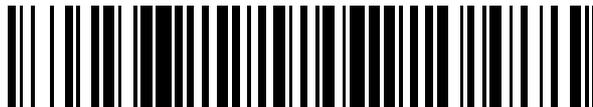


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 198**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2009 PCT/JP2009/058873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09133971**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2009 E 09738908 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2268809**

54 Título: **Método de reprogramación nuclear**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 71508 P
21.08.2008 US 136246 P
19.09.2008 US 136615 P
21.11.2008 US 193363 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2019

73 Titular/es:

KYOTO UNIVERSITY (100.0%)
36-1, Yoshida-honmachi Sakyo-ku Kyoto-shi
Kyoto 606-8501, JP

72 Inventor/es:

YAMANAKA, SHINYA y
OKITA, KEISUKE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 722 198 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

Método de reprogramación nuclear

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para reprogramar una célula somática y producir una célula madre pluripotencial inducida.

Antecedentes de la técnica

10 Establecidas a partir de embriones tempranos humanos o de ratón, las células madre embrionarias ("embryonic stem cells", células ES) son capaces de ser cultivadas durante largo tiempo manteniendo, al mismo tiempo, su potencial para diferenciarse en todos los tipos de células que se encuentran en un organismo vivo. Al tener esta característica, se espera que las células ES humanas puedan utilizarse para terapias de trasplante de células para muchas enfermedades, que incluyen la enfermedad de Parkinson, la diabetes juvenil y la leucemia. Sin embargo, el trasplante de células ES presenta el problema de provocar rechazo, al igual que el trasplante de órganos. Además, bastantes personas se oponen, desde un punto de vista ético, al uso de las células ES establecidas mediante la destrucción de un embrión humano.

15 Si se induce la desdiferenciación de las células somáticas del paciente para obtener células que poseen pluripotencialidad y una capacidad de proliferación similar a la de una célula ES (en la presente, estas células se denominan células madre pluripotenciales inducidas ("induced pluripotent stem cells", células iPS), y a veces se denominan células similares a células madre embrionarias ("embryonic stem cell-like cells" o células similares a ES), las células establecidas serán útiles como células pluripotenciales ideales que no presentan el problema del rechazo ni objeciones éticas. En fechas recientes, se ha indicado que pueden producirse células iPS cells a partir de células diferenciadas humanas y de ratón, lo cual ha provocado mucha atención (solicitud de patente internacional n.º de publicación WO2007/69666; Cell, 126, pp. 663-676, 2006; Cell, 131, pp. 861-872, 2007; Science, 318, pp. 1917-1920, 2007; Nature, 451, pp. 141-146, 2008).

20 Todos estos métodos comprenden la etapa de introducir una pluralidad de factores de reprogramación nuclear concretos (por ejemplo, en Cell, 126, pp. 1-14, 2006, se emplean 4 factores: Oct3/4, Sox2, Klf4, y c-Myc) en una célula somática para lograr la reprogramación, y esta etapa implica el uso de un retrovirus o un lentivirus para introducir los genes que codifican los factores de reprogramación nuclear en una célula somática de modo eficaz. Sin embargo, puesto que el transporte de genes empleando un vector vírico implica problemas de seguridad, existe una demanda para desarrollar un método para producir células iPS sin usar un vector vírico.

30 **Sumario de la invención**

Problema técnico

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para producir una célula iPS mediante la reprogramación de una célula somática sin usar un vector vírico, tal como un retrovirus.

Solución al problema

35 Los presentes inventores han investigado a fondo para resolver los problemas descritos anteriormente, y han descubierto que puede producirse una célula iPS introduciendo genes que codifican factores de reprogramación en una célula somática por medio de un vector de expresión no vírico, tal como un vector plasmídico, y que puede obtenerse una célula iPS segura a partir de una célula somática mediante el método. La presente invención se ha desarrollado basándose en estos descubrimientos.

40 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para producir una célula madre pluripotencial inducida, tal como se define en la reivindicación 1.

La presente invención proporciona el método descrito anteriormente, en el que los vectores son vectores de expresión no víricos que pueden replicarse de modo autónomo fuera de un cromosoma, y el método descrito anteriormente, en el que el vector es un vector plasmídico tal como se define en la reivindicación 1.

45 Además, la presente descripción proporciona el método descrito anteriormente, en el que el gen que codifica un factor de reprogramación es uno de los genes seleccionados mediante un método de seleccionar factores de reprogramación nuclear descrito en el documento WO 2005/80598 o una combinación de una pluralidad de dichos genes; y el método descrito anteriormente, en el que el gen que codifica un factor de reprogramación es uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc, un gen de la familia Lin, y el gen Nanog, preferiblemente una combinación de dos tipos de genes, más preferiblemente una combinación de tres tipos de genes, en particular preferiblemente una combinación de cuatro o más tipos de genes según se define en la reivindicación 1 para el método de la invención.

Las combinaciones más preferibles se indican en las reivindicaciones. Las combinaciones descritas son (a) una combinación de dos tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct y un gen de la familia Sox; (b) una combinación de tres tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox; (c) una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc; (d) una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Lin y el gen Nanog; (e) una combinación de seis tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc, un gen de la familia Lin y el gen Nanog; y similares. Además, también es preferible incluir el gen TERT y/o el gen del antígeno T grande de SV40 en la combinación. Puede darse el caso de que sea preferible excluir los genes de la familia Klf.

Otras combinaciones descritas son una combinación de dos tipos de genes que consiste en Oct3/4 y Sox2; una combinación de tres tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, y Sox2; una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, Sox2, y c-Myc; una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en Oct3/4, Sox2, Lin28, y Nanog; y una combinación de seis tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, y Nanog. También resulta preferible incluir el gen TERT y/o el gen del antígeno T grande de SV40 en estas combinaciones. Puede darse el caso de que sea preferible excluir Klf4.

La presente descripción proporciona el método descrito anteriormente, en el que el número de tipos de vectores de expresión no víricos introducidos en una célula somática sea de 1, 2, 3, o 4; el método descrito anteriormente, en el que los genes que codifican factores de reprogramación son una combinación de tres tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox, y estos genes se incorporan en un tipo de vector de expresión no vírico; el método descrito anteriormente, en el que los genes que codifican factores de reprogramación nuclear son una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc, y el gen de la familia Oct, el gen de la familia Klf y el gen de la familia Sox se incorporan en un tipo de vector de expresión no vírico; el método descrito anteriormente, en el que el gen de la familia Oct, el gen de la familia Klf y el gen de la familia Sox se incorporan en un tipo de vector de expresión no vírico en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3'; y el método descrito anteriormente, en el que el gen de la familia Oct, el gen de la familia Klf y el gen de la familia Sox se incorporan en un tipo de vector de expresión no vírico con una secuencia intermedia que permite la expresión policistónica.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona el método descrito anteriormente de la reivindicación 1, en el que dos o más tipos de los vectores de expresión no víricos descritos anteriormente se introducen al mismo tiempo en una célula somática; el método descrito anteriormente, en el que los genes que codifican factores de reprogramación son una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc, y un primer vector de expresión no vírico que incorpora tres o menos tipos de genes seleccionado de los cuatro tipos de genes, y un segundo vector de expresión no vírico que incorpora el gen o genes restantes, se introducen al mismo tiempo en una célula somática; el método descrito anteriormente, en el que los tres o menos tipos de genes son un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox, y el gen restante es un gen de la familia Myc; el método descrito anteriormente, en el que los tres o menos tipos de genes son Oct3/4, Klf4 y Sox2, y el gen restante es c-Myc; y el método descrito anteriormente, en el que la introducción del vector de expresión no vírico en una célula somática se realiza repetidamente dos o más veces.

En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona el método descrito anteriormente, en el que un primer vector de expresión no vírico que porta Oct3/4, Klf4 y Sox2 y un segundo vector de expresión no vírico que porta c-Myc se introducen en una célula somática; el método descrito anteriormente, en el que un primer vector de expresión no vírico que porta Oct3/4, Klf4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' a 3', y un segundo vector de expresión no vírico que porta c-Myc se introducen en una célula somática; el método descrito anteriormente, en el que Oct3/4, Klf4 y Sox2 se acoplan en este orden en la orientación desde el extremo 5' a 3' con una secuencia intermedia que permite la expresión policistónica y se insertan en el primer vector de expresión no vírico; el método descrito anteriormente, en el que el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico se introducen al mismo tiempo en una célula somática; y el método descrito anteriormente, en el que la introducción se realiza repetidamente dos o más veces. También se proporciona el método descrito anteriormente, en el que todo o parte de dicho al menos un vector de expresión no vírico introducido no se integra sustancialmente en el cromosoma.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona el método descrito anteriormente, en el que la célula somática es una célula somática de un mamífero, incluyendo un ser humano, preferiblemente una célula somática humana o de ratón, en particular preferiblemente una célula somática humana; el método descrito anteriormente, en el que la célula somática es una célula humana fetal o una célula somática derivada de un adulto humano; y el método descrito anteriormente, en el que la célula somática es una célula somática recolectada de un paciente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula madre pluripotencial inducida que puede obtenerse mediante el método descrito anteriormente. En una realización preferida, la presente descripción proporciona además una célula madre pluripotencial inducida, en la que todo o parte de dicho al menos un vector de expresión

no vírico introducido no se integra sustancialmente en el cromosoma.

También se describe la célula madre pluripotencial inducida descrita anteriormente, en la que la célula somática es una célula somática de un mamífero, incluyendo un ser humano, preferiblemente una célula somática humana o de ratón, en particular preferiblemente una célula somática humana; la célula madre pluripotencial inducida descrita anteriormente, en la que la célula somática es una célula humana fetal o una célula somática derivada de un adulto humano; y la célula madre pluripotencial inducida descrita anteriormente, en la que la célula somática es una célula somática recolectada de un paciente.

La presente descripción también proporciona un vector de expresión no vírico, preferiblemente un vector plasmídico, para su uso en el método descrito anteriormente para producir una célula madre pluripotencial inducida que incorpora al menos un gen que codifica un factor de reprogramación.

La presente descripción también proporciona una célula somática inducida y diferenciada a partir de la célula madre pluripotencial inducida descrita anteriormente.

La presente descripción también proporciona una terapia con células madre, que comprende la etapa de trasplantar a un paciente una célula somática obtenida mediante la inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotencial inducida obtenida mediante el método descrito anteriormente usando una célula somática separada del paciente.

La presente descripción también proporciona un método para evaluar las toxicidades y actividades fisiológicas de compuestos, fármacos, sustancias venenosas y similares empleando diversas células obtenidas mediante la inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotencial inducida obtenida mediante el método descrito anteriormente.

Efectos ventajosos de la invención

Producida sin usar un vector que vaya a integrarse en un cromosoma, tal como un retrovirus, la célula madre pluripotencial inducida proporcionada por la presente invención resulta ventajosa porque no surgen tumorigénesis ni otros problemas en las células somáticas y los tejidos obtenidos mediante la diferenciación de la célula madre pluripotencial inducida. En una realización preferida de la presente invención, en la célula madre pluripotencial inducida producida mediante el método de la presente invención, todo o parte de dicho al menos un vector de expresión no vírico introducido está presente de modo episómico, no integrado sustancialmente en el cromosoma. Por tanto, el método de la presente invención permite preparar una célula madre pluripotencial inducida muy segura procedente, por ejemplo, de una célula somática del paciente, y las células obtenidas mediante la diferenciación de esta célula (por ejemplo, células miocárdicas, células productoras de insulina o células nerviosas y similares) pueden usarse de forma segura para terapias de trasplante de células madre para una amplia gama de enfermedades, que incluyen la insuficiencia cardíaca, la diabetes dependiente de insulina, la enfermedad de Parkinson y lesiones medulares.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un protocolo de desarrollo en el tiempo para la transfección de una célula somática (MEF) con Oct3/4, Klf4, Sox2, y c-Myc usando plásmidos según el método de la presente invención, los resultados de siete ensayos independientes (fotografías a la izquierda, 432A-1 a 432A-7: densidad celular de 1×10^6 células/placa de 100 mm) y los resultados de otro ensayo (fotografías a la derecha, 432B-1: densidad celular de 2×10^5 células/placa de 100 mm). Los paneles inferiores en el centro muestran los resultados del control (sin transfección). En la figura 1, las columnas de fase muestran imágenes de contraste de fase, y las columnas de GFP muestran colonias positivas a GFP.

La figura 2 muestra un plásmido de expresión para la producción de células iPS. Se acoplaron tres tipos de ADNc que codifican Oct3/4, Klf4 y Sox2 en este orden, con la secuencia que codifica el péptido 2A como secuencia intermedia, y se insertan en el plásmido pCX (pCX-2A-mOKS). Además se insertó un ADNc de c-Myc en pCX (pCX-c-Myc). Las líneas en negrita muestran las regiones de amplificación usadas en el análisis de PCR para detectar la integración del plásmido en el genoma (figura 6).

La figura 3 muestra los programas de desarrollo en el tiempo para la inducción de células iPS usando plásmidos. Las flechas negras indican los momentos de la transfección de los respectivos plásmidos.

La figura 4 muestra la morfología de células iPS no mediadas por virus obtenidas. Los paneles superiores muestran imágenes de contraste de fase, y los paneles inferiores muestran colonias positivas a GFP (barra de escala = 200 μm).

La figura 5 muestra los resultados del análisis con PCR para la expresión genética de marcadores de células ES, obtenidos usando ARN totales aislados de células ES, células iPS inducidas usando retrovirus (clon 20D-17: Nature, 448, pp. 313-317, 2007), células iPS inducidas usando plásmidos (clones 440A-3, 4, 7, 8, 10 y 11; clon 432A-1), y células MEF.

