

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 827**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2013 PCT/JP2013/064409**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13176233**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13793513 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2853592**

54 Título: **Método altamente eficiente para establecer una célula madre pluripotencial artificial**

30 Prioridad:

**23.05.2012 US 201261650694 P**

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

**27.09.2019**

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 2 725 827 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 altamente eficiente para establecer una célula madre pluripotencial artificial

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método para establecer, de modo eficaz, una célula madre pluripotencial inducida (denominada en la presente iPS) y a un kit para producir un célula iPS, y similares. Más en concreto, la presente invención se refiere a un método de producción de una célula iPS, que comprende una etapa de introducir, en una célula somática, (1) uno o más vectores episómicos que contienen un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear; y (2) un vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1, que es diferente de (1) y además un vector episómico que contiene un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en el que el inhibidor de la función de p53 mencionado anteriormente es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53. La presente invención también se refiere a un kit para producir una célula iPS, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Antecedentes de la técnica**

15 En años recientes, se han establecido células iPS de ratón y humanas, una después de la otra. Yamanaka *et al.* han inducido células iPS transfiriendo los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en fibroblastos procedentes de ratón y humanos (documento de patente 1 y documentos que no son patentes 1 y 2). Por otra parte, el grupo de Thomson *et al.* han producido células iPS humanas usando Nanog y Lin28 en lugar de Klf4 y c-Myc (documento de patente 2 y documento que no es patente 3).

20 Se ha intentado varias veces potenciar la eficacia de establecimiento de las células iPS. Un intento ha consistido en la optimización de la combinación de factores de reprogramación. Los presentes inventores han indicado que la eficacia del establecimiento de células iPS puede mejorar notablemente mediante el uso de una combinación de 5 factores de Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc y Lin28 como factores de reprogramación, y la inactivación de la expresión de p53 mediante una técnica de ARNi (documento de patente 3 y documento que no es patente 4). Algunos consideran que sería deseable evitar la supresión del gen supresor de cáncer p53, aunque sea de modo transitorio, en particular cuando se considera la aplicación de las células iPS humanas a la medicina regenerativa, puesto que debe minimizarse el riesgo de tumorización. Por otra parte, Maekawa *et al.* han indicado que la eficacia del establecimiento de células iPS puede mejorar aún más notablemente introduciendo Glis1 junto con Oct3/4, Sox2 y Klf4 (OSK) en una célula somática, más que mediante el uso de 3 factores de OSK (documento de patente 4 y documento que no es patente 5). Además, Maekawa *et al.* han indicado que las células iPS humanas pueden establecerse con una eficacia aproximadamente 2 veces mayor mediante el uso de 6 factores de Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28 y Glis1 (OSKULG) que con la combinación de ARNhc de p53 con 5 factores de Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc y Lin28 (OSKUL) (solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/521.153).

35 Los vectores víricos de retrovirus, lentivirus y similares tienen una alta eficacia de transgenes, comparados con los vectores no víricos y, por tanto, son mejores vectores puesto que pueden producir células iPS con facilidad. Sin embargo, puesto que los retrovirus y lentivirus se incorporan en el cromosoma, presentan problemas de seguridad cuando se considera la aplicación clínica de las células iPS. Aunque se ha indicado la producción de células iPS sin la incorporación en el cromosoma usando vectores no víricos, tales como un vector adenovírico, plásmidos y similares (documentos que no son patentes 6-8), la eficacia de establecimiento es baja cuando se compara con retrovirus y lentivirus. Además, con cierta frecuencia se obtiene una cepa de expresión estable que incorpora el factor de reprogramación en el cromosoma, incluso cuando se emplea un vector episómico considerado, en general, resistente a la incorporación, lo cual puede ser debido a la alta expresión sostenida necesaria de los factores de reprogramación en la selección de células iPS (documentos que no son patentes 7 y 9).

40 Por otra parte, un método que emplea un vector episómico que puede replicarse de modo estable y autónomo fuera del cromosoma muestra una baja eficacia del establecimiento de células iPS mencionado anteriormente, una baja frecuencia de desaparición espontánea del vector debido a la detención de la selección con fármacos, y requiere de mucho tiempo (documento que no es patente 8). Por tanto, se desea un método para retirar con eficacia un vector en poco tiempo, junto con la mejora en la eficacia del establecimiento de células iPS. A este respecto, los presentes inventores han descubierto un vector de autodesaparición temprana que se desprende rápidamente de la célula, y ya han indicado este vector (documento de patente 3, documento que no es patente 4 y solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/521.153).

55 Sin embargo, un método que emplea un vector episómico está asociado con un problema de una eficacia de establecimiento de células iPS extremadamente baja a partir de una célula concreta, por ejemplo, una célula sanguínea, comparado con un método que emplea otro vector. Puesto que las células sanguíneas son una de las fuentes de células somáticas más útiles para la construcción de un banco de células iPS, se ha deseado un método con un vector episómico capaz de establecer células iPS con eficacia, independientemente del tipo de células.

Lista de documentos

*Documentos de patente*

Documento de patente 1: WO 2007/069666

Documento de patente 2: WO 2008/118820

5 Documento de patente 3: WO 2011/016588

Documento de patente 4: WO 2011/102531

*Documentos que no son patentes*

Documento que no es patente 1: Takahashi, K. y Yamanaka, S., Cell, 126:663-676 (2006).

Documento que no es patente 2: Takahashi, K. *et al.*, Cell, 131:861-872 (2007).

10 Documento que no es patente 3: Yu, J. *et al.*, Science, 318:1917-1920 (2007).

Documento que no es patente 4: Okita, K. *et al.*, Nature Methods, 8(5), 409-412 (2011).

Documento que no es patente 5: Maekawa, M. *et al.*, Nature, 474:225-229 (2011).

Documento que no es patente 6: Stadtfeld, M. *et al.*, Science, 322:945-949 (2008).

Documento que no es patente 7: Okita, K. *et al.*, Science, 322:949-953 (2008).

15 Documento que no es patente 8: Yu, J. *et al.*, Science, 324:797-801 (2009).

Documento que no es patente 9: Kaji, K. *et al.*, Nature, 458:771-775 (2009).

El documento WO 2011/119942 se refiere a la inducción de células madre pluripotenciales inducidas usando vectores episómicos transitorios. El documento WO 2011/032166 se refiere a un método para reprogramar células sanguíneas para producir células madre pluripotenciales o multipotenciales. El documento WO 2010/147612 se refiere a un método para inhibir la función de p53 en una célula poniendo en contacto la célula con un inhibidor de PP2A.

20

**Sumario de la invención**

Problemas que se van a solucionar mediante la invención

A la vista de la situación mencionada anteriormente, la presente invención se dirige a establecer con eficacia una célula iPS humana segura para la aplicación clínica. Por tanto, el primer problema de la presente invención consiste en proporcionar un medio para mejorar la eficacia de establecimiento de células iPS, en particular células iPS humanas, y un método para producir con eficacia células iPS usando el medio. El segundo problema de la presente invención consiste en proporcionar un método para establecer con eficacia células iPS a partir de células sanguíneas, que permite la obtención no invasiva de una fuente de células somáticas para la aplicación a la medicina regenerativa.

25

30

Medios para resolver los problemas

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Los presentes inventores han realizado estudios profundos para intentar resolver los problemas mencionados anteriormente y han descubierto, por primera vez, que la eficacia de establecimiento de células iPS puede aumentar notablemente usando, en una etapa de establecimiento de células iPS, un vector episómico que contiene un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear, junto con un vector episómico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1 (en la presente también se denomina "vector Extra EBNA-1"), que es diferente del anterior vector. Además, los presentes inventores han descubierto, por primera vez, que pueden establecerse con eficacia células iPS a partir de células sanguíneas mediante el uso de dicho método, aunque para los métodos convencionales esto es muy difícil de conseguir. La presente invención se ha completado basándose en estos descubrimientos.

35

40

Por consiguiente, la presente invención incluye lo siguiente:

[1] Un método para producir una célula iPS, que comprende una etapa de introducir los siguientes (1) y (2):

(1) uno o más vectores episómicos que contienen un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear; y

45 (2) un vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1, que es diferente de (1)

en una célula somática;

comprendiendo además dicho método introducir un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en forma de un vector episómico, en el que el inhibidor de la función de p53 mencionado anteriormente es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53.

5 [2] El método de [1], en el que el factor de reprogramación nuclear mencionado anteriormente es uno o más seleccionado del grupo que consiste en miembros de la familia Oct, de la familia Klf, de la familia Sox, de la familia Myc, de la familia Lin y de la familia Glis.

[3] El método de [2], en el que los factores de reprogramación nuclear mencionados anteriormente comprenden Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc y Lin28.

10 [4] El método de uno cualquiera de [1] a [3], en el que el ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear se divide y está contenido en 2 o 3 vectores episómicos.

[5] El método de [4], en el que los vectores episómicos mencionados anteriormente que contienen el ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear comprenden los siguientes (a) a (c):

15 (a) un vector episómico que comprende un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica Oct3/4, oriP y el gen EBNA-1;

(b) un vector episómico que comprende un módulo de expresión, en el que un ácido nucleico que codifica Sox2 y un ácido nucleico que codifica Klf4 están unidos en este orden en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica, oriP y el gen EBNA-1; y

20 (c) un vector episómico que comprende un módulo de expresión, en el que un ácido nucleico que codifica L-Myc y un ácido nucleico que codifica Lin28 están unidos en este orden en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica, oriP y el gen EBNA-1.

[6] El método de uno cualquiera de [1] a [5], en el que el vector plasmídico mencionado anteriormente que contiene el ácido nucleico que codifica EBNA-1 tiene una estructura que contiene una región codificadora de EBNA-1 insertada bajo la regulación de un promotor.

25 [7] El método de uno cualquiera de [1] a [6], en el que la célula somática se selecciona de un fibroblasto humano (HDF) y una célula sanguínea.

[8] El método de [7], en el que la célula sanguínea es una célula mononuclear de sangre periférica ("peripheral blood mononuclear cell", PMNC).

30 [9] Un método para mejorar la eficacia de establecimiento de células iPS, que comprende una etapa de introducir, en una célula somática, uno o más vectores episómicos que contienen un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear, en el que se introduce un vector plasmídico diferente que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1 en la célula somática junto con el vector, comprendiendo dicho método además introducir un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en forma de un vector episómico, en el que el inhibidor de la función de p53 es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53.

35 [10] Un kit para producir una célula iPS, que comprende los siguientes (1) y (2):

(1) un vector episómico que contiene un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear; y

(2) un vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1, que es diferente de (1);

40 comprendiendo dicho kit además un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en forma de un vector episómico, en el que el inhibidor de la función de p53 es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53.

[11] El kit según [10], en el que los factores de reprogramación nuclear mencionados anteriormente comprenden Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc y Lin28.

45 [12] Un método para producir una célula somática, que comprende el método según uno cualquiera de [1] a [9], y que comprende además someter una célula iPS obtenida mediante dicho método según uno cualquiera de [1] a [9] a un tratamiento de diferenciación para permitir la diferenciación en una célula somática.

[13] El método o el kit de uno cualquiera de [1] a [12], en el que el inhibidor de la función de p53 mencionado anteriormente es un mutante negativo dominante de p53.

[14] El método o el kit de [13], en el que el mutante negativo dominante de p53 mencionado anteriormente es p53DD.

[15] El método o el kit de uno cualquiera de [1] a [14], en el que dicho vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1 es un plásmido que consiste en lo siguiente:

A) una estructura que contiene una región codificadora de EBNA-1 insertada bajo la regulación de un promotor;

B) una estructura que permite la expresión de la región codificadora de EBNA-1; y opcionalmente

5 C) un potenciador, una señal de adición de poliA, y un gen marcador de selección además del promotor.

Efecto de la invención

El uso del vector Extra EBNA-1 en la etapa de reprogramación nuclear de una célula somática aumenta notablemente la eficacia de establecimiento de células iPS, y permite un suministro más eficaz de células iPS humanas. Además, el uso del vector Extra EBNA-1 permite el establecimiento eficaz de células iPS a partir de células sanguíneas, lo cual resulta extremadamente difícil de conseguir por medio de métodos convencionales, lo cual, a su vez, permite obtener una fuente de células somáticas de una forma no invasiva. Por tanto, la presente invención es extremadamente útil para la aplicación de células iPS humanas a la medicina regenerativa.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra la estructura de pCEB-hSK-O, y la figura 1B muestra la estructura de pCEB-hUL-G.

15 Las figuras 2A-E muestran las estructuras de diversos plásmidos episómicos (pCE-hOCT3/4, pCE-hOCT3/4-shp53, pCE-hSK, pCE-hUL y pCE-mp53DD).

La figura 3A muestra la estructura del vector plasmídico Extra EBNA-1 (pCXWB-EBNA-1). La figura 3B muestra la estructura del vector plasmídico Extra EBNA-1 (pCXB-EBNA-1).

20 La figura 4 muestra el establecimiento de una célula iPS a partir de un fibroblasto humano (HDF1419). La célula iPS se estableció a partir de un fibroblasto humano (HDF1419) usando 2 vec. (pCEB-hSK-O y pCEB-hUL-G) que es una combinación de plásmidos, y una combinación de estos con pCXWB-EBNA1. Como células de soporte se emplearon MEF tratados con mitomicina C, o SNL tratadas con mitomicina C.

25 La figura 5 muestra el establecimiento de una célula iPS a partir de un fibroblasto humano (HDF1388). La célula iPS se estableció a partir de un fibroblasto humano (HDF13889) empleando Y4 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL) que es una combinación de plásmidos, y una combinación de estos con pCXWB-EBNA1. Como células de soporte se emplearon MEF tratados con mitomicina C, o SNL tratadas con mitomicina C.

