las células no pluripotentes.

En algunos casos, la etapa a) comprende introducir al menos uno, pero no todos, de un polipéptido Oct exógeno, un polipéptido Klf exógeno, un polipéptido Myc exógeno y un polipéptido Sox exógeno en las células no pluripotentes.

En algunos casos, el agente particular está entre 50-1500 daltons.

10 En algunos casos, la etapa a) comprende introducir dos casetes de expresión en las células, en donde cada casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una proteína diferente, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox, y los miembros restantes del grupo no se introducen en las células.

15 En algunos casos, la etapa a) comprende la introducción de tres casetes de expresión en las células, en donde cada casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una proteína diferente, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox, y el miembro restante del grupo no se introduce en las células.

20 En algunos casos, las células son células humanas. En algunos casos, las células son células de mamífero no humanas. En algunos casos, las células no pluripotentes son células progenitoras. En algunos casos, las células progenitoras son células progenitoras neuronales, células progenitoras de la piel o células progenitoras del folículo piloso.

En algunos casos, el polipéptido Oct es Oct4, el polipéptido Klf es Klf 4, el polipéptido Myc es c-Myc, y el polipéptido Sox es Sox2.

La presente descripción también proporciona métodos de selección para células de mamífero con características de células madre pluripotentes. En algunos casos, el método comprende

25 a) poner en contacto las células con un inhibidor de la cinasa MAPK/ERK (MEK) de modo que se inhiba el crecimiento de células no pluripotentes y se promueva el crecimiento de células madre pluripotentes; y

b) analizar las células en contacto para determinar las características de las células madre pluripotentes.

En algunos casos, el método comprende

poner en contacto las células con una biblioteca de agentes antes de la etapa a);

30 y, después de la etapa b), seleccionar un agente que induzca las células madre pluripotentes en función de los resultados de la etapa b).

En algunos casos, las células son células humanas. En algunos casos, las células son células de ratón, perro, vaca, cerdo, rata y primate no humano.

En algunos casos, el inhibidor de MEK es PD0325901.

35 La presente descripción también proporciona métodos para producir células madre pluripotentes inducidas a partir de células no pluripotentes de mamífero. En algunos casos, el método comprende

a) introducir uno o más de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox en las células no pluripotentes;

40 b) poner en contacto las células con un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9, produciendo de ese modo células madre pluripotentes inducidas.

En algunos casos, la etapa a) comprende poner en contacto las células no pluripotentes con uno o más polipéptidos exógenos seleccionados de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox. En algunos casos, la etapa a) comprende al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) ciclos de:

45 i. poner en contacto las células no pluripotentes con uno o más polipéptidos exógenos seleccionados de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox;

ii. seguido por cultivar las células en ausencia de los polipéptidos exógenos.

En algunos casos, la etapa a) comprende introducir uno o más casetes de expresión para la expresión de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox en las células no pluripotentes.

En algunos casos, el método comprende, además, analizar las células en contacto para determinar las características de las células madre pluripotentes.

En algunos casos, se introduce un casete de expresión para la expresión de un polipéptido Oct y un casete de expresión para la expresión de un polipéptido Sox en las células no pluripotentes.

- 5 En algunos casos, la etapa de introducción comprende introducir en las células no pluripotentes uno o más casetes de expresión para la expresión de un polipéptido Klf y un polipéptido Oct, en donde no se introduce un casete de expresión para un polipéptido Myc y/o un polipéptido Sox en las células.

En algunos casos, el polipéptido Klf es Klf4 y el polipéptido Oct es Oct4.

En algunos casos, las células no pluripotentes son células somáticas.

- 10 En algunos casos, las células no pluripotentes son células de fibroblastos.

En algunos casos, no se introduce un casete de expresión para la expresión de un polipéptido Myc ni un casete de expresión para la expresión de un polipéptido Klf en las células no pluripotentes.

En algunos casos, la etapa de introducción se realiza in vivo. En algunos casos, la etapa de introducción se realiza in vitro.

- 15 En algunos casos, el método comprende, además,

c) seleccionar las células que presentan características de células madre pluripotentes.

En algunos casos, las células no pluripotentes se obtienen de un animal; y las células madre pluripotentes inducidas se diferencian en un tipo de célula deseado.

- 20 En algunos casos, el tipo de célula deseado se introduce en el animal. En algunos casos, el animal es un ser humano. En algunos casos, el animal es un animal no humano.

En algunos casos, las células seleccionadas no comprenden un casete de expresión exógeno para la expresión de Oct4.

En algunos casos, el agente inhibe la metilación de H3K9. En algunos casos, el agente que inhibe la metilación de H3K9 es BIX01294.

- 25 En algunos casos, las células son células humanas. En algunos casos, las células son células de ratón. En algunos casos, las células no pluripotentes son células progenitoras. En algunos casos, las células progenitoras son células progenitoras neuronales.

En algunos casos, la etapa de introducción comprende introducir

- 30 un primer vector que comprende un promotor enlazado operativamente a un primer casete de expresión, el primer casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica Klf4;

un segundo vector que comprende un promotor enlazado operativamente a un segundo casete de expresión, el segundo casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica Sox2; y un tercer vector que comprende un promotor enlazado operativamente a un tercer casete de expresión, el tercer casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica c-Myc.

- 35 En algunos casos, los vectores son vectores retrovirales, lentivirales, adenovirales, plásmidos no virales estándar o vectores de expresión episomal.

- 40 La presente descripción también comprende una mezcla de células de mamífero y un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9, en donde las células expresan al menos uno o más de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Sox y un polipéptido Myc; y/o están en contacto con al menos uno o más de un polipéptido Oct exógeno, un polipéptido Klf exógeno, un polipéptido Sox exógeno y un polipéptido Myc exógeno.

- 45 En algunos casos, las células comprenden un primer, segundo y tercer casete de expresión recombinante, el primer casete de expresión comprende un promotor enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf, el segundo casete de expresión comprende un promotor enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido Sox; y el tercer casete de expresión comprende un promotor enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido Myc.

En algunos casos, el agente inhibe la metilación de H3K9. En algunos casos, el agente que inhibe la metilación de H3K9 es BIX01294.

En algunos casos, las células comprenden uno o más vectores de expresión de retrovirales, lentivirales, adenovirales,

plásmidos no virales o episomales, uno o más vectores de expresión retrovirales, lentivirales, adenovirales, plásmidos no virales o episomales que comprenden el primer, segundo y tercer casete de expresión.

5 En algunos casos, la mezcla comprende un primer, segundo y tercer vector de expresión retroviral, lentiviral, adenoviral, plásmido no viral o episomal, el primer vector de expresión retroviral, lentiviral, adenoviral, plásmido no viral o episomal comprende el primer casete de expresión; el segundo vector de expresión retroviral, lentiviral, adenoviral, plásmido no viral o episomal comprende el segundo casete de expresión; y el tercer vector retroviral, lentiviral, adenoviral, plásmido no viral o episomal comprende el tercer casete de expresión.

10 En algunos casos, las células son células humanas. En algunos casos, las células son células de ratón. En algunos casos, las células comprenden células episomales. En algunos casos, las células progenitoras son células progenitoras neuronales, células progenitoras de la piel o células progenitoras del folículo piloso.

En algunos casos, el polipéptido Klf es Klf4, el polipéptido Myc es c-Myc, y el polipéptido Sox es Sox2.

15 La presente descripción también proporciona una o más células de mamífero que expresan de forma endógena al menos una de una proteína seleccionada del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox, en donde: la célula no expresa de forma endógena al menos una proteína del grupo, en donde la proteína no expresada de forma endógena se expresa a partir de ARN codificado por un casete de expresión recombinante heterólogo presente en la célula, en donde la célula expresa de forma endógena o heteróloga cada uno del polipéptido Oct, el polipéptido Klf, el polipéptido Myc, y el polipéptido Sox; y la expresión de la proteína a partir del casete de expresión heteróloga da como resultado la reprogramación o desdiferenciación de la célula a partir de una célula no pluripotente a una célula madre pluripotente.

20 En algunos casos, el polipéptido Oct es Oct4, el polipéptido Klf es Klf4, el polipéptido Myc es c-Myc, y el polipéptido Sox es Sox2. En algunos casos, la célula expresa de forma endógena un polipéptido Sox y un polipéptido Myc y expresa de forma heteróloga un polipéptido Oct y un polipéptido Klf. En algunos casos, el polipéptido Oct es Oct4, el polipéptido Klf es Klf 4, el polipéptido Myc es c-Myc, y el polipéptido Sox es Sox2.

25 La presente descripción también proporciona métodos para inducir la expresión de Oct4 en una célula. En algunos casos, el método comprende poner en contacto la célula con un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9, induciendo de ese modo la expresión de Oct4 en la célula.

En algunos casos, la célula no expresa Oct4 inmediatamente antes de la etapa de contacto. En algunos casos, las células que se ponen en contacto no son células pluripotentes. En algunos casos, las células son inducidas a pluripotencia después de la etapa de contacto.

30 La presente descripción también proporciona métodos para inducir células no pluripotentes en células pluripotentes. En algunos casos, el método comprende poner en contacto las células no pluripotentes con uno o más agentes que inducen la pluripotencia y/o introducir casetes de expresión en las células para expresar proteínas que inducen la pluripotencia, en donde las células no se cultivan en células de alimentación y las células se unen a una superficie de cultivo sólida. En algunos casos, el método comprende, además, analizar las células en contacto para determinar las características de las células madre pluripotentes.

En algunos casos, las células se unen a la superficie de la superficie de cultivo sólida mediante un enlace molecular, el enlace molecular se selecciona del grupo que consiste en matrigel, una matriz extracelular (ECM) o análogo de ECM, laminina, fibronectina y colágeno.

En algunos casos, la etapa de contacto comprende las etapas de

40 a) introducir uno o más casetes de expresión para la expresión de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox en las células no pluripotentes;

b) poner en contacto las células con un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9, produciendo de ese modo células madre pluripotentes inducidas.

45 La presente descripción también proporciona métodos para producir células madre pluripotentes inducidas a partir de células no pluripotentes de mamífero. En algunos casos, el método comprende

a) poner en contacto las células con al menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más) de:

un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9 (que incluye, pero no se limita a, BIX);

un agonista del canal de Ca tipo L (que incluye, pero no se limita a, BayK);

50 un activador de la vía de cAMP (que incluye, pero no se limita a, forskolina);

un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT) (que incluye, pero no se limita a, RG108 o 5-aza-C);

- un ligando de receptores nucleares (que incluye, pero no se limita a, dexametasona);  
un inhibidor de GSK3 (que incluye, pero no se limita a, CHIR99021);  
un inhibidor de MEK;
- 5 un inhibidor de ALK5/ receptor de TGF $\beta$  (que incluye, pero no se limita a, SB431542, A-83-01 o 2-(3-(6-Metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina),  
un inhibidor de HDAC (que incluye, pero no se limita a, TSA, VPA, butirato de sodio, SAHA, etc.); y  
un inhibidor de Erk;
- produciendo de ese modo células madre pluripotentes inducidas.
- 10 En algunos casos, el método comprende, además, analizar las células en contacto para determinar las características de las células madre pluripotentes.
- En algunos casos, el método comprende
- a) poner en contacto las células con:
- i. un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9; y  
ii. un agente seleccionado del grupo que consiste en
- 15 un agonista del canal de Ca tipo L (que incluye, pero no se limita a, BayK);  
un activador de la vía de cAMP (que incluye, pero no se limita a, forskolina); un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT) (que incluye, pero no se limita a, RG108 o 5-aza-C);  
un ligando de receptores nucleares (que incluye, pero no se limita a, dexametasona);  
un inhibidor de GSK3 (que incluye, pero no se limita a, CHIR99021);
- 20 un inhibidor de MEK;
- un inhibidor de ALK5/ receptor de TGF $\beta$  (que incluye, pero no se limita a, SB431542, A-83-01 o 2-(3-(6-Metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina),  
un inhibidor de HDAC (que incluye, pero no se limita a, TSA, VPA, butirato de sodio, SAHA, etc.); y  
un inhibidor de Erk;
- 25 En algunos casos, el método comprende, además,
- b) introducir uno o más casetes de expresión para la expresión de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y/o un polipéptido Sox en las células no pluripotentes.
- En algunos casos, Klf4 y Oct 4 se introducen en las células (y opcionalmente, Myc y Sox no).
- 30 La presente descripción también proporciona mezclas de células de mamífero y al menos uno (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más) de:
- un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9,  
un agonista del canal de Ca tipo L;  
un activador de la vía de cAMP;  
un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT);
- 35 un ligando de receptores nucleares;  
un inhibidor de GSK3;  
un inhibidor de MEK;  
un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ ,  
un inhibidor de HDAC; y

un inhibidor de Erk;

En algunos casos, la mezcla comprende

i. un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9, y

ii. un agente seleccionado del grupo que consiste en

5 un agonista del canal de Ca tipo L;

un activador de la vía de cAMP;

un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT);

un ligando de receptores nucleares;

un inhibidor de GSK3;

10 un inhibidor de MEK;

un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ ,

un inhibidor de HDAC; y

un inhibidor de Erk;

15 En algunos casos, las células comprenden un casete de expresión heterólogo para la expresión de un polipéptido Oct y un casete de expresión heterólogo para la expresión de un polipéptido Sox.

En algunos casos, las células son células no pluripotentes. En algunos casos, las células son células de fibroblastos.

En algunos casos, no se introduce un casete de expresión para la expresión de un polipéptido Myc ni un casete de expresión para la expresión de un polipéptido Klf en las células no pluripotentes.

20 La presente descripción también proporciona composiciones que comprenden un agente que inhibe la metilación de H3K9 y un agente seleccionado del grupo que consiste en

un agonista del canal de Ca tipo L;

un activador de la vía de cAMP;

un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT);

un ligando de receptores nucleares;

25 un inhibidor de GSK3;

un inhibidor de MEK;

un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ ,

un inhibidor de HDAC; y

un inhibidor de Erk;

30 La presente descripción también proporciona kits que comprenden

i. un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9; y

ii. un agente seleccionado del grupo que consiste en

un agonista del canal de Ca tipo L;

un activador de la vía de cAMP;

35 un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT);

un ligando de receptores nucleares;

un inhibidor de GSK3;

un inhibidor de MEK;

un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ ,

un inhibidor de HDAC; y

un inhibidor de Erk;

En algunos casos, los kits comprenden, además, células de mamífero.

- 5 La invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para producir células madre pluripotentes inducidas a partir de células no pluripotentes de mamíferos, el método comprende:

(a) introducir en las células no pluripotentes de mamíferos (i) uno o más casetes de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; o (ii) uno o más polipéptidos que comprenden un polipéptido Oct4 exógeno; y

- 10 (b) poner en contacto las células no pluripotentes de mamífero con un inhibidor de MEK; produciendo de ese modo células madre pluripotentes inducidas.

La invención también proporciona una mezcla *in vitro* o *ex vivo* de células de mamífero y un inhibidor de MEK, en donde se introducen (i) uno o más casetes de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; o (ii) uno o más polipéptidos que comprenden un polipéptido Oct4 exógeno en las células.

- 15 La invención también proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para inducir la expresión de Oct4 endógeno en una célula, el método comprende,

introducir (i) uno o más casetes de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; o (ii) uno o más polipéptidos que comprenden un polipéptido Oct4 exógeno en la célula, y poner en contacto la célula con un inhibidor de MEK, induciendo de ese modo la expresión de Oct4 en la célula.

- 20 Otras realizaciones de la invención resultarán claras a partir de una lectura de la descripción completa.

#### Breve descripción de las figuras

- 25 **Figura 1 Generación de células iPS a partir de células progenitoras neuronales primarias definidas mediante transducción viral de Oct4/Klf4 y tratamiento con BIX01294.** Una comparación de la cantidad de colonias de células GFP + iPS generadas a partir de  $3,5 \times 10^4$  células progenitoras neuronales OG2 primarias mediante transducción retroviral de Oct4/Klf4/Sox2/c-Myc, Oct4/Klf4/Sox2, u Oct4/Klf4 con o sin tratamiento con BIX01294.

**Figura 2 Generación de células iPS a partir de células progenitoras neuronales primarias mediante transducción viral de Klf4/Sox2/c-Myc y tratamiento con BIX01294.** La cantidad de colonias de células GFP + iPS generadas a partir de  $3,5 \times 10^4$  células progenitoras neuronales OG2 primarias mediante transducción retroviral de Klf4/Sox2/c-Myc con o sin tratamiento con BIX01294.

- 30 **Figura 3. Generación de iPSC OK2B a partir de MEF OG2 primarios.** Gráfico de barras que muestra la cantidad promedio de la colonia de GFP<sup>+</sup> inducida a partir de MEF OG2 en 3 experimentos independientes. Este gráfico muestra datos para células MEF OG2 transducidas con 4 factores (Oct4, Klf4, Sox2, y cMyc; 4F); transducidas con OK (OK); transducidas con OK y tratadas con BIX 1  $\mu$ M (OK+BIX); transducidas con OK y tratadas con BIX 1  $\mu$ M + BayK 2  $\mu$ M (OK+BIX+BayK); transducidas con OK y tratadas con BIX 1  $\mu$ M + RG108 0,04  $\mu$ M (OK+BIX+RG108), n=3, la barra de error representa la desviación estándar calculada con Excel.

- 35 **Figura 4. Las iPSC OK2B tienen un perfil transcripcional similar al de mESC.** (A) El análisis mediante RT-PCR de las iPSC OK2B indicó que expresan genes específicos de mESC pluripotentes. Se usaron mESC R1 como control positivo mientras que se usaron MEF OG2 como control negativo. Se usó GAPDH como control de carga. (B) La secuenciación de bisulfito reveló que el promotor de nanog iPSC OK2B está desmetilado, lo que sugiere, además, una reactivación de genes endógenos específicos de mESC. Representación esquemática de la citosina presente en la región del promotor de Nanog que se amplificó para este análisis. El círculo abierto indica citosina desmetilada, mientras que el círculo negro/relleno indica citosina metilada.

- 45 **Figura 5. El tratamiento con BIX, BayK o una combinación de ambos no aumenta la proliferación de células mES.** Gráfico de dispersión que muestra la cantidad de células mES R1 después del tratamiento con DMSO (control), BayK 2  $\mu$ M, BIX 1  $\mu$ M y una combinación de ambos (BayK+BIX). n=3. Las barras de error representan la desviación estándar calculada en Excel. No se obtuvo una diferencia significativa para cada tratamiento en comparación con DMSO según se calculó mediante el uso de la prueba t en Excel.

- 50 **Figura 6. Análisis mediante RT-PCR para la expresión de Sox2 después del tratamiento con compuesto.** Los MEF OG2<sup>+/-</sup>/ROSA26<sup>+/-</sup> (OG2) se trataron con DMSO (control), BIX 1  $\mu$ M, BayK 2  $\mu$ M, y una combinación de ambos durante 6 días. El ARN se extrajo luego mediante el uso del mini kit Qiagen RNAeasy. La expresión de Sox2 se evaluó mediante PCR semicuantitativa. Se usaron R1 y p37 iPSC OK2B como control positivo, GAPDH como control de carga.

## Definiciones

Un “polipéptido Oct” se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de la familia de octómeros de factores de transcripción, o variantes de estos que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de al menos 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro de la familia de origen natural relacionado más cercano, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro de la familia de origen natural, y que opcionalmente comprenden un dominio de activación transcripcional. Los ejemplos de polipéptidos Oct incluyen, por ejemplo, Oct3/4 (denominado en la presente “Oct4”), que contiene el dominio POU. Véase, Ryan, A.K. & Rosenfeld, M.G. *Genes Dev.* 11, 1207-1225 (1997). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Oct de origen natural tal como los enumerados anteriormente.

Un “polipéptido Klf” se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de la familia de factores tipo Krüppel (Klf) proteínas de dedos de zinc que contienen secuencias de aminoácidos similares a la del regulador del patrón embrionario de *Drosophila* Krüppel, o variantes de los miembros de origen natural que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de al menos 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro de la familia de origen natural relacionado más cercano, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro de la familia de origen natural, y que opcionalmente comprenden un dominio de activación transcripcional. Véase, Dang, D.T., Pevsner, J. & Yang, V.W. *Cell Biol.* 32, 1103-1121 (2000). Los ejemplos de miembros de la familia Klf incluyen, por ejemplo, Klf1, Klf4 y Klf5, cada uno de los cuales ha demostrado que se pueden reemplazar entre sí para producir resultado células iPS. Véase, Nakagawa, et al., *Nature Biotechnology* 26:101 - 106 (2007). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Klf de origen natural tal como los enumerados anteriormente. En la medida en que se describe en la presente memoria, un polipéptido KLF puede reemplazarse por un Essrb. Por lo tanto, se pretende que para cada realización de polipéptidos Klf descrita en la presente memoria se describa igualmente para el uso de Essrb en lugar de un polipéptido Klf4.