- 5 La figura 6 muestra la detección de la integración del plásmido mediante PCR. Se extrajeron ADN genómicos de un ratón C57BL/6, una célula iPS inducida usando retrovirus (clon 20D-17), células iPS inducidas con plásmidos (clon 432A-1; clones 440A-1 a 11) y células MEF, y se analizaron mediante PCR usando los cebadores mostrados en las figuras 2, 13 y 14. En la PCR para O-1, K y M, las bandas derivadas de genes endógenos se indican mediante las cabezas de flecha blancas, y las bandas derivadas de los plásmidos integrados se indican mediante las cabezas de flecha negras. Para el indicador Fbx15, la banda inferior indica los alelos de tipo salvaje, y la banda superior indica los alelos inactivados.
- 10 La figura 7 muestra los resultados de la formación de teratomas. Se trasplantaron células iPS sin integración de plásmidos (clones 440A-3, -4, y -8) por vía subcutánea a ratones atímicos ("nude"). Cuatro semanas después, los tumores se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Desde arriba, se muestran los resultados para tejido epitelial similar a intestino, tejido epidérmico, músculos estriados y tejido nervioso, respectivamente (barra de escala = 50 μ m).
- 15 La figura 8 muestra ratones quiméricos derivados de células iPS sin integración (clones 440A-3 y -8).
- La figura 9 muestra la detección de la integración de los plásmidos mediante PCR. Se extrajeron ADN genómicos de un ratón ICR, una célula iPS (clon 432A-1) y ratones quiméricos derivados de células iPS inducidas usando plásmidos (clon 432A-1; clones 440A-3, 8), y las regiones O-1, K y M mostradas en la figura 2 se amplificaron mediante PCR. Las bandas derivadas de genes endógenos se indican mediante las cabezas de flecha blancas, y las bandas derivadas de los plásmidos integrados se indican mediante las cabezas de flecha negras. La presencia del indicado Nanog y el indicador Fbx15 también fue detectada mediante PCR.
- 20 La figura 10 muestra las sondas usadas en el análisis de la transferencia Southern y las posiciones de los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción. E indica EcoRI, y B indica BamHI.
- 25 La figura 11 muestra los resultados del análisis de la transferencia Southern. Se extrajeron ADN genómicos (6 μ g) a partir de células RF8 ES y células iPS (clones 440A-3, 4, 7, 8, 10, y 11; clon 432A-1), y se rompieron con BamHI y EcoRI. Una mezcla de plásmidos pCX-2A-mOKS y pCX-c-Myc (20 pg de cada uno) actúa como control. Las cabezas de flecha blancas indican las bandas derivadas de genes endógenos, y las cabezas de flecha negras indican la banda derivadas del pseudogén Oct3/4 (tamaño calculado de 2049 pb) en el cromosoma 3. Las flechas indican las bandas derivadas de transgenes. Aunque no están claras las identidades de muchas bandas observadas en el clon 432A-1, esto puede sugerir la integración de múltiples transgenes. Se usó la sonda GFP para detectar alelos del indicador Nanog.
- 30 La figura 12 muestra los resultados del análisis SSLP. Se realizó un análisis SSLP con ADN genómicos (50 ng de cada uno) procedentes de un ratón C57BL/6, una célula RF8 ES, células iPS sin integración (clones 440A-3 a 11) y células MEF. Estas células iPS se derivan de una mezcla de cinco clones de células MEF (clones 1, 2, 3, 5 y 6).
- Las figuras 13 y 14 muestran los cebadores usados para la PCR en los ejemplos 1 a 3.
- 35 La figura 15 muestra un protocolo de desarrollo en el tiempo para la transfección de células madre de pulpa dental humanas con Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, Nanog y el antígeno T grande de SV40 usando plásmidos según el método de la presente invención, y 16 colonias de células iPS independientes.
- Las figuras 16 y 17 muestran fotografías de células iPS obtenidas a partir de HDF fetales (5 clones: 203A-1 a 203A-5, de las cuales se escogió 203A-4 como control negativo) en el día 31 después de la transfección (figura 16) y en el 2° subcultivo (figura 17).
- 40 La figura 18 muestra los resultados de un análisis de PCR genómico de 5 clones de células iPS (de 203A-1 a 203A-5).
- Las figuras 19 y 20 muestran fotografías de células iPS establecidas a partir de células madre de la pulpa dental humanas (5 clones: 217A-1 a -4 y -6) en el día 35 después de la transfección (figura 19) y en el 2° subcultivo (figura 20).
- 45 La figura 21 muestra los resultados de un análisis de PCR genómico de 5 clones de células iPS (217A-1 a -4 y -6).
- Las figuras 22 y 23 muestran fotografías de células iPS obtenidas a partir de HDF de hembras jóvenes (2 clones: 279A-1 y -2) en el día 35 después de la primera electroporación (figura 22) y el clon 279A-2 después de un cultivo de transferencia (figura 23; el panel derecho es un primer plano del área recuadrada en el panel izquierdo).
- 50 La figura 24 muestra los resultados de un análisis de PCR genómico del clon 279A-2 de células iPS que demuestra la integración de los transgenes.
- La figura 25 muestran fotografías de células iPS (8 clones: 497A-1 a A-8) después de la selección (las colonias se seleccionan el día 25 después de la transfección). Los paneles superiores muestran imágenes de contraste de fase, y los paneles inferiores muestran colonias positivas a GFP.

La figura 26 muestra los resultados de un análisis de PCR genómico de 5 clones de células iPS (de 497A-1 a A-5). En 497A-2 y 497A-5 no se integraron genes exógenos en el genoma.

Descripción de las realizaciones

5 El método de la presente invención está previsto para producir una célula madre pluripotencial inducida, que comprende la etapa definida en la reivindicación 1. El vector de expresión no vírico es un vector de expresión de replicación autónoma fuera de un cromosoma, concretamente un vector de expresión plasmídico, tal como se define en la reivindicación 1.

10 Como ejemplo de un medio para identificar un factor de reprogramación nuclear, puede utilizarse un método de selección de factores de reprogramación nuclear descrito en el documento WO 2005/80598. Los expertos en la técnica son capaces de seleccionar factores de reprogramación nuclear y utilizarlos para el método de la presente invención, remitiéndose a la publicación mencionada anteriormente. También es posible identificar factores de reprogramación nuclear usando un método modificado o alterado a partir del método de selección descrito anteriormente.

15 Se describen algunos ejemplos de combinaciones de genes que codifican factores de reprogramación en el documento WO2007/69666. Los expertos en la técnica son capaces de seleccionar genes que pueden utilizarse de modo adecuado en el método de la presente invención, según sea apropiado, remitiéndose a la publicación mencionada anteriormente. Se ofrecen otros ejemplos de combinaciones de genes que codifican factores de reprogramación en Science, 318, pp. 1917-1920, 2007, el documento WO2008/118820 y similares. Por tanto, los expertos en la técnica son capaces de entender la diversidad de combinaciones de genes que codifican factores de reprogramación nuclear; mediante la utilización del método de selección de factores de reprogramación nuclear descrito en el documento WO 2005/80598, pueden utilizarse combinaciones apropiadas de genes distintas de las combinaciones descritas en el documento in WO2007/69666 y Science, 2007 (supra) en el método de la presente invención. El método de la presente invención se define en la reivindicación 1.

25 Los genes preferibles que codifican factores de reprogramación incluyen uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc, un gen de la familia Lin, y el gen Nanog, preferiblemente una combinación de dos tipos de genes, más preferiblemente de tres tipos de genes, y en particular preferiblemente de cuatro tipos de genes.

30 Se ofrecen ejemplos de genes de la familia Oct, genes de la familia Klf, genes de la familia Sox, y genes de la familia Myc en el documento WO2007/69666. De modo similar, para los genes de la familia Lin, los expertos en la técnica son capaces de extraer, de modo similar, un gen de esta familia. Por ejemplo, como ejemplos de genes de la familia Lin pueden incluirse Lin28 y Lin28B.

Las combinaciones descritas incluyen, pero no se limitan a:

- (a) una combinación de dos tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct y un gen de la familia Sox;
 - 35 (b) una combinación de tres tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox;
 - (c) una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc;
 - (d) una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Lin y el gen Nanog;
 - 40 (e) una combinación de seis tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Myc, un gen de la familia Lin y el gen Nanog;
- y similares.

45 Todos estos genes están presentes de manera habitual en mamíferos, incluyendo en seres humanos. Pueden usarse genes derivados de mamíferos opcionalmente elegidos (por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, ganado bovino, ovejas, caballos, monos) en la presente invención. Además del gen de tipo salvaje, también pueden utilizarse genes mutantes cuyos productos de la traducción presentan varios aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, en particular preferiblemente 1 o 2) sustituidos, insertados y/o delecionados, y que poseen una función similar a la del producto del gen de tipo salvaje. Por ejemplo, como genes c-Myc, puede usarse el tipo salvaje, un gen que codifica un mutante de tipo estable (T58A) y similares. Esto mismo se aplica a otros productos génicos.

Además de los genes mencionados anteriormente, también puede combinarse un gen que codifica un factor que induce la inmortalización de las células. Tal como se describe en el documento WO2007/69666, por ejemplo, el gen TERT y uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en los siguientes genes: antígeno T grande de SV40, HPV16 E6, HPV16 E7, y Bmil, pueden usarse de modo individual o en combinación, según sea apropiado.

Los ejemplos de combinaciones preferibles incluyen:

(f) una combinación de cinco tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc y el gen TERT;

5 (g) una combinación de cinco tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc y el gen del antígeno T grande de SV40;

(h) una combinación de seis tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc, el gen TERT y el gen del antígeno T grande de SV40; y

10 (i) una combinación de siete tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc, un gen de la familia Lin, el gen Nanog y el gen TERT o el gen del antígeno T grande de SV40.

Según sea necesario, el gen de la familia Klf puede excluirse de las combinaciones mencionadas anteriormente.

15 Es más, además de los genes mencionados anteriormente, también pueden combinarse uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tcl1 y β -catenina y/o pueden combinarse uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en ECAT1, Esg1, Dnmt3L, ECAT8, Gdf3, Sox15, ECAT15-1, Fthl17, Sall4, Rexl, UTF1, Stella, Stat3 y Grb2. Estas combinaciones se describen específicamente en el documento WO2007/69666.

20 Si uno o más tipos de estos genes ya se expresan en la célula somática que se va a reprogramar, el gen o genes pueden excluirse de los genes que se van a introducir. Cuando uno o más tipos de estos genes se introducen en una célula somática que se va a reprogramar usando un vector para ser integrado en un cromosoma, tal como un retrovirus, el resto de dichos uno o más genes pueden introducirse usando un vector de expresión no vírico según el método de la presente descripción. Como alternativa, cuando uno o más tipos de los productos génicos de estos genes se introducen en un núcleo por medio de microinyección nuclear o de proteínas condensadas, el resto de dichos uno o más genes pueden introducirse usando un vector de expresión no vírico según el método de la presente descripción.

25 Las combinaciones de genes descritas son:

(1) una combinación de dos tipos de genes que consiste en Oct3/4 y Sox2;

(2) una combinación de tres tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4 y Sox2;

(3) una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc;

(4) una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en Oct3/4, Sox2, Lin28 y Nanog;

30 (5) una combinación de cinco tipos de genes que consiste en Oct3/4, Sox2, c-Myc, TERT y el antígeno T grande de SV40;

(6) una combinación de seis tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, TERT y el antígeno T grande de SV40;

(7) una combinación de seis tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Lin28 y Nanog;

35 (8) una combinación de siete tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Lin28, Nanog y TERT o el antígeno T grande de SV40;

y similares.

40 Además de los genes mencionados anteriormente, también puede combinarse un gen que codifica un factor que induce la inmortalización de las células. Tal como se describe en el documento WO2007/69666, por ejemplo, uno o más tipos de genes seleccionados del grupo que consiste en el gen TERT y los siguientes genes: HPV16 E6, HPV16 E7, y Bmil, pueden usarse de modo individual o en combinación, según sea apropiado.

45 Cuando la reprogramación se realiza usando células madre nerviosas que expresan de modo endógeno Sox2 y c-Myc, o similares, como fuente de células somáticas, también puede mencionarse una combinación de dos tipos de genes que consiste en Oct3/4 y Klf4, o una combinación de dos tipos de genes que consiste en Oct3/4 y c-Myc (véase Nature, publicado en línea, 29 de junio de 2008, pl-5 (doi:10.1038/nature07061)).

En las anteriores combinaciones (3), (5), (6) y (7) puede usarse L-Myc en lugar de c-Myc.

Debe advertirse que las combinaciones de genes no se limitan a estas. Además, el alcance de la presente descripción incluye un método en el que uno o más genes seleccionados de entre los genes descritos anteriormente se introducen en una célula somática empleando un vector de expresión no vírico, y el resto de los genes o

5 productos génicos se introducen en la célula somática a través de otro medio. Por ejemplo, también es posible introducir uno o más genes seleccionados de entre los genes descritos anteriormente en una célula somática empleando un vector de expresión no vírico, e introducir el resto de los genes en la célula somática empleando un vector vírico, tal como un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado, vector vírico Sendai.

10 Cuando dos o más tipos de genes que codifican factores de reprogramación se introducen en una célula somática usando vectores de expresión no víricos, algunos de dichos dos o más tipos de genes que van a ser introducidos pueden introducirse en una célula somática en un momento diferente al de los otros genes, o todos los tipos de genes que se van a introducir pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática. sin embargo, es preferible que todos los genes que se vayan a introducir se introduzcan al mismo tiempo en una célula somática. Cuando se emplean dos o más tipos de vectores de expresión no víricos diferentes para introducir dos o más tipos de genes, todos los tipos de vectores de expresión no víricos pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática; esto representa una realización preferida de la presente invención, tal como se define en la reivindicación 1.

15 En el método de la presente invención, como genes que codifican factores de reprogramación, puede usarse, por ejemplo, una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc.

20 En el método de la presente invención resulta preferible que los cuatro tipos de genes descritos anteriormente se introduzcan al mismo tiempo en una célula somática. Para introducir los cuatro tipos de genes descritos anteriormente, pueden usarse varios tipos de vectores de expresión no víricos en combinación según sea apropiado, para cubrir todas las combinaciones de estos genes. Cuando se emplean varios tipos de vectores de expresión no víricos, resulta preferible emplear preferiblemente dos o tres tipos, más preferiblemente dos tipos de vectores de expresión no víricos. Resulta preferible que estos vectores de expresión no víricos se introduzcan al mismo tiempo en una célula somática.

25 Si el número de genes introducidos es mayor que cuatro tipos, varios tipos de vectores de expresión no víricos pueden combinarse según sea apropiado, para cubrir todas las combinaciones de estos genes. Cuando se emplean varios tipos de vectores de expresión no víricos, resulta preferible emplear preferiblemente de dos a cinco tipos, más preferiblemente de dos a cuatro tipos, más preferiblemente tres o cuatro de los vectores de expresión no víricos. Estos vectores de expresión no víricos se introducen preferiblemente al mismo tiempo en una célula somática.

30 Un ejemplo de un método preferible es un método en el que un vector de expresión no vírico que porta un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox, y un vector de expresión no vírico que porta un gen de la familia Myc, se introducen al mismo tiempo en una célula somática.

35 En otra realización preferida, también es posible usar un método en el que un vector de expresión no vírico que porta un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc se introduzca en una célula somática.

40 En una realización preferida de la presente descripción, en una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc, o una combinación elegida opcionalmente de tres tipos o dos tipos seleccionados de entre estos cuatro tipos de genes, preferiblemente puede usarse la combinación de tres tipos o dos tipos de genes, en la que dicha combinación no contiene c-Myc. Esta realización preferida se describe de modo específico a continuación, la cual no limita de ninguna manera el alcance de la presente descripción.

(a1) Un método en el que un tipo de vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc, se introduce en una célula somática.

45 (b1) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc, y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta el resto de los dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

50 (c1) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta tres tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc, y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta el tipo de gen restante seleccionado de Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

55 (d1) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2, y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta el tipo de gen restante seleccionado de Oct3/4, Klf4 y Sox2, y c-Myc, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

(e1) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta Oct3/4, Klf4 y Sox2, y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta c-Myc, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

5 (f1) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta c-Myc y uno cualquiera de los genes de Oct3/4, Klf4 y Sox2 no contenido en el primer vector de expresión no vírico, se introducen en una célula somática. Más específicamente, puede usarse un primer vector de expresión no vírico, más
10 preferiblemente un vector plasmídico, que porta (i) Oct3/4 y Klf4, (ii) Klf4 y Sox2, o (iii) Oct3/4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3'; el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

(g1) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta Oct3/4, Klf4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', y un segundo vector de expresión
15 no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta c-Myc, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

El método de (f1) o (g1) puede usarse preferiblemente cuando la célula somática se deriva de ratón.

20 En los anteriores (b1) a (g1), para uno cualquiera del primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico, puede emplearse un vector vírico (por ejemplo, un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado, vector vírico Sendai o similares) en lugar del vector de expresión no vírico.

En otra realización preferida de la presente descripción, en los anteriores (a1) a (g1), puede usarse L-Myc en lugar de c-Myc.

25 En otra realización descrita, puede emplearse una combinación de tres tipos de genes que consiste en Oct3/4, Klf4 y Sox2. Esta realización se describe de modo específico a continuación, la cual no limita de ninguna manera el alcance de la presente descripción.

(a2) Un método en el que un tipo de vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta Oct3/4, Klf4 y Sox2, se introduce en una célula somática.

30 (b2) Un método en el que un tipo de vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta Oct3/4, Klf4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', se introduce en una célula somática.

(c2) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2, y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta el tipo de gen restante seleccionado de Oct3/4, Klf4 y Sox2, se
35 introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

(d2) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta uno cualquiera
40 de los genes de Oct3/4, Klf4 y Sox2 no contenido en el primer vector de expresión no vírico, se introducen en una célula somática. Más específicamente, puede usarse un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta (i) Oct3/4 y Klf4, (ii) Klf4 y Sox2, o (iii) Oct3/4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', y el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

45 El método de (b2) o (d2) puede usarse preferiblemente cuando la célula somática se deriva de ratón.

En los anteriores (c2) o (d2), para uno cualquiera del primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico, puede emplearse un vector vírico (por ejemplo, un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado, vector vírico Sendai o similares) en lugar del vector no vírico.

50 En otra realización preferida de la presente descripción, puede emplearse una combinación de dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2. Esta realización se describe de modo específico a continuación, la cual no limita de ninguna manera el alcance de la presente descripción.

(a3) Un método en el que un tipo de vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2, se introduce en una célula somática.

(b3) Un método en el que un tipo de vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que

porta (i) Oct3/4 y Klf4, (ii) Klf4 y Sox2, o (iii) Oct3/4 y Sox2 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', se introduce en una célula somática.