30 La figura 6 muestra el establecimiento de una célula iPS a partir de una célula mononuclear de sangre periférica (PMNC). (A) muestra el protocolo de la inducción de la célula iPS a partir de PMNC usando un plásmido. (B) y (C) son fotografías de una colonia de células iPS establecida utilizando una combinación de plásmidos Y4 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL). (D) muestra los resultados de un análisis de la transferencia Southern en el locus del gen TRB. Se descubrió el retejido de V(D)J en el locus del gen TRB de clones de células iPS (585A1, 585B1, 604A1 y 604B1) derivados de dos donantes (n.º 1 y n.º 3). (E)-(G) muestran la formación de teratomas a partir de células iPS.

35 La figura 7 muestra el efecto estimulante del establecimiento de una célula iPS del plásmido del vector Extra EBNA-1. (A) y (B) muestran los resultados del establecimiento de una célula iPS a partir de PMNC utilizando una combinación de plásmidos Y4 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL), y una combinación de estos con pCXWB-EBNA1. Como medio se utilizó medio de células T (A) o medio no de células T (B). (C) muestra el número de copias del vector episómico que quedan en las células iPS establecidas.

### Descripción de las realizaciones

#### 40 Descripción detallada de la invención

La invención es como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

(A) Fuentes de células somáticas

Puede usarse cualquier célula distinta de las células germinales de origen de mamífero (por ejemplo, seres humanos, ratones, monos, cerdos, ratas, etc.) como material de partida para la producción de las células iPS. Los ejemplos incluyen células epiteliales queratinizantes (por ejemplo, células epidérmicas queratinizadas), células epiteliales mucósicas (por ejemplo, células epiteliales de la capa superficial de la lengua), células epiteliales de glándulas exocrinas (por ejemplo, células de glándulas mamarias), células secretoras de hormonas (por ejemplo, células adrenomedulares), células para el metabolismo o el almacenamiento (por ejemplo, células hepáticas), células epiteliales íntimas que constituyen interfases (por ejemplo, células alveolares de tipo I), células epiteliales íntimas del canal obturador (por ejemplo, células endoteliales vasculares), células que presentan cilios con capacidad transportadora (por ejemplo, células epiteliales de las vías respiratorias), células para la secreción de la

matriz extracelular (por ejemplo, fibroblastos), células constrictivas (por ejemplo, células del músculo liso), células de la sangre y del sistema inmunológico (por ejemplo, linfocitos T), células relacionadas con la detección (por ejemplo, células bacilares), neuronas del sistema nervioso autónomo (por ejemplo, neuronas colinérgicas), células sustentaculares de órganos sensoriales y neuronas periféricas (por ejemplo, células satélite), células nerviosas y células de la glía del sistema nervioso central (por ejemplo, células astrogliales), células de pigmentos (por ejemplo, células epiteliales del pigmento retiniano), sus células progenitoras (células progenitoras de tejidos) y similares. No existen limitaciones en el grado de diferenciación celular, en la edad del animal del cual se extraen las células y similares; incluso pueden usarse células progenitoras no diferenciadas (que incluyen células madre somáticas) y células maduras finalmente diferenciadas como fuentes de células somáticas en la presente invención. Los ejemplos de células progenitoras no diferenciadas incluyen células madre de tejidos (células madre somáticas), tales como células madre neurales, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimáticas y células madre de la pulpa dental. En particular, puesto que las células sanguíneas (células mononucleares de sangre periférica (que incluyen células T y células que no son células T (que incluyen células positivas a CD34 y células madre progenitoras)), linfocitos de sangre periférica, células de sangre de cordón umbilical y similares) pueden obtenerse con facilidad y no están acompañadas de una invasión, se prevé su utilización como fuente de células somáticas para el banco de células iPS. Además, puesto que pueden prepararse células madre de la pulpa mediante su aislamiento a partir de una muela del juicio, de un diente extraído debido a una enfermedad periodontal y similares, estas pueden obtenerse con facilidad y se prevé su utilización como fuente de células somáticas para el banco de células iPS.

Cuando se emplea una célula mononuclear de sangre periférica como la célula somática, el locus del gen del receptor de células T (TCR) puede contener o no una recombinación V(D)J. Un ejemplo preferible de célula mononuclear de sangre periférica incluye, pero no se limita a una célula T, en la que el locus del gen del receptor de células T (TCR) contiene una recombinación V(D)J.

La elección del mamífero individual como fuente de células somáticas no está particularmente limitada; sin embargo, cuando las células iPS obtenidas se van a utilizar en medicina regenerativa en seres humanos, resulta preferible, desde el punto de vista de la prevención del rechazo del injerto, recolectar las células somáticas de un paciente o de otra persona con el mismo tipo o sustancialmente el mismo tipo de HLA que el paciente. "Sustancialmente el mismo tipo de HLA", tal como se emplea en la presente, significa que el tipo de HLA del donante se corresponde con el del paciente, en la medida en que las células trasplantadas, que se han obtenido induciendo la diferenciación de células iPS derivadas de células somáticas del donante, pueden injertarse cuando se trasplantan al paciente con el uso de un inmunosupresor y similares. Por ejemplo, esto incluye un tipo de HLA en el que los HLA principales (por ejemplo, los tres principales loci de HLA-A, HLA-B y HLA-DR, los cuatro loci que incluyen además HLA-Cw) son idénticos (en lo sucesivo se aplicará este mismo significado) y similares. Cuando las células iPS obtenidas no van a administrarse (trasplantarse) a un ser humano, sino que se emplean, por ejemplo, como una fuente de células para la selección para evaluar la susceptibilidad a un fármaco de un paciente o reacciones adversas, de modo similar se desea recolectar las células somáticas del paciente o de otra persona con el mismo polimorfismo genético que se correlaciona con la susceptibilidad a un fármaco o reacciones adversas.

Cuando el mamífero individual que es fuente de células somáticas es un ser humano, su edad en general estará entre la veintena y la sesentena, preferiblemente entre la veintena y la cuarentena, aunque no se limitan a estas.

Las células somáticas aisladas de un mamífero pueden precultivarse usando un medio conocido como adecuado para su cultivo según la elección de las células antes de ser sometidas a la etapa de reprogramación nuclear. Los ejemplos de dichos medios incluyen, pero no se limitan a medio esencial mínimo ("minimal essential medium", MEM) que contiene suero bovino fetal (FCS) aproximadamente del 5 al 20%, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio RPMI1640, medio 199, medio F12 y similares. Por ejemplo, cuando se emplea una célula madre de pulpa como célula somática, preferiblemente se emplea un medio para células madre mesenquimáticas, tal como medio basal de células madre mesenquimáticas (Lonza) y similares. Cuando se emplean células sanguíneas, pueden añadirse IL-2, anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD28 al medio de cultivo, puesto que se emplean células T tras la concentración. De modo similar, pueden añadirse IL-3, IL-6, G-CSF y GM-CSF puesto que se emplean células que no son células T tras la concentración. Las células pueden concentrarse antes o después de la introducción de los vectores episómicos de la presente invención de los puntos (1) y (2) mencionados anteriormente (y otro vector episómico que contiene un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53; en lo sucesivo, también se denominará "el conjunto de vectores de la presente invención"). Cuando se emplea el conjunto de vectores de la presente invención y, por ejemplo, un reactivo de transferencia, si es necesario, tal como un liposoma catiónico para poner en contacto la célula somática con el mejorador de la eficacia de establecimiento de células iPS, a veces resulta preferible que el medio se reemplace por medio sin suero para prevenir la disminución de la eficacia de transferencia.

Para obtener una célula iPS humana completamente sin xenocomponentes adecuada para la aplicación clínica en seres humanos, resulta más deseable un medio sin componentes derivados de animales no humanos, tal como FCS. En el mercado puede obtenerse un medio obtenido mediante la adición a un medio básico de diversos componentes derivados de humanos adecuados para el cultivo de células somáticas (en particular, una proteína humana recombinante, tal como un factor de crecimiento y similares), aminoácidos no esenciales, vitaminas y similares, y los expertos en la técnica pueden seleccionar un medio sin xenocomponentes apropiado a partir de una

fuelle de células somáticas. La célula somática precultivada en un medio sin xenocomponentes se desprende de un recipiente de cultivo usando una disolución de desprendimiento de células sin xenocomponentes, se recupera y se pone en contacto con el conjunto de vectores de la presente invención.

(B) Factor de reprogramación nuclear (también denominado simplemente "factor de reprogramación")

- 5 El "factor de reprogramación nuclear" en la presente invención significa un factor proteico (grupo) capaz de inducir una célula iPS a partir de una célula somática. El factor de reprogramación nuclear que se va a emplear en la presente invención puede ser un factor proteico (grupo), con la condición de que pueda inducir una célula iPS mediante la introducción de un ácido nucleico que lo codifica en la célula somática. Por ejemplo, puede ser uno o más factores proteicos seleccionados del grupo que consiste en miembros de la familia Oct, de la familia Klf, de la familia Sox, de la familia Myc, de la familia Lin y de la familia Glis. Preferiblemente, el factor de reprogramación nuclear que se va a emplear en la presente invención contiene al menos Oct3/4, Klf4 y Sox2 (Klf4 y/o Sox2 pueden reemplazarse por otro factor o factores que se ha indicado que pueden reemplazar sus funciones). El factor de reprogramación nuclear que se va a emplear en la presente invención está característicamente exento de Nanog. De modo específico, pueden mencionarse las siguientes combinaciones como factor de reprogramación nuclear:
- 10 (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc (en este caso, Sox2 puede reemplazarse por Sox1, Sox3, Sox15, Sox17 o Sox18; Klf4 puede reemplazarse por Klf1, Klf2 o Klf5)
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, antígeno T grande de SV40 (en lo sucesivo SV40LT)
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E7
- 20 (5) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, Bmi1
- (7) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28
- (8) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, Glis1
- (9) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, SV40LT
- 25 (10) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, TERT, SV40LT
- (11) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, SV40LT
- (12) Oct3/4, Esrrb, Sox2, L-Myc (Esrrb puede reemplazarse por Esrrg)
- (13) Oct3/4, Klf4, Sox2
- (14) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, SV40LT
- 30 (15) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6
- (16) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E7
- (17) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7
- (18) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, Bmi1
- (19) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28
- 35 (20) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, SV40LT
- (21) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, TERT, SV40LT
- (22) Oct3/4, Klf4, Sox2, SV40LT
- (23) Oct3/4, Esrrb, Sox2 (Esrrb puede reemplazarse por Esrrg)

40 En los anteriores, también puede utilizarse Lin28b en lugar de Lin28. Cuando se emplea Esrrb o Esrrg (en los puntos (12) y (23) mencionados anteriormente), Klf4 puede usarse en combinación.

Cualquier combinación que no se incluye en los anteriores (1) a (23), pero que comprende todos los constituyentes de uno cualquiera de (1) a (22) y que comprende además otra sustancia opcionalmente elegida también puede incluirse en el alcance de los "factores de reprogramación nuclear" en la presente invención. Con la condición de que la célula somática que va a someterse a una reprogramación nuclear exprese endógenamente uno o más de los

constituyentes de uno cualquiera de los anteriores (1) a (23) a un nivel suficiente para provocar la reprogramación nuclear, una combinación de solo los constituyente remanentes que excluya dichos uno o más constituyentes también puede incluirse en el alcance de los "factores de reprogramación nuclear" en la presente invención.

5 Entre estas combinaciones, son ejemplos preferibles 5 factores de Oct3/4 (a veces abreviado como "O"), Sox2 (a veces abreviado como "S"), Klf4 (a veces abreviado como "K"), Lin28 (a veces abreviado como "L") y L-Myc (a veces abreviado como "U"), y 6 factores de Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28, L-Myc y Glis1 (a veces abreviado como "G").

10 Está disponible información de las secuencias de ADNc de ratón y humanas de los factores de reprogramación nuclear mencionados anteriormente remitiéndose a los números de registro de NCBI mencionados en el documento WO 2007/069666 (en la publicación, Nanog se describe como ECAT4). La información de las secuencias de ADNc de ratón y humanas sobre Lin28, Lin28b, Esrrb, Esrrg, L-Myc y Glis1 puede adquirirse remitiéndose a los siguientes números de registro de NCBI, respectivamente); los expertos en la técnica pueden aislar con facilidad estos ADNc.

Nombre del gen	Ratón	Humano
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Glis1	NM_147221	NM_147193

(c) Inhibidores de la función de p53

15 En la presente invención, un inhibidor de la función de p53 se pone en contacto con una célula somática, además del factor de reprogramación nuclear mencionado anteriormente, en el que el inhibidor de la función de p53 es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53. Tal como se menciona en la presente, "un inhibidor de la función de p53" puede ser cualquier sustancia, en la medida en que sea capaz de inhibir (a) la función de la proteína p53, o (b) la expresión del gen p53. Es decir, no solo las sustancias que actúan directamente sobre la proteína p53 para inhibir su función y las sustancias que actúan directamente sobre el gen p53 para inhibir su expresión, sino también sustancias que actúan sobre un factor implicado en la transducción de señales de p53 para provocar la inhibición de la función de la proteína p53 o la expresión del gen p53, también se incluyen en el alcance de "un inhibidor de la función p53" tal como se menciona en la presente.

25 Los ejemplos de sustancias que inhiben la función de la proteína p53 incluyen, pero no se limitan a un inhibidor químico de p53, un mutante negativo dominante de p53, un anticuerpo antagonista anti-p53, un ácido nucleico señuelo que contiene una secuencia consenso del elemento de respuesta a p53, un inhibidor de la vía de p53 y similares. Según la invención, se emplea un ARNhc de mutante negativo dominante de p53 para p53.

Los ejemplos específicos de un inhibidor de la función de p53, de un método para obtenerlos y de un método para ponerlos en contacto con células somáticas se describen en detalle en el documento WO 2009/157593.

30 En la presente invención, el ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53 como inhibidor de la función de p53 se introduce, en forma de un vector episómico que contiene un ácido nucleico que lo codifica, en una célula somática para lograr el contacto con la célula somática.