Un “polipéptido Myc” se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de la familia Myc (véase, por ejemplo, Adhikary, S. & Eilers, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:635-645 (2005)), o variantes de estos que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de al menos 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro de la familia de origen natural relacionado más cercano, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro de la familia de origen natural, y que opcionalmente comprenden un dominio de activación transcripcional. Los ejemplos de polipéptidos Myc incluyen, por ejemplo, c-Myc, N-Myc y L-Myc. En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Myc de origen natural tal como los enumerados anteriormente.

Un “polipéptido Sox” se refiere a cualquiera de los miembros de origen natural de los factores de transcripción de caja HMG relacionados con SRY (Sox), caracterizados por la presencia de un dominio de un grupo de alta movilidad (HMG), o variantes de estos que mantienen una actividad del factor de transcripción similar (dentro de al menos 50 %, 80 % o 90 % de actividad) en comparación con el miembro de la familia de origen natural relacionado más cercano, o polipéptidos que comprenden al menos el dominio de unión al ADN del miembro de la familia de origen natural, y que opcionalmente comprenden un dominio de activación transcripcional. Véase, por ejemplo, Dang, D.T., et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1103-1121 (2000). Los ejemplos de polipéptidos Sox incluyen, por ejemplo, Sox1, Sox2, Sox3, Sox15 y Sox18, cada uno de los cuales ha demostrado que se pueden reemplazar entre sí para producir resultado células iPS. Véase, Nakagawa, et al., *Nature Biotechnology* 26:101 - 106 (2007). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con un miembro de la familia de polipéptidos Sox de origen natural tal como los enumerados anteriormente.

“H3K9” se refiere a la lisina 9 de histona H3. H3K9 puede dimetilarse en K9. Véase, por ejemplo, Kubicek, et al., *Mol. Cell* 473-481 (2007).

El término “pluripotente” o “pluripotencia” se refiere a las células con la capacidad de dar lugar a la progenie que puede experimentar diferenciación, en las condiciones apropiadas, en tipos de células que demuestran colectivamente características asociadas con linajes celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, y ectodermo). Las células madre pluripotentes pueden contribuir con muchos o todos los tejidos de un animal prenatal, posnatal o adulto. Se puede usar una prueba estándar aceptada en la técnica, tal como la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas, para establecer la pluripotencia de una población celular, sin embargo, también se puede usar la identificación de varias características de células madre pluripotentes para detectar células pluripotentes.

Las “características de las células madre pluripotentes” se refieren a las características de una célula que distinguen a las células madre pluripotentes de otras células. La capacidad de dar lugar a la progenie que puede experimentar diferenciación, en las condiciones apropiadas, en tipos de células que demuestran colectivamente características asociadas con linajes celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, y ectodermo) es una característica de las células madre pluripotentes. La expresión o la no expresión de determinadas combinaciones de marcadores moleculares también son características de las células madre pluripotentes. Por ejemplo, las células madre pluripotentes humanas expresan al menos algunos, y opcionalmente todos, los marcadores de la siguiente lista

no limitativa: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox2, E-cadherina, UTF-1, Oct4, Rex1 y Nanog. Las morfologías celulares asociadas con células madre pluripotentes también son características de las células madre pluripotentes.

5 El término “biblioteca” se utiliza según su uso común en la técnica para designar una colección de moléculas, opcionalmente organizadas y/o catalogadas de tal manera que se puedan identificar los miembros individuales. Las bibliotecas pueden incluir, pero no se limitan a, bibliotecas químicas combinatorias, bibliotecas de productos naturales y bibliotecas de péptidos.

10 Un polinucleótido “recombinante” es un polinucleótido que no está en su estado nativo, por ejemplo, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la naturaleza, o el polinucleótido está en un contexto distinto al que se encuentra naturalmente, por ejemplo, separado de secuencias de nucleótidos con las que normalmente se encuentra en proximidad en la naturaleza, o secuencias de nucleótidos adyacentes (o contiguas) con las que normalmente no está en proximidad. Por ejemplo, la secuencia en cuestión puede clonarse en un vector, o recombinarse de otro modo con uno o más ácidos nucleicos adicionales.

15 “Casete de expresión” se refiere a un polinucleótido que comprende un promotor u otra secuencia reguladora enlazada operativamente a una secuencia que codifica una proteína.

20 Las expresiones “promotor” y “secuencia de control de expresión” se usan en la presente memoria para hacer referencia a una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en la presente memoria, un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de polimerasa tipo II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos bloqueadores o potenciadores distales, que se pueden ubicar hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen promotores constitutivos e inducibles. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo en la regulación ambiental y de desarrollo. La expresión “enlazado/a operativamente” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o serie de sitios de unión a factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

30 Tal como se usan en la presente memoria, una “secuencia heteróloga”, un “ácido nucleico heterólogo” se refiere a una secuencia que se origina en una fuente externa a la célula hospedadora particular o, si proviene de la misma fuente, que se modifica en su forma original. Por lo tanto, un casete de expresión heterólogo en una célula es un casete de expresión que no es endógeno a la célula hospedadora particular, por ejemplo, que se enlaza a secuencias de nucleótidos de un vector de expresión en lugar de ADN cromosómico, que se enlaza a un promotor heterólogo, que se enlaza a un gen indicador, etc.

35 Las expresiones “agente” o “compuesto de prueba” se refieren a cualquier compuesto útil en los ensayos de análisis descritos en la presente memoria. Un agente puede ser, por ejemplo, un compuesto orgánico (por ejemplo, una molécula pequeña tal como un fármaco), un polipéptido (por ejemplo, un péptido o un anticuerpo), un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, de cadena doble, de cadena simple, un oligonucleótido, ARN antisentido, ARN inhibidor pequeño, micro ARN, una ribozima, etc.), un oligosacárido, un lípido. Normalmente, los agentes utilizados en los presentes métodos de detección tienen un peso molecular menor que 10.000 daltons, por ejemplo, menor que 8000, 40 6000, 4000, 2000 daltons, por ejemplo, entre 50-1500, 500-1500, 200-2000, 500-5000 daltons. El compuesto de prueba puede estar en forma de una biblioteca de compuestos de prueba, como una biblioteca combinatoria o aleatoria que proporciona un intervalo de diversidad suficiente. Los compuestos de prueba se unen opcionalmente a un compañero de fusión, por ejemplo, compuestos diana, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizantes, compuestos dirigibles y otros restos funcionales. Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles mediante la identificación de un compuesto de prueba (llamado “compuesto líder”) con alguna propiedad o actividad conveniente, por ejemplo, la capacidad de inducir la pluripotencia en determinadas condiciones como las que se describen en la presente memoria, creando variantes del compuesto líder, y evaluando la propiedad y actividad de esas variantes del compuesto. A menudo, se emplean métodos de análisis de alto rendimiento (HTS) para dicho análisis.

50 Las expresiones “ácido nucleico” o “polinucleótido” se usan de forma indistinta en la presente memoria para hacer referencia a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de estos ya sea en forma de cadena simple o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o enlaces o residuos estructurales modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo, ácidos peptidonucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular también abarca las variantes modificadas de manera conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones

redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

- 5 Los "inhibidores", "activadores" y "moduladores" de expresión o de actividad se usan para hacer referencia a moléculas inhibidoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas mediante el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la expresión o actividad de una proteína diana descrita (o polinucleótido de codificación), por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, inhiben la expresión, se unen a o bloquean parcial o  
10 totalmente la estimulación o la actividad inhibidora de la proteasa, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan por disminución la actividad de la proteína diana descrita, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo, inducen o activan la expresión de una proteína diana descrita o se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, mejoran la actividad de los inhibidores de la proteasa, sensibilizan o regulan la actividad de la proteína diana descrita (o polinucleótido de codificación), por ejemplo, agonistas.  
15 Los moduladores incluyen ligandos, antagonistas y agonistas de origen natural y sintéticos (por ejemplo, moléculas químicas pequeñas, anticuerpos y similares que funcionan como agonistas o antagonistas). Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, aplicar compuestos moduladores putativos a las células que expresan la proteína diana descrita y luego determinar los efectos funcionales sobre la actividad de la proteína diana descrita, tal como se describió anteriormente. Las muestras o ensayos que comprenden una proteína diana descrita que se  
20 tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador, para examinar el alcance del efecto. A las muestras de control (sin tratar con los moduladores) se les asigna un valor de actividad relativa de 100 %. La inhibición de una proteína diana descrita se logra cuando el valor de la actividad en relación con el control es alrededor de 80 %, opcionalmente 50 % o 25 %, 10 %, 5 % o 1 %. La actividad de la proteína diana descrita se logra cuando el valor de la actividad con relación al control es de 110 %, opcionalmente 150 %, opcionalmente 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o 1000-3000 % o mayor.  
25

## Descripción detallada

### I. Introducción

La presente descripción se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que pueden usarse moléculas pequeñas para imitar los efectos de los factores de transcripción implicados en la activación de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Por ejemplo, tal como se describe en detalle en la presente memoria, Oct4 puede  
30 "reemplazarse" con una molécula pequeña que reduce la metilación de lisina 9 de histona 3 (H3K9). Por lo tanto, por ejemplo, BIX01294, una molécula pequeña que inhibe específicamente G9a (una histona metiltransferasa para H3K9), cuando se pone en contacto con una célula de mamífero en la que se ha expresado Klf4, c-Myc y Sox2, da lugar a la inducción de células madre pluripotentes.

35 Estos resultados no solo son interesantes con respecto al papel de la metilación de H3K9 y su participación en la programación celular, sino que también muestra que pueden identificarse moléculas pequeñas que reemplazan a los factores de transcripción que anteriormente se había demostrado que son esenciales para la inducción de células madre pluripotentes. Esto puede ser de particular interés cuando el objetivo es la introducción (o reintroducción) de células madre pluripotentes inducidas, o células posteriormente diferenciadas, tales como células progenitoras derivadas de las células iPS, en un paciente. Como varios (por ejemplo, Oct4, Myc) de los cuatro factores de transcripción iPS tienen actividades oncogénicas conocidas, puede ser beneficioso reemplazar estos factores con  
40 otras moléculas menos oncogénicas o no oncogénicas. Además, el reemplazo de algunos o cada uno de los cuatro factores con moléculas pequeñas que no requieren transformación (y, por lo tanto, los posibles efectos oncogénicos de la inserción del ADN en el cromosoma) ayudará a reducir los posibles efectos secundarios de las terapias que involucran iPS.  
45

La presente descripción también proporciona células pluripotentes inducidas en las que al menos algunos de los factores de transcripción de iPS se expresan en niveles endógenos o inferiores y, sin embargo, son pluripotentes. Esta descripción se basa, en parte, en el descubrimiento de que determinadas células que expresan Sox2 de forma endógena pueden inducirse a la pluripotencia mediante la introducción y expresión heteróloga solo de Oct4 y Klf4.

50 Además, como se muestra en la presente memoria, las células no pluripotentes que no expresan de forma endógena o heteróloga un polipéptido Sox (por ejemplo, Sox2) pueden inducirse a la pluripotencia mediante el uso de los métodos de la descripción. Por ejemplo, la pluripotencia se puede inducir mediante la introducción de solo Oct4 y Klf4 en células no pluripotentes (por ejemplo, células de fibroblastos) que también se ponen en contacto con un agente que inhibe la metilación de H3K9, y opcionalmente también se ponen en contacto con al menos uno de agonista del canal de calcio tipo L, un activador de la vía de cAMP, un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT), un agonista del receptor nuclear, un inhibidor de GSK3 o un inhibidor de MEK. Los inventores también han encontrado que combinaciones de agentes  
55 tales como un inhibidor de GSK y un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de GSK y un activador de la vía de cAMP; o un inhibidor de GSK y un inhibidor de ALK5 (con y sin un inhibidor de G9a) son eficaces para la inducción de pluripotencia en células que expresan de forma heteróloga Oct4 solo, u Oct4/Sox2 o Sox2/Klf4. Por consiguiente, la descripción proporciona mezclas de células y agentes, en donde las células inicialmente no son células pluripotentes  
60

(por ejemplo, son células no madre) y opcionalmente se expresan de forma heteróloga o endógena o están de otra manera intactas con Oct4 y/o Klf4, y en donde los agentes son uno o más de un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; y/o un inhibidor de Erk.

Tal como se describe más adelante, la descripción también proporciona nuevos métodos de análisis de células con características de células madre pluripotentes mediante el cultivo de células que serán analizadas con un inhibidor de MEK, un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk. Los inhibidores de MEK, por ejemplo, inhiben el crecimiento de células no iPS mientras promueven simultáneamente el crecimiento y la reprogramación estable de células iPS, enriqueciendo de ese modo una mezcla de células particulares para células con características de células madre pluripotentes.

## **II. Inducción de células madre pluripotentes**

### **15 A. Expresión heteróloga/endógena**

En algunos casos, se identifican células no pluripotentes que expresan de forma endógena al menos una (y opcionalmente, dos o tres de) proteína del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox. Las proteínas restantes (no expresadas de forma endógena) del grupo pueden luego expresarse de forma heteróloga en las células y analizarse para determinar la reprogramación y/o desdiferenciación en células pluripotentes, opcionalmente en presencia de uno o más de un inhibidor de MEK, un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; y/o un inhibidor de Erk.

Se cree que cualquier tipo de célula no pluripotente de mamífero puede analizarse para determinar la expresión de proteínas y posteriormente convertirse en una célula pluripotente. En algunos casos, las células de partida son células progenitoras aisladas. Los ejemplos de células progenitoras incluyen, pero no se limitan a, células progenitoras del endodermo, células progenitoras del mesodermo (por ejemplo, células progenitoras musculares, células progenitoras óseas, células progenitoras de la sangre) y células progenitoras del ectodermo (por ejemplo, células progenitoras de tejido epidérmico y células progenitoras neuronales). Las células útiles para estos aspectos pueden identificarse fácilmente mediante el análisis líneas celulares para determinar la expresión de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox o identificar células con metilación reducida del promotor (por ejemplo, mediante secuenciación de bisulfito de ADN) o identificar células con un estado de histona modificado para determinar el estado de silenciamiento reducido de estos genes. Los factores de transcripción que no se expresan de forma endógena pueden expresarse de forma heteróloga para inducir la pluripotencia sin expresión heteróloga de los factores ya expresados de forma endógena.

Tal como se muestra en los Ejemplos, algunas células (por ejemplo, células progenitoras neuronales y de fibroblastos (no se muestran datos)) pueden inducirse a la pluripotencia mediante la expresión heteróloga solo de Oct4 y Klf4. Esto demuestra que las proteínas Sox y Myc, y probablemente las proteínas Oct y Klf, no necesitan estar sobreexpresadas (por ejemplo, mediante el uso de un vector viral de gran expresión) para lograr la pluripotencia. En cambio, algunas de estas proteínas pueden expresarse a niveles endógenos o incluso inferiores detectables y aún ser elegibles para la conversión en células pluripotentes mediante la expresión heteróloga de los otros miembros del grupo. Por lo tanto, en algunos casos, se identifican células que expresan de forma endógena un polipéptido Sox y/o un polipéptido Myc, y un polipéptido Oct y un polipéptido Klf se expresan de forma heteróloga en la célula, induciendo de ese modo la conversión de la célula en una célula pluripotente. En algunos casos, se identifican células que expresan de forma endógena un polipéptido Oct y/o un polipéptido Klf y/o un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox se expresa de forma heteróloga en la célula, induciendo de ese modo la conversión de la célula en una célula pluripotente. Opcionalmente, puede expresarse Sall4 (Zhang et al., Nat Cell Biol. 8(10):1114-23 (2006)) en lugar de cualquiera o todos de Myc, Klf4 y Sox2.

La eficiencia de la inducción a la pluripotencia como se describe en la presente memoria puede mejorarse aún más mediante la inclusión en células no pluripotentes de, por ejemplo, uno o más de, UTF1, SV40, TERT (ya sea mediante la introducción de un casete de expresión que codifica estos productos génicos, o poniendo en contacto las células con las propias proteínas) y/o mediante la reducción de la expresión de p53 (por ejemplo, mediante ARNip). Véase, por ejemplo, Zhao, et al., Cell Stem Cell 3:475-479 (2008).

**B. Proteínas del factor de transcripción**

Como se detalla en la presente memoria, varios aspectos de la descripción implican la introducción de uno o más polipéptidos en las células, induciendo de ese modo la pluripotencia en la célula. Como se describió anteriormente, la introducción de un polipéptido en una célula puede comprender la introducción de un polinucleótido que comprende uno o más casetes de expresión en una célula e inducir la expresión, introduciendo de ese modo los polipéptidos en la célula mediante transcripción y traducción del casete de expresión. De manera alternativa, se puede introducir un polipéptido exógeno (es decir, una proteína proporcionada desde el exterior de la célula y/o que no es producida por la célula) en la célula mediante una serie de métodos diferentes que no implican la introducción de un polinucleótido que codifica el polipéptido.

10 Por consiguiente, para cualquier aspecto de la descripción que se refiere a la introducción de un polipéptido en una célula, o la introducción de un casete de expresión que codifica un polipéptido en una célula, debe entenderse que la presente descripción también proporciona expresamente la introducción exógena del polipéptido como una proteína en la célula. Por lo tanto, en algunos casos, las células no pluripotentes de mamíferos son inducidas a la pluripotencia a) al introducir de forma exógena uno o más de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y/o un polipéptido Sox en las células no pluripotentes; y opcionalmente b) al poner en contacto las células con uno o más de un inhibidor de MEK, un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ , un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk, lo que produce células madre pluripotentes inducidas.

20 En algunos casos, se identifican células no pluripotentes que expresan de forma endógena al menos una (y opcionalmente, dos o tres de) proteína del grupo que consiste en un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox. Las proteínas restantes (no expresadas de forma endógena) del grupo pueden luego introducirse de forma exógena en las células y analizarse para determinar la reprogramación y/o desdiferenciación en células pluripotentes, opcionalmente en presencia de uno o más de un inhibidor de MEK, un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ , un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk.

25 En algunos casos, se identifican células que expresan de forma endógena un polipéptido Sox y/o un polipéptido Myc, y como una segunda etapa un polipéptido Oct y un polipéptido Klf se introducen de forma exógena en la célula, induciendo de ese modo la conversión de la célula en una célula pluripotente. En algunos casos, se identifican células que expresan de forma endógena un polipéptido Oct y/o un polipéptido Klf y/o un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox se introduce de forma exógena en la célula, induciendo de ese modo la conversión de la célula en una célula pluripotente.

30 La introducción exógena de un polipéptido en una célula puede producirse de muchas maneras. Una o más proteínas pueden cultivarse simplemente en presencia de células diana en condiciones que permitan la introducción de las proteínas en la célula. En algunos casos, las proteínas exógenas comprenden el polipéptido del factor de transcripción de interés enlazado (por ejemplo, enlazado como una proteína de fusión o enlazado de otro modo de manera covalente o no covalente) a un polipéptido que mejora la capacidad del factor de transcripción para entrar en la célula (y opcionalmente el núcleo celular).

35 Los ejemplos de secuencias de polipéptidos que mejoran el transporte a través de las membranas incluyen, pero no se limitan a, la proteína de transcripción de homeoproteína de *Drosophila antennapedia* (AntHD) (Joliet et al., *New Biol.* 3: 1121-34, 1991; Joliet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1864-8, 1991; Le Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9120-4, 1993), la proteína estructural del virus del herpes simple VP22 (Elliott and O'Hare, *Cell* 88: 223-33, 1997); la proteína TAT activadora transcripcional del VIH-1 (Green y Loewenstein, *Cell* 55: 1179-1188, 1988; Frankel y Pabo, *Cell* 55: 1 289-1193, 1988); transportadores que mejoran la administración tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 6,730,293 (que incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de péptidos que comprende al menos 7-25 argininas contiguas); y el péptido Penetratin™ 1 comercialmente disponible, y los vectores péptidos Diatos ("DPV") de la plataforma Vectocell® disponibles en Daitos S.A. de París, Francia. Véase también, WO/2005/084158 y WO/2007/123667 y transportadores adicionales descritos en ellas. Estas proteínas no solo pueden pasar a través de la membrana plasmática, sino que la unión de otras proteínas, como los factores de transcripción descritos en la presente, es suficiente para estimular la absorción celular de estos complejos.