5 (c3) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta un tipo de gen seleccionado de Oct3/4, Klf4 y Sox2, y un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta uno cualquiera de los genes de Oct3/4, Klf4 y Sox2 no contenido en el primer vector de expresión no vírico, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

El método de (b3) puede usarse preferiblemente cuando la célula somática se deriva de ratón.

10 En el anterior (c3), para uno cualquiera del primer vector de expresión no vírico y el segundo vector de expresión no vírico, puede emplearse un vector vírico (por ejemplo, un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado, vector vírico Sendai o similares) en lugar del vector no vírico.

15 En otra realización preferida de la presente invención según se define en las reivindicaciones, puede emplearse una combinación de seis tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y Nanog. Esta realización preferida se describe de modo específico a continuación, la cual no limita de ninguna manera el alcance de la presente descripción.

20 (a4) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta dos tipos de genes seleccionados de Oct3/4, Klf4 y Sox2, un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta el tipo de gen restante seleccionado de Oct3/4, Klf4 y Sox2, y un tercer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta los genes c-Myc, Lin28 y Nanog, se introducen en una célula somática. Preferiblemente, el primer, segundo y tercer vector de expresión no vírico pueden introducirse al mismo tiempo en una célula somática.

25 (b4) Un método en el que un primer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta (i) Oct3/4 y Klf4, (ii) Klf4 y Sox2, (iii) Oct3/4 y Sox2, o (iv) Sox2 y Klf4 en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', un segundo vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta el tipo de gen restante seleccionado de Oct3/4, Klf4 y Sox2, y un tercer vector de expresión no vírico, más preferiblemente un vector plasmídico, que porta los genes c-Myc, Lin28 y Nanog en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', se introducen en una célula somática.

30 Cuando un gen que codifica un factor que induce la inmortalización de células, tales como TERT, el antígeno T grande de SV40, HPV16 E6, HPV16 E7 o Bmi1, se combina además con dos, tres, cuatro o seis de los genes mencionados anteriormente, aquel puede incorporarse preferiblemente en otro vector de expresión no vírico.

35 En el anterior contexto, cuando se incorpora una pluralidad de genes (por ejemplo, un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox) en un tipo de vector de expresión no vírico, estos genes preferiblemente pueden insertarse en el vector de expresión no vírico con una secuencia intermedia que permite la expresión policistrónica. Mediante el uso de una secuencia intermedia que permite la expresión policistrónica, es posible expresar de modo más eficaz una pluralidad de genes incorporados en un tipo de vector de expresión no vírico. Las secuencias útiles que permiten la expresión policistrónica incluyen, por ejemplo, la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca (SEQ ID NO:61, a veces denominada secuencia autoprocadora 2A de FMDV) (PLoS ONE 3, e2532, 2008; células madre 25, 1707, 2007), la secuencia IRES y similares, preferiblemente la secuencia 2A. De modo más específico, cuando se construye un vector de expresión no vírico que porta (i) Oct3/4, Klf4 y Sox2, (ii) Oct3/4 y Klf4, (iii) Klf4 y Sox2, (iv) Oct3/4 y Sox2, (v) Sox2 y Klf4, o (vi) c-Myc, Lin28 y Nanog en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3', resulta preferible insertar la secuencia 2A entre estos genes. Por consiguiente, la presente descripción también proporciona el uso de la secuencia 2A para preparar un vector de expresión no vírico para la inducción de células iPS, que porta dos o más tipos de factores de reprogramación.

45 El número de repeticiones de la manipulación para introducir un vector de expresión no vírico en una célula somática no está limitado particularmente, y con la condición de que el efecto de la presente invención de reprogramar una célula somática para producir una célula madre pluripotencial inducida pueda lograrse, la transfección puede realizarse una o más veces opcionalmente elegidas (por ejemplo, de una a 10 veces, de una a 5 veces o similares). Cuando se introducen dos o más tipos de vectores de expresión no víricos en una célula somática, resulta preferible que todos estos tipos de vectores de expresión no víricos se introduzcan al mismo tiempo en una célula somática; sin embargo, incluso en este caso, la transfección puede realizarse una o más veces opcionalmente elegidas (por ejemplo, de una a 10 veces, de una a 5 veces o similares), y preferiblemente la transfección puede realizarse repetidamente dos veces o más (por ejemplo, 3 veces o 4 veces).

55 Cuando la transfección se repite dos veces o más, los ejemplos de intervalos de tiempo, sin limitarse a estos, son de 12 horas a 1 semana, preferiblemente de 12 horas a 4 días, por ejemplo, de 1 día a 3 días.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula madre pluripotencial inducida (célula iPS)" se refiere a una célula que posee propiedades similares a las de las células ES, e incluye, de modo más específico, células no

diferenciadas reprogramadas a partir de células somáticas que poseen capacidad de pluripotencialidad y de proliferación (autorrenovación). Sin embargo, debe advertirse que esta expresión no es limitante en ningún sentido y debe considerarse en su sentido más amplio. Un método para preparar una célula madre pluripotencial inducida por medio de factores de reprogramación nuclear hipotéticos se describe en el documento WO2005/80598 (en esta publicación se emplea la expresión célula similar a ES), y también se describe específicamente un método para aislar una célula madre pluripotencial inducida. El documento WO2007/69666 describe ejemplos específicos de factores de reprogramación y métodos de reprogramación de células somáticas que los utilizan. Por tanto, resulta deseable que, en la realización de la presente invención, los expertos en la técnica se remitan a estas publicaciones.

Además del gen que codifica un factor de reprogramación, preferiblemente una secuencia reguladora necesaria para la transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador y/o terminador o similares) se une operablemente al gen en el vector de expresión no vírico.

Como promotor puede usarse una secuencia de ADN que muestra actividad de transcripción en las células somáticas, y el promotor puede elegirse según sea apropiado para la especie animal y el tipo de célula somática. Los ejemplos de promotores útiles que pueden expresarse en células de mamífero incluyen un promotor del gen IE ("immediate early", temprano inmediato) de citomegalovirus (CMV humano), el promotor inicial de SV40, el promotor de retrovirus, el promotor de metalotioneína, el promotor del choque térmico, el promotor de SR α y similares. Puede emplearse un potenciador del gen IE del CMV humano junto con un promotor. Un promotor útil es el promotor de CAG (que comprende el potenciador de citomegalovirus, el promotor de β -actina de pollo y el sitio señal de poliA del gen de β -globina).

El vector de expresión no vírico puede incorporar una secuencia de ADN que permita la replicación autónoma del vector de expresión en una célula somática de mamífero. Un ejemplo de la secuencia de ADN es el origen de la replicación de SV40.

El vector de expresión no vírico preferiblemente es un vector de expresión de replicación autónoma fuera de un cromosoma, y el vector de expresión no vírico es preferiblemente un vector que no se integra en el cromosoma. Los ejemplos más preferibles incluyen los vectores plasmídicos. Los ejemplos de vectores plasmídicos incluyen, pero no se limitan a plásmidos derivados de *Escherichia coli* (plásmidos de la serie ColE, tales como pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 y pBluescript, y similares), plásmidos derivados de *Actinomyces* (pJ486 y similares), plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pSH19 y otros), plásmidos derivados de levaduras (YEp13, YEp 24, Ycp50 y similares) y similares, así como vectores plasmídicos artificiales y similares.

Los ejemplos de vectores de expresión no víricos fácilmente disponibles incluyen, pero no se limitan a pCMV6-XL3 (OriGene Technologies Inc.), EGFP-C1 (Clontech), pGBT-9 (Clontech), pcDNA1 (FUNAKOSHI), pcDM8 (FUNAKOSHI), pAGE107 (Cytotechnology, 3,133, 1990), pCDM8 (Nature, 329, 840, 1987), pcDNA1/AmP (Invitrogen), pREP4 (Invitrogen), pAGE103 (J. Blochem., 101, 1307, 1987), pAGE210 y similares.

El vector de expresión no vírico puede incorporar un marcador seleccionable según sea necesario. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen genes que son deficientes en la célula hospedante, tales como el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) o el gen TPI de *Schizosaccaromyces pombe*, y genes para la resistencia a fármacos, tales como ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina o higromicina.

Aunque un vector de expresión no vírico, tal como un vector plasmídico, introducido en una célula somática generalmente no se integra en el genoma de la célula, bajo una presión selectiva para la inducción de células iPS puede observarse una mayor eficacia de integración del vector de expresión no vírico, debido a la necesidad de una expresión estable de los factores de reprogramación. Por consiguiente, cuando esté previsto que las células iPS de interés se utilicen para la medicina regenerativa y similares, el vector de expresión no vírico puede contener preferiblemente una secuencia que permita la escisión de transgenes, tales como la secuencia loxP (Chang *et al.*, STEM CELLS, publicado en línea, 12 de febrero de 2009 (doi: 10.1002/stem.39)), el transposón piggyback (Kaji *et al.*, Nature, publicación adelantada en línea, 1 de marzo de 2009 (doi:10.1038/nature07864); Woltjen *et al.*, Nature, publicación adelantada en línea, 1 de marzo de 2009 (doi:10.1038/nature07863)) y el elemento de respuesta a la tetraciclina en una región de promotor (Tet-On® & Tet-Off® Gene Expression Systems, Clontech).

Un método para acoplar un gen que codifica un factor de reprogramación, un promotor, un potenciador y/o un terminador y similares, usado en la presente invención, en un orden apropiado para construir un vector de expresión no vírico capaz expresar el factor de reprogramación en la célula somática será obvio para los expertos en la técnica.

Cuando se emplean dos o más tipos de genes que codifican factores de reprogramación, los genes pueden incorporarse en un vector de expresión no vírico. Como alternativa, pueden usarse dos o más tipos de vectores de expresión no víricos que incorporan diferentes genes. En este último caso, pueden combinarse un vector de expresión no vírico que incorpora dos o más tipos de genes y un vector de expresión no vírico que incorpora uno o más tipos de genes diferentes de los anteriores, según sea apropiado.

Puede emplearse cualquier método de introducción de vectores de expresión en una célula animal disponible para los expertos en la técnica para introducir un vector de expresión no vírico en una célula somática. Los ejemplos de

métodos útiles incluyen el uso de un reactivo de transfección, tal como el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche), el uso de un microporador, el método de electroporación, el método de fosfato de calcio, el método de lipofección, el método de transfección mediado por DEAE-dextrano, el método de transfección, el método de microinyección, el método de transfección mediada por lípidos catiónicos y similares. También puede usarse la nucleofección para introducir un gen. Estos métodos pueden usarse en combinación.

En la introducción de un vector de expresión no vírico en una célula somática, el vector de expresión puede introducirse en la célula somática que está siendo cultivada sobre células de soporte, y puede introducirse solo en la célula somática. Para aumentar la eficacia de introducción del vector de expresión, a veces este último método resulta adecuado. Las células de soporte empleadas pueden ser las que se usan para el cultivo de células madre embrionarias, por ejemplo, fibroblastos en cultivo primario procedentes de un embrión de ratón de 14 a 15 días, STO (línea celular derivada de fibroblastos) y similares, tratadas con un agente químico, tal como mitomicina C, o expuestas a radiación y similares.

Mediante el cultivo de una célula somática que incorpora un vector de expresión no vírico bajo condiciones apropiadas, es posible conseguir que la reprogramación nuclear se desarrolle de modo autónomo y se produzca una célula madre pluripotencial inducida a partir de la célula somática. La etapa de cultivar una célula somática que incorpora un vector de expresión no vírico para obtener una célula madre pluripotencial inducida puede realizarse de la misma manera que un método convencional que emplea un retrovirus; por ejemplo, esto puede lograrse como se describe en publicaciones, tales como *Cell*, 126, pp. 1-14, 2006; *Cell*, 131, pp. 1-12, 2007; y *Science*, 318, pp. 1917-1920, 2007. En la producción de una célula madre pluripotencial inducida, a veces resulta deseable que la densidad de cultivo celular después de la introducción del vector de expresión se ajuste a un nivel inferior que al de un cultivo de células animales normales. Por ejemplo, resulta preferible continuar el cultivo a una densidad de células de 10.000 a 100.000 células, preferiblemente de aproximadamente 50.000 células por placa de cultivo de células. Puede emplearse cualquier medio para el cultivo que los expertos en la técnica consideren adecuado; por ejemplo, para producir una célula madre pluripotencial inducida humana, a veces resulta preferible usar un medio adecuado de cultivo de células ES humanas. Con respecto a la elección del medio y las condiciones de cultivo, las publicaciones mencionadas anteriormente sirven de referencia.

Las células madre pluripotencial inducidas resultantes pueden identificarse usando diversos marcadores característicos de las células no diferenciadas; los medios para lograr esta identificación también se describen específicamente y en detalle en las publicaciones mencionadas anteriormente. En la técnica se conocen diversos medios que permiten el mantenimiento del estado no diferenciado y la pluripotencialidad de células ES o medios que no permiten el mantenimiento de estas propiedades; mediante el uso de medios apropiados en combinación puede aislarse con eficacia una célula madre pluripotencial inducida. El potencial de diferenciación y el potencial de proliferación de las células madre pluripotenciales inducidas aisladas pueden ser confirmados con facilidad por los expertos en la técnica utilizando un método de identificación que se emplee habitualmente para células ES. Cuando la célula madre pluripotencial inducida resultante se hace proliferar bajo condiciones apropiadas, se obtiene una colonia de células madre pluripotenciales inducidas; es posible identificar la presencia de una célula madre pluripotencial inducida basándose en la forma de la colonia. Por ejemplo, se sabe que las células madre pluripotenciales inducidas de ratón forman colonias alzadas, mientras que las células madre pluripotenciales inducidas humanas forman colonias planas, y las formas de estas colonias son muy similares a las colonias de células ES de ratón y células ES humanas, respectivamente; por tanto, es posible que los expertos en la técnica identifiquen la célula madre pluripotencial inducida resultante basándose en la forma de la colonia. Cuando la reprogramación se realiza usando una célula somática que posee un gen que incorpora un gen marcador, tal como GFP cadena abajo de un promotor de un gen que se expresa específicamente en células ES, es posible identificar una célula madre pluripotencial inducida si la célula se convierte en positiva para el marcador (GFP).

Las "células somáticas" que van a ser reprogramadas mediante el método de la presente invención se refieren a cualquier célula, excepto a las células totipotenciales y pluripotenciales tales como los embriones tempranos y las células ES, y su elección no está limitada. Por ejemplo, así como las células somáticas en el estadio fetal, pueden usarse células somáticas neonatales y células somáticas maduras. Preferiblemente, se emplean células somáticas derivadas de mamífero, que incluyen seres humanos; más preferiblemente, se emplean células somáticas derivadas de humano o ratón. De modo específico, pueden mencionarse (1) células madre de tejidos (células madre somáticas), tales como células madre nerviosas, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimáticas y células madre de la pulpa dental, (2) células progenitoras de tejidos, o (3) células diferenciadas, tales como linfocitos, células epiteliales, células musculares, fibroblastos (células dérmicas y similares), células del pelo, células hepáticas y células gastromucósicas. Cuando se utiliza una célula madre pluripotencial inducida para tratar una enfermedad, resulta deseable usar células somáticas separadas de un paciente que va a ser tratado o de otra persona que comparte el mismo tipo de HLA que el paciente; por ejemplo, pueden usarse células somáticas implicadas en la enfermedad y células somáticas implicadas en el tratamiento de la enfermedad y similares.