Un mutante negativo dominante de p53 particularmente preferido en la presente invención es p53DD, en el que los 14-301 primeros aminoácidos (que se corresponden con los 11-304 aminoácidos en p53 humano) de p53 de ratón se han delecionado (Bowman, T., Genes Develop., 10, 826-835 (1996)).

35 Puede obtenerse un ácido nucleico que codifica un mutante negativo dominante de p53, por ejemplo, mediante el siguiente método. En primer lugar, se sintetiza un oligonucleótido adecuado como sonda o cebador basándose en la información de la secuencia de ADNc de p53 de ratón o humano, y un ADNc de p53 de ratón o humano se clona a partir de un ARNm, un ADNc o un banco de ADNc derivado de una célula o tejido de ratón o humano, usando el método de hibridación o el método de (RT-)PCR, y se subclona en un plásmido apropiado. En el caso de un variante de delección, tal como p53DD, se diseña un cebador fuera del sitio que se va a delecionar, con el que se realiza una PCR inversa usando un plásmido insertado con ADNc de p53 como molde, por lo cual se obtiene un ADNc que

codifica el mutante negativo dominante objetivo.

El ADNc aislado se inserta en el vector episómico mencionado a continuación de la misma manera que en el ácido nucleico mencionado anteriormente que codifica un factor de reprogramación nuclear, y puede introducirse en la célula somática.

- 5 Puede diseñarse un ARNhc contra p53 basándose en la información de la secuencia de ADNc de p53 de ratón o humano, por ejemplo, según las reglas propuestas por Elbashir *et al.* (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)). Los candidatos a secuencia diana seleccionados basándose en las reglas descritas anteriormente se estudian para la homología con secuencias de 16-17 bases en sucesión en ARNm distintos de la diana, usando un programa informático de búsqueda de homología, tal como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para confirmar la especificidad de las secuencias diana seleccionadas. Para las secuencias diana cuya especificidad se ha confirmado, se unen un ARN bicatenario que consiste en una hebra sentido de 19-21 bases y una hebra antisentido complementaria con aquella a través de cualquier secuencia de conector capaz de formar una estructura de bucle (por ejemplo, aproximadamente 8-25 bases), con lo cual puede diseñarse un ARNhc.

15 Específicamente, el ARNhc para p53 humano, que tiene la secuencia 5'-GACTCCAGTGGTAATCTACTGctcgagCAGTAGATTACCACTGGAGTC-3' (SEQ ID NO:1; la parte subrayada es la secuencia diana de p53, las letras mayúsculas muestran la parte que forma el ARNbc), y similares, puede usarse como ARNhc particularmente preferible en la presente invención.

20 Para un vector que expresa un ADN que codifica ARNhc, aunque puede usarse un promotor de pol II (por ejemplo, el promotor temprano inmediato de CMV) como promotor, es una práctica habitual usar un promotor de pol III para permitir la transcripción precisa de ARN corto. Como promotor de pol III, pueden mencionarse los promotores de U6-snARN de ratón y humano, el promotor de ARN de H1-ARNasa P humano, el promotor de valina-ARNt humano y similares. Como señal de fin de la transcripción, se emplea una secuencia de 4 o más restos T en sucesión.

25 El módulo de expresión de ARNhc construido de este modo se inserta en el vector episómico mencionado a continuación de la misma manera que en el ácido nucleico mencionado anteriormente que codifica un factor de reprogramación nuclear, y puede introducirse en la célula somática.

(D) Módulo de expresión

30 El ácido nucleico mencionado anteriormente que codifica un factor de reprogramación nuclear (y un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53) puede constituir el módulo de expresión por sí solo o en cualquier combinación, y estos módulos de expresión pueden estar contenidos en cualquier combinación en un vector episómico, con la condición de que estén de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, cuando se emplean Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28 y L-Myc como factores de reprogramación, cinco ácidos nucleicos que codifican estos factores de reprogramación están contenidos como los siguientes 3 módulos de expresión en un vector episómico:

- (a) un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico (O) que codifica Oct3/4;
- 35 (b) un módulo de expresión, en el que el ácido nucleico (S) que codifica Sox2 y el ácido nucleico (K) que codifica Klf4 están unidos en este orden (S-K) en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica; y
- (c) un módulo de expresión, en el que el ácido nucleico (U) que codifica L-Myc y el ácido nucleico (L) que codifica Lin28 están unidos en este orden (U-L) en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica.
- 40

También puede usarse Glis1 como factor de reprogramación además de los 5 factores de reprogramación mencionados anteriormente. En este caso, un ácido nucleico que codifica 6 factores de reprogramación está contenido como 4 módulos de expresión de los 3 módulos de expresión (a)-(c) mencionados anteriormente, y

- (d) un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico (G) que codifica Glis1

45 en un vector episómico.

En otra realización, se combinan 5 factores de reprogramación de Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28 y L-Myc con ARNhc de p53 o p53DD. En este caso, seis ácidos nucleicos que codifican 5 factores de reprogramación y ARNhc de p53 o p53DD están contenidos como los siguientes 4 módulos de expresión en un vector episómico:

- (a) un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico (O) que codifica Oct3/4;
- 50 (b) un módulo de expresión, en el que el ácido nucleico (S) que codifica Sox2 y el ácido nucleico (K) que codifica Klf4 están unidos en este orden (S-K) en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica;

(c) un módulo de expresión, en el que el ácido nucleico (U) que codifica L-Myc y el ácido nucleico (L) que codifica Lin28 están unidos en este orden (U-L) en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica; y

5 (d') un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica ARNhc de p53, o (d'') un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica p53DD.

Como la "secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica", puede usarse la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca (PLoS ONE 3, e2532, 2008, Stem Cells, 25, 1707, 2007), la secuencia IRES (patente de EE. UU. n.º 4.937.190) y similares, preferiblemente la secuencia 2A. El "módulo de expresión" contiene un factor de reprogramación y/o un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53 (O, S-K, U-L, G y similares), así como al menos un promotor unido operablemente al ácido nucleico. Los ejemplos del promotor para un factor de reprogramación o un ácido nucleico que codifica un mutante negativo dominante de p53 incluyen el promotor de EF1 $\alpha$ , el promotor de CAG, el promotor de SR $\alpha$ , el promotor de SV40, el promotor de LTR, el promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), la LTR de MoMuLV (virus de la leucemia de ratón de Moloney), el promotor de HSV-TK (timidina quinasa del virus del herpes simplex) y similares, prefiriéndose el promotor de EF1 $\alpha$ , el promotor de CAG, la LTR de MoMuLV, el promotor de CMV, el promotor de SR $\alpha$  y similares. Además, el módulo de expresión puede contener, además de la secuencia de promotor basal, una secuencia potenciadora para potenciar la expresión del factor de reprogramación (por ejemplo, el potenciador inmediato temprano de CMV, etc.). En el caso de un ácido nucleico que codifica ARNhc de p53, se emplea preferiblemente un promotor de pol III, tal como un promotor de U6, y similares, como el promotor mencionado anteriormente.

20 Preferiblemente, el módulo de expresión usado según la presente invención contiene, además del promotor, una señal de adición de poliA a 3' cadena abajo del ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación o un mutante negativo dominante de p53. En el caso de un ácido nucleico que codifica ARNhc de p53, una secuencia de 4 o más restos T continuos está preferiblemente contenida como señal de fin de la transcripción a 3' cadena abajo del ácido nucleico. Además, en el módulo de expresión puede insertarse la secuencia del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota ("woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element", WPRE), por ejemplo, entre la región codificadora y la señal de adición de poliA del factor de reprogramación y el mutante negativo dominante, para intentar mejorar la estabilidad del factor de reprogramación y el ARNm del mutante negativo dominante de p53.

#### (E) Vector episómico

30 Los ejemplos de vectores episómicos que se van a usar en la presente invención incluyen un vector que comprende, como componente del vector, una secuencia derivada de EBV, SV40 y similares, necesaria para la autorreplicación en una célula de mamífero. El componente del vector necesario para la autorreplicación en una célula de mamífero se ejemplifica específicamente con un origen de la replicación funcional en células de mamífero y un gen que codifica una proteína que se une al origen de la replicación para controlar la replicación. Sus ejemplos incluyen el origen de la replicación oriP y el gen EBNA-1 para EBV, y el origen de la replicación ori y el gen del antígeno T grande de SV40 para SV40. Más preferiblemente, se emplean oriP y el gen EBNA-1.

35 Cuando se desee, el vector episómico puede contener además un origen de la replicación de bacteria o levadura (por ejemplo, pUC ori, ColE1 ori, 2 $\mu$  ori etc.), un gen marcador de selección (por ejemplo, gen de resistencia a la ampicilina, gen complementario auxotrófico) y similares para permitir la amplificación en masa de bacterias y levaduras, tales como *Escherichia coli* y similares. Además, cuando se desee, por ejemplo también puede estar contenido el gen de dihidrofolato reductasa, el gen de resistencia a neomicina y similares, como gen marcador de selección en una célula de mamífero. Además, el vector episómico puede contener un sitio de multiclonación para facilitar la inserción de un módulo de expresión de un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación. En una realización, el promotor, el potenciador, la señal de adición de poliA, la secuencia WPRE y similares en el módulo de expresión mencionado anteriormente están previamente contenidos en el vector episómico, y el vector episómico también puede diseñarse para construir un vector de transgén mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación entre el promotor y la señal de adición de poliA (la secuencia WPRE cuando el vector contiene una secuencia WPRE). En este caso, el vector episómico preferiblemente contiene un sitio de multiclonación entre el promotor y la señal de adición de poliA (la secuencia WPRE cuando el vector contiene una secuencia WPRE).

40 El conjunto de vectores de la presente invención puede construirse incluyendo 1 o 2 de los módulos de expresión (a)-(c), o (a)-(d), (d') o (d'') mencionados anteriormente, en cada uno de varios (preferiblemente 2, 3 o 4) vectores episómicos. A este respecto, los presente inventores previamente han indicado que una combinación de varios módulos de expresión y su orden en un vector episómico afecta en gran medida la eficacia de establecimiento de células iPS (solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/521.153).

55 En la presente invención, la eficacia de establecimiento de las células iPS se ve notablemente mejorada mediante el uso combinado de vectores Extra EBNA-1. Por tanto, el conjunto de vectores de la presente invención puede contener 1 o 2 de los módulos de expresión (a)-(c), o (a)-(d), (d') o (d'') mencionados anteriormente, en 2, 3 o 4 vectores episómicos en cualquier combinación y en cualquier ordena en cualquier posición, con la condición de que

estén de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Sin embargo, en una realización preferible, el conjunto de vectores usados en la presente invención se construye montando dos de los módulos de expresión (a)-(d) mencionados anteriormente sobre dos vectores episómicos según las siguientes reglas (solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/521.153).

5 Cuando los módulos de expresión se insertan en la orientación 5' a 3' en el orden de [módulo de expresión A]-[módulo de expresión B] en el lado 3' de un gen (hebra sentido) que codifica una proteína (por ejemplo, EBNA-1, antígeno T grande de SV40, etc., preferiblemente EBNA-1), que se une al origen de la replicación funcional en una célula de mamífero y regula la replicación del vector en la célula de mamífero, como origen (en lo sucesivo la posición del módulo de expresión en el vector episómica siempre se muestra usando este origen):

10 1) el módulo de expresión de (a) mencionado anteriormente (que incluye el ácido nucleico (O) que codifica Oct3/4) está dispuesto en la posición del módulo de expresión B; preferiblemente,

2) el módulo de expresión de (b) mencionado anteriormente, en el que el ácido nucleico (S) que codifica Sox2 y el ácido nucleico (K) que codifica Klf4 están unidos en este orden (S-K) en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica, está dispuesto en la posición del módulo de expresión A.

En este caso, el módulo de expresión (a) mencionado anteriormente y el módulo de expresión (b) mencionado anteriormente pueden colocarse (i) en el mismo vector episómico (dispuestos en el primer vector episómico en el orden de (b)-(a)), o pueden colocarse (ii) en diferentes vectores episómicos (dispuestos en el primer vector episómico en el orden de (c) o (d)-(a), y dispuestos en el segundo vector episómico en el orden de (b)-(d) o (c)). El punto (i) mencionado anteriormente incluye dos tipos de combinaciones: (ia) una combinación de los primeros vectores episómicos: (b)-(a) (orden de los factores de reprogramación SK-O), y los segundos vectores de expresión: (c)-(d) (orden de los factores de reprogramación UL-G), y (ib) una combinación de los primeros vectores episómicos: (b)-(a) (orden de los factores de reprogramación SK-O), y los segundos vectores de expresión: (d)-(c) (orden de los factores de reprogramación G-UL). El punto (ii) mencionado anteriormente incluye dos tipos de combinaciones: (iia) una combinación de los primeros vectores episómicos: (c)-(a) (orden de los factores de reprogramación UL-O), y los segundos vectores de expresión: (b)-(d) (orden de los factores de reprogramación SK-G), y (iib) una combinación de los primeros vectores episómicos: (d)-(a) (orden de los factores de reprogramación G-O), y los segundos vectores de expresión: (b)-(c) (orden de los factores de reprogramación SK-UL).

De estos, una combinación particularmente preferible es la combinación (ia) mencionada anteriormente, es decir, una combinación de los primeros vectores episómicos: (b)-(a) (orden de los factores de reprogramación SK-O), y los segundos vectores de expresión: (c)-(d) (orden de los factores de reprogramación UL-G). De modo más específico, puede mencionarse la combinación de pCEB-hSK-O y pCEB-hUL-G mostrada en el ejemplo mencionado a continuación y la figura 1.