40 En algunos casos, los polipéptidos del factor de transcripción descritos en la presente memoria se introducen de forma exógena como parte de un liposoma, o cóctel de lípidos como Fugene6 y Lipofectamina comercialmente disponibles). En otra alternativa, las proteínas del factor de transcripción pueden ser microinyectadas o introducidas directamente de otro modo en la célula diana.

45 Como se describe en los Ejemplos, los inventores han encontrado que la incubación de células con los polipéptidos del factor de transcripción durante períodos prolongados es tóxica para las células. Por lo tanto, la presente descripción proporciona una incubación intermitente de células de mamíferos no pluripotentes con uno o más de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y/o un polipéptido Sox, con períodos intermedios de incubación de las

células en ausencia del uno o más polipéptidos. En algunos casos, el ciclo de incubación con y sin los polipéptidos se puede repetir 2, 3, 4, 5, 6 o más veces y se realiza durante períodos de tiempo suficientes (es decir, las incubaciones con y sin proteínas) para lograr el desarrollo de células pluripotentes. Se pueden incluir varios agentes (por ejemplo, inhibidor de MEK y/o inhibidor de GSK y/o inhibidor de TGFbeta) para mejorar la eficiencia del método.

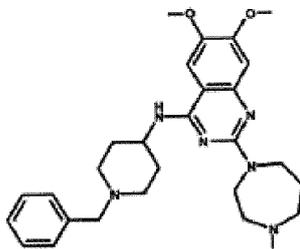
### 5 C. Reemplazo de moléculas pequeñas de los factores de transcripción de iPS

En algunos aspectos de la descripción, una célula expresa (de forma endógena o heteróloga) al menos una proteína seleccionada de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox (por ejemplo, al menos 1, 2 o 3 de estos) y se pone en contacto con al menos un agente, en donde el agente es suficiente para producir la inducción de la célula en una célula madre pluripotente en ausencia de la expresión de una o más de las proteínas no expresadas restantes, es decir, cualquiera del polipéptido Klf, el polipéptido Myc o el polipéptido Sox no se expresa en la célula.

Como se muestra en los Ejemplos, poner en contacto la célula con determinados agentes puede “complementar” o reemplazar lo que generalmente se entiende como una expresión necesaria de una de estas proteínas para producir las células pluripotentes. Al poner en contacto una célula con un agente que reemplaza funcionalmente la expresión de una de las proteínas enumeradas anteriormente, es posible generar células pluripotentes con la expresión de todas las proteínas enumeradas anteriormente, excepto la proteína reemplazada o complementada por el agente. Las proteínas restantes pueden expresarse de forma endógena, heteróloga o en alguna combinación de las dos (por ejemplo, un polipéptido Sox y Myc podrían expresarse de forma endógena, un polipéptido Klf podría expresarse de forma heteróloga y el polipéptido Oct podría “reemplazarse” al poner en contacto la célula con un agente complementario tal como un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9).

Además, las moléculas pequeñas pueden mejorar la eficiencia de un proceso para generar células pluripotentes (por ejemplo, células iPS). Por ejemplo, una mayor eficiencia puede manifestarse al acelerar el tiempo para generar dichas células pluripotentes (por ejemplo, al acortar el tiempo para el desarrollo de células pluripotentes en al menos un día en comparación con un proceso similar o igual sin la molécula pequeña). De manera alternativa, o en combinación, una pequeña molécula puede aumentar la cantidad de células pluripotentes generadas por un proceso particular (por ejemplo, aumentar la cantidad en un período de tiempo dado en al menos 10 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 %, etc. en comparación con un proceso similar o igual sin la molécula pequeña).

Como se describe en los Ejemplos, las células que expresan Klf4, Sox2 y Myc de forma heteróloga pueden inducirse a la pluripotencia al poner en contacto las células con un agente que inhibe la metilación de H3K9 sin la expresión heteróloga de Oct4. De hecho, se ha descubierto que la pluripotencia se puede inducir al poner en contacto células no pluripotentes con un agente que inhibe la metilación de H3K9 y la introducción de cualquiera de los Oct 4 solo (por ejemplo, sin introducir también un vector para expresar un polipéptido Myc, un polipéptido Sox o un polipéptido Klf) u Oct4 con Klf4. Las células que pueden inducirse a la pluripotencia incluyen, pero no se limitan a, células progenitoras neuronales y fibroblastos. Los agentes que inhiben la metilación de H3K9 incluyen agentes que inhiben las metilasas (también conocidas como metil transferasas) que se dirigen a H3K9. Por ejemplo, la histona metiltransferasa G9a metila H3K9 y se sabe que la inhibición de la histona metiltransferasa G9a reduce la metilación de H3K9. Véase, *por ejemplo*, Kubicek, et al., Mol. Cell 473-481 (2007). Un ejemplo de una histona metiltransferasa G9a útil según los métodos de la descripción es BIX01294 (véase, *por ejemplo*, Kubicek, et al., Mol. Cell473-481 (2007)), o formas de sales, hidratos, isoformas, racematos, solvatos y profármacos de esta. Bix01294 se muestra a continuación:



**BIX-01294**

Los compuestos de Bix01294 también incluyen las formas de sales, hidratos, solvatos y profármacos. Bix01294 posee átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; se pretende que se incluyan los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales. Por ejemplo, el compuesto puede ser el isómero R o el isómero S, o una mezcla de ellos. Además, el compuesto puede ser el isómero E o el isómero Z, o una combinación de ellos.

En algunos casos, el agente que inhibe la metilación de H3K9 es un análogo de sustrato de una histona metiltransferasa. El sustrato de varias metiltransferasas es S-adenosil-metionina (SAM). Por lo tanto, en algunos casos, el agente que inhibe la metilación de H3K9 es un análogo de SAM. Los ejemplos de análogos de SAM incluyen, pero no se limitan a, metiltio-adenosina (MTA), sinefungina y S-adenosil-homocisteína (SAH). En otros casos, el

agente que inhibe la metilación de H3K9 no compite con SAM en una histona metiltransferasa.

Las células pluripotentes resultantes (de expresión heteróloga y/o "reemplazo" de moléculas pequeñas) pueden convertirse en muchos o en los tres tipos principales de tejido: endodermo (por ejemplo, revestimiento interno del intestino), mesodermo (por ejemplo, músculo, hueso, sangre), y ectodermo (por ejemplo, tejidos epidérmicos y sistema nervioso), pero, opcionalmente, pueden mostrar restricciones en su potencial de desarrollo (por ejemplo, pueden no formar tejido placentario u otros tipos de células de un linaje definido). Las células pueden ser humanas o no humanas (por ejemplo, de primates, ratas, ratones, conejos, bovinos, perros, gatos, cerdos, etc.).

En otros casos, se puede usar BIX01294, u otros agentes que inhiben la metilación de H3K9 o promueven la desmetilación de H3K9, para inducir la pluripotencia en células que anteriormente no eran pluripotentes. En algunos casos, se usa un agente que inhibe la metilación de H3K9 para inducir la expresión de Oct4 en las células, o al menos alteraciones en la metilación del ADN del promotor de Oct4 y/o la metilación de histonas para permitir la inducción de las células a la pluripotencia. Por lo tanto, en algunos casos, las células que inicialmente no son células pluripotentes se ponen en contacto con un agente que inhibe la metilación del H3K9 para inducir a las células a volverse pluripotentes. De hecho, sin pretender limitar el alcance de la descripción a un modo particular de acción, los inventores creen que poner en contacto células no pluripotentes con un agente que inhibe la metilación de H3K9 o promueve la desmetilación de H3K9 mejorará cualquier método para inducir las células a la pluripotencia. Por ejemplo, el agente que inhibe la metilación de H3K9 se puede poner en contacto con una célula no pluripotente e inducir a la pluripotencia en un método que comprende poner en contacto células no pluripotentes con un agente que inhibe la metilación de H3K9, opcionalmente, también poner en contacto con las células con uno o más de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ , un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk, en donde cada compuesto se incluye en una cantidad suficiente para mejorar la eficiencia de la inducción. En algunos casos, como se describe en este párrafo, Oct4 solo, u Oct4/Klf4, o Sox2/Klf4 se expresan, además, de forma heteróloga en las células no pluripotentes, lo que resulta en la inducción de la pluripotencia luego del contacto con los agentes que se describen en la presente memoria.

Los inventores también han descubierto que la combinación de un inhibidor de GSK y un inhibidor de HDAC, o un inhibidor de GSK y un activador de la vía de cAMP, o un inhibidor de GSK y un inhibidor de ALK5 puede inducir a la pluripotencia de cualquiera de los fibroblastos de ratón o humanos o queratinocitos que expresan cualquier de: Oct4 solo, Oct4/Klf4 o Sox2/Klf4 (no se muestran datos). En otros casos, se induce una célula no pluripotente a la pluripotencia en un método que comprende poner en contacto células no pluripotentes con un inhibidor de GSK3, opcionalmente, también poner en contacto con las células con uno o más de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ , un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk, en donde cada compuesto se incluye en una cantidad suficiente para mejorar la eficiencia de la inducción. En otros casos, se induce una célula no pluripotente a la pluripotencia en un método que comprende poner en contacto células no pluripotentes con un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ , opcionalmente, también poner en contacto con las células con uno o más de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk, en donde cada compuesto se incluye en una cantidad suficiente para mejorar la eficiencia de la inducción. En otros casos, se induce una célula no pluripotente a la pluripotencia en un método que comprende poner en contacto células no pluripotentes con un inhibidor de HDAC, opcionalmente, también poner en contacto con las células con uno o más de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ ; o un inhibidor de Erk, en donde cada compuesto se incluye en una cantidad suficiente para mejorar la eficiencia de la inducción. En otros casos, se induce una célula no pluripotente a la pluripotencia en un método que comprende poner en contacto células no pluripotentes con un inhibidor de MEK, opcionalmente, también poner en contacto con las células con uno o más de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de ALK5/receptor de TGF $\beta$ , un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk, en donde cada compuesto se incluye en una cantidad suficiente para mejorar la eficiencia de la inducción. En algunos casos, como se describe en este párrafo, Oct4 solo, u Oct4/Klf4, o Sox2/Klf4 se expresan, además, de forma heteróloga en las células no pluripotentes, lo que resulta en la inducción de la pluripotencia luego del contacto con los agentes que se describen en la presente memoria.

Los ejemplos de agonistas del canal de calcio tipo L incluyen, pero no se limitan a, BayK8644 (véase, *por ejemplo*, Schramm, et al., Nature 303:535-537 (1983)), Deshidrodidemnina B (véase, *por ejemplo*, la patente estadounidense n.º 6,030,943), FPL 64176 (FPL) (véase, *por ejemplo*, Liwang, et al., Neuropharmacology 45:281-292 (2003)), S(+)-PN 202-791 (véase, *por ejemplo*, Kennedy, et al., Neuroscience 49:937-44 (1992)) y CGP 48506 (véase, *por ejemplo*, Chahine, et al., Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 81:135-141 (2003)).

Los ejemplos de activadores de la vía de cAMP incluyen, pero no se limitan a, forskolina (véase, *por ejemplo*, Liang, et al., *Endocrinology* 146: 4437-4444 (2005)), FSH (véase, Liang, *supra*), milrinona (véase, Liang, *supra*), cilostamida (véase, Liang, *supra*), rolipram (véase, Liang, *supra*), dbcAMP (véase, Liang, *supra*) y 8-Br-cAMP (véase, Liang, *supra*).

5 Los ejemplos de inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT) pueden incluir anticuerpos que se unen, variantes negativas dominantes y ARNip y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de DNMT. Los inhibidores de DNMT incluyen, pero no se limitan a, RG108 (disponible, *por ejemplo*, de Sigma-Aldrich), 5-aza-C (5-azacitidina o azacitidina) (véase, *por ejemplo*, Schermelleh, et al., *Nature Methods* 2:751-6 (2005)), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR) (véase, *por ejemplo*, Zhu, *Clinical Medicinal Chemistry* 3(3):187-199 (2003)), decitabina (véase, *por ejemplo*, Gore, *Nature Clinical Practice Oncology* 2:S30-S35 (2005)), doxorubicina (véase, *por ejemplo*, Levenson, *Molecular Pharmacology* 71:635-637 (2007)), EGCG ((-)-epigallocatequina-3-galato) (véase, *por ejemplo*, Fang, et al., *Cancer Research* 63:7563-7570 (2003)), RG108 (véase, *por ejemplo*, Carninci, et al., WO2008/126932) y zebularina (véase, Carninci, *supra*).

15 Los ejemplos de ligandos de receptores nucleares, es decir, agonistas, antagonistas, activadores y/o represores de receptores nucleares, pueden modular la expresión génica local o la transcripción en el sitio de administración. Se pueden usar agonistas de receptores nucleares (y también antagonistas de receptores nucleares). En algunos casos, los receptores nucleares son correguladores de la transcripción. La activación o inhibición de determinados receptores nucleares regula los estados epigenéticos de los locus de genes específicos donde se unen. Los inventores han descubierto que la dexametasona (por ejemplo, a 1 µM, un agonista del receptor de glucocorticoides), ciglitazona y Fmoc-Leu (ambos utilizados a 5 µM) (un agonista de PPAR), y bexaroteno (por ejemplo, a 3 µM) (un antagonista de RXR) pueden mejorar la reprogramación celular. Los ligandos de receptores nucleares representativos incluyen, pero no se limitan a, estradiol (*por ejemplo*, 17-beta estradiol), ácido retinoico todo trans, ácido retinoico 13-cis, dexametasona, clobetasol, andrógenos, tiroxina, glitazonas de vitamina D3, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, prostaglandinas y fibratos (*por ejemplo*, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrozil, fenofibrato y clofibrato). Además, la actividad de los ligandos endógenos (tales como las hormonas estradiol y testosterona) cuando se unen a sus receptores nucleares cognados normalmente regula por aumento la expresión génica. Esta regulación por aumento o estimulación de la expresión génica mediante el ligando puede denominarse una respuesta agonista. Los efectos agonistas de las hormonas endógenas también pueden ser imitados por determinados ligandos sintéticos, por ejemplo, el fármaco antiinflamatorio del receptor de glucocorticoides dexametasona. Los ligandos agonistas funcionan induciendo una conformación del receptor que favorece la unión del coactivador. (Véase, *por ejemplo*, WO08011093A.)

35 Los inhibidores de GSK3 pueden incluir anticuerpos que se unen, variantes negativas dominantes y ARNip y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a GSK3. Los ejemplos específicos de inhibidores de GSK3 incluyen, pero no se limitan a, Kenpaulona, 1-Azakenpaulona, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418 (véase, *por ejemplo*, Gould, et al., *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 7:387-390 (2004)), CT 99021 (véase, *por ejemplo*, Wagman, *Current Pharmaceutical Design* 10:1105-1137 (2004)), CT 20026 (véase, Wagman, *supra*), SB216763 (véase, *por ejemplo*, Martin, et al., *Nature Immunology* 6:777-784 (2005)), AR-A014418 (véase, *por ejemplo*, Noble, et al., *PNAS* 102:6990-6995 (2005)), litio (véase, *por ejemplo*, Gould, et al., *Pharmacological Research* 48: 49-53 (2003)), SB 415286 (véase, *por ejemplo*, Frame, et al., *Biochemical Journal* 359:1-16 (2001)) y TDZD-8 (véase, *por ejemplo*, Chin, et al., *Molecular Brain Research*, 137(1-2):193-201 (2005)). Los ejemplos adicionales de GSK3 disponibles de Calbiochem (véase, *por ejemplo*, Dalton, et al., WO2008/094597), incluyen, pero no se limitan a, BIO (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxima (inhibidor IX de GSK3); BIO-Acetoxima (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubina-3'-acetoxima (inhibidor X de GSK3); (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina (inhibidor XIII de GSK3); complejo de piridocarbazol-ciclopenadienilruteno (inhibidor XV de GSK3); TDZD-8 4-Bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona (inhibidor I de GSK3beta); 2-Tio(3-iodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol (inhibidor II de GSK3beta); OTDZT 2,4-Dibencil-5-oxotiadiazolidina-3-tiona (inhibidor III de GSK3beta); alfa-4-Dibromoacetofenona (inhibidor VII de GSK3beta); AR-AO 14418 N-(4-Metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea (inhibidor VIII de GSK-3beta); 3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol-2,3-b)piridin-3-il]-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona (inhibidor XI de GSK-3beta); compuesto de TWSI 19 pirrolopirimidina (inhibidor XII de GSK3beta); L803 H-KEAPPAPPQSpP-NH2 o su forma miristoilada (inhibidor XIII de GSK3beta); 2-Cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-il)-etanona (inhibidor VI de GSK3beta); AR-AO144-18; SB216763; y SB415286. Se han identificado residuos de GSK3b que interactúan con inhibidores. Véase, *por ejemplo*, Bertrand et al., *J. Mol Biol.* 333(2): 393-407 (2003). Los inhibidores de GSK3 pueden activar, por ejemplo, la vía de Wnt/β-catenina. Muchos de los genes de β-catenina corriente abajo corregulan las redes génicas de pluripotencia. Por ejemplo, un inhibidor de GSK activa la expresión de cMyc y aumenta la estabilidad de la proteína y la actividad transcripcional. Por lo tanto, en algunos casos, los inhibidores de GSK3 se pueden usar para estimular la expresión del polipéptido Myc endógeno en una célula, eliminando de ese modo la necesidad de que la expresión de Myc induzca la pluripotencia.

60 Los inhibidores de MEK pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes y ARNip y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de MEK. Los ejemplos específicos de inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, PD0325901, (véase, *por ejemplo*, Rinehart, et al., *Journal of Clinical Oncology* 22: 4456-4462 (2004)), PD98059 (disponible, *por ejemplo*, de Cell Signaling Technology), U0126 (disponible, *por ejemplo*, de Cell Signaling Technology), SL 327 (disponible, *por ejemplo*, de Sigma-Aldrich), ARRY-162 (disponible, *por ejemplo*, de Array Biopharma), PD184161 (véase, *por ejemplo*, Klein, et al., *Neoplasia* 8:1 - 8 (2006)), PD184352 (CI-1040) (véase, *por ejemplo*, Mattingly, et al., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:456-465 (2006)), sunitinib

(véase, por ejemplo, Voss, et al., US2008004287), sorafenib (véase, Voss *supra*), Vandetanib (véase, Voss *supra*), pazopanib (véase, por ejemplo, Voss *supra*), Axitinib (véase, Voss *supra*) y PTK787 (véase, Voss *supra*).

5 Actualmente, varios inhibidores de MEK están siendo sometidos a evaluaciones de ensayos clínicos. CI-1040 ha sido evaluado en ensayos clínicos de fase I y II para el cáncer (véase, por ejemplo, Rinehart, et al., Journal of Clinical Oncology 22(22):4456-4462 (2004)). Otros inhibidores de MEK que están siendo evaluados en ensayos clínicos incluyen PD184352 (véase, por ejemplo, English, et al., Trends in Pharmaceutical Sciences 23(1):40-45 (2002)), BAY 43-9006 (véase, por ejemplo, Chow, et al., Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 46:72-78 (2001)), PD-325901 (también PD0325901), GSK1120212, ARRY-438162, RDEA119, AZD6244 (también ARRY-142886 o ARRY-886), RO5126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704). (Véase, por ejemplo, la información de National Institutes of Health ubicados en el sitio web [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), así como la información de Nation Cancer Institute ubicado en el sitio web [cancer.gov/clinicaltrials](http://cancer.gov/clinicaltrials)).