En la presente invención, para aumentar la eficacia del establecimiento de una célula madre pluripotencial inducida, además de la introducción de un vector de expresión no vírico de la presente invención, pueden introducirse o añadirse diversos mejoradores de la eficacia de establecimiento. Los ejemplos de mejoradores de la eficacia de establecimiento de células iPS incluyen, pero no se limitan a inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) [por ejemplo, ácido valproico (VPA) (*Nat. Biotechnol.*, 26(7):795-797 (2008)), inhibidores de bajo peso molecular, tales

como tricostatina A, butirato de sodio, MC 1293, y M344, inhibidores de la expresión basados en ácidos nucleicos, tales como ARNip y ARNhc contra HDAC (por ejemplo, ARNip de HDAC1 Smartpool® (Millipore), construcciones de ARNhc 29-meras de HuSH contra HDAC1 (OriGene) y similares), y similares], inhibidores de la G9a histona metiltransferasa [por ejemplo, inhibidores de bajo peso molecular, tales como BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2:525-528 (2008)), inhibidores de la expresión basados en ácidos nucleicos, tales como ARNip y ARNhc contra G9a (por ejemplo, ARNip de G9a (humano) (Santa Cruz Biotechnology) y similares) y similares], agonistas del canal L de calcio (por ejemplo, Bayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008)), UTF1 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)), señalización de Wnt (por ejemplo, Wnt3a soluble) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008)), 2i/LIF (2i es un inhibidor de la señalización de proteína quinasa activada por mitógenos y la glucógeno sintasa quinasa-3; PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008)), inhibidores de p53 (por ejemplo, ARNip y ARNhc contra p53 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)) y similares. Los inhibidores de la expresión basados en ácidos nucleicos pueden estar en forma de vectores de expresión que portan un ADN que codifica ARNip o ARNhc. En este caso, el ADN que codifica ARNip o ARNhc puede insertarse en un vector de expresión no vírico de la presente invención, junto con los factores de reprogramación.

La célula madre pluripotencial inducida producida mediante el método de la presente invención no está sujeta a limitaciones con respecto a su uso y puede emplearse para todos los tipos de estudios e investigaciones que emplean células ES y para el tratamiento de enfermedades que emplean células ES, en lugar de las células ES. Por ejemplo, mediante el tratamiento de una célula madre pluripotencial inducida obtenida a partir de una célula somática recolectada de un paciente mediante el método de la presente invención con ácido retinoico, un factor de crecimiento, tal como EGF, o un glucocorticoide y similares, puede lograrse la inducción de las células diferenciadas deseadas (por ejemplo, células nerviosas, células miocárdicas, células sanguíneas y similares) para que formen un tejido apropiado. Cuando se devuelve el tejido o la célula diferencia obtenidos de este modo al paciente, se logra una terapia de células madre mediante trasplante de células autólogas. Debe advertirse que el uso de una célula madre pluripotencial inducida de la presente invención no se limita a la realización concreta descrita anteriormente.

La presente descripción también proporciona un vector de expresión no vírico para su uso en el método descrito anteriormente para producir una célula madre pluripotencial inducida, es decir, un vector de expresión no vírico (preferiblemente un vector plasmídico) que incorpora al menos un gen que codifica un factor de reprogramación. La estructura del vector se describe en detalle en la sección del método para producir una célula madre pluripotencial inducida de la presente invención.

Un ejemplo es un vector de expresión no vírico que incorpora un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox, preferiblemente incorporados en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3'. Un ejemplo más preferible es un vector de expresión no vírico que incorpora estos genes con una secuencia intermedia que permite la expresión policistrónica, en particular preferiblemente un vector de expresión no vírico en el que se incorporan OCT3/4, Klf4 y Sox 2 con una secuencia intermedia que permite la expresión policistrónica, preferiblemente una secuencia autoprocadora 2A de FMDV, en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3'.

Puesto que un vector de expresión no vírico, tal como un vector plasmídico, introducido en una célula somática generalmente no se integra en el genoma de la célula, en una realización preferida, la presente descripción proporciona una célula madre pluripotencial inducida en la que los transgenes no se integran en el genoma. Puesto que dicha célula iPS reduce el riesgo de provocar tumorigénesis en tejidos u órganos diferenciados de ellas y/o la alteración (por ejemplo, ruptura o alteración) de un gen endógeno, puede usarse preferiblemente para la medicina regenerativa, tal como las terapias de trasplante de células.

Sin embargo, bajo una presión selectiva para la inducción de células iPS, puede observarse una mayor eficacia de integración del vector de expresión no vírico, debido a la necesidad de una expresión estable de los factores de reprogramación. Por tanto, en otra realización preferida, la presente descripción proporciona una célula madre pluripotencial inducida, en la que los transgenes se integran en el genoma en forma de un plásmido. Estas células iPS pueden reducir el riesgo de provocar tumorigénesis en tejidos u órganos diferenciados de ellas, comparado con las células iPS inducidas mediante infección retroviral. Además, los transgenes pueden escindirarse del genoma según sea necesario usando un sistema Cre/loxP (Chang *et al.*, 2009 (supra)) o un vector de transposón piggyback y un transposón piggyback (Kaji *et al.*, 2009 (supra); Woltjen *et al.*, 2009 (supra)) o la inducción de un gen dependiente de tetraciclina. Puede introducirse una Cre recombinasa o transposasa para la escisión que puede expresarse en las células iPS usando un vector plasmídico o un vector adenovírico. En el caso de emplear la inducción de genes dependiente de tetraciclina, la proteína represora de Tet o la proteína represora de Tet mutada se expresa al mismo tiempo.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará a continuación con más detalle por medio de los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo de referencia 1

Se emplearon ratones que portan un indicador Nanog como sistema experimental (Okita *et al.*, Nature, vol. 448, pp. 313-317, 2007). Estos ratones se prepararon incorporando EGFP y un gen de resistencia a la puomicina en el locus del gen Nanog de un BAC ("bacterial artificial chromosome", cromosoma artificial bacteriano) adquirido en BACPAC Resources. El gen Nanog de ratón se expresa específicamente en células pluripotenciales, tales como células ES y embriones tempranos. Se ha demostrado que las células iPS de ratón positivas a este indicador poseen un potencial de diferenciación casi equivalente al de las células ES. Estos ratones con indicador Nanog se cruzaron con ratones con indicador Fbx15 (Tokuzawa *et al.*, Mol. Cell Biol., vol. 23, 2699-2708 (2003)), con lo cual se generaron ratones mutantes que poseen el indicador Nanog y el indicador Fbx15.

El plásmido usado para la reprogramación se preparó tratando pCX-EGFP (un plásmido suministrado por el doctor Masaru Okabe de la Universidad de Osaka, FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) con EcoRI, e insertando una construcción en la que las regiones codificadoras de Oct3/4, Sox2 y Klf4 (todos genes derivados de ratón) están acopladas a través de la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca en el orden de Oct3/4, Klf4 y Sox2, en lugar de EGFP (pCX-2A-mOKS; figura 2). De modo similar, se preparó un plásmido con la región codificadora de c-Myc insertada (pCX-c-Myc; figura 2).

En la preparación de la construcción de la secuencia 2A y Oct3/4, Klf4 y Sox2 acoplados, primero se asociaron oligonucleótidos sentido y antisentido que comprenden la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca (SEQ ID NO:61), sitios de endonucleasas de restricción cadena arriba (XbaI y BglII), y sitios de endonucleasas de restricción cadena abajo (BspHI, MfeI y PstI), y se insertaron en el vector pBluescript II KS (-) digerido con XbaI y PstI (pBS-2A). Después, un ADNc de ratón que codifica Oct3/4 o Klf4 se amplificó mediante PCR, el codón de fin de la traducción se reemplazó por un sitio BamHI, y cada ADNc se clonó en pCR2.1. Después, los ADNc de Oct3/4 y Klf4 se acoplaron con pBS-2A usando una endonucleasa de restricción apropiada para producir pBS-Oct3/4-2A y pBS-Klf4-2A. Después se insertó Klf4-2A en pBS-Oct3/4-2A dentro de marco empleando una endonucleasa de restricción apropiada, con lo cual se produjo pBS-Oct3/4-2A-Klf4-2A. Después, la construcción Oct3/4-2A-Klf4-2A resultante se acopló con un ADNc de Sox2 que contiene un codón de fin de la traducción dentro de marco, usando una endonucleasa de restricción apropiada. Por último, la construcción Oct3/4-2A-Klf4-2A-Sox2-STOP resultante, en la que las secuencias 2A y Oct3/4, Klf4 y Sox2 están acopladas, se insertó en el sitio EcoRI de pCX-EGFP, con lo cual se preparó pCX-2A-mOKS.

Se aislaron fibroblastos (MEF) a partir del feto de ratón mutante mencionado anteriormente (13,5 días después de la fertilización). Puesto que no expresan el gen Nanog, los MEF no expresan EGFP que produce fluorescencia verde. Así, los MEF se recolectaron hacia una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon), previamente revestida con gelatina al 0,1% (Sigma), a $1,3 \times 10^5$ células por pocillo. El medio de cultivo usado fue DMEM/FCS al 10% (DMEM (Nacalai Tesque) suplementado con suero de ternero fetal al 10%), y los MEF se cultivaron a 37 °C, CO₂ al 5%. Al día siguiente se añadieron 4,5 µl del reactivo de transfección FuGene6 (Roche) en 100 µl de medio con reducción de suero Opti-MEM I (Invitrogen), y se dejó el medio en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añadieron 1,5 µg de un vector de expresión (pCX-2A-mOKS), y se dejó el medio en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras lo cual el medio se añadió al medio de cultivo de MEF. Al día siguiente se retiró el medio y se introdujeron 1,5 µg de otro vector de expresión (pCX-c-Myc) con el reactivo de transfección FuGene6 como se describió anteriormente.

Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por un suministro fresco (DMEM/FCS al 10%) y se introdujo un vector de expresión (pCX-2A-mOKS) como se describió anteriormente; al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por un medio de cultivo de células ES (DMEM (Nacalai Tesque) suplementado con suero de ternero fetal al 15%, L-glutamina 2 mM (Invitrogen), aminoácidos no esenciales 100 µM (Invitrogen), 2-mercaptoetanol 100 µM (Invitrogen), penicilina 50 U/ml (Invitrogen) y estreptomycin 50 mg/ml (Invitrogen)), y se introdujo un vector de expresión (pCX-c-Myc) usando el reactivo de transfección FuGene6 como se describió anteriormente.

Al día siguiente, el medio se reemplazó con un medio de cultivo de células ES. En el día 9 después de la recolección, el medio de cultivo de MEF se retiró, y las células se lavaron mediante la adición de 2 ml de PBS. Después de retirar el PBS se añadió tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen), y la reacción se llevó a cabo a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células se alzasen, se añadió un medio de cultivo de células ES, las células se suspendieron, y se recolectaron 1×10^6 (Exp432A) o 2×10^5 (Exp432B) células sobre una placa de 100 mm con células de soporte recolectadas previamente. Las células de soporte usadas fueron células SNL que habían sido tratadas con mitomicina C para finalizar su división celular.

Después el medio de cultivo de ES fue reemplazado por un suministro fresco cada dos días hasta que emergió una colonia visible; la colonización comenzó alrededor del día 17, y se observó una colonización completa alrededor del día 24 (figura 1). El anterior programa de desarrollo en el tiempo se resume en Exp432 en las figuras 1 y 3.

Las células obtenidas se convirtieron gradualmente en positivas a GFP, mostraron una morfología indistinguible de la de las células ES de ratón (432A-1 en la figura 4), se ensayaron dando positivo para diversos marcadores de células ES a unos niveles similares que con las células ES (iPS-432A-1 en la figura 5), y produjeron ratones quiméricos adultos. Basándose en la forma de colonia característica de las células iPS de ratón y los resultados

positivos a GFP y los resultados positivos para otros marcadores que no son marcadores de la diferenciación, se concluyó que mediante la introducción del vector de expresión descrito anteriormente en células MEF, la reprogramación nuclear avanza completamente para producir una célula iPS, y la célula iPS prolifera y forma la colonia visible. Por tanto, estos resultados demuestran que puede prepararse una célula iPS sin usar un retrovirus o un lentivirus. Un análisis de PCR detectó la integración del vector de expresión descrito anteriormente en el genoma del hospedante (iPS-432A-1 en la figura 6).

Ejemplo 2

Para evitar la integración de pCX-2A-mOKS y pCX-c-Myc en el genoma del hospedante, se modificó el protocolo de transfección.

En los días 1, 3, 5 y 7 después del inicio del experimento, pCX-2A-mOKS y pCX-c-Myc fueron transfectados juntos (Exp440 en la figura 3). Como resultado se obtuvieron muchas colonias positivas a GFP y se produjeron células morfológicamente indistinguibles de las células ES (440A-3 en la figura 4). Las células obtenidas expresan los marcadores de células ES al mismo nivel que las células ES (iPS-440A en la figura 5). Para examinar la integración del ADN plasmídico en el genoma se diseñaron 16 conjuntos de cebadores de PCR capaces de amplificar cada porción del plásmido (figuras 2, 13 y 14). En 9 de los 11 clones positivos a GFP obtenidos mediante el protocolo modificado no se observó amplificación de un ADN exógeno (figura 6). Además, en un análisis de la transferencia Southern, no se detectó la integración de un gen exógeno en estos clones (figura 11). Aunque no se puede descartar definitivamente la posible presencia de un pequeño fragmento de plásmido, los anteriores resultados demuestran que estas células iPS no presentan los plásmidos pCX-2A-mOKS y pCX-c-Myc integrados en el genoma del hospedante.

Para descartar la posibilidad de que las células iPS sin integración se derivan de posibles células contaminantes ES Nanog-GFP, se realizó un análisis SSLP. En Exp440 en la figura 3, se emplearon células MEF procedentes de cinco fetos. En el análisis SSLP, estos cinco fetos fueron distinguibles, y se identificaron las derivaciones de las células iPS sin integración (figura 12). Este análisis también demuestra que las células iPS sin integración se diferencian de las células ES derivadas de la cepa 129S4 (figura 12).

Ejemplo 3

Para confirmar la pluripotencialidad de las células iPS sin integración, células iPS obtenidas como se describe en el ejemplo 2 fueron trasplantadas de modo subcutáneo a ratones atómicos. Todos los clones ensayados (440A-3, -4, -8 y -10) produjeron tumores, que incluyen una amplia gama de tipos celulares, incluyendo células derivadas de las tres capas germinales (figura 7). Además, se inyectaron células iPS sin integración en blastocitos de ratón ICR. A juzgar por los colores del pelo, se obtuvieron quimeras adultas a partir de todos los clones inyectados (440A-3, -4, -6, -8, -9 y -10) (figura 8). En estos ratones quiméricos, los análisis de PCR no detectaron la integración de ninguno de los transgenes (figura 9). El análisis de PCR detectó los indicadores Nanog y Fbx15 en las quimeras (figura 9). Combinado con el hecho de que aparecieron células iPS sin integración en los ratones con los dos indicadores, y que el laboratorio del inventor no mantiene células ES con los dos indicadores, estos resultados demuestran que las quimeras se derivaron de células iPS sin integración, y no de células ES contaminantes. Por tanto, estos resultados confirman que las células iPS sin integración poseen pluripotencialidad.

Un examen a largo plazo de los 71 ratones quiméricos obtenidos y su descendencia demostró que, en los ratones quiméricos derivados de una célula iPS preparada introduciendo 4 genes (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) empleando un retrovirus, y sus descendientes, comparados con ratones normales, la tasa de mortalidad empezó a aumentar en un momento más temprano, mientras que los ratones quiméricos derivados de una célula iPS sin integración de los 4 genes, y sus descendientes, mostraron una curva de supervivencia similar a la de los ratones normales.

Cuando se cruzaron los ratones quiméricos obtenidos y ratones de tipo salvaje, se obtuvieron ratones F1; por tanto, se confirma que las células iPS sin integración contribuyen a la línea germinal (transmisión por línea germinal).

Ejemplo de referencia 4

Se emplearon células madre de la pulpa dental humanas (nombre del clon: DP31, documento PCT/JP2008/068320, J. Dent. Res., 87(7):676-681 (2008)) como sistema experimental. Se dejó que las DP31 expresasen el gen del receptor del virus ecotrópico de ratón Slc7a1 usando un lentivirus como se describió en Cell, 131, 861-872 (2007). Estas células se cultivaron usando el kit de bala MSCGM (Lonza).

Los plásmidos usados para la reprogramación se prepararon a partir de pCX-EGFP (suministrado por el doctor Masaru Okabe de la Universidad de Osaka, FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) de la misma manera que en el ejemplo 1. De modo específico, el pCX-EGFP se trató con EcoRI, y se insertó una construcción con las regiones codificadoras de SOX2 y KLF4 acopladas a través de la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca, en lugar de EGFP, con lo cual se preparó el plásmido pCX-hSK. De modo similar, se preparó un plásmido con c-Myc, Lin28, y Nanog acoplados a través de la secuencia 2A (pCX-hMLN), un plásmido con la región codificadora de OCT3/4 insertada (pCX-hOCT3/4), y un plásmido con el antígeno T grande de SV40 insertado (pCX-SV40LT).