En el orden de los módulos de expresión mencionados anteriormente, la orientación de la transcripción de cada módulo de expresión no está particularmente limitada, y pueden insertarse dos módulos de expresión de modo que se transcriban en la misma orientación (de la cabeza a la cola), o pueden insertarse de modo que se transcriban en orientaciones opuestas (de cabeza a cabeza o de cola a cola). La orientación de la transcripción de cada módulo de expresión puede ser la misma o puede ser opuesta a la orientación de la transcripción de un gen que codifica una proteína que se une al origen de la replicación funcional en una célula de mamífero y que regula la replicación del vector en la célula de mamífero. En una realización preferida, todos los módulos de expresión se montan en el vector de modo que se transcriben en la misma orientación que la de del gen.

En otra realización preferible, el conjunto de vectores usados en la presente invención comprende los módulos de expresión (a)-(c) mencionados anteriormente montados en 3 vectores episómicos. De modo más específico, los ejemplos de los 3 vectores episómicos incluyen pCXLE-hOCT3/4 (Addgene n.º 27076), pCXLE-hSK (Addgene n.º 27078) y pCXLE-hUL (Addgene n.º 27080) (véase Nat. Methods, 8(5):409-412 (2011)), y pCE-hOCT3/4, pCE-hSK y pCE-hUL mostrados en los ejemplos mencionados a continuación y la figura 2.

Cuando el conjunto de vectores contiene además un módulo de expresión de un inhibidor de la función de p53 (es decir, un módulo de expresión de (d') o (d'') mencionados anteriormente), según se define en la presente invención, el módulo de expresión puede montarse individualmente en un vector episómico separado (un total de 4 vectores episómicos). Los ejemplos específicos incluyen pCE-mp53DD y similares mostrados en los ejemplos mencionados a continuación y la figura 2.

Como alternativa, un módulo de expresión de un inhibidor de la función de p53 puede montarse junto con cualquiera de los 3 vectores episómicos que contienen los módulos de expresión (a)-(c) mencionados anteriormente. Preferiblemente, pero sin limitación, puede montarse en un vector episómico junto con el módulo de expresión (a) mencionado anteriormente. Cuando se monta en un vector episómico junto con un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación, su orden no está particularmente limitado. Por ejemplo, pueden colocarse en el orden de expresión del inhibidor de la función de 53-módulo de expresión del factor de reprogramación. Los ejemplos específicos incluyen pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (Addgene n.º 27077) (también denominado "pCXLE-

hOCT3/4-shp53", véase Nat. Methods, 8(5):409-412 (2011)), y pCE-hOCT3/4-shp53-F (también denominado "pCE-hOCT3/4-shp53") mostrados en los ejemplos mencionados a continuación y la figura 2.

El vector episómico en la presente invención puede contener o no una secuencia loxP en el lado 5' y el lado 3' del componente del vector necesario para la replicación del vector en una célula de mamífero. Preferiblemente, puede usarse un vector episómico que contenga una secuencia loxP en el lado 5' y el lado 3' del componente del vector en la misma orientación. Puesto que un vector episómico es capaz de llevar a cabo una replicación autónoma fuera del cromosoma, incluso cuando no se incorpora al genoma, puede proporcionarse una expresión estable en una célula hospedante. Tras haber establecido la célula iPS, el vector se elimina con rapidez de modo deseable. La capacidad de replicación autónoma de un vector episómico puede hacerse desaparecer colocando un componente del vector necesario para la replicación de un vector episómico en una célula de mamífero flanqueado por dos secuencias loxP, lo cual permite que la recombinasa Cre actúe sobre ellas y escinda el componente del vector, y puede hacerse que el vector se desprenda de la célula iPS en una etapa temprana.

Las secuencias loxP útiles en la presente invención incluyen, además de la secuencia loxP de tipo salvaje derivada del bacteriófago P1, otras secuencias loxP mutantes seleccionadas opcionalmente capaces de delecionar la secuencia flanqueada por la secuencia loxP mediante recombinación cuando se colocan en la misma orientación en posiciones que flanquean a un componente del vector necesario para la replicación del vector episómico en una célula de mamífero. Los ejemplos de dichas secuencias loxP mutantes incluyen lox71, mutado en la repetición 5', lox66, mutado en la repetición 3', y lox2272 y lox511, mutados en la porción del espaciador. Aunque las dos secuencias loxP colocadas en los lados 5' y 3' del componente del vector pueden ser idénticas o no, las dos secuencias loxP mutantes mutadas en la porción del espaciador deben ser idénticas (por ejemplo, una pareja de secuencias lox2272, una pareja de secuencias lox511). Se prefiere una combinación de una secuencia loxP mutante mutada en la repetición 5' (por ejemplo, lox71) y una secuencia loxP mutante mutada en la repetición 3' (por ejemplo, lox66). En este caso, las secuencias loxP que permanecen en el cromosoma tienen mutaciones dobles en las repeticiones en el lado 5' y el lado 3' como resultado de una recombinación y, por tanto, no es probable que sean reconocidas por la recombinasa Cre, reduciendo así el riesgo de provocar una mutación de delección en el cromosoma debido a una recombinación no deseada. Cuando se emplean las secuencias loxP mutantes lox71 y lox66 en combinación, cada una puede colocarse en cualquiera de los lados 5' y 3' del componente del vector mencionado anteriormente, pero es necesario que las secuencias loxP mutantes se inserten en una orientación de modo que los sitios mutados se localicen en los extremos exteriores de las respectivas secuencias loxP. Aunque un vector episómico preferible de la presente invención es un vector que desaparezca pronto desprendiéndose de la célula iPS en una etapa temprana incluso sin la acción de una recombinasa Cre, puesto que puede ser necesario muchísimo tiempo para que se retire de la célula, puede resultar preferible diseñar una secuencia loxP que se ocupe del riesgo de una recombinación innecesaria y similares, debido al tratamiento con la recombinasa Cre.

Cada una de las dos secuencias loxP se coloca en la misma orientación en los lados 5' y 3' de un constituyente del vector fundamental para la replicación del vector episómico en una célula de mamífero (es decir, un origen de la replicación funcional en una célula de mamífero (por ejemplo, oriP de EBV, ori de SV40, etc., preferiblemente oriP), o una secuencia génica que codifica una proteína que se une al origen de la replicación para controlar la replicación (por ejemplo, EBNA-1, antígeno T grande de SV40, etc., preferiblemente EBNA-1)). El constituyente del vector flanqueado por las secuencias loxP puede ser un origen de la replicación o una secuencia génica que codifica una proteína que se une al origen de la replicación para controlar la replicación, o ambos.

El vector episómico para ser utilizado en la presente invención proporciona no solo el efecto intrínseco del vector episómico consistente en que, tanto si está o no presente la secuencia loxP, no se incorpora un factor de ácido nucleico exógeno (que incluye un factor de reprogramación o un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53) que constituye el vector en el genoma celular, incluso de modo transitorio, cuando se introduce en una célula somática, sino también el efecto inesperado de que el vector presente como un episoma se desprende de la célula iPS en una etapa temprana incluso sin aplicar un tratamiento con la recombinasa Cre. También se describe un vector episómico de autodesaparición que proporciona la expresión de un factor o factores de reprogramación y un inhibidor de la función de p53 suficiente para establecer una célula iPS, tras lo cual se desprende de la célula en una etapa temprana. Tal como se emplea en la presente, "desprenderse" significa que la presencia del vector o la expresión de un factor de reprogramación o un inhibidor de la función de p53 montado en el vector no se detecta (por debajo del límite de detección) mediante el análisis de PCR descrito en el ejemplo 6 o 10 o el análisis de RT-PCR descrito en el ejemplo 11 del documento WO 2011/016588 A1. Dicho vector se caracteriza porque se desprende de la célula iPS antes de 10 transferencias en 50% o más, preferiblemente en 60% o más, más preferiblemente en 70% o más de los clones de células iPS establecidos mediante la introducción del vector. Como alternativa, el vector episómico de autodesaparición se caracteriza porque es inestable en la célula hasta el punto de que el número de copias por  $1 \times 10^4$  células es del orden de  $10^6$  dentro de una semana después de la introducción, mientras que el número de copias por  $1 \times 10^4$  células es de 100 o menor, preferiblemente de 50 o menor, más preferiblemente de 30 o menor, cuando se establece la célula iPS (por ejemplo, aproximadamente 4 semanas desde la introducción del vector).

Más específicamente, el vector de autodesaparición temprana posee al menos una, preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 3 o más, en particular preferiblemente 4 o más características estructurales de los siguientes (i)-(vii), con la condición de que estén de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas:

(i) Una secuencia loxP se dispone en la misma orientación en el lado 5' y el lado 3' de un componente del vector necesario para la replicación de un vector episómico en una célula de mamífero (por ejemplo, el gen EBNA-1, el gen del antígeno T grande de SV40, preferiblemente el gen EBNA-1).

(ii) Un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación bajo la regulación de un promotor de CAG.

5 (iii) Un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación o un mutante negativo dominante de p53 bajo la regulación de un potenciador inmediato temprano de CMV.

(iv) Un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación o un mutante negativo dominante de p53 bajo la regulación de una señal de adición de poliA de  $\beta$ -globina de conejo.

10 (v) Una secuencia WPRE contenida entre un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación o un mutante negativo dominante de p53 y una señal de adición de poliA.

(vi) Un ácido nucleico que codifica ARNhc de p53 bajo la regulación de un promotor de U6.

(vii) Un origen de la replicación (por ejemplo, pUC ori, ColE1 ori, preferiblemente pUC ori) funcional en una bacteria, y un gen marcador (por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina) que permite la selección de la bacteria.

15 (viii) Un componente del vector necesario para la replicación de un vector episómico en una célula de mamífero (por ejemplo, el gen EBNA-1, el gen del antígeno T grande de SV40, preferiblemente el gen EBNA-1) y un ácido nucleico que codifica cada factor de reprogramación o inhibidor de la función de p53 montado en el vector que se transcriben en la misma orientación.

20 Tal como se muestra en el ejemplo 6 de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/521.153, puede establecerse una célula iPS incluso si se introduce en una célula somática un vector de transgén que contiene 4 módulos de expresión sobre un vector episómico. También en este caso, la eficacia de establecimiento puede mejorarse aún más estudiando el orden de los módulos de expresión.

(F) Plásmido del vector Extra EBNA-1

25 En la infección latente de células con EBV (virus de Epstein-Barr), la proteína EBNA-1 (antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr) desempeña un papel extremadamente importante en la replicación y el mantenimiento de su episoma y la expresión transcripcional del grupo de genes del virus, y se sabe que dicha función se logra cuando dicha proteína se une a la región OriP del ADN del genoma del EBV (Frappier, L. y O'Donnell, M. (1991), J. Biol. Chem., 266, 7819-7826). El plásmido del vector Extra EBNA-1 en la presente invención utiliza dicha función de EBNA-1 y permite la replicación autónoma de un vector episómico que contiene una región OriP. El plásmido del vector Extra EBNA-1 en la presente invención porta un gen que codifica la proteína EBNA-1, y puede expresar, de modo transitorio o constitutivo, la proteína EBNA-1 en una célula de mamífero.

35 Cualquier plásmido de vector Extra EBNA-1 en la presente invención puede usarse, con la condición que sea un plásmido que tenga una estructura que contenga una región codificadora de EBNA-1 insertada bajo la regulación de un promotor y que tenga una estructura que permita la expresión de la región codificadora de EBNA-1. Por ejemplo, el plásmido del vector Extra EBNA-1 en la presente invención puede contener, cuando se desee, un potenciador, una señal de adición de poliA, un gen marcador de selección y similares, además del promotor. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen el gen de resistencia a la ampicilina, el gen de dihidrofolato reductasa, el gen de resistencia a la neomicina, el gen de resistencia a la puromicina y similares. Como promotor que regula la región codificadora de EBNA-1, se emplean el promotor de EF1 $\alpha$ , el promotor de CAG, el promotor de SR $\alpha$ , el promotor de SV40, el promotor de LTR, el promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), la LTR de MoMuLV (virus de la leucemia de ratón de Moloney), el promotor de HSV-TK (timidina quinasa del virus del herpes simplex) y similares. De estos, son preferibles el promotor de CAG, el promotor de CMV y similares. El plásmido del vector Extra EBNA-1 en la presente invención puede producirse, por ejemplo, usando pCX-EGFP (FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) y mediante las siguientes etapas:

45 - Se inserta una secuencia WPRE en el lado 5' de la secuencia pA de pCX-EGFP, y después se retira SV40ori mediante un tratamiento con la enzima de restricción BamHI.

- Después, la parte de EGFP del vector se retira mediante EcoRI, y en su lugar se inserta la región codificadora de EBNA-1.

50 El plásmido del vector Extra EBNA-1 obtenido de esta forma también se denomina "pCXWB-EBNA-1" en la presente memoria descriptiva.

Como alternativa, el plásmido del vector Extra EBNA-1 en la presente invención puede producirse, por ejemplo, usando pCX-EGFP (FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) y mediante las siguientes etapas:

- Se trata pCX-EGFP con la enzima de restricción BamHI para permitir el autoacoplamiento (pCXB-EGFP).

- Después el vector se trata con la enzima de restricción EcoRI, y se inserta el fragmento EcoRI de pCXWB-EBNA1 (región codificadora de EBNA-1).

El plásmido del vector Extra EBNA-1 obtenido de esta forma también se denomina "pCXB-EBNA1" en la presente memoria descriptiva.

- 5 Como una realización del uso del plásmido del vector Extra EBNA-1, por ejemplo, este puede ponerse en contacto con una célula en la etapa de establecimiento de las células iPS, al mismo tiempo que con un vector episómico que porta un factor de reprogramación nuclear. En otra realización, el plásmido del vector Extra EBNA-1 puede ponerse en contacto con una célula antes o después de poner en contacto la célula con un vector episómico que porta un factor de reprogramación nuclear. La anterior realización es más preferible para la aplicación de la presente invención.