15 Los inhibidores del receptor beta de TGF (por ejemplo, ALK5) pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de los receptores beta de TGF (por ejemplo, ALK5). Los inhibidores de ALK5/receptor de TGFβ incluyen, pero no se limitan a, SB431542 (véase, por ejemplo, Inman, et al., Molecular Pharmacology 62(1):65-74 (2002)), A-83-01, también conocido como 3-(6-Metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida (véase, por ejemplo, Tojo, et al., Cancer Science 96(11):791-800 (2005) y, por ejemplo, comercialmente disponible de Toicris Bioscience); 2-(3-(6-Metilpiridin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina, Wnt3a/BIO (véase, por ejemplo, Dalton, et al., WO2008/094597), BMP4 (véase, Dalton, *supra*), GW788388 (-[4-[3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]piridin-2-il]-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)benzamida) (véase, por ejemplo, Gellibert, et al., Journal of Medicinal Chemistry 49(7):2210-2221 (2006)), SM16 (véase, por ejemplo, Suzuki, et al., Cancer Research 67(5):2351-2359 (2007)), IN-1130 (3-((5-(6-metilpiridin-2-il)-4-(quinoxalin-6-il)-1H-imidazol-2-il)metil)benzamida) (véase, por ejemplo, Kim, et al., Xenobiotica 38(3):325-339 (2008)), GW6604 (2-fenil-4-(3-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)piridina) (véase, por ejemplo, de Gouville, et al., Drug News Perspective 19(2):85-90 (2006)), SB-505124 (clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butyl-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina) (véase, por ejemplo, DaCosta, et al., Molecular Pharmacology 65(3):744-752 (2004)) y derivados de pirimidina (véase, por ejemplo, los que se enumeran en Stiefl, et al., WO2008/006583). Además, si bien que no se pretende que “un inhibidor de ALK5” comprenda inhibidores no específicos de quinasas, debe entenderse que un “inhibidor de ALK5” comprende inhibidores que inhiben ALK4 y/o ALK7 además de ALK5, tales como por ejemplo, SB-431542 (véase, por ejemplo, Inman, et al., J. Mol. Pharmacol. 62(1): 65-74 (2002)). Sin la intención de limitar el alcance de los casos, se cree que los inhibidores de ALK5 afectan el proceso de conversión/transición mesenquimal a epitelial (MET). La vía de TGFβ/activina es un impulsor de la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Por lo tanto, la inhibición de la vía de TGFβ/activina puede facilitar el proceso MET (es decir, la reprogramación).

35 En vista de los datos de la presente memoria que muestran el efecto de la inhibición de ALK5, se cree que la inhibición de la vía de TGFβ/activina tendrá efectos similares. Por lo tanto, puede usarse cualquier inhibidor (por ejemplo, corriente arriba o corriente arriba) de la vía de TGFβ/activina en combinación con, o en lugar de, inhibidores de ALK5 tal como se describe en cada párrafo de la presente memoria. Los ejemplos de inhibidores de la vía de TGFβ/activina incluyen, pero no se limitan a: inhibidores del receptor de TGF beta, inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3, inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD 4, y activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7. Además, las categorizaciones descritas a continuación son simplemente con fines organizativos y un experto en la técnica sabría que los compuestos pueden afectar uno o más puntos dentro de una vía y, por lo tanto, los compuestos pueden funcionar en más de una de las categorías definidas.

45 Los inhibidores del receptor de TGF beta pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes y ARNip o ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a los receptores de TGF beta. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero no se limitan a, SU5416; clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butyl-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (SB-505124); lerdelimumb (CAT-152); metelimumab (CAT-192); GC-1008; ID11; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; Gleevec; 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin); activina-M108A; P144; TBR2-Fc soluble; y células tumorales transfectadas antisentido que se dirigen a los receptores de TGF beta. (Véase, por ejemplo, Wrzesinski, et al., Clinical Cancer Research 13(18):5262-5270 (2007); Kaminska, et al., Acta Biochimica Polonica 52(2):329-337 (2005); y Chang, et al., Frontiers in Bioscience 12:4393-4401 (2007).)

Los inhibidores de la fosforilación de SMAD 2/3 pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a SMAD2 o SMAD3. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen PD169316; SB203580; SB-431542; LY364947; A77-01; y 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona (Morin). (Véase, por ejemplo, Wrzesinski, *supra*; Kaminska, *supra*; Shimanuki, et al., Oncogene 26:3311-3320 (2007); y Kataoka, et al., EP1992360.)

55 Los inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD4 pueden incluir anticuerpos, variantes negativas dominantes y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a SMAD2, SMAD3 y SMAD4. Los ejemplos específicos de inhibidores de la interacción de SMAD 2/3 y SMAD4 incluyen, pero no se limitan a, Trx-SARA, Trx-xFoxH1b y Trx-Lef1. (Véase, por ejemplo, Cui, et al., Oncogene 24:3864-3874 (2005) y Zhao, et al., Molecular Biology of the Cell, 17:3819-3831 (2006).)

60 Los activadores/agonistas de SMAD 6 y SMAD 7 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, variantes dominantes

negativas y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a SMAD 6 o SMAD 7. Los ejemplos específicos de inhibidores incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos PTO smad7-as. (Véase, por ejemplo, Miyazono, et al., US6534476, y Steinbrecher, et al., US2005119203.)

5 Los ejemplos de inhibidores de HDAC pueden incluir anticuerpos que se unen, variantes negativas dominantes y ARNip y ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a HDAC. Los inhibidores de HDAC incluyen, pero no se limitan a, TSA (tricostatina A) (véase, por ejemplo, Adcock, British Journal of Pharmacology 150:829-831 (2007)), VPA (ácido valproico) (véase, por ejemplo, Munster, et al., Journal of Clinical Oncology 25:18S (2007): 1065), butirato de sodio (NaBu) (véase, por ejemplo, Han, et al., Immunology Letters 108:143-150 (2007)), SAHA (ácido hidroxamínico de suberoilánilida o vorinostat) (véase, por ejemplo, Kelly, et al., Nature Clinical Practice Oncology 2:150-157 (2005)),  
 10 fenilbutirato de sodio (véase, por ejemplo, Gore, et al., Cancer Research 66:6361-6369 (2006)), depsipéptido (FR901228, FK228) (véase, por ejemplo, Zhu, et al., Current Medicinal Chemistry 3(3):187-199 (2003)), trapoxina (TPX) (véase, por ejemplo, Furumai, et al., PNAS 98(1):87-92 (2001)), péptido que contiene ácido hidroxamínico cíclico 1 (CHAP1) (véase, Furumai *supra*), MS-275 (véase, por ejemplo, Carninci, et al., WO2008/126932), LBH589 (véase, por ejemplo, Goh, et al., WO2008/108741) y PXD101 (véase, Goh, *supra*). En general, a nivel global, las células pluripotentes tienen más acetilación de histonas, y las células diferenciadas tienen menos acetilación de histonas. La acetilación de histonas también participa en la regulación de la metilación de histona y ADN. En algunos casos, los inhibidores de HDAC facilitan la activación de genes de pluripotencia silenciados.

20 Los ejemplos de inhibidores de ERK incluyen PD98059 (véase, por ejemplo, Zhu, et al., Oncogene 23:4984-4992 (2004)), U0126 (véase, Zhu, *supra*), FR180204 (véase, por ejemplo, Otori, Drug News Perspective 21(5):245-250 (2008)), sunitinib (véase, por ejemplo, Ma, et al., US2008004287), sorafenib (véase, Ma, *supra*), Vandetanib (véase, Ma, *supra*), pazopanib (véase, Ma, *supra*), Axitinib (véase, Ma, *supra*) y PTK787 (véase, Ma, *supra*).

25 Una vez que se han introducido casetes de expresión en las células y/o las células se han puesto en contacto con uno o más agentes, las células pueden analizarse, opcionalmente, para determinar las características de las células madre pluripotentes, identificando de ese modo las células que son pluripotentes en una mezcla. Dichas células pueden aislarse, por ejemplo, de las otras células y usarse adicionalmente, según sea apropiado.

### III. Células no pluripotentes

30 Tal como se usa en la presente memoria, "células no pluripotentes" se refiere a células de mamíferos que no son células pluripotentes. Los ejemplos de dichas células incluyen células diferenciadas así como células progenitoras. Los ejemplos de células diferenciadas incluyen, pero no se limitan a, células de un tejido seleccionado de médula ósea, piel, músculo esquelético, tejido adiposo y sangre periférica. Los ejemplos de tipos de células incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, hepatocitos, mioblastos, neuronas, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos T.

En algunos casos en que se va a tratar a un individuo con las células pluripotentes resultantes, se usan células no pluripotentes propias del individuo para generar células pluripotentes.

35 Las células pueden ser, por ejemplo, de mamíferos no humanos o humanos. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, gatos, perros, conejos, cobayos, hámsteres, ovejas, cerdos, caballos y bovinos.

### IV. Transformación

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

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

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

#### A. Vectores de plásmidos

50 Se contempla el uso de un vector de plásmido para transformar una célula hospedadora. En general, los vectores de plásmidos que contienen un replicón y secuencias de control que derivan de una especie compatible con la célula hospedadora se utilizan en conexión con estos hospedadores. El vector puede contener un punto de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas.

#### B. Vectores virales

La capacidad de determinados virus para infectar células o ingresar a las células a través de endocitosis mediada por

receptor e integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes virales de manera estable y eficiente los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños a las células (por ejemplo, células de mamíferos). A continuación, se describen ejemplos no limitantes de vectores virales que pueden usarse para administrar un ácido nucleico.

5 **i. Vectores adenovirales**

Un método particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica se contrarresta con la alta eficacia de la transferencia génica proporcionada por estos vectores. Se pretende que el “vector de expresión de adenovirus” incluya las construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción y (b) expresar finalmente una construcción específica de tejido o célula que ha sido clonada en esta. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus de ADN de cadena doble lineal de ~36 kb permite la sustitución de grandes fragmentos de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus et al., Seminar in Virology, 200(2):535-546, 1992)).

15 **ii. Vectores AAV**

El ácido nucleico puede introducirse en la célula mediante el uso de transfección asistida por adenovirus. Se ha reportado un aumento en las eficiencias de transfección en los sistemas celulares mediante el uso de sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher and Vos, Biotechniques, 17(6):1110-7, 1994; Cotten et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89(13):6094-6098, 1992; Curiel, Nat Immun, 13(2-3):141-64, 1994.). El virus adenoasociado (AAV) es un sistema de vectores atractivo, ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células que no se dividen, lo que lo hace útil para la transmisión de genes a células de mamíferos, por ejemplo, en cultivos de tejidos (Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97-129, 1992) o in vivo. Los detalles relativos a la generación y uso de vectores rAAV se describen en las patentes de los Estados Unidos n.º 5,139,941 y 4,797,368.

25 **iii. Vectores retrovirales**

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

Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico (por ejemplo, un gen de codificación de interés) en el genoma viral en el lugar de determinadas secuencias virales para producir un virus con deficiencia de replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env, pero sin los componentes LTR y de empaquetamiento (Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc junto con las secuencias de empaquetamiento y LTR retroviral en una línea celular especial (por ejemplo, mediante precipitación con fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite que la transcripción de ARN del plásmido recombinante sea empaquetada en partículas de virus, que luego se secretan en los medios de cultivo (Nicolas y Rubinstein, en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, págs. 494-513, 1988; Temin, en: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), Nueva York: Plenum Press, págs. 149-188, 1986; Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983). Los medios que contienen los retrovirus recombinantes se recolectan, opcionalmente se concentran y se usan para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales pueden infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable típicamente involucran la división de las células hospedadoras (Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey et al., Nat Biotechnol, 15(9):871-875, 1997; Blomer et al., J Virol., 71(9):6641-6649, 1997; las patentes estadounidenses n.º 6,013,516 y 5,994,136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de inmunodeficiencia de simio: VIS. Los vectores lentivíricos se han generado mediante la atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, se eliminan los genes env, vif, vpr, vpu y nef, lo que hace que el vector sea biológicamente seguro.

Los vectores lentivirales recombinantes pueden infectar células que no se dividen y se pueden usar para la transferencia de genes tanto in vivo como ex vivo y la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide en la que una célula hospedadora adecuada se transfecta con dos o más vectores que poseen las funciones de empaquetamiento, a saber, gag, pol y env, así como rev y tat se describen en la patente estadounidense n.º 5,994,136. Se puede dirigir el virus recombinante mediante el enlace de la proteína de la envoltura con un anticuerpo o un ligando particular para que se dirija a un receptor de un tipo de célula particular. Al insertar una secuencia (que incluye una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector pasa a ser específico de la diana.

#### iv. Administración mediante el uso de virus modificados

Un ácido nucleico a ser administrado puede alojarse dentro de un virus infeccioso que ha sido diseñado para expresar un ligando de unión específico. Por lo tanto, la partícula del virus se unirá específicamente a los receptores cognados de la célula diana y administrará el contenido a la célula. Se desarrolló un nuevo enfoque diseñado para permitir el direccionamiento específico de vectores de retrovirus en función de la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la envoltura viral. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglicoproteínas.

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

#### C. Administración de vectores y transformación celular

Se cree que los métodos adecuados para la administración de ácido nucleico para la transformación de una célula, un tejido o un organismo para su uso con la presente invención incluyen virtualmente cualquier método mediante el cual un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) puede introducirse en una célula, un tejido o un organismo, como se describe en la presente memoria o como puede conocer un experto en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, administración directa de ADN tal como mediante transfección ex vivo (Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989; Nabel and Baltimore, Nature 326:711-713, 1987), opcionalmente, con Fugene6 (Roche) o Lipofeciamina (Invitrogen), mediante inyección (patentes estadounidenses n.º 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 and 5,580,859), que incluye microinyección (Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099, 1985; patente estadounidense n.º 5,789,215); mediante electroporación (patente estadounidense n.º 5,384,253; Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986; Potter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984); mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973; Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987; Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990); mediante el uso de DEAE-dextrano seguido por polietilenglicol (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985); mediante carga sónica directa (Fechheimer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982; Fraley et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987; Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980; Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989; Kato et al., J Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, Biochemistry, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987); y una combinación de dichos métodos.

#### V. Cultivo de células

Las células que se inducirán a la pluripotencia pueden cultivarse según cualquier método conocido en la técnica. Las pautas generales se pueden encontrar, por ejemplo, en Maherali, et al., Cell Stem Cell 3:595-605 (2008).

En algunos casos, las células se cultivan en contacto con células de alimentación. Los ejemplos de células de alimentación incluyen, pero no se limitan a, células de fibroblastos, por ejemplo, células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Los métodos para cultivar células en células de alimentación son conocidos en la técnica.

En algunos casos, las células se cultivan en contacto en ausencia de células de alimentación. Las células, por ejemplo, se pueden unir directamente a una superficie de cultivo sólida (por ejemplo, una placa de cultivo), por ejemplo, a través de un enlace molecular. Los inventores han descubierto que el cultivo de células inducidas a la pluripotencia tiene una eficiencia mucho mayor de la inducción a la pluripotencia (es decir, una mayor parte de las células logra la pluripotencia) cuando las células se unen directamente a la superficie de cultivo sólida en comparación con la eficiencia de las células tratadas de forma idéntica que se cultivan en células de alimentación. Los ejemplos de enlaces moleculares incluyen, pero no se limitan a, matrigel, una matriz extracelular (ECM), análogos de la MEC, laminina, fibronectina o colágeno. Los expertos en la técnica, sin embargo, reconocerán que esta es una lista no limitante y que se pueden usar otras moléculas para unir células a una superficie sólida. Los métodos para la unión inicial de los enlaces a la superficie sólida son conocidos en la técnica.

Tal como se usa en esta sección de "cultivo", "las células que se inducirán a la pluripotencia" se inducen por cualquier método en la técnica, lo que incluye, pero no se limita a, los métodos descritos en esta solicitud.

#### VI. Usos para células pluripotentes

La presente descripción permite el estudio adicional y el desarrollo de tecnologías de células madre, que incluyen, pero no se limitan a, usos profilácticos o terapéuticos. Por ejemplo, en algunos casos, las células de la descripción (ya sea células pluripotentes o células inducidas para diferenciarse a lo largo de un destino celular deseado) se introducen en individuos que lo necesitan, los que incluyen, pero no se limitan a, individuos que necesitan la regeneración de un órgano, tejido, o tipo de célula. En algunos casos, las células se obtienen originalmente en una biopsia de un individuo; se inducen a la pluripotencia como se describe en la presente memoria, se inducen opcionalmente a diferenciación

(por ejemplo, en una célula progenitora deseada particular) y luego se trasplantan de nuevo en el individuo. En algunos casos, las células se modifican genéticamente antes de su introducción en el individuo.

En algunos casos, las células pluripotentes generadas según los métodos de la descripción se inducen posteriormente para formar, por ejemplo, células hematopoyéticas (células madre/progenitoras), células neuronales (células madre/progenitoras) (y opcionalmente, células más diferenciadas, como neuronas de subtipo específico, oligodendrocitos, etc.), células pancreáticas (por ejemplo, células progenitoras endocrinas o células que expresan la hormona pancreática), hepatocitos, células cardiovasculares (células madre progenitoras) (por ejemplo, cardiomiocitos, células endoteliales, células del músculo liso), células retinales, etc.

Se conocen diversos métodos para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en los tipos de células deseados. Una lista no limitante de publicaciones de patentes recientes que describen métodos para inducir la diferenciación de células madre en varios destinos celulares se presenta a continuación: publicaciones de patente estadounidense 2007/0281355; 2007/0269412; 2007/0264709; 2007/0259423; 2007/0254359; 2007/0196919; 2007/0172946; 2007/0141703; 2007/0134215.

Se puede mejorar una variedad de enfermedades mediante la introducción y, opcionalmente, el direccionamiento de células pluripotentes de la descripción a un tejido lesionado particular. Los ejemplos de enfermedades resultantes de lesiones tisulares incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de neurodegeneración, infarto cerebral, enfermedad vascular obstructiva, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema pulmonar, bronquitis, enfermedad pulmonar intersticial, asma, hepatitis B (daño hepático), hepatitis C (daño hepático), hepatitis alcohólica (daño hepático), cirrosis hepática (daño hepático), insuficiencia hepática (daño hepático), pancreatitis, diabetes mellitus, enfermedad de Crohn, colitis inflamatoria, glomerulonefritis por IgA, glomerulonefritis, insuficiencia renal, decúbito, quemadura, herida sutural, laceración, herida de incisión, herida por mordedura, dermatitis, queloide cicatricial, queloide, úlcera diabética, úlcera arterial y úlcera venosa.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria (por ejemplo, uno o más de un polipéptido Klf, un polipéptido Oct, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox) son agentes terapéuticos útiles solos, o en combinación como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los polipéptidos, o combinaciones de ellos, son útiles para reducir el daño tisular y, por lo tanto, pueden administrarse para tratar, mejorar o prevenir el daño tisular. En algunos casos, un compuesto se administra a un individuo que tiene, o corre el riesgo de tener daño tisular en un órgano interno. Los órganos internos incluyen, pero no se limitan a, cerebro, páncreas, hígado, intestino, pulmón, riñón o corazón, heridas, por ejemplo, por quemadura o corte. Por ejemplo, en algunos casos, los compuestos son eficaces para reducir el tamaño del infarto en la reperfusión después de la isquemia. Por lo tanto, se puede administrar una proteína a individuos que tienen, con riesgo de tener o que han tenido un derrame cerebral. De manera similar, se puede administrar una proteína a individuos que tienen, con riesgo de tener o que han tenido un ataque cardíaco o daño cardíaco.

Los agentes descritos en la presente memoria (por ejemplo, un agente que inhibe la metilación de H3K9; un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC, o un inhibidor de Erk) también son agentes terapéuticos útiles solos, o en combinación entre sí como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los agentes, o combinaciones de ellos, son útiles para reducir el daño tisular y, por lo tanto, pueden administrarse para tratar, mejorar o prevenir el daño tisular. En algunos casos, un agente se administra a un individuo que tiene, o corre el riesgo de tener daño tisular en un órgano interno. Los órganos internos incluyen, pero no se limitan a, cerebro, páncreas, hígado, intestino, pulmón, riñón o corazón, heridas, por ejemplo, por quemadura o corte. Por ejemplo, en algunos casos, los agentes son eficaces para reducir el tamaño del infarto en la reperfusión después de la isquemia. Por lo tanto, se puede administrar una agente a individuos que tienen, con riesgo de tener o que han tenido un derrame cerebral. De manera similar, se puede administrar un agente a individuos que tienen, con riesgo de tener o que han tenido un ataque cardíaco o daño cardíaco.