Las DP31 cultivadas en una placa de 100 mm se lavaron con PBS, se añadió tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen), y la reacción se llevó a cabo a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células se alzasen, se añadió MSCGM, las células se suspendieron, y se recuperaron 6×10^5 en un tubo de 15 ml. Las células se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos, después se retiró el sobrenadante, y se introdujeron los plásmidos de expresión usando el kit de fibroblastos dérmicos humanos Human Dermal Fibroblast Nucleofector Kit (Amaxa). Las cantidades de plásmidos usadas fueron de 0,5 µg para pCX-hOCT3/4, 1,0 µg para pCX-hSK, 1,5 µg para pCX-hMLN, y 0,5 µg para pCX-SV40LT. Después del tratamiento, las células se recolectaron hacia una placa de 6 pocillos. Después de cultivarse en MSCGM durante 10 días, las células se volvieron a lavar con PBS, de nuevo se añadió tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen), y la reacción se llevó a cabo a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células se alzasen, se añadió MSCGM, las células se suspendieron, y se recolectaron 1×10^6 células sobre una placa de 100 mm con células de soporte recolectadas previamente. Las células de soporte usadas fueron células SNL que habían sido tratadas con mitomicina C para finalizar su división celular. Después, se reemplazó el medio por un suministro fresco cada dos días hasta que se empezó a observar una colonia. El medio usado se preparó mezclando volúmenes iguales de un medio de cultivo de células ES de primate (ReproCELL) suplementado con MSCGM y bFGF (4 ng/ml), respectivamente. La colonización comenzó alrededor del día 19, lo cual confirma el establecimiento de células iPS humanas (figura 15).

Después, se transfectaron HDF humanas fetales (Cell Applications, INC) con los mismos siete tipos de gene que se describieron anteriormente. Después de la transfección, las células se cultivaron usando un medio de cultivo de células ES de primate (ReproCELL) suplementado con bFGF humano recombinante 4 ng/ml (WAKO). Las células MSTO actuaron como células de soporte. Se muestran fotografías de las células en el día 31 después de la transfección (5 clones: 203A-1 a 203A-5, de los cuales se escogió 203A-4 como control negativo) en la figura 16, y se muestran fotografías de células en el 2º subcultivo en la figura 17. Los clones 203A-1 a 203A-3 y 203A-5 mostraron una morfología similar a células ES típica, confirmando el establecimiento de células iPS humanas.

Estas células se sometieron a un análisis de PCR genómico, y se examinaron para la integración de los transgenes en el genoma. Los resultados se muestran en la figura 18. En todos los clones, se detectó la integración de Oct3/4 (pCX-hOCT3/4) y c-Myc (pCXhMLN). Se detectó la integración de Klf4 (pCX-hSK) en los clones distintos a 203A-4. No se detectó la integración de SV40LT (pCX-SV40LT) en ninguno de los clones.

Ejemplo de referencia 5

Se transfectaron células madre de la pulpa dental DP31, usadas en el ejemplo 4, con seis tipos de genes, excluyendo el antígeno T grande de SV40 (pCX-hSK, pCX-hMLN, pCX-hOCT3/4), de la misma manera que en el ejemplo 4. Se muestran fotografías de las células en el día 35 después de la transfección (5 clones: 217A-1 a -4 y -6) en la figura 19. En la figura 20 se muestran fotografías de las células en el 2º subcultivo. Todos los clones mostraron una morfología similar a células ES típica, confirmando el establecimiento de células iPS humanas.

Estos clones de células iPS humanas establecidas (217A-1 a 217A-4, 217A-6) fueron sometidos a un análisis de PCR genómico. Los resultados se muestran en la figura 21. En todos estos clones se demostró la integración de los transgenes.

Ejemplo de referencia 6

Se dejó que una línea de células HDF derivada de una niña japonesa de 6 años (HDF-120; JCRB) expresase el gen Slc7a1. Las células resultantes (HDF-120-Slc) se transfectaron con los seis tipos de genes mencionados anteriormente y ARNhc contra p53 (ARNhc2: SEQ ID NO:62) (vectores introducidos: pCX-hOCT3/4, pCX-hSK, pCX-hMLN-shp53).

Cada uno de pCX-hOCT3/4 (0,5 µg), pCX-hSK (1,0 µg), y pCX-hMLN-shp53 (1,5 µg) se introdujeron eléctricamente en $6,0 \times 10^5$ células de HDF-120-Slc usando un microporador (punta de 100 µl, 1600 V, 10 ms, 3 veces). Diez días después, cada vector se introdujo de nuevo eléctricamente bajo las mismas condiciones, y las células se recolectaron sobre MSTO (placa de 100 mm). Estas células se cultivaron usando DMEM/FCS al 10% hasta el día 10, y después usando un medio de cultivo de células ES de primate (ReproCELL) suplementado con bFGF humano recombinante 4 ng/ml (WAKO). En la figura 22 se muestran fotografías de las células en el día 35 después de la primera electroporación. En la figura 23 se muestran fotografías de las células después del cultivo de transferencia. Apareció una morfología similar a células ES típica, confirmando el establecimiento de células iPS humanas. Un análisis de PCR genómico demostró la integración de los transgenes (carril 279A-2 en la figura 24).

Ejemplo 7

Se introdujeron vectores de expresión que incorporan por separado los cuatro tipos de genes Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc (pCX-Oct4, pCX-Sox2, pCX-Klf4, pCX-c-Myc) en células MEF derivadas de un ratón con indicador Nanog (Okita *et al.*, Nature, vol. 448, pp. 313-317, 2007) según el protocolo del ejemplo 2.

En primer lugar, las células MEF con indicador Nanog se recolectaron sobre una placa de 6 pocillos revestida con gelatina ($1,3 \times 10^5$ células/pocillo), y se transfectaron con cada uno de pCX-Oct4 (0,37 µg), pCX-Sox2 (0,36 µg),

5 pCX-Klf4 (0,39 μg), y pCX-c-Myc (0,38 μg) usando FuGene6 en los días 1, 3, 5 y 7. En el día 9, se recolectaron 1×10^6 células (1,0) o $0,2 \times 10^6$ células (0,2) sobre MSTO-PH o gelatina (placa de 100 mm), y las colonias se seleccionaron en el día 25. En la figura 25 se muestran fotografías de las células después de la selección. Se obtuvo una forma de colonia característica de las células iPS de ratón y también resultados positivos a GFP, lo cual confirma el establecimiento de células iPS de ratón. Los clones de células iPS de ratón establecidos (497A-1 a A-5) fueron sometidos a un análisis de PCR genómico. Los resultados se muestran en la figura 26. Tanto 497A-2 como 497A-5 demostraron ser células iPS sin integración de ninguno de los genes exógenos.

Aplicabilidad industrial

10 Según el método de la presente invención, es posible preparar una célula madre pluripotencial inducida muy segura a partir, por ejemplo, de una célula somática de un paciente. Las células obtenidas mediante la diferenciación de la célula madre pluripotencial inducida (por ejemplo, células miocárdicas, células productoras de insulina, células nerviosas y similares) pueden usarse de forma segura para terapias de trasplante de células madre para una amplia gama de enfermedades, que incluyen la insuficiencia cardíaca, la diabetes dependiente de insulina, la enfermedad de Parkinson y lesiones medulares.

15 Listado de secuencias

<110> Kyoto University

<120> MÉTODO DE REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

20 <130> 091381

<150> US 61/071,508

<151> 2008-05-02

25 <150> US 61/136,246

<151> 2008-08-21

<150> US 61/136,615

<151> 2008-09-19

30

<150> US 61/193,363

<151> 2008-11-21

<160> 62

35

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 20

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para G3PDH

45

<400> 1

accacagtcc atgcatcac 20

<210> 2

<211> 20

50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> Cebador para G3PDH

<400> 2

tccaccacc tggctgta 20

60

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para Nanog
 5 <400> 3
 agggctgct actgagatgc t 21
 <210> 4
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Nanog
 15 <400> 4
 caacacctgg ttttctgcc accg 24
 <210> 5
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Rex1
 25 <400> 5
 acgagtggca gtttctctt gggg 24
 <210> 6
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Rex1
 35 <400> 6
 tatgactcac ttccaggggg cact 24
 40 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para ECAT1
 <400> 7
 50 tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat 28
 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para ECAT1
 60 <400> 8
 atgggccgcc atacgacgac gctcaact 28
 <210> 9
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para ERas
 5 <400> 9
 actgccctc atcagactgc tact 24
 <210> 10
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para ERas
 15 <400> 10
 cactgccttg tactcgggta gctg 24
 <210> 11
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador para Fbx15
 <400> 11
 gttggaatct gctctacag 20
 30 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para Fbx15
 <400> 12
 40 cttaccaag attccgatg 20
 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para Esg1
 <400> 13
 50 gaagtctggt tcctggcag gatg 24
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Esg1
 60 <400> 14
 actcgataca ctggcctagc 20
 <210> 15
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para Oct3/4
 5 <400> 15
 ctgagggcca ggcaggagca cgag 24
 <210> 16
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Oct3/4
 15 <400> 16
 ctgtagggag ggcttcgggc actt 24
 <210> 17
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Sox2
 25 <400> 17
 ggttacctct tcctcccact ccag 24
 <210> 18
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para Sox2
 <400> 18
 40 tcacatgtgc gacaggggca g 21
 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para Klf4
 <400> 19
 50 caccatggac ccgggcgtgg ctgccagaaa 30
 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Klf4
 60 <400> 20
 ttaggctggt ctttccggg gccacga 27
 <210> 21
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para c-Myc
 5 <400> 21
 cagaggagga acgagctgaa ggcg 24
 <210> 22
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para c-Myc
 15 <400> 22
 ttatgcacca gagtttcgaa gctgttcg 28
 <210> 23
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador para O-1
 <400> 23
 cggaattcaa ggagctagaa cagttgcc 29
 30 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para O-1
 <400> 24
 ctgaagggtc tcattgtgt cg 22
 40 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para O-2
 <400> 25
 50 gatcactcac atcgcaatc 20
 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para O-2
 60 <400> 26
 ctgggaaagg tgcctgtag cc 22
 <210> 27
 <211> 25
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para K
 5 <400> 27
 gcggaaggg agaagacact gcgtc 25
 <210> 28
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para K
 15 <400> 28
 taggagggcc ggggtgtac tgct 24
 <210> 29
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para K-S
 25 <400> 29
 ccttacacat gaagaggcac ttt 23
 <210> 30
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para K-S
 35 <400> 30
 cagctccgtc tccatcatgt tat 23
 40 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para M
 <400> 31
 50 aactcccc aacaccagga cgttt 25
 <210> 32
 <211> 29
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para M
 <400> 32
 60 gctcgcccaa atcctgtacc tcgtccgat 29
 <210> 33
 <211> 25
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para M

5 <400> 33
 gagatgagcc cgactccgac ctctt 25

<210> 34
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para 1

15 <400> 34
 aggtgcaggc tgcctatc 18

<210> 35
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para 1

25 <400> 35
 ttagccagaa gtcagatgct c 21

<210> 36
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para 2

<400> 36
 40 tggcgtaatc atggcatag 20

<210> 37
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador para 2

<400> 37
 50 gcaacgcaat taatgtgagt tag 23

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para 3

<400> 38
 60 ctggatccgc tgcattaatg a 21

<210> 39
 <211> 17
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para 3
 5 <400> 39
 ccgagcgcag cgagtca 17
 <210> 40
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 4
 15 <400> 40
 gccttatccg gtaactatcg t 21
 <210> 41
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 4
 25 <400> 41
 gcaccgccta catacctc 18
 30 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para 5
 <400> 42
 agttgcctga ctcccgtcg tg 22
 40 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para 5
 <400> 43
 50 ggagccggtg agcgtgggtc 20
 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 6
 60 <400> 44
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttg 24
 <210> 45
 <211> 22
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para 6
 5 <400> 45
 tcacagaaaa gcatcttacg ga 22
 <210> 46
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 7
 15 <400> 46
 gaaaagtgcc acctggtcga catt 24
 <210> 47
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 7
 25 <400> 47
 gggccattta ccgtaagta tgta 24
 <210> 48
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 8
 35 <400> 48
 tatcatatgc caagtacgc 19
 40 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para 8
 <400> 49
 50 tagatgtact gccaagtagg aa 22
 <210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 9
 60 <400> 50
 tctgactgac cgcgttact 19
 <210> 51
 <211> 22
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

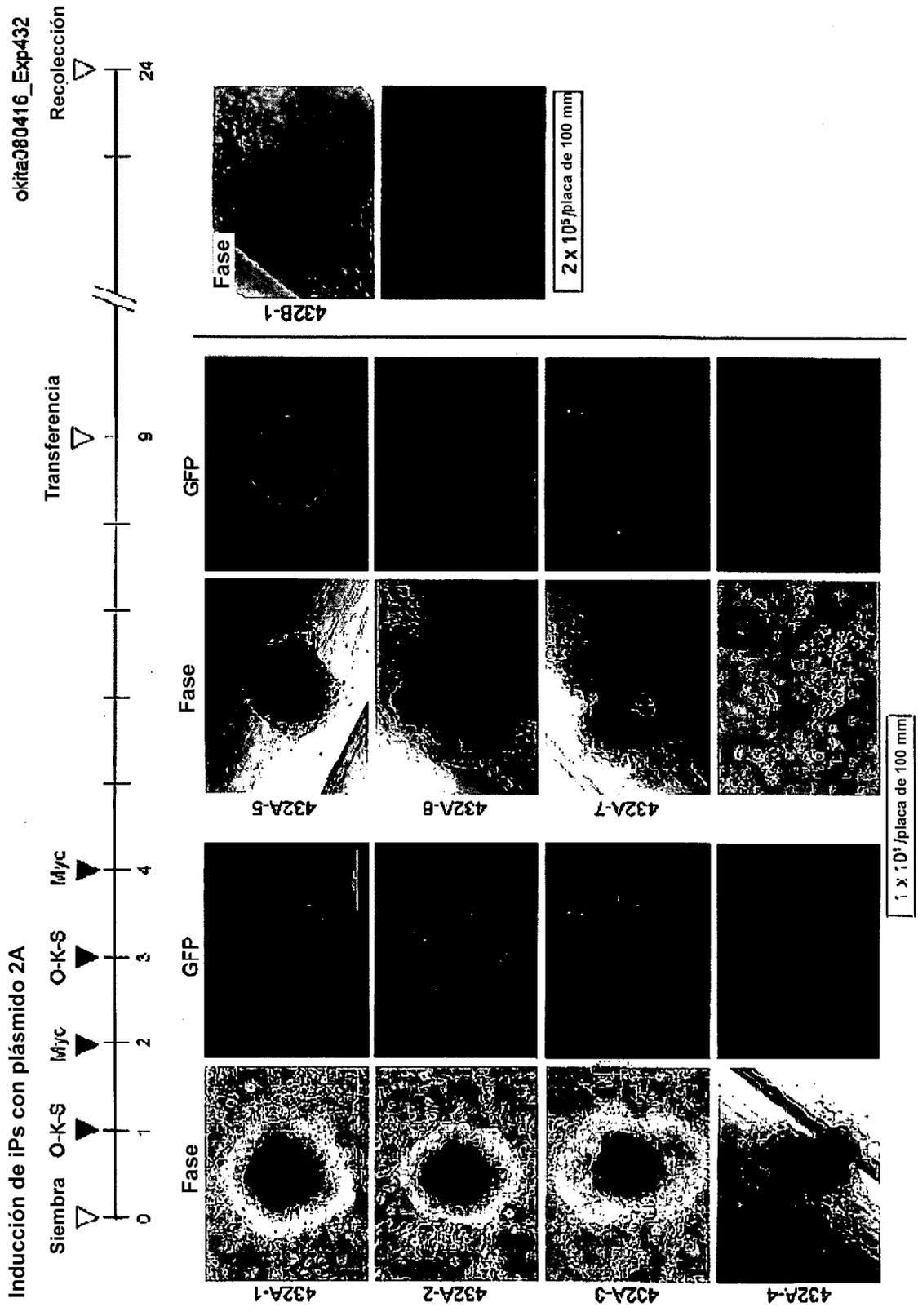
<220>
 <223> Cebador para 9
 5 <400> 51
 agaaaagaaa cgagccgtca tt 22
 <210> 52
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para 10
 15 <400> 52
 gggggctgcg aggggaacaa a 21
 <210> 53
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador para 10
 <400> 53
 gccgggccgt gctcagcaac t 21
 30 <210> 54
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para 11
 <400> 54
 40 gcgagccgca gccattgcct tta 24
 <210> 55
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para 11
 <400> 55
 50 cccagatttc ggctccgcca gat 23
 <210> 56
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Nanog-indicador
 60 <400> 56
 tgggatccct atgctactcc gtcgaagttc 30
 <210> 57
 <211> 28
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para Nanog-indicador
 5 <400> 57
 ctaggcaaac tgtggggacc aggaagac 28
 <210> 58
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Fbx15-indicador
 15 <400> 58
 tggccaaca tcttatacac agtaatga 28
 <210> 59
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Fbx15-indicador
 25 <400> 59
 gtggaactcc ctctagccc tctatccc 28
 <210> 60
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para Fbx15-indicador
 35 <400> 60
 aatgggctga ccgcttcctc gtgctt 26
 40 <210> 61
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia 2A
 <400> 61
 aaaattgtcg ctctgtcaa acaaactctt aactttgatt tactcaaact ggctgggat 60
 50 gtagaaaagca atccagggtcc a 81
 <210> 62
 <211> 48
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNhc contra p53
 60 <400> 62
 gactccagtg gtaatctact gctcgagcag tagattacca ctggagtc 48