- 10 Como mecanismo del efecto mejorador de la eficacia de establecimiento de células iPS del plásmido del vector Extra EBNA-1 puede considerarse, por ejemplo, que no se logra la cantidad suficiente de EBNA-1 unida a oriP mediante métodos convencionales, lo cual, a su vez, evita la replicación suficiente de un vector episómico que porta un factor de reprogramación nuclear y provoca un nivel de expresión insuficiente del factor de reprogramación nuclear; sin embargo, el plásmido del vector Extra EBNA-1 puede compensar la cantidad insuficiente de EBNA-1. Es evidente que la presente invención no se ve afectada, incluso si la eficacia de establecimiento de las células iPS aumenta mediante otro mecanismo.

- 15 En la presente memoria descriptiva, las células iPS establecidas usando un vector episómico a veces se abrevian como "células epi-iPS" o "epi-iPSC". Cuando la combinación de transgenes en la presente invención se abrevia como "C1, T1, T2, Y3, Y3+EBNA1, Y4, Y4+EBNA1, Y5+EBNA1, Y6+EBNA1", estas combinaciones son como se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Nombre de la mezcla	Nombre del plásmido	Cantidad (µg)	Genes
C1	pEB-C5	2,5	OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28
	pEB-Tg	0,5	SV40LT
T1	pEP4EO2SEN2K	1,05	OCT3/4, SOX2, NANOG, KLF4
	pEP4EO2SET2K	1,12	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pCEP4-M2L	0,83	C-MYC, UN28
T2	pEP4EO2SET2K	0,91	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SCK2MEN2L	2,09	OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, LIN28
Y3	pCXLE-hOCT3/4	1	OCT3/4
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-MYC, LIN28
Y3 + EBNA1	pCXLE-hOCT3/4	0,83	OCT3/4
	pCXLE-hSK	0,83	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	0,83	L-MYC, LIN28
	pCXWB-EBNA1	0,5	CAG::EBNA1
Y4	pCXLE-hOCT3/4-shp53	1	OCT3/4, ARNhc de p53
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-MYC, LIN28
Y4 + EBNA1	pCXLE-hOCT3/4-shp53	0,83	OCT3/4, ARNhc de p53
	pCXLE-hSK	0,83	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	0,83	L-MYC, LIN28
	pCXWB-EBNA1	0,5	CAG::EBNA1

Nombre de la mezcla	Nombre del plásmido	Cantidad (µg)	Genes
Y5 + EBNA1 (- WPRE)	pCE-hOCT3/4-shp53	0,83	OCT3/4, ARNhc de p53
	pCE-hSK	0,83	SOX2, KLF4
	pCE-hUL	0,83	L-MYC, LIN28
	pCXB-EBNA1	0,5	CAG::EBNA1
Y6+ EBNA1 (-WPRE) (- shRNA)	pCE-hOCT3/4	0,625	OCT3/4
	pCE-hSK	0,625	SOX2, KLF4
	pCE-hUL	0,625	L-MYC, LIN28
	pCE-mp53DD	0,625	Negativo dominante de p53 de ratón
	pCXB-EBNA1	0,5	CAG::EBNA1

(G) Método para introducir un conjunto de vectores en una célula somática

Un conjunto de vectores compuesto por una combinación de los vectores episómicos mencionados anteriormente puede introducirse en células somáticas, por ejemplo, usando un método de lipofección, un método de liposomas, un método de electroporación, un método de coprecipitación con fosfato de calcio, un método de DEAE-dextrano, un método de microinyección, un método de pistola de partículas y similares. De modo específico, por ejemplo, pueden usarse los métodos descritos en Science, 324:797-801 (2009), el documento WO 2011/016588 A1, Nature Methods, 8(5), 409-412 (2011) y similares.

Puede confirmarse que un componente del vector necesario para la replicación de un vector episómico en una célula de mamífero se ha retirado de las células iPS realizando un análisis de la transferencia Southern o un análisis de PCR usando, como sonda o cebador, un ácido nucleico que contiene una secuencia de bases en el componente del vector y/o una secuencia de bases en la vecindad de la secuencia loxP cuando se emplea la secuencia loxP, y aislando una fracción de episomas de las células iPS como molde, y examinando la presencia o la ausencia de una banda o la longitud de la banda detectada (véase el documento WO 2011/016588 A1, Nature Methods, 8(5), 409-412 (2011)). La fracción de episomas puede prepararse mediante un método muy conocido en la técnica y pueden usarse, por ejemplo, los métodos descritos en Science, 324:797-801 (2009), el documento WO 2011/016588 A1, Nature Methods, 8(5), 409-412 (2011) y similares.

(H) Sustancia mejoradora de la eficacia de establecimiento de células iPS

Se espera que la eficacia de establecimiento de células iPS aumente aún más poniendo en contacto una sustancia mejoradora de la eficacia de establecimiento de células iPS conocida con una célula somática. Los ejemplos de sustancia mejoradora de la eficacia de establecimiento de células iPS incluyen, pero no se limitan a un inhibidor 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 la expresión de ácidos nucleicos, tales como inhibidores de bajo peso molecular, tales como BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2:525-528 (2008)) y similares, 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)), regulador de la transducción de señales intracelulares [por ejemplo, activador de la señalización de Wnt (por ejemplo, Wnt3a soluble) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008)), inhibidor de TGF-β, inhibidor de MEK, 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))], otros compuestos de bajo peso molecular naturales o sintéticos (por ejemplo, 5'-azacitidina, tiazovivina, vitamina C etc.), miARN específico de células ES (por ejemplo, agrupamiento miR-302-367 (Mol. Cell. Biol., doi:10.1128/MCB.00398-08, documento WO 2009/075119), miR-302 (RNA (2008), 14:1-10), miR-291-3p, miR-294 y miR-295 (todos los cuales se describen en Nat. Biotechnol., 27:459-461 (2009))) y similares. Tal como se mencionó anteriormente, los inhibidores de la expresión basados en ácidos nucleicos pueden estar en forma de vectores de expresión que portan un ADN que codifica un ARNip o ARNhc.

Estos mejoradores de la eficacia de establecimiento de células iPS pueden ponerse en contacto con una célula somática mediante un método similar a un método conocido convencional para un factor mejorador de la eficacia de establecimiento de la presente invención para cada uno de los siguientes casos: (a) cuando la sustancia es un factor proteico, (b) cuando la sustancia es un ácido nucleico que codifica el factor proteico, o (c) un compuesto de bajo

peso molecular.

Un mejorador de la eficacia de establecimiento de células iPS puede ponerse en contacto con una célula somática al mismo tiempo que el conjunto de vectores de la presente invención, y cada uno puede ponerse en contacto antes, con la condición de que la eficacia de establecimiento de células iPS a partir de una célula somática mejore significativamente, comparado con la eficacia obtenida en ausencia del mejorador.

(I) Mejorar la eficacia de establecimiento por medio de las condiciones de cultivo

La eficacia de establecimiento de células iPS puede mejorar aún más cultivando las células bajo condiciones hipóxicas en el proceso de reprogramación nuclear para células somáticas. Tal como se menciona en la presente, la expresión "condiciones hipóxicas" significa que la concentración de oxígeno ambiental en el momento del cultivo de las células es significativamente menor que la de la atmósfera. De modo específico, pueden mencionarse unas condiciones que implican concentraciones más bajas de oxígeno que las concentraciones de oxígeno ambiental en 5-10% de CO<sub>2</sub>/95-90% de aire atmosférico, que se emplean normalmente para el cultivo celular normal; los ejemplos incluyen condiciones que implican una concentración de oxígeno ambiental del 18% o menor. Preferiblemente, la concentración de oxígeno ambiental es del 15% o menor (por ejemplo, del 14% o menor, del 13% o menor, del 12% o menor, del 11% o menor y similares), del 10% o menor (por ejemplo, del 9% o menor, del 8% o menor, del 7% o menor, del 6% o menor y similares), o del 5% o menor (por ejemplo, del 4% o menor, del 3% o menor, del 2% o menor y similares). La concentración de oxígeno ambiental es preferiblemente del 0,1% o mayor (por ejemplo, del 0,2% o mayor, del 0,3% o mayor, del 0,4% o mayor y similares), del 0,5% o mayor (por ejemplo, del 0,6% o mayor, del 0,7% o mayor, del 0,8% o mayor, del 0,95% o mayor y similares), o del 1% o mayor (por ejemplo, del 1,1% o mayor, del 1,2% o mayor, del 1,3% o mayor, del 1,4% o mayor y similares).

Aunque puede usarse cualquier método para crear un estado hipóxico en un entorno celular, la manera más fácil es cultivar las células en un incubador de CO<sub>2</sub> que permita ajustar la concentración de oxígeno, y este representa un caso adecuado. Los incubadores de CO<sub>2</sub> que permite el ajuste de la concentración de oxígeno están disponibles en el mercado en diversos fabricantes (por ejemplo, los incubadores de CO<sub>2</sub> para cultivos hipóxicos fabricados por Thermo Scientific, Ikemoto Scientific Technology, Juji Field, Wakenyaku etc.).

El momento de comenzar el cultivo celular bajo condiciones hipóxicas no está particularmente limitado, con la condición de que no se evite mejorar la eficacia de establecimiento de células iPS, comparado con la concentración normal de oxígeno (al 20%). Aunque el cultivo puede comenzar antes de que la célula somática se ponga en contacto con el conjunto de vectores de la presente invención, o al mismo tiempo que el contacto o después del contacto, resulta preferible, por ejemplo, que el cultivo bajo condiciones hipóxicas comience justo después de que la célula somática se ponga en contacto con el conjunto de vectores, o a un intervalo de tiempo concreto después del contacto [por ejemplo de 1 a 10 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) días].

La duración del cultivo de las células bajo condiciones hipóxicas no está particularmente limitado, con la condición de que no se evite mejorar la eficacia de establecimiento de células iPS, comparado con la concentración normal de oxígeno (al 20%); los ejemplos incluyen, pero no se limitan a periodos de 3 días o más, 5 días o más, 7 días o más o 10 días o más, y 50 días o menos, 40 días o menos, 35 días o menos o 30 días o menos y similares. La duración preferida del cultivo bajo condiciones hipóxicas varía dependiendo de la concentración de oxígeno ambiental; los expertos en la técnica pueden ajustar de modo apropiado la duración del cultivo según la concentración de oxígeno usada. Si se seleccionan colonias candidatas a célula iPS con la resistencia a fármacos como índice, resulta preferible que se restablezca una concentración normal de oxígeno a partir de las condiciones hipóxicas antes de comenzar la selección con fármacos.

Además, el tiempo de inicio preferido y la duración preferida de cultivo de las células bajo condiciones hipóxicas también varía dependiente de la eficacia de establecimiento de células iPS a concentraciones normales de oxígeno y similares.

Después de ponerse en contacto con el conjunto de vectores de la presente invención (y otro mejorador de la eficacia de establecimiento de células iPS cuando sea necesario), la célula puede cultivarse, por ejemplo, bajo condiciones adecuadas para el cultivo de células ES. En el caso de células de ratón, en general, el cultivo se realiza con la adición del factor inhibidor de leucemia ("leukemia inhibitory factor", (LIF) como factor de supresión de la diferenciación a un medio normal. Por otro lado, en el caso de células humanas, resulta deseable añadir el factor de crecimiento de fibroblastos básico ("basic fibroblast growth factor", bFGF) y/o el factor de células madre ("stem cell factor", SCF) en lugar del LIF. La célula puede cultivarse en copresencia, como células de soporte, de fibroblastos embrionarios de ratón tratados con radiación o un antibiótico para finalizar la división celular, o puede cultivarse en una placa de cultivo revestida con una matriz extracelular en lugar de estas células de soporte. Como fibroblastos derivados de embrión de ratón, en general se usa a menudo la línea celular STO (ATCC CRL-1503) y similares como soporte. Para la inducción de las células iPS, a menudo se utilizan células SNL obtenidas incorporando de modo estable un gen de resistencia a la neomicina y un gen LIF a células STO (células SNL76/7 STO; ECACC 07032801) (McMahon, A. P. y Bradley, A., Cell, 62, 1073-1085 (1990)) y similares. Además, también pueden emplearse fibroblastos primarios derivados de embrión de ratón ("mouse embryo-derived primary fibroblasts", MEF). En el mercado están disponibles MEF tratados con mitomicina C en Millipore y ReproCELL Incorporated. El cocultivo

con estas células de soporte puede comenzar antes del contacto con el conjunto de vectores de la presente invención, en el momento del contacto o después del contacto (por ejemplo, 1-10 días después).

El medio de cultivo puede contener un inhibidor de Rho quinasa (ROCK). En particular, cuando la etapa de cultivo incluye una etapa de dispersar las células iPS humanas en una única célula, resulta preferible que el medio contenga un inhibidor de ROCK. Cuando se emplean células MEF y células SNL como células de soporte, el medio usado para ellas puede o no contener un inhibidor de ROCK, prefiriéndose su ausencia. Como inhibidor de ROCK puede utilizarse Y-27632, pero el inhibidor de ROCK no se limita a este.