Los compuestos activos descritos en la presente memoria también incluyen las sales, hidratos, solvatos y formas de profármacos ellos. Los compuestos también incluyen los isómeros y metabolitos de ellos. Algunos de los compuestos poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; se pretende que se incluyan los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales. Por ejemplo, el compuesto puede ser el isómero R o el isómero S, o una mezcla de ellos. Además, el compuesto puede ser el isómero E o el isómero Z, o una combinación de ellos.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos ácidos son sales formadas con bases, a saber, sales catiónicas tales como sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, así como sales de amonio, tales como amonio, trimetilamonio, dietilamonio, y sales de tris-(hidroximetil)-metil-amonio. En algunos casos, la presente descripción proporciona la sal de clorhidrato. En otros casos, el compuesto es clorhidrato de elipticina.

De manera similar, las sales de adición de ácido, tales como los ácidos minerales, ácidos carboxílicos orgánicos y ácidos sulfónicos orgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, también son posibles siempre que un grupo básico, tal como piridilo, forme parte de la estructura.

Las formas neutras de los compuestos pueden regenerarse al poner en contacto la sal con una base o ácido y al aislar el compuesto original de la forma convencional. La forma original del compuesto puede diferir de las diversas formas de sales en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en solventes polares, pero en otros aspectos las sales equivalen a la forma original del compuesto para los fines de la presente descripción.

- 5 Los compuestos pueden elaborarse mediante una variedad de métodos conocidos por el experto en la técnica (véase, Comprehensive Organic Transformations Richard C. Larock, 1989). Un experto en la técnica apreciará que otros métodos para elaborar los compuestos son útiles en la presente descripción.

10 La administración de células o compuestos descritos en la presente descripción se realiza mediante cualquiera de las vías utilizadas normalmente para introducir productos farmacéuticos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte mediante las composiciones particulares que se administran, así como mediante el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente descripción (véase, *por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985)).

15 Las formulaciones adecuadas para su administración incluyen soluciones acuosas o no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, soluciones tamponadas, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, nasal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intratecal o en el ojo (por ejemplo, mediante inyección o gotas oculares). Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes cerrados de dosis unitarias o dosis múltiples, tales como ampollas y viales. Pueden prepararse soluciones y suspensiones a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo previamente descrito. Los moduladores también pueden administrarse como parte de un alimento o fármaco preparado.

20 La dosis administrada a un paciente debe ser suficiente para inducir una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, es decir, para mejorar una afección del sujeto. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la eficacia del modulador específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, y la posible combinación con otro fármaco. El tamaño de la dosis también se determinará según la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que acompañe la administración de un compuesto o vector particular en un paciente particular. La administración se puede lograr mediante dosis divididas o únicas.

### **VII. Detección de agentes que inducen el desarrollo de células madre pluripotentes**

La presente descripción proporciona métodos para detectar agentes que pueden "reemplazar" uno de los cuatro factores de transcripción de iPS (es decir, un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox), o alternativamente pueden reemplazar un polipéptido Oct, un polipéptido Klf o un polipéptido Sox en células en donde Myc no es necesario para reprogramar las células en células pluripotentes (Nakagawa, M. et al. Nature Biotechnol. 26, 101-106 (2007); Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. & Jaenisch, R. Cell Stem Cell 2, 10-12 (2008)) o alternativamente mejoran la eficiencia de la inducción a la pluripotencia.

En algunos casos, los métodos comprenden la introducción de uno o más casetes de expresión para la expresión de al menos uno, pero no todos, de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox en células no pluripotentes para generar células transfectadas; poner en contacto posteriormente las células transfectadas con una biblioteca de agentes diferentes; detectar las características de las células madre pluripotentes en las células en contacto; y correlacionar el desarrollo de las características de las células madre con un agente particular de la biblioteca, identificando de ese modo un agente que estimula la desdiferenciación de las células en células madre pluripotentes. En algunos casos, las células se ponen en contacto con al menos uno de un agente que inhibe la metilación de H3K9; un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk, así como uno o más miembros de una molécula pequeña u otra biblioteca de agentes para identificar un miembro de la biblioteca que induce o mejora la inducción de células a la pluripotencia. Por lo tanto, en la presente se proporcionan mezclas de células no pluripotentes y al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) de un agente que inhibe la metilación de H3K9; un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk.

Los agentes en la biblioteca pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los agentes de prueba serán péptidos y moléculas químicas pequeñas. Esencialmente, se puede usar cualquier compuesto químico como agente potencial en los ensayos de la descripción, aunque la mayoría de las veces se usan compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos están diseñados para detectar grandes bibliotecas químicas mediante la automatización de las etapas del ensayo y el suministro de compuestos de cualquier fuente

conveniente para los ensayos, que generalmente se ejecutan en paralelo (*por ejemplo*, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que hay muchos proveedores de compuestos químicos, que incluyen Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

- 5 En algunos casos, los métodos de detección de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria de productos químicos o péptidos que contiene una gran cantidad de posibles agentes de reemplazo de iPS (que pueden actuar para reemplazar una de las proteínas de iPS). Dichas "bibliotecas químicas combinatorias" se analizan en uno o más ensayos, como se describe en la presente memoria, para identificar los miembros de la biblioteca (especies químicas particulares o subclases) que muestran una actividad característica deseada, es decir, como la inducción de características de células madre pluripotentes en células que expresan algunos, pero no todos, de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados ya sea por síntesis química o por síntesis biológica, mediante la combinación de una serie de "componentes básicos" químicos, como los reactivos. Por ejemplo, se forma una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos combinando un conjunto de componentes básicos químicos (aminoácidos) en todas las formas posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, la cantidad de aminoácidos en un compuesto de polipéptidos). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos.

La preparación y detección de bibliotecas químicas combinatorias es conocida por los expertos en la técnica. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (*véase, por ejemplo*, la patente estadounidense 5,010,175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493 (1991) y Houghton et al., Nature 354:84-88 (1991)). También se pueden utilizar otras técnicas químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Dichas técnicas químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (*por ejemplo*, publicación PCT n.º WO 91/19735), péptidos codificados (*por ejemplo*, publicación PCT WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (*por ejemplo*, publicación PCT n.º WO 92/00091), benzodiazepinas (*por ejemplo*, patente estadounidense n.º 5,288,514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos viniligos (Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de glucosa (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., Science 261:1303 (1993)), y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell et al., J. Org. Chem. 59:658 (1994)), bibliotecas de ácido nucleico (*véase* Ausubel, Berger y Sambrook, todos *supra*), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (*véase, por ejemplo*, la patente estadounidense 5,539,083), bibliotecas de anticuerpos (*véase, por ejemplo*, Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14(3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (*véase, por ejemplo*, Liang et al., Science, 274:1520-1522 (1996) y la patente estadounidense 5,593,853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (*véase, por ejemplo*, benzodiazepines, Baum C&EN, ene 18, pág. 33 (1993); isoprenoides, patente estadounidense 5,569,588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente estadounidense 5,549,974; pirrolidonas, patentes estadounidenses 5,525,735 y 5,519,134; compuestos de morfolino, patente estadounidense 5,506,337; benzodiazepinas, 5,288,514, y similares).

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

Las células que se pusieron en contacto con los agentes y, opcionalmente, expresaron algunos, pero no todos, de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc y un polipéptido Sox (*por ejemplo*, combinaciones de uno, dos o tres de un polipéptido Oct, un polipéptido Klf, un polipéptido Myc, y un polipéptido Sox), se pueden analizar para detectar el desarrollo de células pluripotentes, *por ejemplo*, al detectar una o más características de células madre pluripotentes. Los análisis iniciales pueden diseñarse mediante la transformación de las células a analizar con un casete de expresión que comprende elementos promotores que se sabe que se activan en células madre pluripotentes (opcionalmente, pero no en otras células) enlazadas operativamente a un marcador seleccionable o identificable de otra manera. *Por ejemplo*, se puede usar un marcador detectable, como GFP u otro sistema indicador. Los ejemplos de elementos promotores que se sabe que se activan en células pluripotentes incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras de Oct4, Nanog, SSEA1 y ALP. Las células también pueden analizarse para detectar la expresión de otros marcadores de células pluripotentes (*por ejemplo*, mediante inmunofluorescencia, etc.) como se conocen en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, Nanog, SSEA1 y ALP. En algunos casos, se examina la morfología celular.

En algunos casos, las células se cultivan en presencia de un inhibidor de la quinasa MAPK/ERK (MEK). Los inventores han descubierto que la presencia de un inhibidor de MEK da como resultado tanto la inhibición del crecimiento de células no pluripotentes como la estimulación del crecimiento de células madre pluripotentes. *Por lo tanto*, este efecto magnifica la "señal" del análisis y permite una detección más eficiente y sensible de agentes que inducen la reprogramación de las células en células madre pluripotentes. Se conoce una amplia variedad de inhibidores de MEK, que incluyen, pero no se limitan a, PD0325901 (*véase, por ejemplo*, Thompson, et al., Current Opinion in Pharmacology

5(4): 350-356 (2005)); inhibidor de MEK U0126 (Promega), ARRY-886 (AZD6244) (Array Biopharma); PD98059 (Cell Signaling Technology); y Amino-tio-acrilonitrilos (patente estadounidense n.º 6,703,420). Otros inhibidores de MEK se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,696,440 y WO 04/045617, entre otros.

#### **VIII. Mezclas celulares**

5 Tal como se describe en la presente memoria, la presente descripción proporciona células no pluripotentes en una mezcla con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk. En algunos casos, el compuesto está en la mezcla en una concentración suficiente para inducir o mejorar la eficiencia de la inducción a la pluripotencia. Por ejemplo, en algunos casos, los compuestos están en una concentración de al menos 0,1 nM, por ejemplo, al menos 1, 10, 100, 1000, 10.000 o 100.000 nM, por ejemplo, entre 0,1 nM y 100.000 nM, por ejemplo, entre 1 nM y 10.000 nM, por ejemplo, entre 10 nM y 10.000 nM. En algunos casos, las mezclas están en un recipiente sintético (por ejemplo, un tubo de ensayo, una placa de Petri, etc.). Por lo tanto, en algunos casos, las células son células aisladas (no parte de un animal). En algunos casos, las células se aíslan de un animal (humano o no humano), se colocan en un recipiente, en contacto con uno o más compuestos como se describe en la presente memoria. Las células se pueden cultivar posteriormente y, opcionalmente, se pueden volver a insertar en el mismo animal o en un animal diferente, opcionalmente después de que las células hayan sido estimuladas para convertirse en un tipo o linaje de células particular.

20 Como se explica en la presente memoria, en algunos casos, las células comprenden un casete de expresión para la expresión heteróloga de al menos uno o más de un polipéptido Oct, un polipéptido Myc, un polipéptido Sox y un polipéptido Klf. En algunos casos, las células no incluyen un casete de expresión para expresar ninguno de los polipéptidos Oct, Myc, Sox o Klf. Las células con o sin dichos casetes de expresión son útiles, por ejemplo, en métodos de detección tal como se describe en la presente memoria.

25 Los ejemplos de células no pluripotentes incluyen, pero no se limitan a, células de un tejido seleccionado de médula ósea, piel, músculo esquelético, tejido adiposo y sangre periférica. Los ejemplos de tipos de células incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, hepatocitos, mioblastos, neuronas, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos T.

La presente descripción también proporciona mezclas (con, u opcionalmente sin células) de un agente que inhibe la metilación de H3K9 (que incluye, pero no se limita a, BIX-01294) con un compuesto seleccionado de al menos uno de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK57receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk. En algunos casos, el agente y al menos uno de los compuestos enumerados anteriormente se encuentran en una concentración como la descrita anteriormente. Tales mezclas son útiles, por ejemplo, como "premezclas" para la inducción de la pluripotencia en las células.

#### **IX. Kits**

La presente descripción también proporciona kits, por ejemplo, para uso en la inducción o mejora de la eficiencia de la inducción de pluripotencia en células. Dichos kits comprenden uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un agente que inhibe la metilación de H3K9, un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk. En algunos casos, los kits comprenden un agente que inhibe la metilación de H3K9 (que incluye, pero no se limita a, BIX-01294) y un segundo compuesto (separado o mezclado con un agente que inhibe la metilación de H3K9) seleccionado de al menos uno de un agonista del canal de Ca tipo L; un activador de la vía de cAMP; un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT); un ligando de receptores nucleares; un inhibidor de GSK3; un inhibidor de MEK, un inhibidor de ALK57receptor de TGFβ, un inhibidor de HDAC; o un inhibidor de Erk.

En algunos casos, los kits comprenden, además, células no pluripotentes. Los ejemplos de células no pluripotentes incluyen, pero no se limitan a, células de un tejido seleccionado de médula ósea, piel, músculo esquelético, tejido adiposo y sangre periférica. Los ejemplos de tipos de células incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, hepatocitos, mioblastos, neuronas, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos T.

#### **Ejemplo**

##### **Ejemplo 1**

Para identificar las condiciones que pueden reemplazar la transducción viral de los factores de transcripción oncogénicos (por ejemplo, cMyc y Oct4 (Hochedlinger, K. et al., Cell 121, 465-477 (2005)) y para mejorar la eficiencia de la reprogramación, se buscó explotar la combinación de dos enfoques: uno era examinar un tipo de célula progenitora definida basado en la idea de que determinadas células progenitoras adultas accesibles pueden expresar de forma endógena, a un nivel determinado, algunos de los genes necesarios para inducir la pluripotencia y/o los locus de estos genes pueden estar menos silenciados, de modo que dichas células progenitoras puedan reprogramarse de

manera más eficiente y/o con menos manipulaciones genéticas; el otro enfoque era detectar pequeñas moléculas que podrían reemplazar la integración viral de un factor de transcripción específico y/o promover el proceso de reprogramación.

5 Entre las diversas células madre/progenitoras adultas a las que puede accederse desde diferentes tejidos, inicialmente se enfocaron los esfuerzos en las células progenitoras neuronales por las siguientes razones: (i) En contraste con el cultivo heterogéneo de fibroblastos primarios (por ejemplo, MEF) que puede contener varios tipos de células madre/progenitoras, las células progenitoras neuronales son una población de células relativamente definida y pueden expandirse mediante clonación en condiciones químicamente definidas. (ii) Las células progenitoras neuronales expresan de forma endógena genes específicos Sox (por ejemplo, Sox1 o Sox2) que, aunque se encuentran en un nivel más bajo que la sobreexpresión, podrían ser suficientes para generar células iPS. (iii) Las células progenitoras neuronales o células que expresan genes Sox pueden aislarse de otros tejidos (Fernandes, K. J. L. et al., Nature Cell Biology 6, 1082-1093 (2004); Seaberg, R. M. et al., Nature Biotechnol. 22, 1115-1124 (2004)) y expandirse *in vitro*. Por lo tanto, las células progenitoras neuronales representan un sistema de modelo excelente para abordar las preguntas anteriores en el proceso/mecanismo de reprogramación. Para establecer una fuente ilimitada, altamente reproducible y definida de células progenitoras neuronales que se pueden usar en análisis de alto rendimiento, se optó por el uso de células progenitoras neuronales derivadas de mESC que contienen un indicador de GFP-IRES-Puro/GiP bajo el control de elementos reguladores de Oct4, ya que las mESCs se pueden cultivar en gran cantidad y su diferenciación en una población homogénea de células progenitoras neuronales está bien definida (Conti, L. et al., PLoS Biol. 3, e283 (2005)), así como la actividad indicadora validada (Ying, Q. L. et al., Nature 416, 545-548 (2002)) puede facilitar la detección en los ensayos.

Las células progenitoras neuronales indicadoras se generaron mediante el uso de un protocolo bien establecido mediante la diferenciación de las mESCs Oct4-GiP cultivadas en monocapa en gelatina en una condición de medio/CDM químicamente definida en ausencia de suero y otros factores de crecimiento/citoquinas a baja densidad celular durante ocho días, seguido de la formación de neuroesferas y el pasaje en serie posterior en células individuales en medios de expansión de células neuronales complementados con 10 ng/ml de bFGF y EGF en monocapa durante más de seis pasajes/24 días. Las células progenitoras neuronales resultantes fueron homogéneas por la morfología celular y la expresión del marcador neuronal, y se confirmó que eran negativas para GFP y sensibles a la puromicina. Dichas células progenitoras neuronales colocadas en placas en monocapa en medios de cultivo de mESC convencionales se transdujeron con combinaciones de cuatro, tres o dos de los cuatro factores, seguido por el tratamiento de las células transducidas con moléculas pequeñas individuales de una pequeña colección de fármacos conocida en un formato típico de 6 pocillos. El tratamiento con el compuesto y el cultivo continuaron durante diez días adicionales antes de agregar la puromicina. La cantidad de colonias verdes y resistentes a la puromicina se contó el día 14. En comparación con las células neuronales transducidas con cuatro genes solos como control positivo, las condiciones de los compuestos que generaron más colonias verdes que las condiciones de gen solo correspondientes se seleccionaron como coincidencias primarias. Para confirmar aún más estas condiciones de coincidencias primarias, se optó por usar un pasaje tardío de células progenitoras neuronales del SNC de ratón (Do, J. T. et al., Stem Cells 25, 1013-1020 (2007)) que se obtuvieron de cerebro fetal de ratones transgénicos OG2<sup>+/+</sup>/ROSA26<sup>+/+</sup> (que contienen un indicador Oct4-GFP) y se expandieron en monocapa con la misma condición neuronal de CDM que la anterior con 10 ng/ml de bFGF y EGF. Dichas células realmente de un tejido no pluripotente no podrían presentar problemas de contaminación de cualquier célula ES en el sistema de detección anterior, lo cual es altamente improbable con todos los controles apropiados. Se realizaron condiciones de cultivo y ensayos de reprogramación similares mediante el uso de las células progenitoras neuronales OG2, excepto que no se usó puromicina y se seleccionaron colonias verdes y se caracterizaron mediante tinción de Nanog, SSEA1 y ALP. Se descubrió que casi todas las colonias verdes que se pueden identificar el día 12-14 se pueden expandir a células iPS estables a largo plazo que no pueden distinguirse de las mESC clásicas por morfología y expresión típica de marcadores de pluripotencia.

Primero, se enfocaron los esfuerzos de caracterización en dos nuevas condiciones que podrían reconfirmarse mediante el uso de las células progenitoras neuronales fetales. Al igual que la hipótesis de que determinadas células progenitoras específicas del tejido con expresión endógena de determinados genes de reprogramación relevantes pueden requerir una manipulación genética menos exógena para generar células iPS, se descubrió que la transducción viral de Oct4 y Klf4 juntos es suficiente para generar células iPS a partir de células progenitoras neuronales en 10-14 días. Si bien dicha eficiencia de reprogramación (1-2 colonias de GFP cada  $3,5 \times 10^4$  células) es más baja que las condiciones con transducción viral adicional de Sox2 y cMyc (8-10 colonias de GFP cada  $3,5 \times 10^4$  células) (Figura 1), es interesante que la cinética de reprogramación mediante los dos genes solos (Oct4 y Klf4) no es significativamente más lenta que la de los cuatro genes originales. Esto contrasta con las observaciones recientes de que omitir cMyc en la generación de células iPS a partir de MEF es significativamente más lento (por ejemplo, 2 semanas adicionales) que la condición que tiene sobreexpresión de cMyc, incluso los fibroblastos embrionarios expresan cMyc de forma endógena. Lo más interesante es que se encontró una molécula pequeña, BIX01294 (Kubicek, S. et al., Molecular Cell 25, 473-481 (2007)) que inhibe específicamente G9a (una histona metiltransferasa para H3K9me2), puede mejorar significativamente la eficiencia de reprogramación o un nivel más alto que el uso de transducción viral de los cuatro factores, mientras que no se acorta significativamente la cinética de reprogramación. El evento de reprogramación generalmente se analiza por la capacidad de identificar las colonias de células iPS, que está influenciada por muchos factores, que incluyen los métodos de cultivo celular, la identificación y/o selección de células, así como el tipo de célula de entrada, la cantidad y la cinética y eficiencia de reprogramación. Por consiguiente,

un requisito para cualquier gen dado para la reprogramación se relaciona con esa configuración específica y depende en gran medida de la eficiencia/cinética de la reprogramación. En este sentido, esta molécula pequeña individual, BIX01294, reemplazó funcionalmente la transducción viral de cMyc y Sox2 en gran medida.