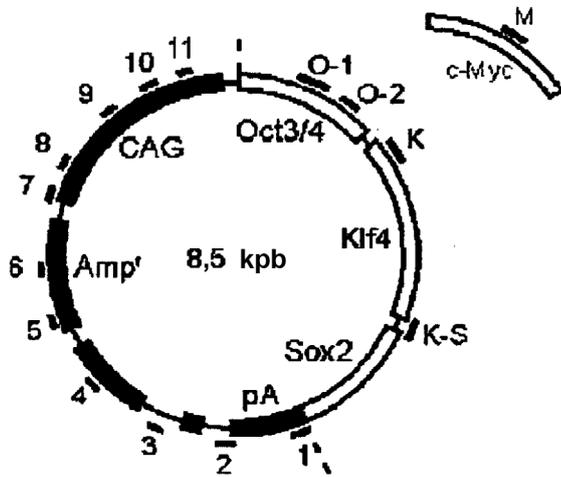
REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para producir una célula madre pluripotencial inducida, que comprende la etapa de introducir dos o más tipos de vectores de expresión no víricos diferentes para introducir cuatro o más tipos de genes que codifican un factor de reprogramación en una célula somática,
- 5 en el que los vectores de expresión no víricos son vectores plasmídicos de replicación autónoma fuera de un cromosoma,
- en el que los genes que codifican un factor de reprogramación se seleccionan del grupo que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox, un gen de la familia Myc, un gen de la familia Lin y el gen Nanog,
- 10 y en el que todos los tipos de vectores de expresión no víricos se introducen al mismo tiempo en la célula somática.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que un primer tipo de vector de expresión no vírico incorpora al menos dos tipos de genes seleccionados de los genes que codifican un factor de reprogramación acoplados a través de una secuencia intermedia que permite la expresión policistrónica.
- 3.- El método de la reivindicación 2, en el que la secuencia intermedia es una secuencia 2A derivada del virus de la enfermedad del pie y la boca.
- 15 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el número de tipos de vectores de expresión no víricos introducidos en la célula somática es de 2, 3, o 4.
- 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los genes que codifican un factor de reprogramación son una combinación de cuatro tipos de genes que consiste en un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf, un gen de la familia Sox y un gen de la familia Myc, en el que el gen de la familia Oct, el gen de la familia Klf y el gen de la familia Sox se incorporan en un tipo de vector de expresión no vírico, preferiblemente (1) en este orden en la orientación desde el extremo 5' al 3' y/o (2) a través de una secuencia intermedia que permite la expresión policistrónica.
- 20 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el gen de la familia Oct es el gen Oct3/4, el gen de la familia Klf es el gen Klf4, y el gen de la familia Sox es el gen Sox2.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los vectores de expresión no víricos incorporan además un gen que codifica un factor que induce la inmortalización de las células, en el que el gen que codifica un factor que induce la inmortalización de las células se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en el gen TERT, el antígeno T grande de SV40, HPV16 E6, HPV16 E7, y Bmi1 que pueden usarse de modo individual o en combinación.
- 30 8.- El método de la reivindicación 7, en el que el gen de la familia Myc es el gen c-Myc, y el gen de la familia Lin es el gen Lin28.
- 9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha introducción se realiza repetidamente dos o más veces.
- 35 10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho método comprende además la introducción o la adición de mejoradores de la eficacia de establecimiento de células iPS seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), inhibidores de la G9a histona metiltransferasa, agonistas del canal L de calcio, UTF1, señalización de Wnt, 2i/LIF, e inhibidores de p53.