Mediante el uso del conjunto de vectores de la presente invención puede producirse una célula iPS humana mediante un cultivo sin el uso de un componente derivado de un animal no humano (es decir, bajo condiciones completamente sin xenocompuestos) desde de la introducción del conjunto de vectores en una célula somática hasta el establecimiento de la célula iPS, y después hasta su mantenimiento como una célula iPS. Cuando la célula iPS humana se induce bajo condiciones sin xenocompuestos, el conjunto de vectores de la presente invención (y además una sustancia mejoradora de la eficacia de establecimiento de células iPS según sea necesario) se pone en contacto y las células se cultivan en un medio sin FCS y sin otros componentes derivados de animales no humanos. Como la sustancia (por ejemplo, bFGF, SCF, etc.) que se va a añadir al medio como inhibidor de la diferenciación, se emplea una proteína purificada derivada de ser humano, preferiblemente una proteína recombinante. Como células de soporte puede utilizarse cualquier célula somática derivada de ser humano. Por ejemplo, preferiblemente pueden usarse fibroblastos de piel humana ("human skin fibroblasts", HDF), células madre de pulpa humanas y similares. También es posible inducir una célula iPS humana sin usar células de soporte. En este caso, también puede usarse una matriz extracelular como agente de revestimiento para un recipiente de células. La matriz extracelular es una estructura supramolecular presente fuera de la célula, que puede ser natural o ser un producto artificial (recombinante). Sus ejemplos incluyen sustancias tales como colágeno, proteoglicano, fibronectina, ácido hialurónico, tenascina, entactina, elastina, fibrilina y laminina, y sus fragmentos. Estos sustratos extracelulares pueden usarse en combinación y pueden prepararse, por ejemplo, a partir de células, tales como BD Matrigel (TM) y similares. Además de estas, puede usarse un agente de revestimiento sin xenocompuestos disponible en el mercado. Los ejemplos de un agente de revestimiento sin xenocompuestos disponible en el mercado incluyen, pero no se limitan a CellStart, Coat1, VTN-N, Synthemax2 y Retronectin.

Se describe en detalle un método para establecer una célula iPS a partir de células mononucleares de sangre periférica (células T y células que no son células T (que incluyen células positivas a CD34 y células madre progenitoras) usando un vector episómico, por ejemplo, en el protocolo de cultivo de células iPS de la Universidad de Kioto (<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/protocol.html>).

Una colonia candidata de células iPS puede seleccionarse de dos formas: con métodos con resistencia a fármacos y actividad indicadora como indicadores, y con métodos basados en el examen macroscópico de la morfología. Como ejemplo de los primeros, una colonia positiva a la resistencia a fármacos y/o a una actividad indicadora se selecciona usando una célula recombinante, en la que un gen de resistencia a fármacos y/o un gen indicador se dirige al locus de un gen altamente expresado específicamente en células pluripotenciales (por ejemplo, Fbx15, Nanog, Oct3/4 y similares, preferiblemente Nanog o Oct3/4). Los ejemplos de dichas células recombinantes incluyen MEF derivados de un ratón que contiene el gen  $\beta$ geo (que codifica una proteína de fusión de  $\beta$ -galactosidasa y neomicina fosfotransferasa) inactivado en el locus del gen Fbx15 [Takahashi y Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)], y MEF derivados de un ratón transgénico que contiene el gen de la proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein", GFP) y el gen de resistencia a puromicina integrados en el locus del gen Nanog [Okita *et al.*, Nature, 448, 313-317 (2007)]. Por otra parte, los métodos para seleccionar una colonia candidata mediante examen macroscópico de la morfología incluyen, por ejemplo, el método descrito por Takahashi *et al.* en Cell, 131, 861-872 (2007). Aunque los métodos que emplean células indicadoras son cómodos y eficaces, la selección de colonias mediante examen macroscópico resulta deseable bajo el punto de vista de la seguridad cuando se preparan células iPS para objetivos terapéuticos en seres humanos.

La identidad de las células de la colonia seleccionada como células iPS puede confirmarse mediante respuestas positivas a indicadores de Nanog (o Oct3/4) (resistencia a puromicina, positividad a GFP y similares), así como mediante la formación visible de una colonia similar a células ES, tal como se describió anteriormente; sin embargo, para asegurar una mayor precisión, es posible realizar ensayos, tales como la tinción con fosfatasa alcalina, el análisis de la expresión de diversos genes específicos de células ES, y el trasplante de las células seleccionadas a un ratón y la confirmación de la formación de teratomas.

Las células iPS establecidas de esta forma pueden usarse para diversos fines. Por ejemplo, usando un método de inducción de la diferenciación indicada con respecto a células ES, puede inducirse la diferenciación en diversas células (por ejemplo, células miocárdicas, células sanguíneas, células nerviosas, células endoteliales vasculares, células secretoras de insulina y similares) a partir de células iPS. Por tanto, la inducción de células iPS usando una célula somática recolectada de un paciente o de otra persona con el mismo tipo o sustancialmente el mismo tipo de HLA permitiría realizar una terapia con células madre mediante trasplante autogéneo o alogéneo, en el que las células iPS se diferencian en células deseadas (es decir, células de un órgano afectado del paciente, células que tienen un efecto terapéutico sobre la enfermedad y similares), que son trasplantadas al paciente. Además, debido a que se cree que las células funcionales (por ejemplo, hepatocitos) diferenciados a partir de células iPS reflejan mejor

el estado real de las células funcionales *in vivo* que las correspondientes líneas celulares existentes, también pueden usarse de modo adecuado para la selección *in vitro* para la eficacia y la toxicidad de compuestos candidatos a productos farmacéuticos y similares.

5 La presente invención se describe a continuación con más detalle por medio de los siguientes ejemplos que, sin embargo, no limitan el alcance de la presente invención.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de diversos plásmidos episómicos que se van a utilizar para la reprogramación

10 Los cuatro tipos de plásmidos usados (pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL y pCXLE-hOCT3/4-shp53-F) fueron los que se han producido previamente (Okita *et al.*, Nature Methods, 8(5), 409-412(2011), documento WO 2011/016588). El resumen de la constitución de los respectivos plásmidos es el siguiente:

1) pCXLE-hOCT3/4 (Addgene n.º 27076):

15 Se configura un plásmido en el que los módulos de expresión contienen una región de traducción de Oct3/4 humano configurada bajo la regulación del promotor de CAG (que contiene la secuencia WPRE y la señal de adición de poliA de  $\beta$ -globina de conejo cadena abajo de la región de traducción, en lo sucesivo será igual) en la orientación 5' a 3' en este orden desde el lado 3' del gen EBNA-1 (hebra sentido) como el origen (en lo sucesivo será igual).

2) pCXLE-hSK (Addgene n.º 27078):

20 Se configura un plásmido en el que los módulos de expresión contienen una construcción, en el que las respectivas regiones de traducción de Sox2 humano y Klf4 humano se unen a través de la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMV) (PLoS ONE 3, e2532, 2008, Stem Cells, 25, 1707, 2007), dispuestas bajo la regulación del promotor de CAG en la orientación 5' a 3' en este orden desde el lado 3' del gen EBNA-1 (hebra sentido) como el origen.

3) pCXLE-hUL (Addgene n.º 27080):

25 Se configura un plásmido en el que los módulos de expresión contienen una construcción, en el que las respectivas regiones de traducción de L-Myc humano y Lin28 humano se unen a través de la secuencia 2A del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMV), dispuestas bajo la regulación del promotor de CAG en la orientación 5' a 3' en este orden desde el lado 3' del gen EBNA-1 (hebra sentido) como el origen.

4) pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (Addgene n.º 27077):

30 Se configura un plásmido en el que los módulos de expresión contienen una región de ácido nucleico que codifica ARNhc de p53 y una región de traducción de Oct3/4 humano, que se disponen bajo la regulación del promotor de U6 y el promotor de CAG, respectivamente, en la orientación 5' a 3' en este orden.

Se produjeron pCEB-hSK-O, pCEB-hUL-G, pCE-EGFP, pCXLE-hGLIS1, pCE-hOCT3/4, pCE-hOCT3/4-shp53-F, pCE-hSK, pCE-hUL y pCE-mp53DD como sigue:

1) pCEB-hSK-O:

35 Se insertó la secuencia WPRE en el lado 5' de la secuencia pA de pCX-EGFP (proporcionada por el doctor Masaru OKABE, Osaka University, FEBS Letters, 407, 313-319, 1997), y después se retiró SV40ori mediante un tratamiento con la enzima de restricción BamHI. Este vector es pCXWB. Se retiró el sitio EGFP de este vector con EcoRI, y en su lugar se insertó una región de traducción de un gen humano, que se escindió de pCXLE-hOCT3/4 con EcoRI de la misma manera. Este se denominó pCXWB-hOCT3/4. Este vector se trató con Sall, y se insertó pCXLE-hSK, que se había tratado con Sall de la misma manera, para producir pCEB-hSK-O (figura 1A).

40 2) pCXLE-hGLIS1:

El sitio hGLIS1 de pMXs-hGLIS1 se amplificó mediante PCR y se insertó en pCR2.1. Después se cortó un fragmento hGLIS1 mediante un tratamiento con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó en pCXLE-EGFP tratado con la enzima de restricción EcoRI.

3) pCEB-hUL-G:

45 El sitio EGFP de pCXWB se retiró con EcoRI, y en su lugar se insertó una región de traducción de un gen humano, que se escindió de pCXLE-hGLIS1 con EcoRI de la misma manera. Este se denominó pCXWB-hGLIS1. Este vector se trató con Sall, y se insertó pCXLE-hUL, que se había tratado con Sall de la misma manera, para producir pCEB-hUL-G (figura 1B).

4) pCE-EGFP:

Se trató pBluescriptII KS- con las enzimas de restricción BamHI/XhoI, y se insertó un conector para producir pBS-XhoBam. Después, pBS-XhoBam se trató con las enzimas de restricción Sall/MfeI, y se insertó un fragmento Sall/EcoRI de pCEP4 para producir un módulo pBS-CEP. Después, pCX-EGFP se trató con la enzima de restricción BamHI, y se insertó un fragmento BamHI/BglII del módulo pBS-CEP para producir pCE-EGFP.

5) pCE-hOCT3/4 (figura 2A):

El pCE-EGFP mencionado anteriormente se trató con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó un fragmento EcoRI de pCXLE-hOCT3/4.

6) pCE-hOCT3/4-shp53-F (figura 2B):

El pCE-hOCT3/4 mencionado anteriormente se trató con la enzima de restricción BamHI, y se insertó un fragmento BamHI de pCXLE-hOCT3/4-shp53-F.

7) pCE-hSK (figura. 2C):

El pCE-EGFP mencionado anteriormente se trató con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó un fragmento EcoRI de pCXLE-hSK.

8) pCE-hUL (figura 2D):

El pCE-EGFP mencionado anteriormente se trató con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó un fragmento EcoRI de pCXLE-hUL.

9) pCE-mp53DD (figura 2E):

El sitio mp53DD de pENTR-p53DD se amplificó mediante PCR, y se insertó en pCR2.1 para producir pTopo-mp53DD. Después, pCXLE-EGFP se trató con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó un fragmento EcoRI de pTopo-mp53DD para producir pCXLE-mp53DD. Después, el pCE-EGFP mencionado anteriormente se trató con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó un fragmento EcoRI de pCXLE-mp53DD para producir pCE-mp53DD.

Ejemplo 2: Producción del plásmido del vector Extra EBNA-1

Para expresar con eficacia el transgén, se insertó la secuencia WPRE en el lado 5' de la secuencia pA de pCX-EGFP (proporcionada por el doctor Masaru OKABE, Osaka University, FEBS Letters, 407, 313-319, 1997), y después se retiró SV40ori mediante un tratamiento con la enzima de restricción BamHI. Este vector es pCXWB. Después se retiró el sitio EGFP de pCXWB con EcoRI, y en su lugar se insertó la región codificadora de EBNA-1, que se amplificó a partir de pCEP4 (Invitrogen) mediante PCR. Este vector se denominó "pCXWB-EBNA1", y se usó en el siguiente experimento (figura 3A).

El pCXB-EBNA1, que es otro plásmido del vector Extra EBNA-1, se produjo como se muestra a continuación. En primer lugar, pCX-EGFP se trató con la enzima de restricción BamHI para permitir el autoacoplamiento. Este vector es pCXB-EGFP. Después, pCXB-EGFP se trató con la enzima de restricción EcoRI, y se insertó un fragmento EcoRI de pCXWB-EBNA1 (región codificadora de EBNA-1) para producir pCXB-EBNA1 (figura 3B).

Ejemplo 3 (de referencia): Establecimiento de una célula iPS derivada de fibroblastos humanos (HDF1419)

Usando una combinación de plásmidos (pCEB-hSK-O y pCEB-hUL-G), y una de sus combinaciones con pCXWB-EBNA1, se establecieron células iPS a partir de fibroblastos humanos (HDF1419).

Los fibroblastos humanos (HDF1419) se adquirieron en Cell Applications, Inc. Los fibroblastos se cultivaron y se mantuvieron en medio de cultivo (DMEM (Nacalai Tesque, Japón) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FCS, Invitrogen)) en una placa de cultivo de 100 mm a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Para la introducción de los plásmidos se retiró el medio y se añadió PBS (5 ml) para lavar las células. Se retiró el PBS, se añadió tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen), y la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante aproximadamente 5 min. Cuando las células empezaron a flotar se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células y se recogieron 6 x 10<sup>5</sup> células en un tubo de centrifugación de 15 ml. Las células se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min para retirar el sobrenadante. Cada plásmido (1,5 µg, pCXLE-hSK-O y pCEB-hUL-G) se introdujo en las células mediante un microporador (ARBROWN CO., LTD.). Las condiciones de la introducción fueron de 100 µl chip, 1650 V, 10 ms y tres pulsos. Las células después de la introducción se trasladaron a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) a la que previamente se le había añadido DMEM/FCS al 10% (3 ml), y se cultivaron bajo las condiciones de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 días. Después se retiró el medio y las células se lavaron con PBS (2 ml). Después de retirar el PBS, se añadió tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen), y la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante aproximadamente 5 min. Cuando las células empezaron a flotar se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células y se cultivaron 1 x 10<sup>5</sup> células en una placa de 100 mm previamente cultivada con células de soporte. Como células de soporte se emplearon MEF tratados con mitomicina C, o SNL76/7 tratadas con mitomicina C. Al día siguiente se intercambié el

medio por un medio para células ES de primate (ReproCELL Incorporated) al que se le había añadido bFGF (Wako) hasta 4 ng/ml, y después se continuó intercambiando el medio cada 2 días. En el día 24 desde la introducción del plásmido se contó el número de colonias similares a ES y colonias no similares a ES, y los resultados se muestran en la figura 4.