5 Las colonias de células GFP + iPS aparecieron fácilmente 12 días después de que las células progenitoras neuronales OG2 se transdujeron con retrovirus de Oct4/Klf4 y se trataron con BIX01294. Las células iPS del día 14 generadas a partir de la transducción viral de Oct4-Klf4 y el tratamiento con BIX01294 se pueden expandir fácilmente en la condición de cultivo de mESC convencional en células de alimentación de MEF en presencia de LIF sin el requisito de un tratamiento continuo con BIX01294. Las células iPS generadas mediante la transducción viral de Oct4/Klf4 y el tratamiento con BIX01294 pueden autorenovarse a largo plazo en los alimentadores de MEF en los medios de cultivo de mESC sin el tratamiento continuo con BIX01294. Crecen como colonias compactas y ovaladas. Estas células iPS mantienen la morfología característica de la colonia de mESC, expresan de forma homogénea marcadores de pluripotencia típicos en un nivel comparable al de mESC, que incluyen Oct4, Nanog, SSEA1 y ALP mediante inmunocitoquímica, histotinción y análisis mediante RT-PCR. Además, dichas células iPS, que se han pasado en serie durante 10 pasajes, pueden diferenciarse de manera eficaz en neuronas características ( $\beta$ III-tubulina), que superan los cardiomiocitos (troponina cardíaca) y células pancreáticas o hepáticas (Pdx1 o Albúmina), derivados de las tres capas germinales primarias en métodos de diferenciación dirigida o cuerpo embrionario estándar. Y aun más importante, dichas células iPS pueden incorporarse eficientemente en la ICM de un blastocisto después de la agregación con un embrión de 8 células, producir un quimerismo de alto grado después de que los embriones agregados se trasplantaron en ratones y contribuir a la línea germinal *in vivo*. Estas caracterizaciones *in vitro* e *in vivo* confirman que las células iPS generadas mediante la transducción viral de Oct4 y Klf4 con tratamiento simultáneo con BIX01294 no son morfológicamente, funcionalmente y, por la expresión típica de marcadores de pluripotencia, distinguibles de las células iPS de los cuatro factores originales y mESC clásicos.

Una pregunta es si la expresión de Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc, independientemente de la forma endógena o exógena, sería un requisito previo para generar células iPS. De manera interesante, estudios recientes de reprogramación sobre la generación de células iPS humanas a partir de fibroblastos han demostrado que la expresión exógena de Klf4 y cMyc son funcionalmente intercambiables con Nanog y Lin28, la expresión de Oct4 y Sox2 parece ser necesaria hasta ahora para todos los estudios de células iPS publicados. De manera interesante, encontramos que la transducción viral de Klf4, Sox2 y cMyc con el tratamiento simultáneo con BIX01294 en ausencia de la expresión de Oct4 también puede generar células iPS (Figura 2) mientras que la transducción viral de tales tres factores/KSM solos no produjo ninguna colonia de células iPS en estas condiciones de ensayo. De manera similar, dichas células iPS generadas por KSM-BIX01294 pueden expandirse de manera estable y autorenovarse a largo plazo en alimentadores MEF en condiciones de cultivo de mESC convencionales en pasajes sin BIX01294, mantener las características morfológicas de mESC, expresar de forma homogénea marcadores de pluripotencia típicos, que incluyen ALP, Oct4, Nanog y SSEA1, y diferenciarse en células en las tres capas germinales *in vitro*. Se debe tener en cuenta que la eficiencia de reprogramación en ausencia de la expresión de Oct4 es relativamente baja.

Finalmente, se observa que la aplicación de un inhibidor específico de molécula pequeña de MEK, PD0325901, en la etapa tardía de la reprogramación (por ejemplo, después de la activación de Oct4-GFP) puede servir como una excelente estrategia de selección para generar células iPS. Debido a la muy baja eficiencia de la reprogramación, las células iPS normalmente se seleccionan mediante el uso de un indicador (por ejemplo, Neo/Puro o GFP) que está bajo el control de los elementos reguladores de un marcador de pluripotencia mediante el uso de líneas celulares somáticas modificadas genéticamente, o se seleccionan manualmente en función de la morfología celular. Si bien el último método aplicable a las células genéticamente no modificadas es más adecuado para la aplicación clínica definitiva de las células iPS, esta es una técnica mucho más tediosa y menos confiable que normalmente requiere recoger y propagar en varios pasajes muchas colonias, solo una pequeña fracción de las cuales se convertiría en células iPS verdaderas de manera eficiente. Esto se debe en parte a que ese gran porcentaje de colonias de aspecto similar pueden ser células reprogramadas parcialmente o simplemente células transformadas, que crecen rápidamente y pueden interferir con el cultivo y la reprogramación de las células iPS. Por consiguiente, sería altamente conveniente tener una estrategia de selección alternativa para las células genéticamente no modificadas. Se descubrió que PD0325901 inhibe el crecimiento de células no iPS mientras que promueve efectivamente el crecimiento y la reprogramación estable de células iPS, lo que produce colonias de células iPS más grandes y más homogéneas. Esta observación podría deberse en parte al mecanismo que requiere la actividad de MEK para la evolución del ciclo celular de las células somáticas, mientras que las mESC carecen de dicha restricción para el crecimiento, y la inhibición de MEK también inhibe la diferenciación de las mESC (lo que contribuye a una mayor estabilización del estado de las células iPS).

55 Los resultados presentados en la presente tienen una serie de implicaciones importantes. (1) El nivel de expresión endógeno más bajo (que la sobreexpresión) de los genes fundamentales necesarios para la reprogramación mediante las células somáticas (progenitoras específicas del tejido) puede ser suficiente para reemplazar la expresión del gen exógeno correspondiente mediante la transducción viral para generar células iPS. Esto apunta a una estrategia alternativa de generar células iPS a partir de células somáticas que utilizan menos manipulación genética al explotar células prácticamente accesibles que expresan de forma endógena determinados genes de reprogramación relevantes a través de una especificidad de tejido intrínseca y/o manipulación de cultivo *ex vivo*. (2) Esta es una demostración de prueba del concepto de que las moléculas pequeñas pueden identificarse a partir de análisis basados en células diseñadas racionalmente para reemplazar funcionalmente la transducción viral de determinados factores

de transcripción, mejorar la eficiencia de reprogramación o servir como condición de selección para generar células iPS. Dicho enfoque farmacológico para reemplazar la manipulación genética específica no solo puede reducir sustancialmente los riesgos asociados a la inserción de oncogenes (por ejemplo, cMyc y Oct4) y la mutagénesis de inserción, sino que también ofrece la posibilidad de permitir un proceso de reprogramación altamente controlado y altamente eficiente mediante moléculas pequeñas definidas. Esto es especialmente importante para el estudio del mecanismo molecular de la reprogramación, que en la actualidad es en gran parte intratable debido a su muy baja eficiencia y cinética lenta. (3) En relación con el enfoque de ganancia de función en la generación de células iPS, el uso altamente eficaz de esos inhibidores de moléculas pequeñas específicas sugiere que la pérdida de función de genes específicos puede ser al menos igualmente importante y eficaz para generar células iPS. Más importante aún, la función de BIX01294 define un mecanismo/objetivo epigenético específico, es decir, la inhibición de H3K9me2 mediada por G9a, en la generación de células iPS. Esto es consistente con los hallazgos previos de que la metilación de H3K9 represiva está asociada con la inactivación de Oct4 durante la diferenciación (Feldman, N. et al., *Nature Cell Biology* 8, 188-194 (2006)), y la metilación de la lisina de la histona, aunque es sólida, es dinámica y está regulada por HMTasas y lisina desmetilasas. BIX01294 puede funcionar para facilitar el cambio del equilibrio epigenético de un estado silenciado de Oct4 a una transcripción activa. (4) Ejemplificada mediante el uso del inhibidor de MEK para la selección fácil de células iPS, la explotación de las diferencias entre células somáticas y ESC mediante moléculas pequeñas representa una estrategia alternativa/atractiva para seleccionar células iPS. Finalmente, es posible que las estrategias y las moléculas pequeñas informadas en la presente memoria puedan explorarse más a fondo para obtener mejores enfoques y una mejor comprensión mecánica de la generación de células iPS, y combinarlas con moléculas pequeñas adicionales (que pueden reemplazar la función de los factores de transcripción transducidos restantes y mejorar la reprogramación), así como otros métodos no genéticos (por ejemplo, transducción de proteínas) para finalmente permitir la generación de células iPS con alta eficiencia en una condición completamente definida químicamente sin ninguna modificación genética.

#### Métodos.

**Cultivo de células progenitoras neuronales.** Las células progenitoras neuronales se obtuvieron de mESC o cerebros fetales de ratón según el protocolo informado por Conti et al (Conti, L. et al., *PLoS Biol.* 3, e283 (2005)). En resumen, las mESC se colocaron en una placa recubierta con gelatina al 0,1 % a  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en el medio de inducción neuronal (DMEM al 50 %/medio basal de F12, medio neurobasal al 50 %, 0,5X N2, 0,5X B27, Glutamax IX, BSA 50 µg/ml) y se diferenciaron durante 7-8 días. Las rosetas neuronales formadas se tripsinizaron luego en células individuales y se colocaron nuevamente en una placa de fijación ultra baja (Corning) para formar una neuroesfera en el medio de expansión de células progenitoras neuronales (DMEM/F12, 1X N2, bFGF 10 ng/ml, EGF 10 ng/ml, BSA 50 µg/ml). Después de tres días en suspensión, las neuroesferas se volvieron a unir a una placa recubierta de gelatina y se diferenciaron adicionalmente durante 4-6 días antes de que se pasaran de nuevo en células individuales y se cultivaran en monocapa en placas recubiertas de gelatina en el medio de expansión de células progenitoras neuronales durante más de 5-6 pasajes.

Se generaron neuroesferas de cerebros fetos heterocigotos ROSA26/OG2 de 12,5 a 16,5 dpc tal como se describió anteriormente (Do, J. T. et al., *Stem Cells* 25, 1013-1020 (2007)). En resumen, la corteza se diseccionó, se disoció enzimáticamente y se pasó a través de una malla de nylon de 70 µm (Falcon; Franklin Lakes, NJ). Las células neuronales se purificaron adicionalmente mediante centrifugación en sacarosa 0,9 M en HBSS 0,5x a 750 g durante 10 min y en BSA al 4 % en solución de EBSS a 200 g durante 7 min. Dichas células se cultivaron adicionalmente en suspensión para formar neuroesferas y posteriormente se pasaron en serie en monocapa sobre placas recubiertas de gelatina en el medio de expansión de células progenitoras neuronales tal como se describió anteriormente. Los experimentos con animales se aprobaron y se realizaron según las Pautas de Protección Animal del Gobierno de Max Planck Society, Alemania.

**Transducción de retrovirus.** Se clonó ADNc murinos para Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc en el vector retroviral pMSCV y se verificaron mediante secuenciación. Los vectores retrovirales basados en pMX se obtuvieron de Addgene. La producción de virus y la transducción se realizaron como se describe en 2-3.

**Inducción de células iPS a partir de células progenitoras neuronales.** Células progenitoras neuronales de ratón OG2 primarias o derivadas de mESC se colocaron en placas de 6 pocillos recubiertas con Matrigel (1:50, BD Biosciences) a  $3,5 \times 10^4$  células/pocillo en los medios de expansión de células progenitoras neuronales. Después de un día, estas células se transdujeron con retrovirus durante la noche, y el medio se cambió a medio de cultivo de mESC [DMEM, FBS al 5 %, KSR al 10 %, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco), L-glutamina 2 mM], B-mercaptoetanol 0,1 mM (Gibco) y LIF  $10^3$  unidades/ml (Chemicon)] con o sin BIX01294 (0,5-1 µM). Las colonias de células iPS positivas para GFP aparecieron después de 9-14 días, y se seleccionaron y expandieron en células de alimentación MEF con el medio de cultivo de mESC.

**Ensayos de caracterización.** La tinción de ALP se realizó según las instrucciones del kit de detección de fosfatasa alcalina (Chemicon). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se lavaron tres veces con PBS y luego se incubaron en PBS que contenía TritonX-100 al 0,3 % (Sigma) y suero de burro normal al 10 % (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con anticuerpo primario durante la noche a 4 °C: anticuerpo anti-Oct4 de ratón, anticuerpo anti-SSEA1 de ratón (1:200, Santa Cruz), anticuerpo anti-Sox2 de conejo (1:200, Chemicon), anticuerpo anti-Nanog de conejo (AbCam), anti-Pdx1 de conejo

(1:200, del Dr. C. Wright), anticuerpo anti- $\beta$ III-tubulina de ratón (1:500, Covance), anti-troponina T cardíaca de ratón (1:200, DSHB), anticuerpo anti-albúmina de conejo (DAKO). Después del lavado, las células se incubaron adicionalmente con anticuerpos secundarios: Alexa Fluro555 de burro anti-IgG de ratón o Alexa Fluro555 de burro anti-IgG de conejo (1:500, Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos fueron detectados mediante tinción DAPI (Sigma). Las imágenes fueron capturadas por Nikon TE2000-U.

**Agregación de células iPS con embriones sin zona.** Las células iPS se agregaron con embriones en etapa de ocho células postcompactas desprovistas para obtener quimera agregada. Se cultivaron embriones de ocho células (B6C3F1) obtenidos de hembras a 2,5 dpc en microgotas de medio KSOM (FCS al 10 %) en aceite mineral. Se seleccionaron grupos de células iPS (10-20 células) después del tratamiento corto de tripsina y se transfirieron a microgotas que contenían embriones de ocho células sin zona. Se cultivaron embriones de ocho células agregadas con células iPS durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Los blastocistos agregados desarrollados a partir de la etapa de ocho células se transfirieron a un cuerno uterino de una receptora pseudopreñada de 2,5 dpc.

### Ejemplo 2

Se pueden inducir células somáticas en células madre pluripotentes (iPSC) con una combinación de cuatro factores de transcripción, Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc u Oct4/Sox2/Nanog/LIN28. Esto proporciona una plataforma que permite obtener células específicas del paciente para diversas aplicaciones terapéuticas y de investigación. Sin embargo, sigue habiendo varios problemas para que este enfoque sea terapéuticamente relevante debido a inconvenientes asociados con la eficiencia y la integración del genoma viral. Como se explicó anteriormente, las células progenitoras neuronales (NPC) transducidas con Oct4/Klf4 se pueden reprogramar en iPSC. Sin embargo, las NPC expresan Sox2 de forma endógena, lo que posiblemente facilita la reprogramación en ausencia de Sox2 exógeno. En este estudio, se identificó una combinación de moléculas pequeñas, BIX-01294 y BayK8644, que permite la reprogramación de los fibroblastos embrionarios de ratón transducidos con Oct4/Klf4, que no expresan de forma endógena los factores esenciales para la reprogramación. Este estudio demuestra que las moléculas pequeñas identificadas a través de un análisis fenotípico pueden compensar la transducción viral de factores fundamentales, como Sox2, y mejorar la eficiencia de la reprogramación.

El objetivo de este ejemplo es evaluar si las moléculas pequeñas pueden reemplazar la transducción viral específica para obtener iPSC de un linaje celular general, en el que no se expresa ninguno de los TF que se consideran esenciales para la reprogramación, Oct4, Sox2 y Klf4. Por lo tanto, se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Encontrar una molécula pequeña que pueda reemplazar uno de estos TF en la inducción de la reprogramación de MEF podría conducir a la identificación de vías generales involucradas en este proceso. Dicha estrategia química podría ser más susceptible de aplicación terapéutica. En consecuencia, seleccionamos una colección de fármacos conocidos para identificar moléculas pequeñas que pueden permitir la generación de iPSC a partir de MEF transducidas con OK, y por lo tanto, podrían compensar la falta de sobreexpresión de Sox2. A través de los diferentes análisis realizados, se identificó que una combinación de BIX con Bayk8644 (BayK), un agonista del canal L de calcio (Schramm, M. et al., Nature, 303:535-537 (1983)) fue una de las más eficaces. Bayk fue de interés porque ejerce su efecto corriente arriba en las vías de señalización celular, y no causa directamente modificaciones epigenéticas. Es probable que este tipo de molécula, como BayK o activadores de la vía de señalización Wnt (Marson, A. et al., Cell Stem Cell, 3:132-135 (2008)), puedan explotarse para inducir la reprogramación de una manera más específica que las moléculas que actúan directamente en el nivel epigenético y que causan la modificación de ADN o histonas. Ya se ha demostrado que algunos de estos modificadores epigenéticos facilitan el proceso de reprogramación, tal como BIX (Shi, Y. et al., Cell Stem Cell, 2:525-528 (2008)), ácido valproico (Huangfu, D. et al., Nat Biotechnol, 26:795-797 (2008)) y 5' azacitidina (Mikkelsen, T. et al., Nature, 454:49-55 (2008)).

Este presente estudio demuestra que las moléculas pequeñas identificadas a través de un análisis fenotípico se pueden usar para compensar efectivamente la transducción viral de otro TF fundamental de iPSC, Sox2, que no se expresa de forma endógena en los fibroblastos. Además, esto destaca la contribución importante que los análisis de moléculas pequeñas finalmente proporcionarán para el descubrimiento de nuevos mecanismos y objetivos moleculares involucrados en procesos biológicos complicados, como la reprogramación.

### Resultados

***El análisis fenotípico conduce al descubrimiento de moléculas pequeñas que permiten la reprogramación de MEF cuando se transduce con solo dos TF.***

Se usaron MEF no modificados derivados de embriones E13-14 de los 129 ratones para el análisis inicial. Los MEF se colocaron en Matrigel a 3,5x10<sup>4</sup> células/pocillo de una placa de 6 pocillos y se transdujeron con OK (vectores retrovirales que expresan Oct4 y Klf4) solo. En un período de 14-21 días, las células tratadas se evaluaron para determinar la aparición de colonias que tenían la morfología de colonias de células madre embrionarias (ESC) característica y eran positivas para el marcador de pluripotencia fosfatasa alcalina (ALP). Dichas células transducidas con OK generaron solo unas pocas colonias pequeñas no compactas, que fueron débilmente positivas para la expresión de ALP. Estas colonias aparecieron inicialmente en los 21 días posteriores a la transducción viral y fueron difíciles de expandir. Por lo tanto, dicho sistema de ensayo ofrecía un fondo limpio para la identificación de moléculas pequeñas con una actividad inductora de reprogramación deseable. Mediante el uso de este sistema, se seleccionaron

los compuestos de una biblioteca de alrededor de 2000 moléculas pequeñas conocidas (ver Procedimientos experimentales más adelante) y se identificaron como coincidencias cuando indujeron la aparición de colonias de ESC que eran muy positivas para ALP dentro de 14-21 días después del tratamiento. Este método basado en imágenes proporcionó una evaluación más precisa de la reprogramación en comparación con un ensayo homogéneo basado en indicadores. BIX pareció tener el efecto más fuerte con la inducción reproducible de más de 1-2 colonias compactas de tipo ESC con alta expresión de ALP. Se observó que cuando los MEF se trataron con BIX después de la transducción viral con OK, las colonias compactas con fuerte expresión de ALP se podían detectar fácilmente en aproximadamente 14-21 días. Estas células también fueron positivas para la expresión de Nanog, Oct4 y SSEA-1. Este resultado, obtenido con un tipo de célula más general, que no expresa de forma endógena ninguno de los tres genes de reprogramación esenciales, validó aún más la observación previa de que BIX tiene una actividad inductora de reprogramación fuerte y la inhibición de la G9a HMTasa puede facilitar la reprogramación (Shi, Y. et al., Cell Stem Cell, 2:525-528 (2008)). Sin embargo, la eficiencia de reprogramación en los MEF transducidos con OK y tratados con BIX fue aún baja, alrededor de 2 colonias/ $3,5 \times 10^4$  células, en comparación con la reprogramación inducida por cuatro factores de los MEF o la reprogramación NPC BIX/OK (Shi, Y. et al., Cell Stem Cell, 2:525-528 (2008)). Por lo tanto, se realizó un segundo análisis mediante el uso de un protocolo similar, pero donde se agregó BIX a los medios basales después de la transducción viral con OK. Esto proporcionó una plataforma más permisiva para identificar nuevas moléculas pequeñas que podrían mejorar aún más la eficiencia de la reprogramación. Más importante aún, este segundo análisis podría facilitar el descubrimiento de moléculas pequeñas que impactan en la reprogramación de una manera más específica, por ejemplo, al actuar sobre las vías de transducción de señales en lugar de las enzimas modificadoras de histonas o ADN. En este segundo análisis, se analizó nuevamente la biblioteca de alrededor de 2000 moléculas pequeñas conocidas (ver los Procedimientos Experimentales) y se confirmaron dos compuestos que pudieron actuar de forma sinérgica con BIX para mejorar la reprogramación según los criterios del análisis. Un ejemplo es RG108, un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT) (Brueckner, B. et al., Cancer Res, 65:6305-6311 (2005)), que mejoró la reprogramación de MEF transducidos con OK en presencia de BIX (Figura 3). Sin embargo, de manera similar a BIX, se sabe que RG108 afecta a las células a un nivel epigenético general, y otro inhibidor de la ADN metiltransferasa, 5-azacitidina, ya ha demostrado mejorar la reprogramación (Mikkelsen, T.S. et al., Nature, 454:49-55 (2008)). Por lo tanto, RG108 no se siguió para este estudio. En su lugar, caracterización fenotípica y funcional se centró en otra molécula pequeña que se identificó en el segundo análisis, BayK, un agonista del canal L de calcio. Esta molécula pequeña, que mostró el efecto más fuerte en el análisis, además de los modificadores conocidos de ADN/histonas, se estudió más a fondo porque no tiene una actividad de reprogramación observable en los MEF transducidos con OK en ausencia de BIX y no se sabe que afecte las células directamente en el nivel epigenético, sino más bien al nivel de transducción de la señal celular. Por lo tanto, BayK podría desempeñar un papel más específico en el proceso de reprogramación. Cuando 129 MEF fueron transducidos con retrovirus vacío (control negativo), no se observaron colonias. Cuando 129 MEF fueron transducidos con OK sin moléculas pequeñas; pocas colonias aplanadas pequeñas con expresión débil de ALP estuvieron presentes. Se observaron colonias de iPSC similares a la ESC 14-21 días después de que 129 MEF se transdujeron con OK y se trataron con BIX/BayK; estas colonias similares a ESC mostraron una fuerte expresión de ALP. Cuando los MEF transducidos con OK se trataron con BIX en combinación con BayK, se pudo observar un aumento significativo en la cantidad de colonias ALP<sup>+</sup> que se parecían mucho a la morfología del mESC (~7 colonias) en comparación con MEF transducidos con OK tratados con BIX solo (~2 colonias). La caracterización adicional de estas colonias primarias de iPSC mostró que eran positivas para marcadores de pluripotencia típicos, como Oct4, Sox2, Nanog y SSEA1, según lo determinado por inmunofluorescencia.