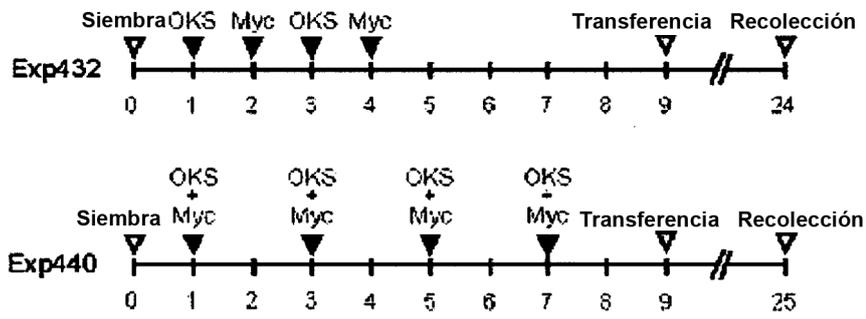
{Fig. 1}



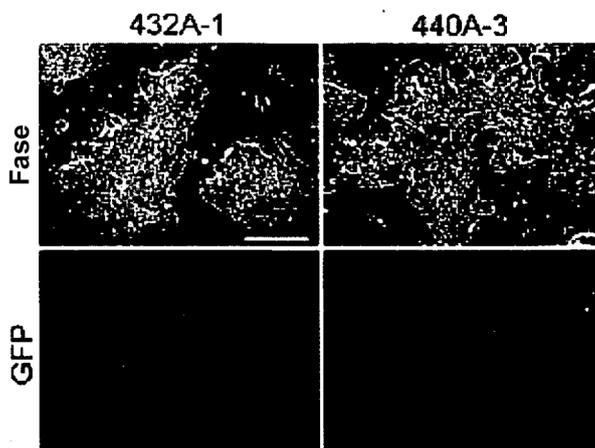
{Fig. 2}



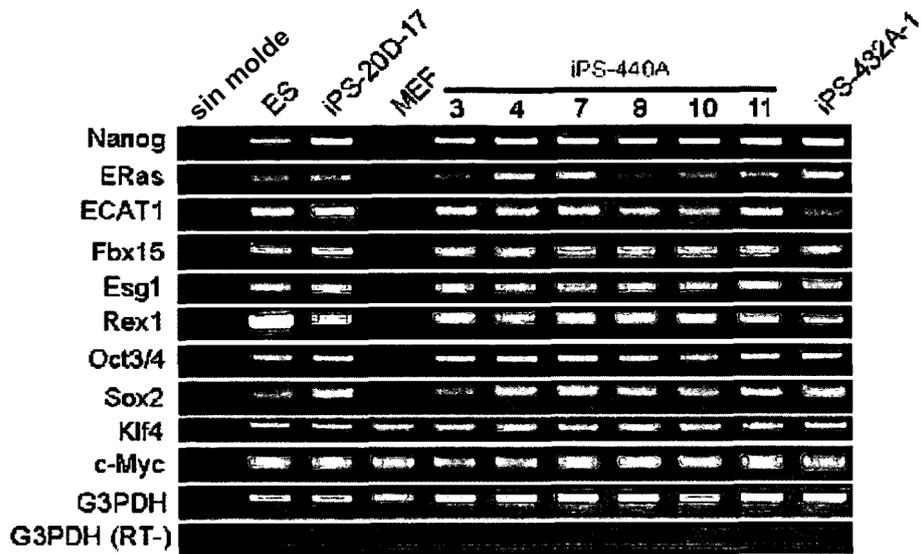
{Fig. 3}



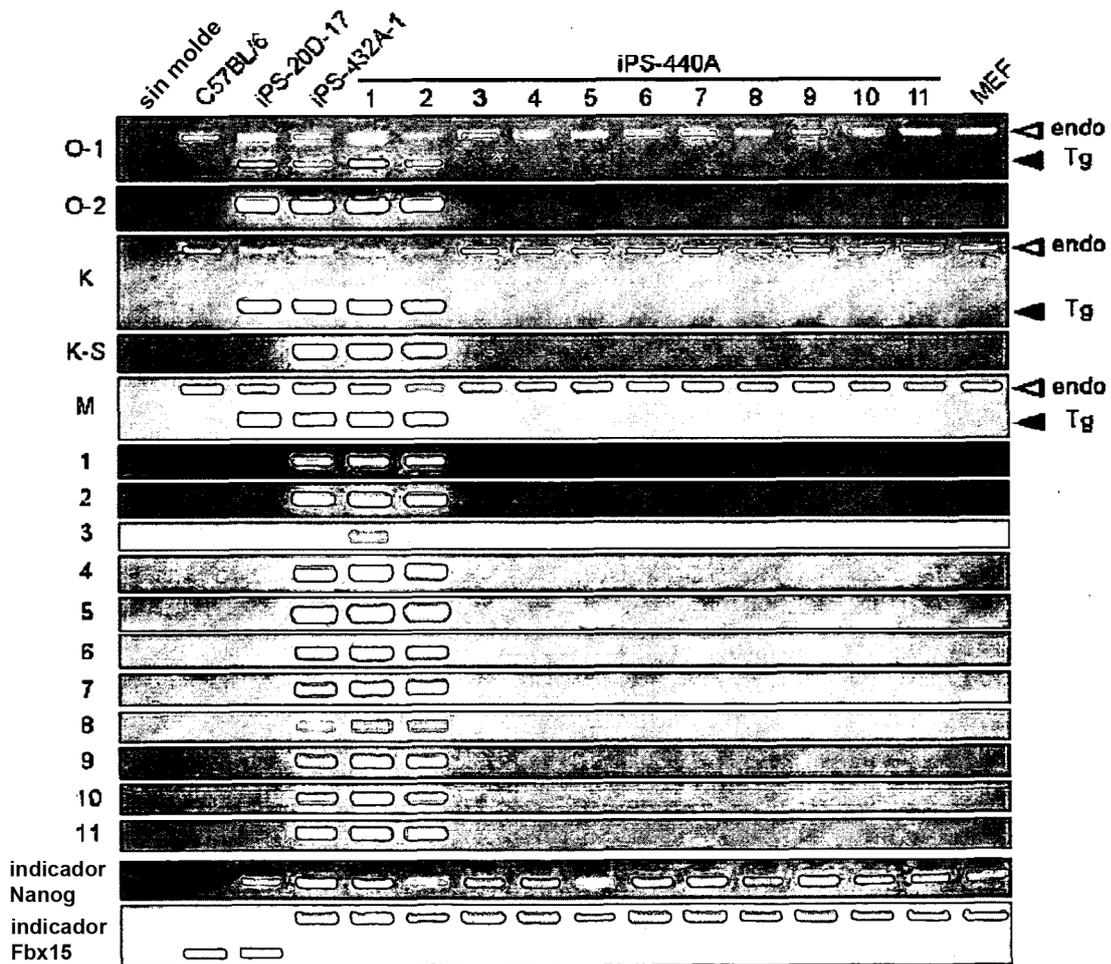
{Fig. 4}



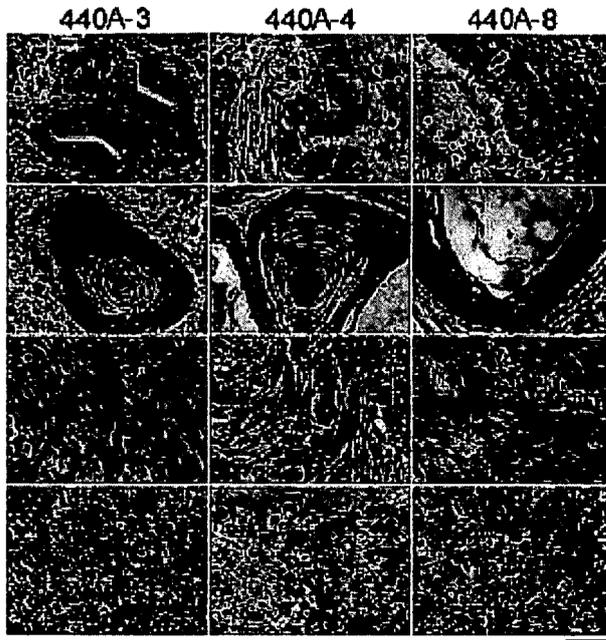
{Fig. 5}



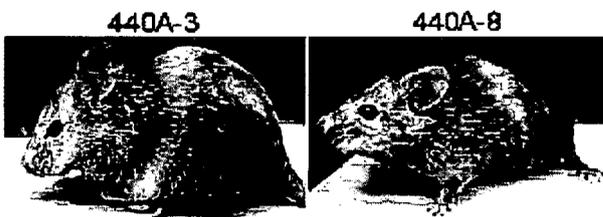
{Fig. 6}



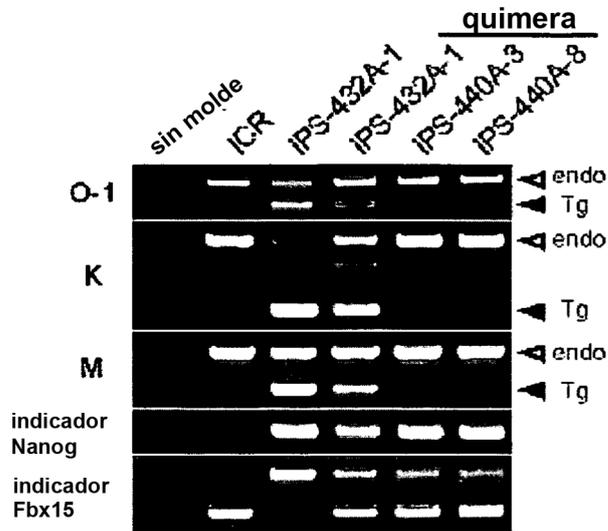
{Fig. 7}



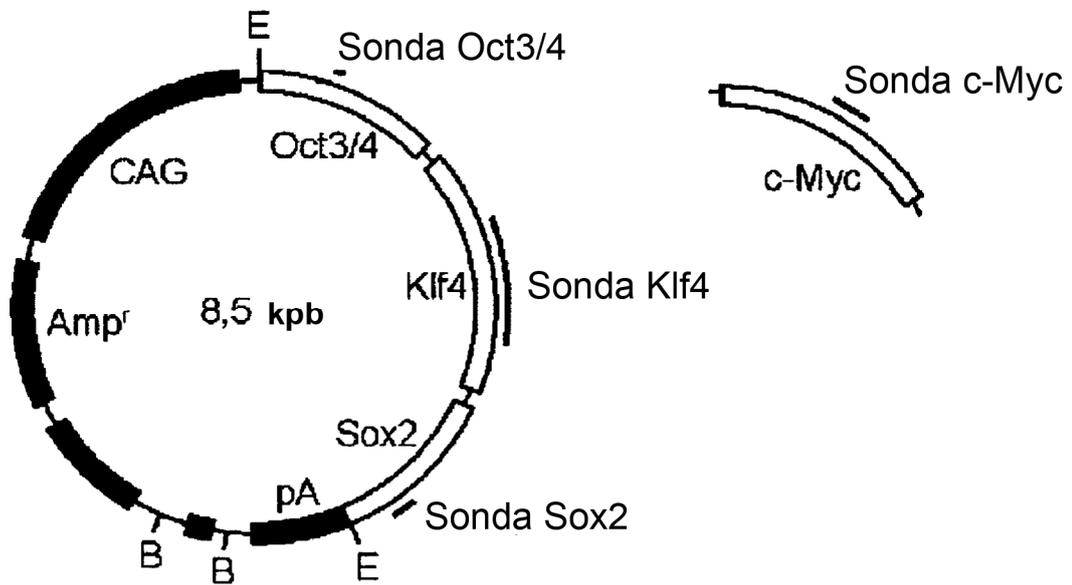
{Fig. 8}



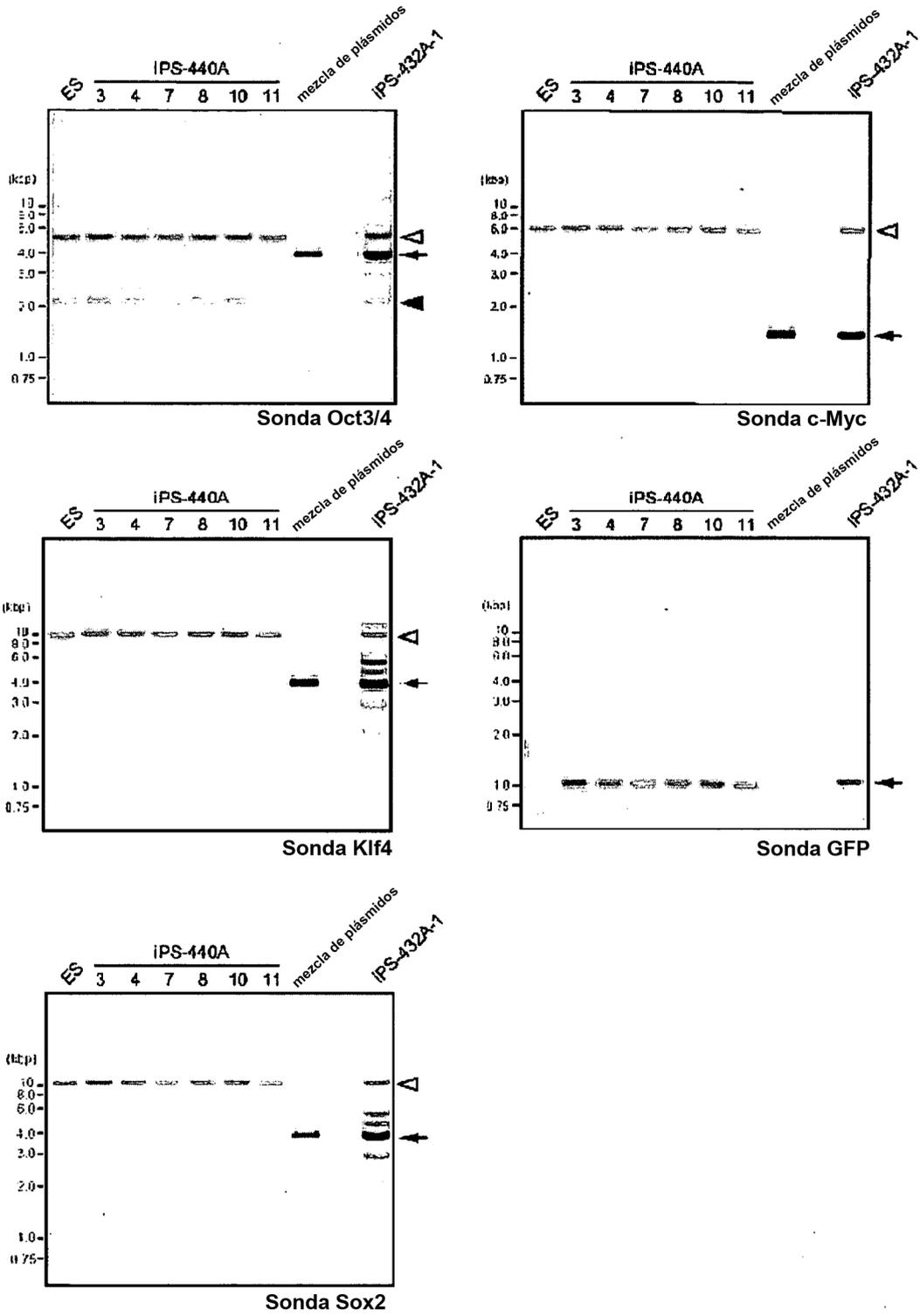
{Fig. 9}



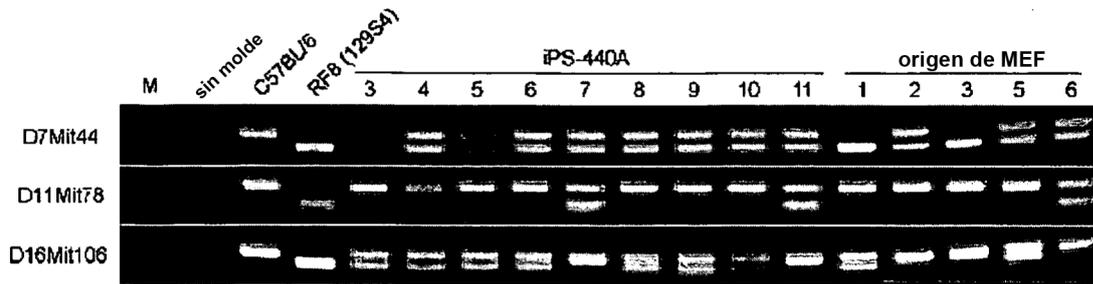
{Fig. 10}



{Fig. 11}



{Fig. 12}



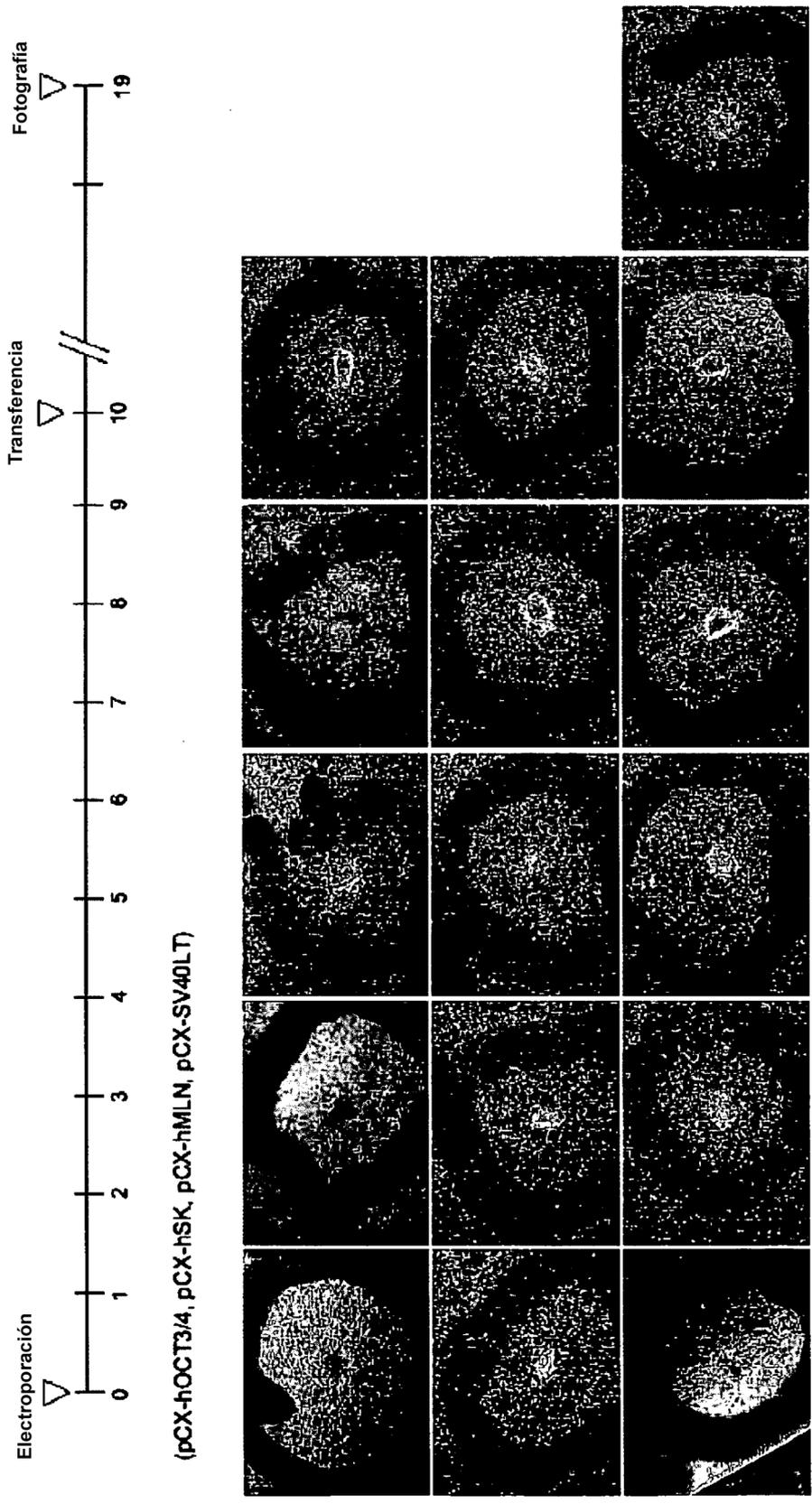
{Fig. 13}

| Regiones | Secuencias |
|----------|---|
| G3PDH | ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC |
| | TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA |
| Nanog | AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT |
| | CAA CAC CTG GTT TTT CTG CCA CCG |
| Rex1 | ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA |
| | TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT |
| ECAT1 | TGT GGG GCC CTG AAA GGC GAG CTG AGA T |
| | ATG GGC CGC CAT ACG ACG ACG CTC AAC T |
| ERas | ACT GCC CCT CAT CAG ACT GCT ACT |
| | CAC TGC CTT GTA CTC GGG TAG CTG |
| Fbx15 | GTT GGA ATC TGC TTC TAC AG |
| | CTT CAC CAA GAT TTC CGA TG |
| Esg1 | GAA GTC TGG TTC CTT GGC AGG ATG |
| | ACT CGA TAC ACT GGC CTA GC |
| Oct3/4 | CTG AGG GCC AGG CAG GAG CAC GAG |
| | CTG TAG GGA GGG CTT CGG GCA CTT |
| Sox2 | GGT TAC CTC TTC CTC CCA CTC CAG |
| | TCA CAT GTG CGA CAG GGG CAG |
| Klf4 | CAC CAT GGA CCC GGG CGT GGC TGC CAG AAA |
| | TTA GGC TGT TCT TTT CCG GGG CCA CGA |
| c-Myc | CAG AGG AGG AAC GAG CTG AAG CGC |
| | TTA TGC ACC AGA GTT TCG AAG CTG TTC G |
| O-1 | CGG AAT TCA AGG AGC TAG AAC AGT TTG CC |
| | CTG AAG GTT CTC ATT GTT GTC G |
| O-2 | GAT CAC TCA CAT CGC CAA TC |
| | CTG GGA AAG GTG TCC TGT AGC C |
| K | GCG GGA AGG GAG AAG ACA CTG CGT C |
| | TAG GAG GGC CGG GTT GTT ACT GCT |
| K-S | CCT TAC ACA TGA AGA GGC ACT TT |
| | CAG CTC CGT CTC CAT CAT GTT AT |
| M | ACA CTC CCC CAA CAC CAG GAC GTT T |
| | GCT CGC CCA AAT CCT GTA CCT CGT CCG AT |
| | GAG ATG AGC CCG ACT CCG ACC TCT T |
| 1 | AGG TGC AGG CTG CCT ATC |
| | TTA GCC AGA AGT CAG ATG CTC |
| 2 | TGG CGT AAT CAT GGT CAT AG |
| | GCA ACG CAA TTA ATG TGA GTT AG |
| 3 | CTG GAT CCG CTG CAT TAA TGA |
| | CCG AGC GCA GCG AGT CA |

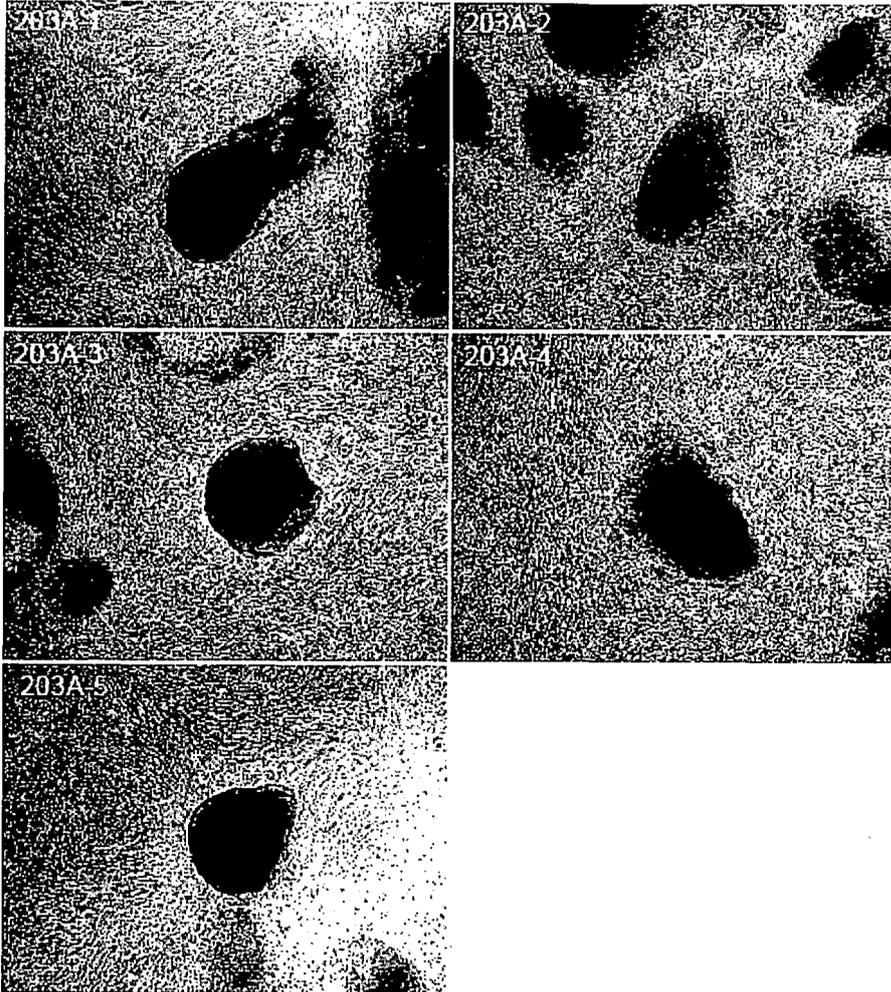
{Fig. 14}

| Regiones | Secuencias |
|--------------------|---|
| 4 | GCC TTA TCC GGT AAC TAT CGT |
| | GCA CCG CCT ACA TAC CTC |
| 5 | AGT TGC CTG ACT CCC CGT CGT G |
| | GGA GCC GGT GAG CGT GGG TC |
| 6 | CCG ATC GTT GTC AGA AGT AAG TTG |
| | TCA CAG AAA AGC ATC TTA CGG A |
| 7 | GAA AAG TGC CAC CTG GTC GAC ATT |
| | GGG CCA TTT ACC GTA AGT TAT GTA |
| 8 | TAT CAT ATG CCA AGT ACG C |
| | TAG ATG TAC TGC CAA GTA GGA A |
| 9 | TCT GAC TGA CCG CGT TAC T |
| | AGA AAA GAA ACG AGC CGT CAT T |
| 10 | GGG GGC TGC GAG GGG AAC AAA |
| | GCC GGG CCG TGC TCA GCA ACT |
| 11 | GCG AGC CGC AGC CAT TGC CTT TTA |
| | CCC AGA TTT CGG CTC CGC CAG AT |
| Indicador Nanog | TGG GAT CCC TAT GCT ACT CCG TCG AAG TTC |
| | CTA GGC AAA CTG TGG GGA CCA GGA AGA C |
| Indicador Fbx15 | TGG TCC AAC ATC TTA TAC ACA GTA ATG A |
| | GTG GAA CTC CCT TCT AGC CCT CTA TCC C |
| | AAT GGG CTG ACC GCT TCC TCG TGC TT |