- 5 Se determinó que el uso combinado de pCEB-hSK-O y pCEB-hUL-G con pCXWB-EBNA1 aumenta la eficacia de establecimiento de células iPS.

Ejemplo 4: Establecimiento de una célula iPS derivada de fibroblastos humanos (HDF1388)

- 10 Mediante un método similar al del ejemplo 3 y usando la combinación de plásmidos Y4 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL) y una de sus combinaciones con pCXWB-EBNA1, se establecieron células iPS a partir de fibroblastos humanos (HDF1388).

Como resultado, se determinó que el uso de Y4 en combinación con pCXWB-EBNA1 aumenta la eficacia de establecimiento de células iPS (figura 5).

Ejemplo 5: Establecimiento de una célula iPS derivada de células mononucleares de sangre periférica (PMNC) humanas

- 15 Usando la combinación de plásmidos T2 (pEP4EO2SET2K and pEP4EO2SCK2MEN2L), Y3 (pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL) y Y4 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL), y una de sus combinaciones con pCXWB-EBNA1, se establecieron células iPS a partir de células mononucleares de sangre periférica (PMNC) humanas.

- 20 Basándose en las indicaciones del Institutional Review Board, se recolectó sangre de un donante sano que ofreció su consentimiento informado. Se recuperaron las PMNC de esta sangre utilizando Ficoll-paque Plus (GE Healthcare) o BD Vacutainer CPT (BD) y mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad. Empleando NucleofectorII (Lonza), se introdujeron 3 µg de una mezcla de plásmidos de expresión en  $3-5 \times 10^6$  PMNC. Para la introducción se usó el kit Amaxa(R) Human T Cell Nucleofector(R) Kit. Las células después de la introducción se trasladaron a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) en la que previamente se habían cultivado células de soporte MEF (tratadas con mitomicina C), y se cultivaron bajo las condiciones de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Como medio se usó medio X-vivo10 (Lonza) (para la inducción a partir de células T) al que se le había añadido IL-2 30 U/ml (PeproTech) y 5 µl/pocillo de Dynabeads Human T-activator CD3/CD28, o medio αMEM al que se le había añadido FCS al 10%, IL-3 10 ng/ml, IL-6 10 ng/ml, G-CSF 10 ng/ml y GM-CSF 10 ng/ml, o StemSpan H3000 (StemCell Technologies) (para la inducción a partir de células que no son células T). En el día 2 desde la introducción del plásmido, sin cambiar el medio, se añadió una cantidad igual del medio para células ES de primate (ReproCELL Incorporated) al que se le había añadido bFGF 4 ng/ml y Y27632 10 µM a cada pocillo. Después, en el día 4 desde la introducción del plásmido, el medio de cultivo se intercambió por un medio para células ES de primate (ReproCELL Incorporated) al que se le había añadido bFGF 4 ng/ml y Y27632 10 µM. En el día 20-25 desde la introducción del plásmido se contaron las colonias similares a ES (colonias de células iPS).

- 35 Como resultado, se determinó que el uso de Y3 y Y4 en combinación con pCXWB-EBNA1 aumenta la eficacia de establecimiento de células iPS (figuras 6 y 7, tablas 2A y B). De modo similar, se determinó que el uso de una combinación de Y5 (pCE-hOCT3/4-shp53, pCE-hSK y pCE-hUL), Y6 (pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL y pCE-mp53DD), y pCXB-EBNA1 establece con éxito células iPS a partir de PMNC (tabla 2B), y el uso de una combinación de Y5 e Y6 con pCXB-EBNA1 aumenta la eficacia de establecimiento de células iPS. Además, se confirmó que, cuando se emplea una combinación de Y6 y pCXB-EBNA1, también puede establecerse una célula iPS de la misma manera usando una placa de cultivo revestida con RetroNectin 20 µg/ml (Takara) en lugar de células de soporte MEF.

Tabla 2

A

Medio <sup>a</sup>	N.º de células (x10 <sup>5</sup> )	Mezclas de plásmidos y condiciones									
		C1 (n = 3)	T1 (n = 3)	T2 (n = 6)	Y3 (n = 3)	Y3 + EBNA1 (n = 3)	Y4 (n = 6)	Y4 + EBNA1 (n = 3)	Y4 + EBNA1 con PMNC congeladas (n = 3)		
NTm	10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6	1,3 ± 1,2	2,5 ± 1,0	4,7 ± 3,8	9,7 ± 2,1		
	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,8	4,3 ± 2,1	2,3 ± 1,2		
Tm	10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	15,7 ± 8,1	51,7 ± 64,4	42,2 ± 8,4	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>		
	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,0 ± 3,5	9,0 ± 9,6	18,8 ± 6,1	184,0 ± 11,3	241,0 ± 77,7		
	1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,7 ± 2,1	5,3 ± 3,1	9,5 ± 2,7	82,7 ± 11,6	101,0 ± 26,5		
	0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2	1,2 ± 0,8	19,3 ± 9,6	31,3 ± 12,9		

Nota: <sup>a</sup>NTm, medio para la población de células que no son células T; Tm, medio para células T. <sup>b</sup>ND, no determinado debido a la formación de demasiadas colonias.

B

Medio <sup>a</sup>	N.º de células (x10 <sup>5</sup> )	Mezclas de plásmidos y condiciones					
		Y4 + EBNA1 (n = 1)	Y5 + EBNA1 (n = 1)	Y6 + EBNA1 (n = 1)	Y4 + EBNA1 (n = 1)	Y5 + EBNA1 (n = 1)	Y6 + EBNA1 (n = 1)
Tm	10	ND	184	268			
	3	242	43	145			
	1	66	9	46			
	0,3	64	8	18			

Nota: <sup>a</sup>Tm, medio para para células T. <sup>b</sup>ND, no determinado debido a la formación de demasiadas colonias.

Puesto que la presente puede aumentar notablemente la eficacia de establecimiento de células iPS, pueden proporcionarse con más eficacia células iPS humanas. Además, puesto que pueden establecerse con eficacia células iPS a partir de células sanguíneas, lo cual resulta extremadamente difícil por medio de métodos convencionales, la presente invención es extremadamente útil para la aplicación de células iPS a la medicina regenerativa.

Aunque la presente invención se ha descrito poniendo énfasis en las realizaciones preferidas, resultará obvio para los expertos en la técnica que las realizaciones preferidas pueden modificarse, con la condición de que estén de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. La presente invención pretende que la presente invención pueda llevarse a cabo mediante métodos distintos de los descritos en detalle en la presente memoria descriptiva, con la condición de que estén de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

**Listado de secuencias**

<110> Universidad de Kioto

<120> Método para establecer con eficacia células madre pluripotenciales inducidas

<130> 092027

<150> documento US 61/650.694

<151> 23-05-2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNhc contra p53

<400> 1

gactccagtg gtaatctact gctcgagcag tagattacca ctggagtc

48

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método para producir una célula iPS, que comprende una etapa de introducir los siguientes (1) y (2):

5 (1) uno o más vectores episómicos que contienen un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear; y

(2) un vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1, que es diferente de (1) en una célula somática;

10 comprendiendo además dicho método introducir un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en forma de un vector episómico, en el que el inhibidor de la función de p53 mencionado anteriormente es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53.

2.- El método de la reivindicación 1, en el que el factor de reprogramación nuclear mencionado anteriormente es uno o más seleccionado del grupo que consiste en miembros de la familia Oct, de la familia Klf, de la familia Sox, de la familia Myc, de la familia Lin y de la familia Glis.

15 3.- El método de la reivindicación 2, en el que los factores de reprogramación nuclear mencionados anteriormente comprenden Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc y Lin28.

4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear se divide y está contenido en 2 o 3 vectores episómicos.

5.- El método de la reivindicación 4, en el que los vectores episómicos mencionados anteriormente que contienen el ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear comprenden los siguientes (a) a (c):

20 (a) un vector episómico que comprende un módulo de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica Oct3/4, oriP y el gen EBNA-1;

(b) un vector episómico que comprende un módulo de expresión, en el que un ácido nucleico que codifica Sox2 y un ácido nucleico que codifica Klf4 están unidos en este orden en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica, oriP y el gen EBNA-1; y

25 (c) un vector episómico que comprende un módulo de expresión, en el que un ácido nucleico que codifica L-Myc y un ácido nucleico que codifica Lin28 están unidos en este orden en la orientación 5' a 3' a través de una secuencia intermedia que permite la expresión dicistrónica, oriP y el gen EBNA-1.

30 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vector plasmídico mencionado anteriormente que contiene el ácido nucleico que codifica EBNA-1 tiene una estructura que contiene una región codificadora de EBNA-1 insertada bajo la regulación de un promotor.

7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la célula somática se selecciona de un fibroblasto humano (HDF) y una célula sanguínea.

8.- El método de la reivindicación 7, en el que la célula sanguínea es una célula mononuclear de sangre periférica (PMNC).

35 9.- Un método para mejorar la eficacia de establecimiento de células iPS, que comprende una etapa de introducir, en una célula somática, uno o más vectores episómicos que contienen un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear, en el que se introduce un vector plasmídico diferente que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1 en la célula somática junto con el vector, comprendiendo dicho método además introducir un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en forma de un vector episómico, en el que el inhibidor de la función de p53 es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53.

40 10.- Un kit para producir una célula iPS, que comprende los siguientes (1) y (2):

(1) un vector episómico que contiene un ácido nucleico que codifica un factor de reprogramación nuclear; y

(2) un vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1, que es diferente de (1);

45 comprendiendo dicho kit además un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la función de p53, en forma de un vector episómico, en el que el inhibidor de la función de p53 es ARNhc de p53 o un mutante negativo dominante de p53.

11.- El kit según la reivindicación 10, en el que los factores de reprogramación nuclear mencionados anteriormente comprenden Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc y Lin28.

12.- Un método para producir una célula somática, que comprende el método según una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 9, y que comprende además someter una célula iPS obtenida mediante dicho método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a un tratamiento de diferenciación para permitir la diferenciación en una célula somática.

5 13.- El método o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de la función de p53 mencionado anteriormente es un mutante negativo dominante de p53.

14.- El método o el kit de la reivindicación 13, en el que el mutante negativo dominante de p53 mencionado anteriormente es p53DD.

15.- El método o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho vector plasmídico que contiene un ácido nucleico que codifica EBNA-1 es un plásmido que consiste en lo siguiente:

- 10
- A) una estructura que contiene una región codificadora de EBNA-1 insertada bajo la regulación de un promotor;
  - B) una estructura que permite la expresión de la región codificadora de EBNA-1; y opcionalmente
  - C) un potenciador, una señal de adición de poliA, y un gen marcador de selección además del promotor.