***Las iPSC obtenidas de MEF transducidos con OK y tratados con BIX/BayK tienen propiedades de pluripotencia características de mESC.***

Para confirmar y caracterizar aún más que la transducción con OK y el tratamiento con BIX/BayK pueden inducir a los MEF a convertirse en iPSC, se utilizaron MEF primarios derivados de ratones transgénicos OG2<sup>+/+</sup>/ROSA26<sup>+/+</sup> (OG2), que contenían un indicador de Oct4-GFP (Do, J.T. and Scholer, H.R., Stem Cells, 22:941-949 (2004)). Una vez reprogramadas, estas células podrían utilizarse para evaluar convenientemente la competencia de la quimera y la línea germinal. De manera similar a los 129 MEF, los MEF OG2 transducidos con OK podrían generar iPSC cuando se tratan con una combinación de BayK/BIX (iPSC OK2B) (Figura 3). Las colonias de iPSC GFP<sup>+</sup> se pudieron detectar por primera vez en el día 14-21 después de la transducción viral y el tratamiento del compuesto. Cuando los MEF OG2 se transdujeron con OK y no se trataron con ningún compuesto, solo aparecieron unas pocas colonias pequeñas para un promedio de  $0,5 \pm 0,7$  colonias cada  $3,5 \times 10^4$  Células. Estas colonias eran difíciles de someter a pasaje y, por lo tanto, no se estudiaron más. El tratamiento de los MEF OG2 transducidos con OK y con BIX solo permitió la reprogramación de manera fácil y reproducible en comparación con el OK solo, con  $2,5 \pm 0,7$  colonias cada  $3,5 \times 10^4$  Células. Hubo otra mejora significativa en la eficiencia de la reprogramación cuando los MEF OG2 transducidos con OK se trataron con la combinación de BIX (2  $\mu$ M) y BayK (2  $\mu$ M), donde se observaron  $7,7 \pm 1,5$  colonias cada  $3,5 \times 10^4$  células (Figura 3). El tratamiento de los MEF OG2 transducidos con OK y con BayK solo, en ausencia de BIX, no aumentó la eficiencia de reprogramación por encima del control de MEF transducido con OK (no se muestran datos).

Se seleccionaron colonias OK2B y se expandieron en serie en células alimentadoras de MEF irradiadas en las condiciones de cultivo de mESC convencionales en ausencia de moléculas pequeñas durante más de 20 pasajes. La tinción y/o RT-PCR (Figura 4A) mostraron que estas iPSC OK2B GFP<sup>+</sup> expresaban marcadores de pluripotencia típicos, incluidos ALP, Nanog, Sox2, Oct4, SSEA1, c-Myc, eRas, Esg1, Ecat1 y Fgf4. El ensayo de RT-PCR también

demostró que las iPSC OK2B expresaban Oct4 y Klf4 endógenos (Figura 4A). Los análisis de secuenciación genómica de bisulfito del promotor Nanog revelaron que está desmetilado en iPSC OK2B de manera similar al control de mESC (R1), mientras que el promotor Nanog de los MEF estaba hipermetilado (Figura 4B). Este resultado sugiere además una reactivación del programa de transcripción de células madre en estas iPSC OK2B. Además, el análisis del transcriptoma mostró que el perfil de expresión de las iPSC OK2B es muy similar al de las mESC con un valor de correlación de Pearson de 0,96, mientras que es significativamente diferente al perfil de los MEF con un valor de correlación de Pearson de 0,84 como se ejemplifica en el análisis de agrupamiento.

Para la comparación del transcriptoma OK2B con las células mES y células de MEF, se llevó a cabo el análisis del transcriptoma. El ARN se extrajo de células iPS OK2B en el pasaje 13 mediante el uso del Mini Kit Qiagen RNAeasy. Los datos de expresión de ARN para las iPSC OK2B se generaron a partir de ARN poliA mediante el uso de matrices de genoma de ratón GeneChip 430 2.0 (Affymetrix). Los datos de expresión para células MEF y células MES se obtuvieron del sitio web de Gene Expression Omnibus (GEO) website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Número de registro de datos de las células mES: GSM198062, GSM198063 y GSM198064. Número de registro de datos de células MEF: GSM198070 y GSM198072. El preprocesamiento, la normalización (GC-RMA) y el agrupamiento jerárquico se realizaron mediante el uso de dChip (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>; (Métrica de distancia: correlación (Pearson); método de enlace: centroide; ordenamiento de genes: por ajuste del grupo). Valor p para iPSC OK2B versus células MEF: 0,84; iPSC OK2B versus células mES: 0,96. Los valores p se obtuvieron mediante el uso de una prueba de correlación de Pearson.

### ***Las iPSC OK2B se diferencian en células de las tres capas germinales y contribuyen a la transmisión de la línea germinal.***

Las iPSC OK2B podrían formar eficientemente cuerpos embrionarios (EB) en suspensión, que podrían diferenciarse en células endodérmicas (albúmina y Pdx1), células mesodérmicas/células del músculo cardíaco (CT3) y células/neuronas ectodérmicas ( $\beta$ III-tubulina, Tuj1), derivadas de las tres capas germinales primarias. Además, las iPSC OK2B podrían incorporarse de manera eficiente en la masa celular interna de un blastocisto luego de la agregación con un embrión de 8 células, y conducir al quimerismo con la contribución de la línea germinal *in vivo* después de que los embriones agregados se trasplantaron en ratones pseudopreñados. Además, el apareamiento de una progenie masculina adulta obtenida de estos blastocistos con un ratón hembra CD1 de tipo salvaje condujo a la producción de progenie LacZ<sup>+</sup>, tres de las cuales mostraron gónadas Oct4-GFP<sup>+</sup>, lo que valida aún más que estas iPSC podrían contribuir a la transmisión de la línea germinal. Estas caracterizaciones *in vitro* e *in vivo* confirman la transducción retroviral con solo dos genes, OK, y junto con el tratamiento con BIX/BayK son suficientes para reprogramar los MEF en iPSC, que son fenotípicamente y funcionalmente similares a las mESC clásicas.

### **Exposición**

Los estudios presentados en la presente memoria proporcionan una demostración de prueba de principio de que las moléculas pequeñas pueden identificarse a partir de análisis fenotípicos diseñados racionalmente para reemplazar funcionalmente la transducción viral de determinados TF, así como mejorar la eficiencia de reprogramación en la generación de iPSC a partir de un tipo de célula general, como MEF. Dicho enfoque químico para la generación de iPSC, que ofrece un control más preciso y temporal del objetivo/proceso, sería ventajoso sobre la manipulación genética con oncogenes que también puede introducir alteraciones genómicas de inserción dañinas y difíciles de detectar. Se están utilizando estrategias similares para encontrar moléculas pequeñas adicionales que puedan, en última instancia, permitir la reprogramación de células de linaje restringido en estado pluripotente o multipotente en una condición completamente definida químicamente. BIX se identificó y caracterizó originalmente como un inhibidor específico para la G9a HMTasa (Kubicek, S. et al., *Mol Cell*, 25:473-481 (2007)). Se ha demostrado que reduce los niveles de H3K9me2 en los genes diana G9a (Feldman, N. et al., *Nat Cell Biol*, 8:188-194 (2006)). De manera interesante, la metilación de la histona H3K9, mediada por G9a, y la heterocromatinización representan un mecanismo altamente específico para el silenciamiento epigenético de genes embrionarios como Oct4 y Rex1 (Feldman, N. et al., *Nat Cell Biol*, 8:188-194 (2006)). Además, también se demostró que la inactivación de G9a puede ayudar en la reprogramación basada en la fusión de células neuronales adultas (Ma, D.K. et al., *Stem Cells*, 26:2131-2141 (2008)). Por lo tanto, es apropiado que se haya observado previamente que BIX puede facilitar la generación de iPSC a partir de NPC transducidos con OK o Klf4/Sox2/c-Myc (Shi, Y. et al., *Cell Stem Cell*, 2:525-528 (2008)), lo que sugiere que se puede compensar la expresión exógena de Sox2 o Oct4. Sin embargo, los NPC ya expresan niveles significativos de Sox2, lo que podría hacer que estas células sean más susceptibles de reprogramarse en las condiciones mencionadas anteriormente. El presente estudio tuvo como objetivo identificar moléculas pequeñas que puedan permitir la reprogramación de MEF que no expresen ninguno de los TF que se consideran necesarios para la reprogramación. Fue fortuito que se haya identificado BIX en los análisis de NPC y MEF, y confirmar que esta molécula tiene una función de permitir y mejorar la generación de iPSC a partir de células somáticas. Dado el mecanismo de acción caracterizado de BIX, los estudios potencialmente identificaron una diana molecular cuya pérdida de función a través de la inhibición farmacológica es suficiente para compensar la ganancia de función de un gen de reprogramación de iPSC esencial. Además, vincula de manera mecánica un proceso epigenético específico, la inhibición de H3K9me2 mediada por G9a, con la generación de iPSC. BIX puede funcionar para facilitar el cambio del equilibrio epigenético de un estado silenciado de los genes de pluripotencia a una transcripción activa. Obviamente, la combinación de BIX con otras moléculas pequeñas modificadoras de la cromatina, que tienen diferentes objetivos y mecanismos de acción, como RG108, podría explotarse para una mejor reprogramación. Por otro lado, la observación de que BayK, con una

actividad caracterizada como un agonista específico del canal de calcio tipo L (Schramm, M. et al., Nature, 303:535-537 (1983)), mejora la eficiencia de reprogramación es intrigante. Se sabe que los canales de calcio tipo L median procesos intracelulares en diferentes tejidos, como la regulación de la presión arterial, la contractilidad del músculo liso, la secreción de insulina, el desarrollo cardíaco, etc. (Tosti, E., *Reprod Biol Endocrinol*, 4:26 (2006)). Además, se ha demostrado que la activación de los canales de calcio tipo L por diferentes agonistas, incluido BayK, induce la señalización intracelular a través de la activación de CREB, la liberación del retículo sarcoplásmico  $Ca^{2+}$ , y el cambio en la actividad de cAMP. Más importante aún, algunos informes sugieren que el calcio podría desempeñar un papel en el control de la proliferación de células mES (Heo, J.S. et al., *Am J Physiol Cell Physiol*, 290:C123-133 (2006)). Sin embargo, en este estudio, el tratamiento de células mES con BayK 2  $\mu$ M solo o en combinación con BIX 1  $\mu$ M no conduce a un cambio en la proliferación (Figura 5). Además, el tratamiento de MEF OG2 con BayK 2  $\mu$ M solo o en combinación con BIX 1  $\mu$ M no induce la expresión de SOX2 (Figura 6). No hace falta decir que se debe realizar más trabajo para analizar el mecanismo preciso mediante el cual BayK impacta el proceso de reprogramación. Sin embargo, es interesante encontrar que una pequeña molécula con actividad en las vías de señalización que no se han vinculado previamente a la reprogramación puede mejorar significativamente su eficiencia. Hasta ahora, es la primera molécula pequeña de su tipo, aparte de la proteína Wnt3 (Marson, A. et al., *Cell Stem Cell*, 3:132-135 (2006)), en mostrar un efecto en la reprogramación sin actuar directamente sobre los modificadores de la cromatina. Como hasta ahora, la mayoría de las otras moléculas pequeñas que se ha descubierto que impactan en la reprogramación parecen modificar directamente el estado epigenético de la célula: es decir, BIX (Shi, Y. et al., *Cell Stem Cell*, 2:525-528 (2008)), ácido valproico (Huangfu, D. et al., *Nat Biotechnol*, 26:795-797 (2008)) y 5'azacitidina (Mikkelsen, T.S. et al., *Nature*, 454:49-55 (2008)). Es importante destacar que BayK parece tener varias características importantes que serían, en última instancia, deseables para que una molécula sea terapéuticamente relevante para la reprogramación y/o regeneración in vivo. El hecho de que no actúe/reprograme por sí sola, sino que necesita la presencia de BIX para ejercer sus efectos, sugiere que las células que ya están experimentando una forma de reprogramación, quizás causada por una lesión, podrían ser más susceptibles a su efecto. Esto podría permitir, en última instancia, reprogramar la célula diana de una manera más específica, sin afectar las células sanas de manera sistémica, como lo podrían hacer los modificadores epigenéticos directos.

En resumen, se han identificado condiciones de moléculas pequeñas definidas, es decir, BIX, y combinaciones de BIX/BayK, o BIX/RG108, que pueden permitir y mejorar la reprogramación de fibroblastos en iPSC junto con la transducción de solo dos TF: Oct4 y Klf4. Este estudio confirma aún más la utilidad de un enfoque de análisis fenotípico en la identificación de moléculas pequeñas que pueden compensar efectivamente la transducción viral de un TF de iPSC esencial, como Sox2 en este estudio o Oct4 como se informó anteriormente (Shi, Y. et al., *Cell Stem Cell*, 2:525-528 (2008)). En última instancia, los análisis fenotípicos de moléculas pequeñas pueden conducir a la identificación de moléculas pequeñas que se convertirán en herramientas poderosas para proporcionar nuevos conocimientos sobre el proceso de reprogramación y, en última instancia, pueden ser útiles para la terapia y la biología de células madre in vivo.

## Procedimientos experimentales

### *Derivación de MEF*

Los MEF 129S2/SvPasCr1f o ROSA26<sup>+/-</sup>/OG2<sup>+/-</sup> se obtuvieron según el protocolo informado en el sitio web de WiCell Research Institute website: "Introduction to human embryonic stem cell culture methods." Los experimentos con animales se realizaron según las Pautas de protección animal de Max Planck Institute for Biomolecular Research, Alemania.

### *Transducción de retrovirus y compuestos*

Los vectores retrovirales basados en pMX para ratones Oct4, Klf4, c-Myc y Sox2 se obtuvieron de Addgene (Cambridge, MA). La producción viral y el proceso de transducción se realizaron como se describió (Takahashi, K. et al., *Cell*, 131:861-872 (2007)). La síntesis y caracterización completa del compuesto BIX-01294 fue como se describió anteriormente (Kubicek, S. et al., *Mol Cell*, 25:473-481 (2007)) y Bayk8644 se adquirió de EMD/Calbiochem Biochemical (San Diego, CA).

### *Análisis para generación de iPSC a partir de MEF*

Para los análisis primarios y secundarios, se utilizó una colección de compuestos conocidos. Esta colección estaba compuesta por aproximadamente 2000 moléculas bioactivas conocidas disponibles comercialmente, incluidos los fármacos aprobados por la FDA, inhibidores conocidos y activadores de enzimas caracterizadas (incluida la colección LOPAC de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Known Bioactive Library from BIOMOL (Plymouth Meeting, PA) y compuestos conocidos no superpuestos de EMD Calbiochem (San Diego, CA)).

MEF primarios 129S2/SvPasCr1f (análisis primario) o ROSA26<sup>+/-</sup>/OG2<sup>+/-</sup> (análisis secundario) MEF se colocaron en placas recubiertas con Matrigel (1:50; BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de  $3.5 \times 10^4$  células por pocillo de una placa de 6 pocillos. Veinticuatro horas después, estas células se transdujeron durante la noche con retrovirus definidos a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Doce a catorce horas más tarde, los medios de las células transducidas se cambiaron a medio mESC [DMEM inactivado, FBS calificado con ES al 10 %, reemplazo de suero inactivado al 10 %, Glutamax

al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, penicilina/estreptomina  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, nucleósidos calificados con EmbryoMax ESC al 1 % (Millipore, Temecula, CA) y LIF  $10^3$ U/ml (Millipore)] (todos los productos eran de Invitrogen, Carlsbad, CA, excepto donde se menciona). El mismo día, se agregaron moléculas pequeñas individuales de la colección de fármacos conocidos a las células en un intervalo entre 0,5 y 2  $\mu$ M. El tratamiento con compuesto se continuó durante 10-14 días; las células se fijaron y se tiñeron el día 14-21 mediante el uso de un kit de detección de ALP estándar (Millipore). Para el segundo análisis, se añadió BIX 1  $\mu$ M al medio mESC 1 día después de la transducción. Cinco días después, además de BIX 1  $\mu$ M, se añadió a cada pocillo una molécula pequeña individual de la colección de fármacos conocidos, en un intervalo entre 0,5 y 2  $\mu$ M. El medio ESC de ratón con moléculas pequeñas definidas se renovó cada tres días hasta que se observaron colonias con una morfología similar a las mESC, que generalmente se encontraba entre 14-21 días después de la transducción. Además de los compuestos confirmados, como se indica en el texto, las coincidencias primarias del segundo análisis sinérgico que no se continuaron incluyen también PD173074, reversina, 5'azacitidina, pluripotina y dexametasona. Otros estudios de caracterización y repeticiones se llevaron a cabo en MEF 129S2/SvPasCrif o ROSA26<sup>+/-</sup>/OG2<sup>+/-</sup>. Cuando se utilizaron MEF ROSA26<sup>+/-</sup>/OG2<sup>+/-</sup>, también se pudieron identificar colonias iPSC mediante la expresión de GFP, como un marcador de la expresión de Oct4. Una vez que se identificaron las colonias iPSC, se seleccionaron para la expansión en células alimentadoras de MEF en medio mESC. Algunas colonias se expandieron en presencia del inhibidor de MEK, PD0325901, a una concentración de 0,5-2  $\mu$ M para confirmar aún más su pluripotencialidad.

### **Ensayo de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia**

La tinción de ALP se realizó según las instrucciones del fabricante mediante el uso del kit de detección de fosfatasa alcalina (Millipore). Para el ensayo de inmunofluorescencia, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se lavaron con PBS. Luego se incubaron en amortiguador de bloqueo (BB) [Triton X-100 al 0,3 % (Sigma-Aldrich), suero de burro normal al 10 % (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) en PBS (Invitrogen)] 30 min a temperatura ambiente. Luego se incubaron con anticuerpo primario durante la noche a 4 °C en BB. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario en BB durante 45-60 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron: anti-Oct4 de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti-SSEAI de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Nanog de conejo (1:500) (Abcam Inc., Cambridge, MA), anti-Sox2 de ratón (1:200) (Millipore), anti-Pdx1 de conejo (1:200) (del Dr. C. Wright), anti- $\beta$ III-Tubulina de ratón (Tuj1) (1:500) (Covance Research Products Inc., Denver, PA), anti-troponina T cardíaca de ratón (CT3) (1:200) (Developmental Studies Hybridoma Bank en University of Iowa, Iowa City, IA), anti-albúmina de conejo (DAKO). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor555 de burro anti-IgG de ratón o de conejo (1:500) (Invitrogen). Los núcleos fueron detectados mediante tinción DAPI (Sigma-Aldrich). Las imágenes se capturaron mediante el uso de un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U/X-cite 120 EXFO con una cámara fotométrica CoolSnap HQ2.