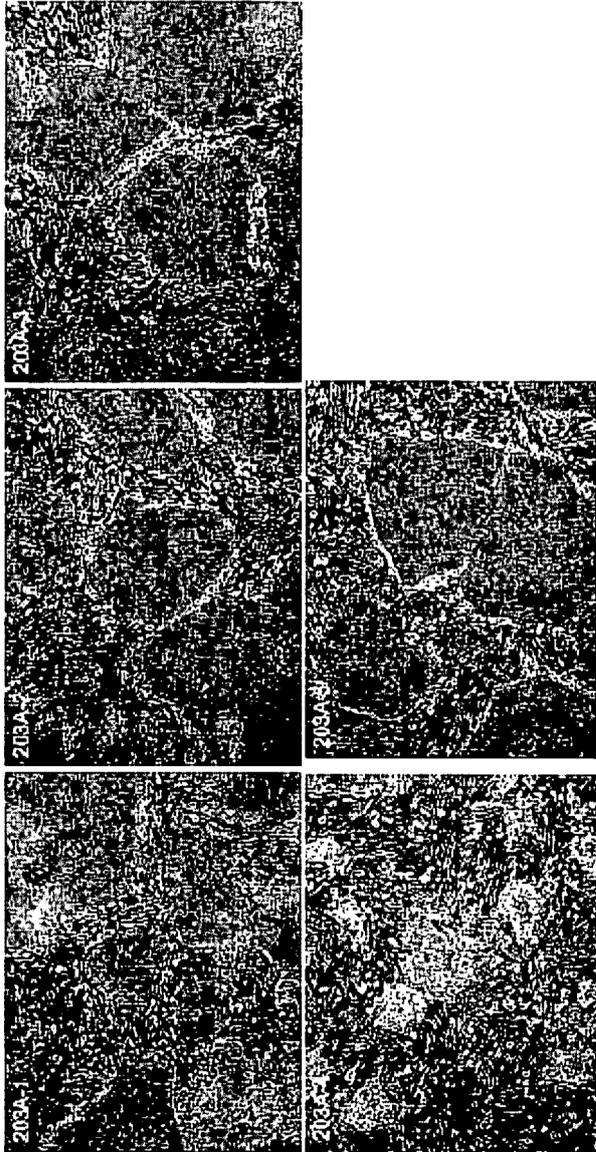
{Fig. 15}



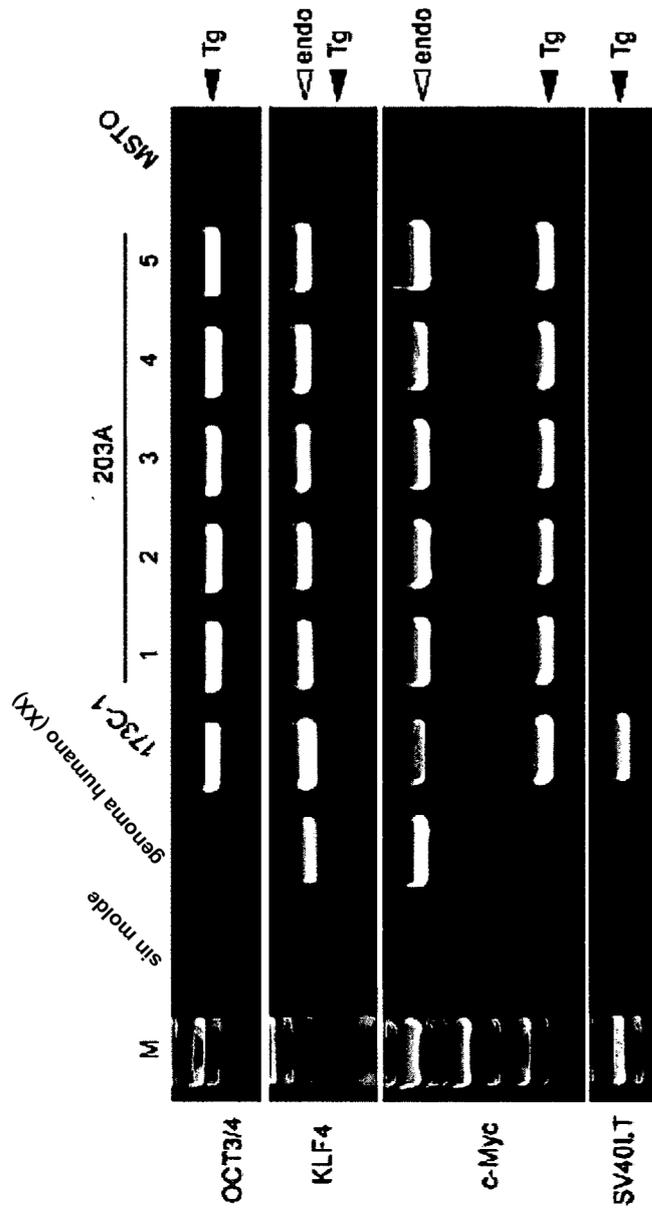
{Fig. 16}



{Fig. 17}



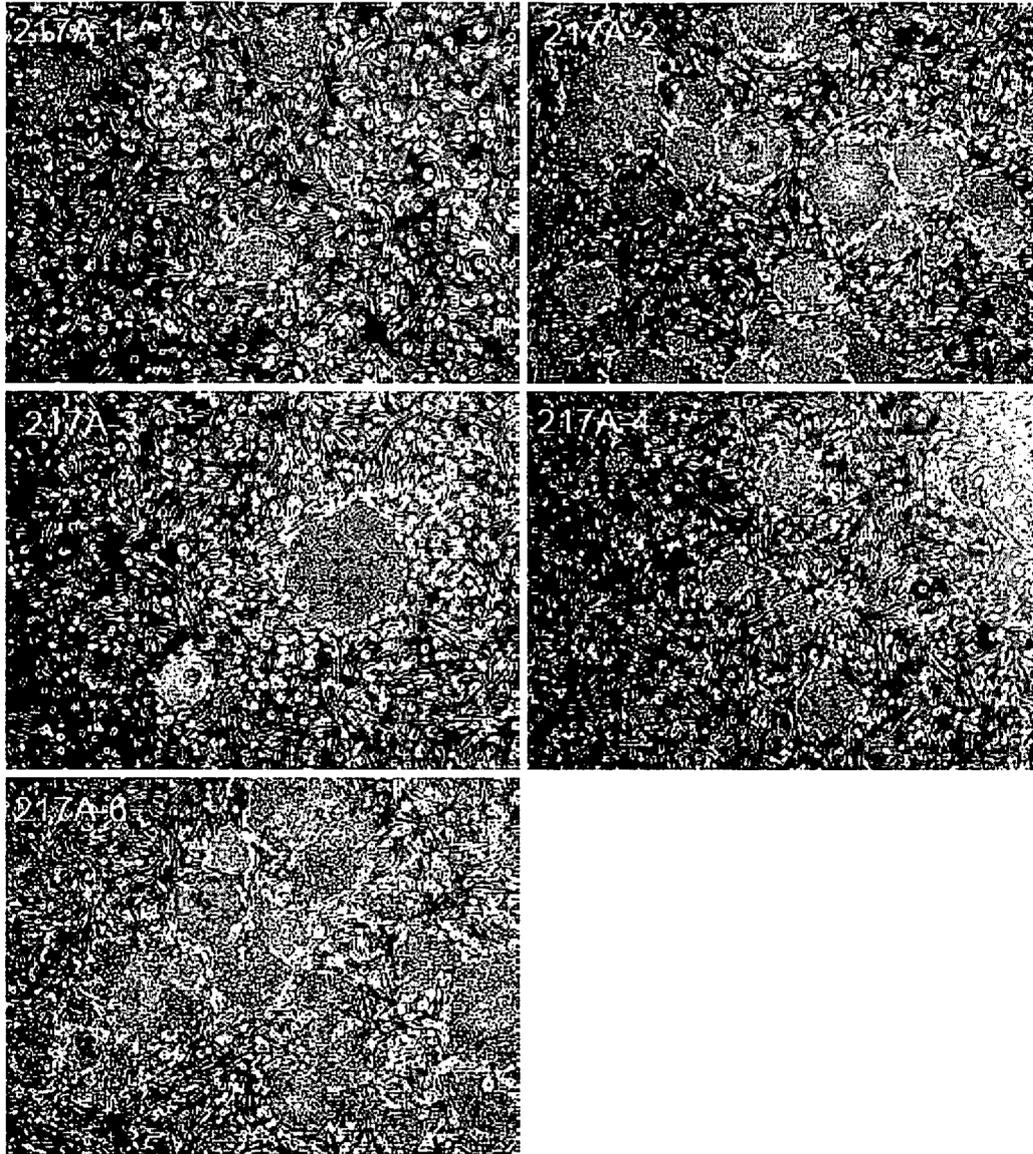
{Fig. 18}



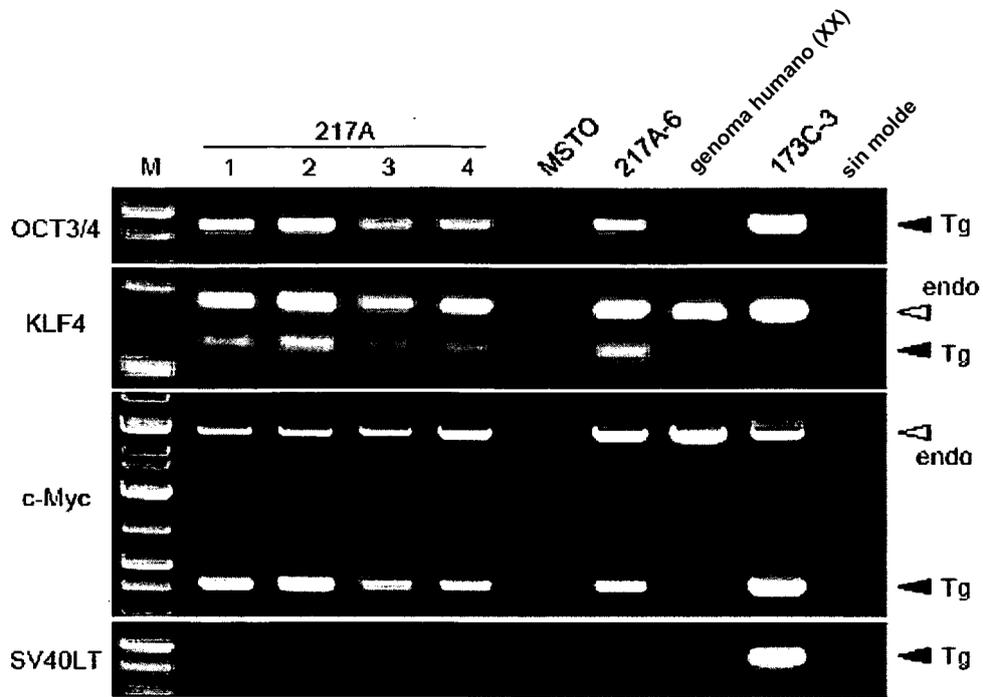
{Fig. 19}



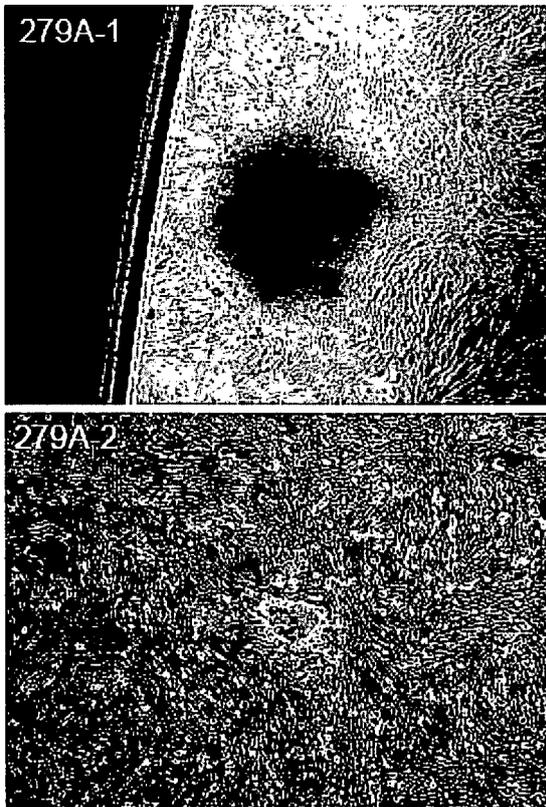
{Fig. 20}



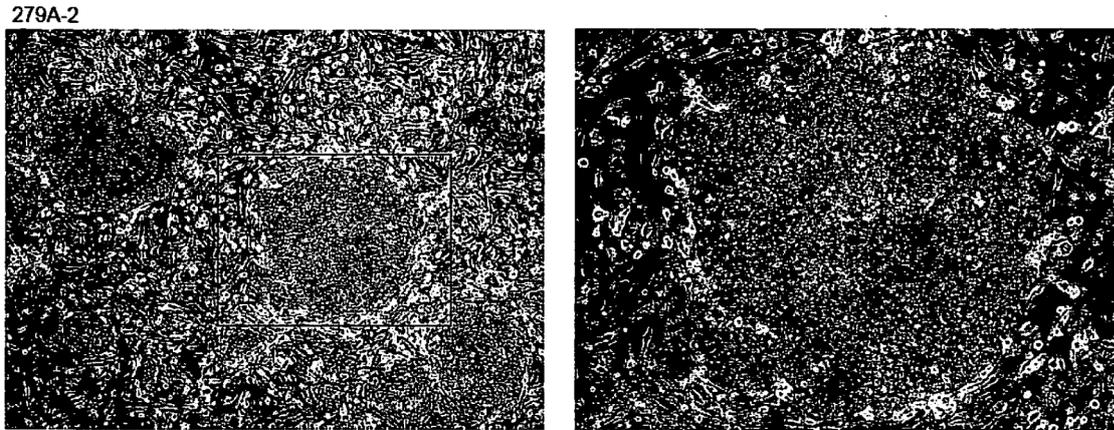
{Fig. 21}



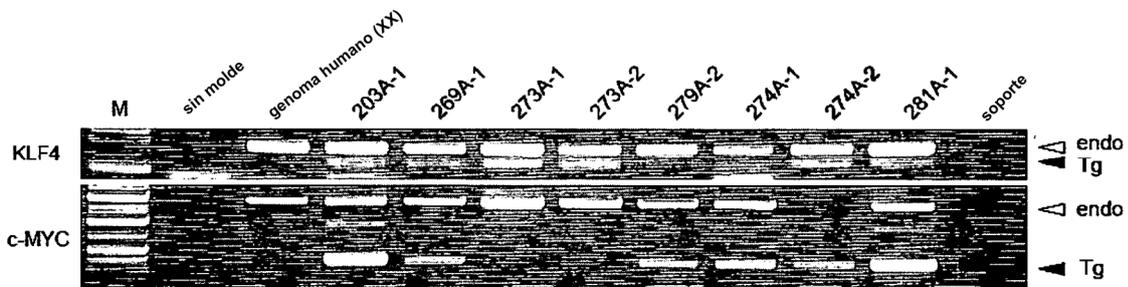
{Fig. 22}



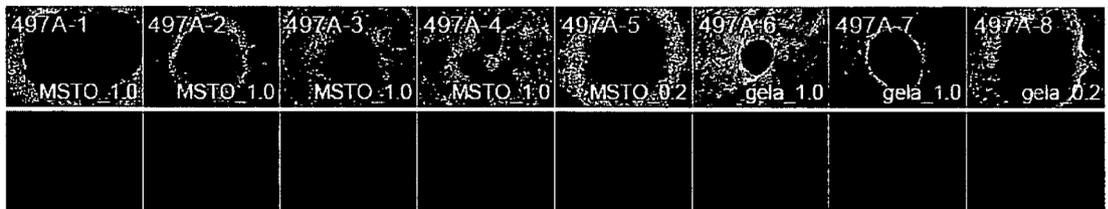
{Fig. 23}



{Fig. 24}



{Fig. 25}



{Fig. 26}