Fig. 1

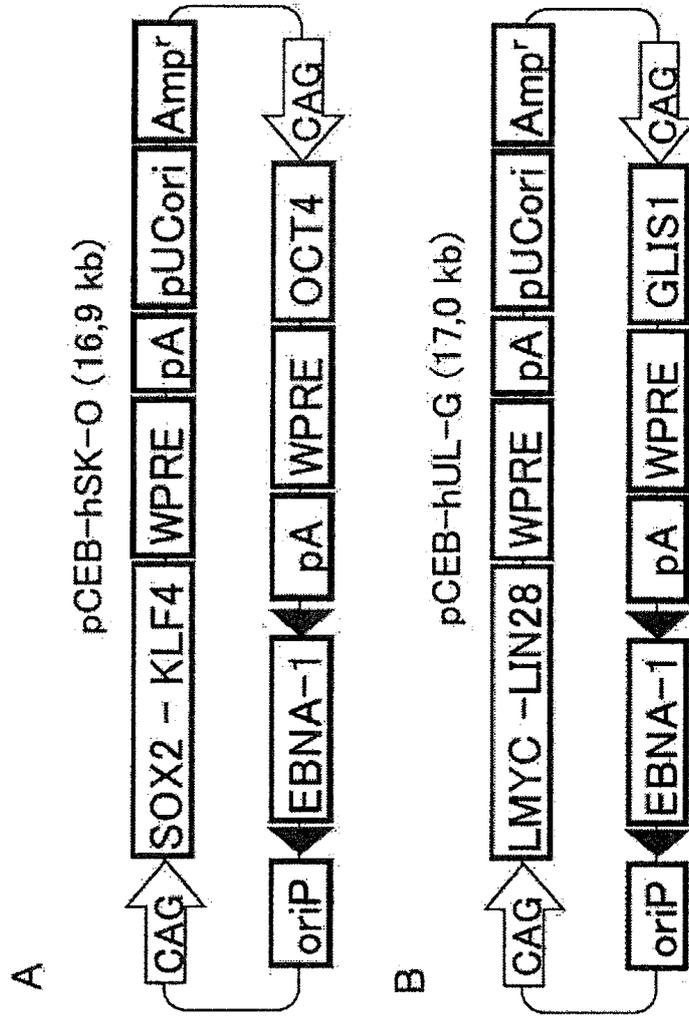


Fig. 2

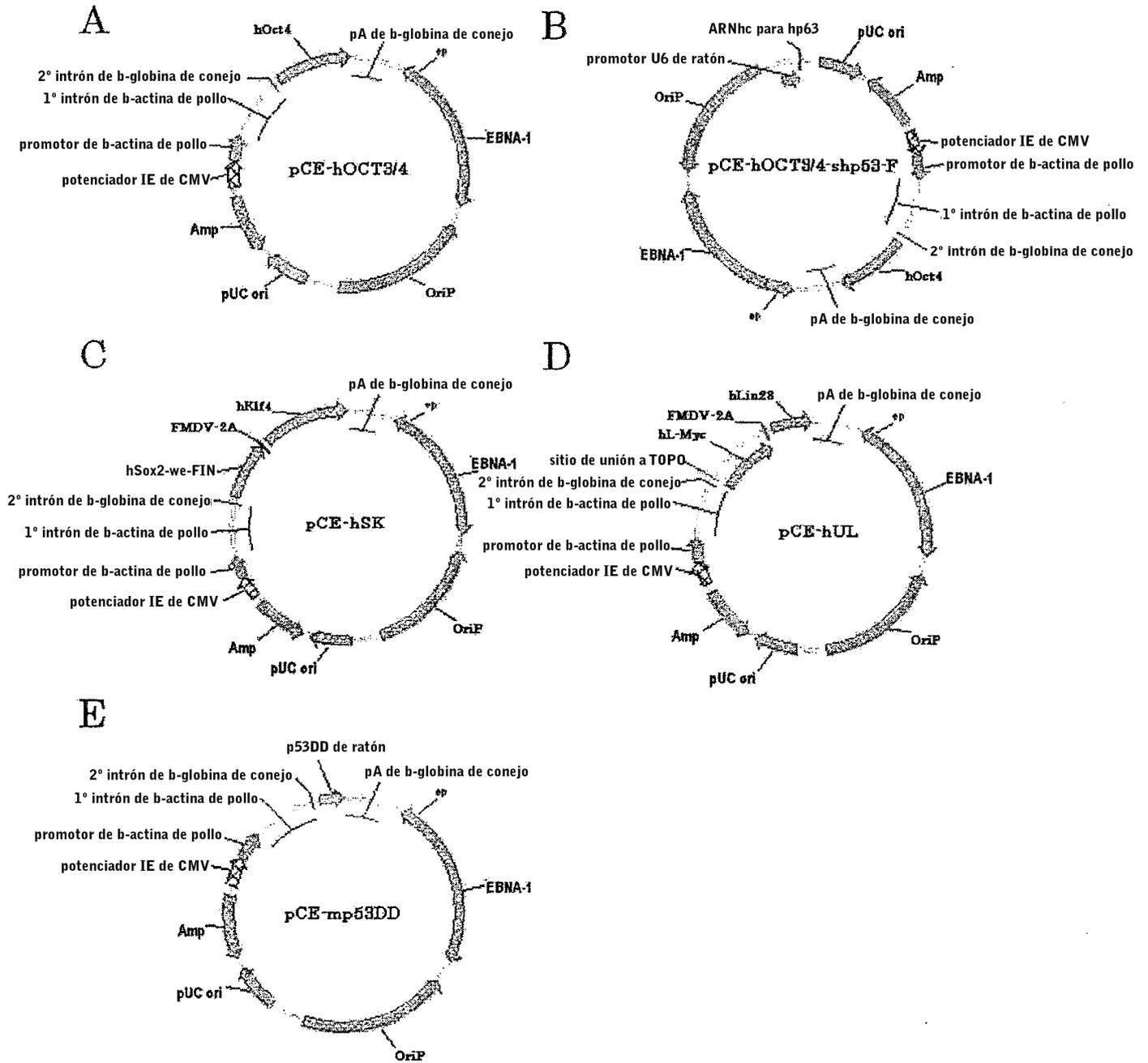


Fig. 3

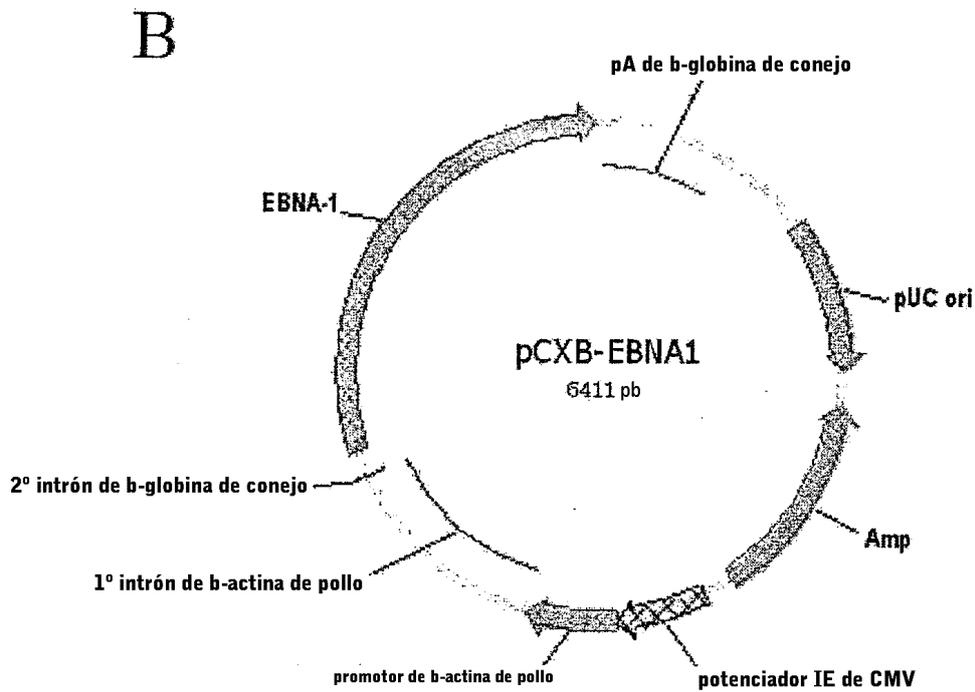
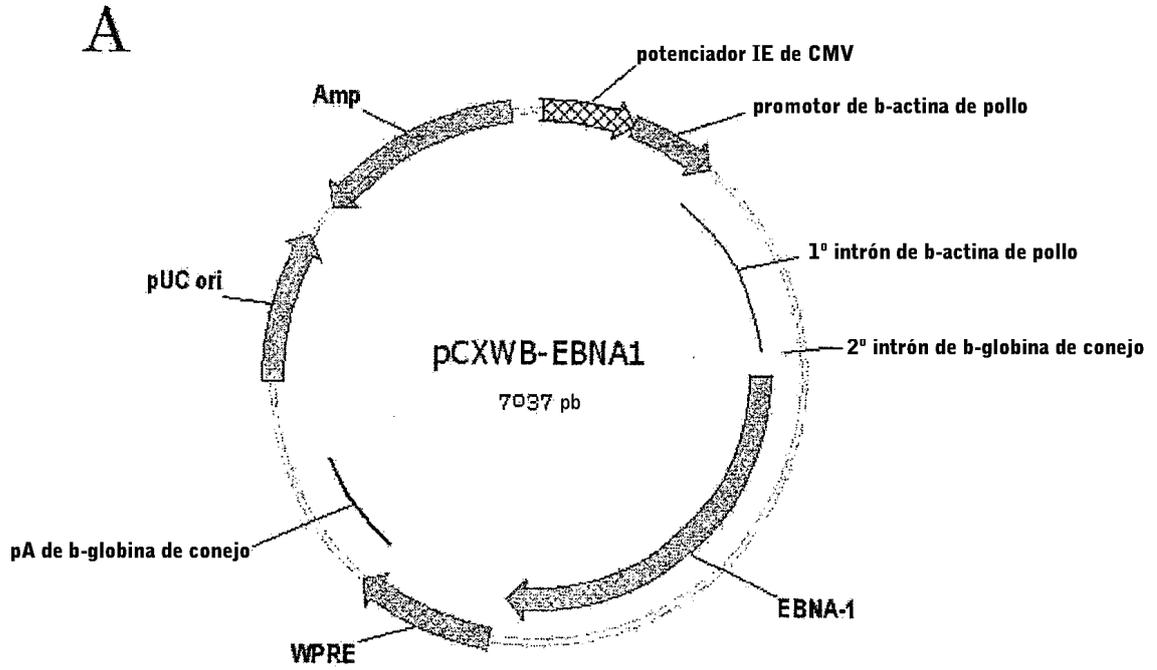


Fig. 4

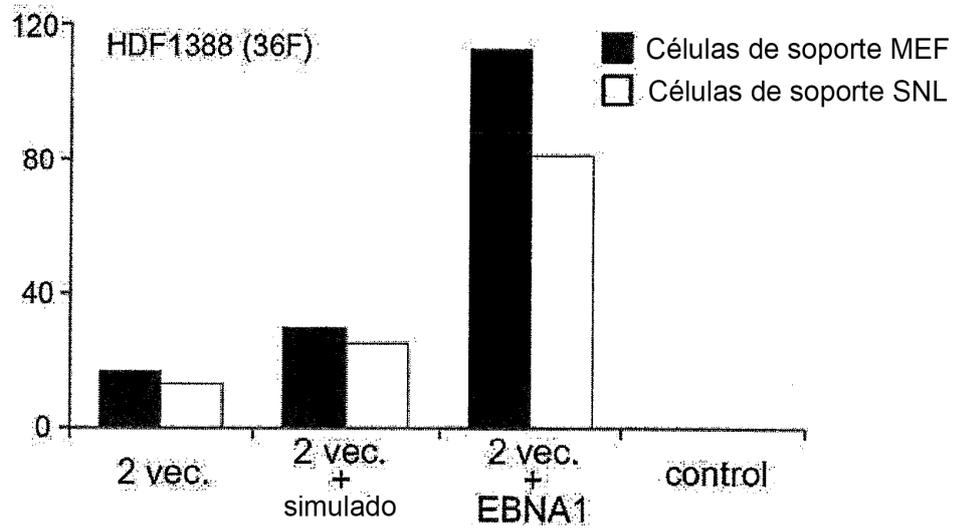
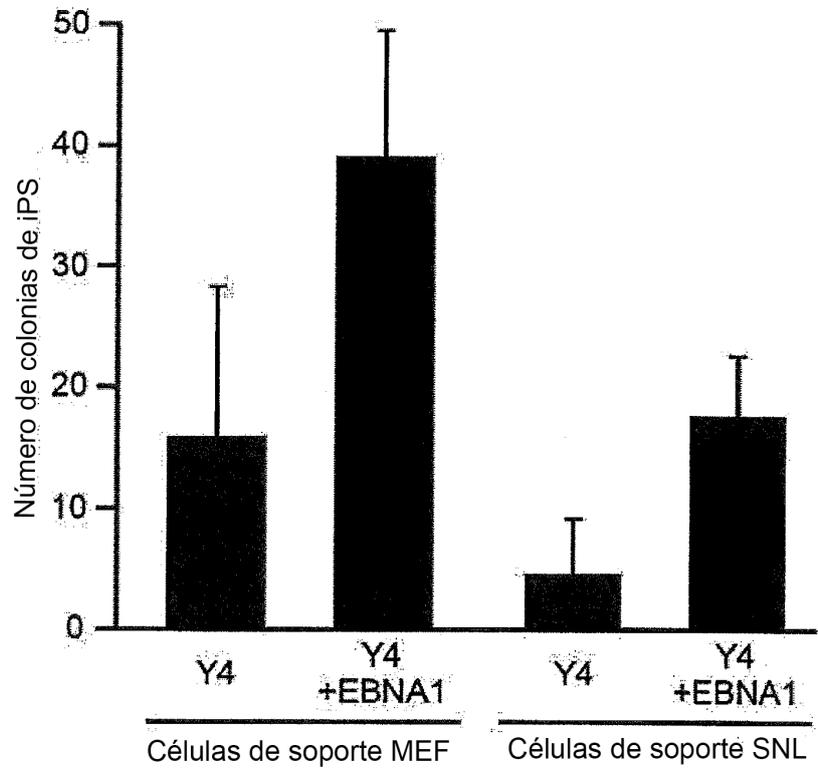


Fig. 5



**Fig. 6**

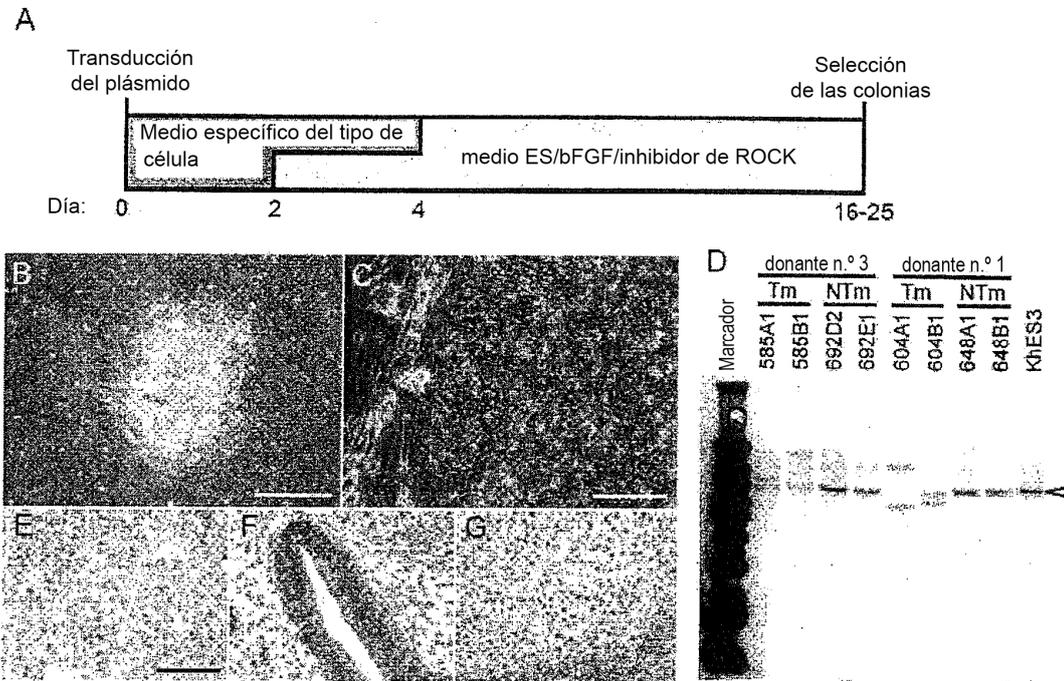


Fig. 7