### **Ensayos de RT-PCR**

El ARN se extrajo de iPSC y líneas celulares de control mediante el uso del mini kit RNeasy Plus en combinación con QIAshredder. El ARN se convirtió en ADNc mediante el uso del kit de síntesis iScriptTMcDNA (BioRad, Hercules, CA). La amplificación de genes específicos se realizó mediante el uso de cebadores publicados previamente (Takahashi, K. et al., Cell, 131:861-872 (2007); Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126:663-676 (2006)) y Platinum PCR SuperMix (Invitrogen) en una máquina de PCR Mastercycler con gradiente (Eppendorf).

### **Ensayo de metilación**

Se aisló ADN de células R1, MEF OG2 e iPSC OK (pasaje 10) mediante el uso del kit de aislamiento de ADN no orgánico (Millipore). Luego se trató el ADN para la secuenciación con bisulfito con el kit EZ DNA Methylation-Gold KitTM (Zymo Research Corp., Orange, CA). El ADN tratado se usó luego para amplificar secuencias de interés. Los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento del promotor fueron los publicados previamente (Blelloch, R. et al., Stem Cells, 24:2007-2013 (2006)). Los fragmentos resultantes se clonaron mediante el uso del kit de clonación TOPO TA para secuenciación (Invitrogen) y se realizó la secuenciación.

### **Agregación de iPSC con embriones sin zona**

Las iPSC se agregaron con embriones de ocho células en etapa postcompactas desprovistas para obtener quimeras agregadas. Se cultivaron embriones de ocho células (B6C3F1) obtenidos de hembras a 2,5 dpc en microgotas de medio KSOM (FCS al 10 %) en aceite mineral. Se seleccionaron grupos de iPSC (10-20 células) después del tratamiento corto de tripsina y se transfirieron a microgotas que contenían embriones de ocho células sin zona. Se cultivaron embriones de ocho células agregadas con células iPSC durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Los blastocistos agregados que se desarrollaron a partir de la etapa de ocho células se transfirieron a un cuerno uterino de una receptora pseudopreñada de 2,5 dpc. Se cruzó una quimera macho adulta con una hembra de ratón CD1 de tipo salvaje. La tinción con X-gal mostró que se generaron seis embriones F1 obtenidos de este apareamiento natural de ratón quimérico y ratón de tipo salvaje por transmisión de la línea germinal.

### **Análisis estadístico**

Los gráficos de barras y los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de una prueba t estándar en Excel.

**Análisis de micromatrices**

iPSC OK2B se cultivaron en medio celular mES completo en gelatina (Millipore, Temecula, CA) durante 2 días [DMEM inactivado, FBS calificado con ES al 10 %, reemplazo de suero inactivado al 10 %, Glutamax al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, penicilina/estreptomina β-mercaptoetanol 0,1 mM, nucleósidos calificados con EmbryoMax ESC al 1 % (Millipore) y LIF 10<sup>3</sup>U/ml (Millipore)] (todos los productos eran de Invitrogen, Carlsbad, CA, excepto donde se menciona). El ARN de los pocillos duplicados se aisló luego mediante el uso del Mini Kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA). Las muestras de ARN total se amplificaron y se marcaron con el kit mejorado de biotina MessageAmp II (Ambion, Austin, TX). Las muestras marcadas amplificadas se hibridaron luego con matrices de genoma de ratón 430 2.0 (Affymetrix) y el análisis se realizó mediante agrupamiento jerárquico (valores centrados en filas con transformación logarítmica de Pearson) mediante el uso de GenePattern (sitio web en: [broad.mit.edu/cancer/software/](http://broad.mit.edu/cancer/software/)).

**Ensayo de proliferación**

Las células mES R1 se colocaron en placas de 6 pocillos recubiertas de gelatina a una densidad de 2x10<sup>5</sup>células/pocillo en medio de células mES completo. Luego de la unión celular, aproximadamente 12 horas, las células se trataron con DMSO, BIX 1 μM, BayK 2 μM y una combinación de ambos, por triplicado. A las 15, 24 y 48 horas, las células se separaron mediante el uso de tripsina y se contaron mediante el uso de un hemocitómetro. Se utilizó azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para la exclusión de células muertas.

**Evaluación de la expresión de SOX2 después del tratamiento con compuesto**

Los MEF OG2<sup>+/+</sup>/ROSA26<sup>+/+</sup> se colocaron en placas de 6 pocillos con una densidad de 3,4x10<sup>4</sup>células por pocillo. El día siguiente, las células se trataron con DMSO, BIX 1 μM, BayK 2 μM y una combinación de ambos, por triplicado durante 6 días. El medio se cambió el día 3. El ARN de cada pocillo se aisló luego mediante el uso del Mini Kit RNAeasy (Quiagen). La transcripción inversa del ARN se realizó mediante el uso del kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad, Hercules, CA). La amplificación de Sox2 endógeno se realizó mediante el uso de cebadores publicados previamente (Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc 2, 3081-3089; Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676) con Platinum PCR SuperMix (Invitrogen) en una máquina de PCR Mastercycler® con gradiente (Eppendorf).

**Ejemplo 3**

Este ejemplo demuestra que la incubación de células de mamíferos con proteínas de factor de transcripción es suficiente para inducir la pluripotencia.

**30 Construcción de genes:**

Para obtener el alto nivel de expresión de proteínas en E. coli, en primer lugar, se optimizaron las cuatro regiones del codón del gen TF humano (G A Gutman and G W Hatfield (1989). PNAS. vol. 86.pp:3699-3703), y se sintetizó lo longitud completa mediante el uso de tecnología de ensamblaje de genes de PCR basada en ADN de oligo (Danilo R Casimiro, Peter E Wright & H Jane Dyson. (1997). Structure. Vol.5. págs: 1407- 1412.). Un marcador de poli-arginina: ESGGGGSPGRRRRRRRRRRR se agregó a cada proteína del extremo C en el diseño (Gump JM, Dowdy SF. (2007) Trends Mol Med. 2007 Oct;13(10):443-8). El fragmento de ADN final se flanqueó con los sitios NdeI y XhoI, y se insertó en los sitios NdeI-XhoI del vector de expresión pET41 para la expresión de proteínas. Cada plásmido se verificó con secuencia de ADN, luego se transformó en células competentes de inicio BL21 para la producción de proteínas recombinantes mediante el uso de medio de autoinducción durante la noche (Studier FW, (2005) Protein Expr Purif. 41(1). págs: 207-234.).

**Preparación de proteínas**

Las células Escherichia coli BL21 (DE3) se transformaron con pET-Oct4-PTD ("PTD" se refiere al dominio de transducción de proteínas), pET-Sox2-PTD, pET-Klf4-PTD y pET-c-Myc-PTD por separado, la expresión de proteínas se realizó mediante el método de autoinducción (Studier F.W., Protein Expression and Purification, 41 (2005) 207-234.). Los cuerpos de inclusión se solubilizaron y las proteínas se replegaron como se describe (LaFevre BM, Wu S. & Lin X. Molecular Cancer Therapeutics 7, 1420-1429, Junio 1, 2008. doi: 10.1158/1535-7163; Medynski D., Tuan M., Liu, W., Wu, S. & Lin, X. Protein Expression and Purification Vol. 52, 395-402, Abril 2007; Hou W., Medynski D., Wu, S., Lin, X. & Li, LY. Clinical Cancer Research Vol. 11, 5595-5602, Agosto 1, 2005).

En resumen, se inoculó E. coli que contenía un plásmido de expresión en 1,0 litros de caldo de Luria-Bertani que contenía kanamicina, se indujo con 500 μmol/L de IPTG a A600nm =0,6 y se agitó durante 3 horas a 37C. Las células se recogieron por centrifugación y el sedimento se sometió a ciclos de congelación y descongelación. Los cuerpos de inclusión liberados se lavaron extensivamente con un amortiguador que contenía tris20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, TritonX-100 al 1 % (pH 8,0) y se disolvieron en un amortiguador que contenía urea 8 mol/L, Tris 0,1 mol/L, glicina 1 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, β-mercaptoetanol 10 mmol/L, DTT 10 mmol/L, glutatión reducido 1 mmol/L, glutatión oxidado 0,1 mmol/L (pH 10) con A280 nm = 2,0. Los cuerpos de inclusión solubilizados se replegaron con un método de dilución rápida como se describe (Lin XL, Lin YZ, Tang J., Methods Enzymol 1994. 241. 195-224; Lin X, Koelsh G., Wu.S,

Downs D, Dashti A. Tang J. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97. 1556 - 1560; Kim YT. Downs D. Wu S, et al. Eur J Biochem 2002. 269: 5669 -77; Michelle LaFevre-Bernt, Shili Wu, y Xinli Lin. (2008). Molecular Cancer Therapeutics. 7: pp:1420-1429). La proteína replegada se concentró mediante ultrafiltración con N2 y se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de Sephacryl S 300. La concentración de endotoxina en cada una de las preparaciones de proteínas fue inferior a 100 UI/mg. La mayoría de las muestras de proteínas replegadas tienen una solubilidad de al menos > 1,5 mg/ml.

Las proteínas replegadas se concentraron mediante el uso de filtración de flujo tangencial, se purificaron mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño con una columna Superdex-200 (XK26x850-mm, GE, Piscataway, NJ) y se confirmaron mediante el uso de SDS-PAGE.

10 Los fibroblastos de ratón se cultivaron en medio mESC complementado con 8 µg/ml de Oct4/Sox2/Klf4 u Oct4/Sox2/Klf4/Myc (todas las proteínas comprendían poli-Arg como se describió anteriormente) durante 6-8 horas, se lavaron e incubaron durante 2-3 días en medios mESC sin los factores de transcripción enumerados anteriormente. Esto (4-12 horas con, 1-3 días sin) se repitió una cantidad de veces (1, 2, 3, 4 o más) y luego las células se cultivaron en mESC durante dos semanas. Al final de este período, se determinó que los cultivos contenían células pluripotentes por la morfología de la colonia y la expresión del marcador (no se muestran datos). En particular, se encontró que la incubación constante de las células con los factores de transcripción (es decir, sin el período de 1-3 días sin las proteínas) era tóxica para las células. Aunque no fue necesario, las células a veces se incubaron con el inhibidor de MEK (PD0325901) y/o el inhibidor de GSK (CHIR99021) y/o el inhibidor de TGFbeta (SB431542) y la presencia de estos agentes mejoró la eficiencia y la velocidad de desarrollo de las células pluripotentes.

20

**REIVINDICACIONES**

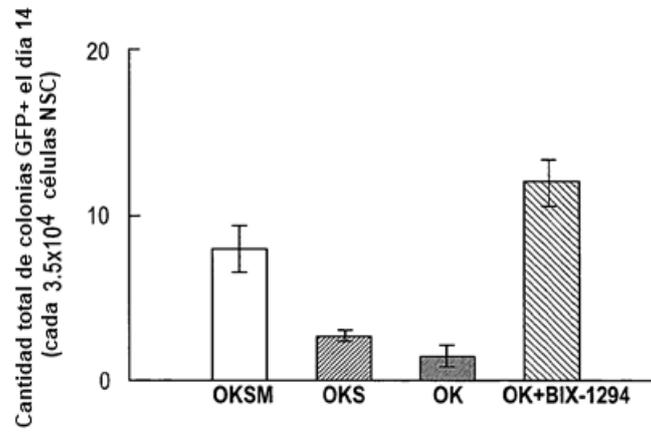
1. Un método *in vitro* o *ex vivo* para producir células madre pluripotentes inducidas a partir de células no pluripotentes de mamíferos, el método comprende:
- 5 (a) introducir en las células no pluripotentes de mamíferos (i) uno o más casetes de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; o (ii) uno o más polipéptidos que comprenden un polipéptido Oct4 exógeno; y
- (b) poner en contacto las células no pluripotentes de mamífero con un inhibidor de MEK; produciendo de ese modo células madre pluripotentes inducidas.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde (b) comprende, además, poner en contacto células no pluripotentes de mamífero con un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más casetes de expresión comprenden, además, un polinucleótido que codifica un polipéptido Myc.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más casetes de expresión comprenden, además, un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en donde las células no pluripotentes de mamífero son:
- células somáticas tales como células de fibroblastos;
  - células humanas; o
  - células progenitoras tales como células progenitoras neuronales, células progenitoras de la piel o células progenitoras del folículo piloso.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, que comprende, además,
- (c) seleccionar las células que presentan características de células madre pluripotentes.
7. El método de la reivindicación 1, en donde las células no pluripotentes de mamífero se obtienen de un animal; y las células madre pluripotentes inducidas se diferencian en un tipo de célula deseada.
- 25 8. Una mezcla *in vitro* o *ex vivo* de células de mamífero y un inhibidor de MEK, en donde se introducen (i) uno o más casetes de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; o (ii) uno o más polipéptidos que comprenden un polipéptido Oct4 exógeno en las células.
9. La mezcla de la reivindicación 8, en donde la mezcla comprende un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ.
10. La mezcla de la reivindicación 8, en donde las células:
- 30 - son células humanas;
- comprenden células progenitoras tales como células progenitoras neuronales, células progenitoras de la piel o células progenitoras del folículo piloso; o
  - son células no pluripotentes tales como células de fibroblastos.
- 35 11. Un método *in vitro* o *ex vivo* para inducir la expresión de Oct4 endógeno en una célula, en donde el método comprende,
- introducir (i) uno o más casetes de expresión que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido Oct4; o (ii) uno o más polipéptidos que comprenden un polipéptido Oct4 exógeno en la célula, y poner en contacto la célula con un inhibidor de MEK, induciendo de ese modo la expresión de Oct4 en la célula.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en donde la célula se pone en contacto con un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ALK5/receptor de TGFβ.
13. El método de la reivindicación 11, en donde uno o más casetes de expresión o el polipéptido Oct4 y opcionalmente uno o más de un polipéptido Sox2 y un polipéptido Klf4 se introducen en una célula que no es una célula pluripotente, y en donde la célula se induce a la pluripotencia después de la etapa de contacto.
- 45 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde: (a) el uno o más casetes de expresión comprenden uno o más de un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf y un polinucleótido que codifica un polipéptido Sox; o

(b) el uno o más polipéptidos comprenden uno o más de un polipéptido Sox exógeno y un polipéptido Klf exógeno.

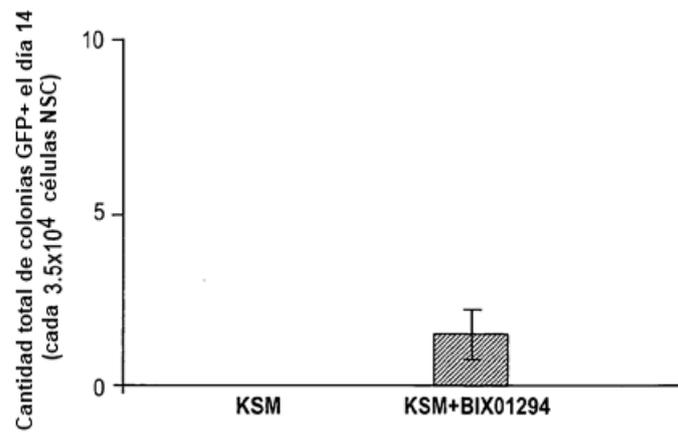
5 **15.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5-7 y 11-13, o la mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde: (a) el uno o más casetes de expresión comprenden uno o más de un polinucleótido que codifica un polipéptido Klf4 y un polinucleótido que codifica un polipéptido Sox2; o (b) el uno o más polipéptidos comprenden uno o más de un polipéptido Sox2 exógeno y un polipéptido Klf4 exógeno.

**16.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la célula no expresa de forma endógena Oct4 inmediatamente antes de la etapa de contacto.

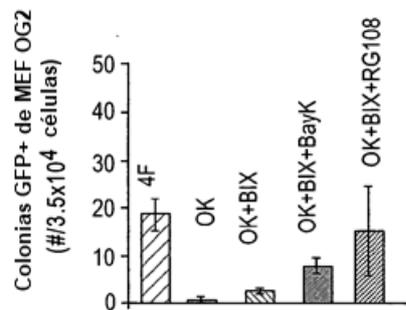
**FIG. 1**



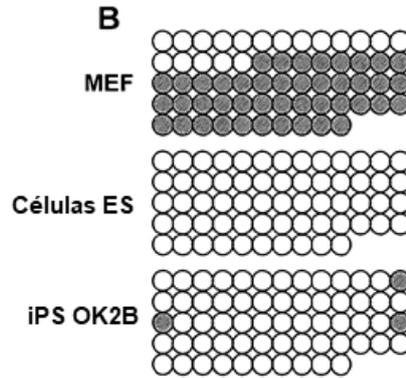
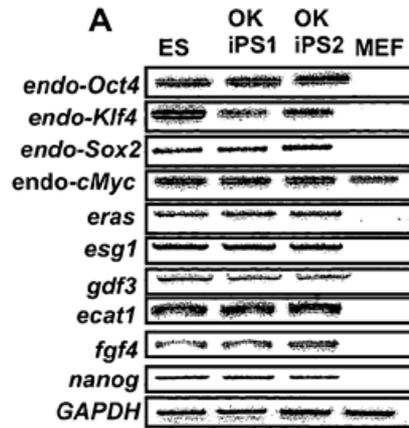
**FIG. 2**



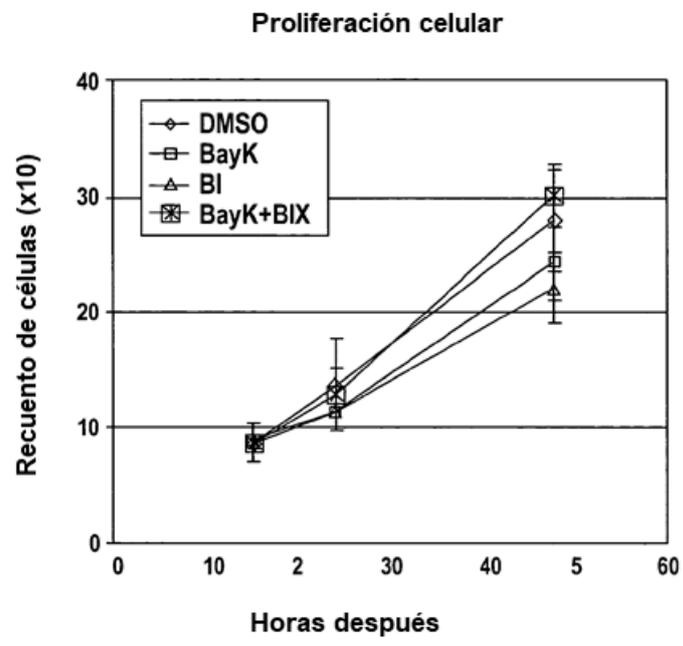
**FIG. 3**

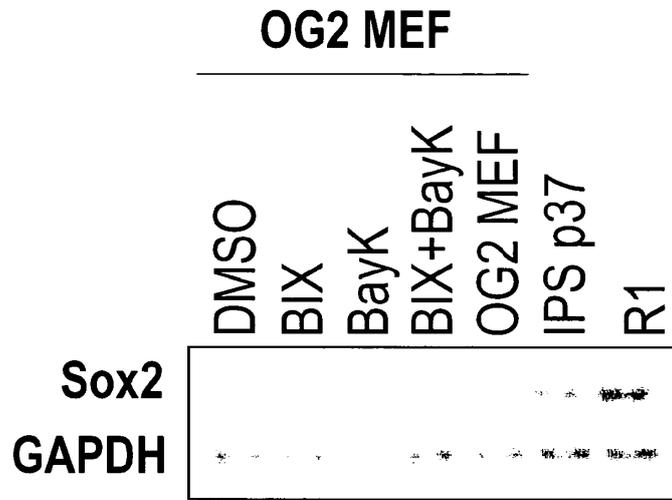


**FIG. 4**



**FIG. 5**





**FIG. 6**