

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 403**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 33/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2014 PCT/IB2014/002816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2014 E 14843160 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3047020**

54 Título: **Métodos de reprogramación nuclear de células**

30 Prioridad:
20.09.2013 US 201361880579 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2020

73 Titular/es:
**LONZA LTD (100.0%)
Lonzastrasse
3930 Visp, CH**

72 Inventor/es:
**WALSH, PATRICK y
FELLNER, THOMAS**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 751 403 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

Métodos de reprogramación nuclear de células

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos de reprogramación de células madre.

5 Antecedentes de la invención

La transformación de células diferenciadas para inducir células madre pluripotentes (CMPi) ha revolucionado la biología de las células madre al proporcionar una fuente más tratable de células pluripotentes para la terapia regenerativa. La obtención de CMPi a partir de numerosas fuentes de células normales y enfermedad ha permitido la generación de células madre para la eventual utilización en terapia celular y medicina regenerativa.

10 Los estudios seminales de Yamanaka y colaboradores han revelado que la expresión ectópica de determinados factores transcripcionales podría inducir pluripotencialidad en las células somáticas. Estas células madre pluripotentes inducidas se autorrenuevan y se diferencian en una amplia diversidad de tipos celulares, convirtiéndolas en una opción atractiva para las terapias de enfermedades y de medicina regenerativa. Se han utilizado para modelar con éxito enfermedades humanas y presentan un gran potencial para la utilización en el cribado de fármacos y la terapia celular.

15 Además, las CMPi generadas a partir de células enfermas podrían servir como herramientas útiles para estudiar mecanismos de enfermedad y potenciales terapias. Sin embargo, queda mucho por entender sobre los mecanismos subyacentes de la reprogramación de las células somáticas en CMPi y hay inquietud respecto a las potenciales aplicaciones clínicas en ausencia de un conocimiento de los mecanismos.

20 El conjunto original de factores (RF) para reprogramar la pluripotencialidad incluye Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, Lin8 y Nanog. Oct3/4 y Sox2 son factores de transcripción que mantienen la pluripotencialidad en las células madre embrionarias (ME), mientras que Klf4 y c-Myc son factores de transcripción que se cree refuerzan la eficiencia de generación de CMPi. El factor de transcripción c-Myc se cree modifica la estructura de la cromatina, permitiendo que Oct3/4 y Sox2 accedan más eficientemente a genes necesarios para la reprogramación, mientras que Klf4 potencia la activación de determinados genes por parte de Oct3/4 y Sox. Nanog, al igual que Oct3/4 y Sox, es un factor de

25 transcripción que mantiene la pluripotencialidad en células ME, mientras que Lin28 es una proteína de unión a ARNm que se cree influye sobre la traducción o estabilidad de ARNm específicos durante la diferenciación. También se ha demostrado que la expresión retroviral de Oct3/4 y Sox, junto con la coadministración de ácido valproico, un desestabilizador de la cromatina e inhibidor de la histona desacetilasa, resulta suficiente para reprogramar los fibroblastos en CMPi.

30 Se ha demostrado que varias clases de vectores inducen pluripotencialidad al sobreexpresar las combinaciones génicas requeridas. Los primeros vectores se basaban en retrovirus y trasposones que se integraban en el ADN para la reprogramación nuclear. Aunque efectivos, surge inherentemente inquietud sobre su potencial tumorigenicidad, mediante mutagénesis por inserción o mediante reexpresión de factores de reprogramación oncogénicos. Aunque se han utilizado enfoques de administración génica de sitio Cre-LoxP o de trasposón PiggyBac para extraer ADN foráneo

35 del genoma del anfitrión tras la administración génica, ninguna de estas estrategias elimina el riesgo de mutagénesis debido a que dejan una pequeña inserción de ADN foráneo residual.

Como alternativa a la modificación genética, se ha demostrado que el ARNm, los plásmidos episómicos de ADN y las proteínas que penetran en las células (PPC) resultan eficaces como factores de reprogramación.

40 Seiga Ohmine et al. describen un método para generar células CMPi a partir de células progenitoras hematopoyéticas o a partir de células mononucleares de sangre periférica bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (BPF), y muestran que las células CMPi obtenidas pueden diferenciarse en las tres capas germinales (ver la fig. 1). Lui Te et al. describen un método para generar células CMPi a partir de líquido amniótico humano mediante la sobreexpresión de oct4 en estas células (véase la fig. 1). Huangfu Danwei et al. Describen un método para generar células madre pluripotentes y muestra que la adición de inhibidores de HDAC, tales como el ácido valproico potencia en gran medida la eficiencia de reprogramación (véase la fig. 1). El documento n° WO2012/11248 describe un método para potenciar la eficiencia de reprogramación de una célula mediante la expresión de factores de pluripotencialidad en la célula y la sobreexpresión de PARP-1. El documento n° WO2010/033920 describe un método para potenciar la eficiencia de reprogramación mediante la utilización de un agente que inhibe la metilación de las histonas. En el documento n°

45 WO2012/079278 se describe un método que permite la preparación mejorada (5 a 60 veces) de células CMPi con elevada eficiencia de producción mediante la adición de sal de litio. El documento n° WO2008/008923 describe una composición que comprende un péptido un ARNip, y que puede comprender además hidróxido de aluminio. La composición, al inyectarla en ratones SCID que portan melanomas cutáneos humanos, reduce el peso y el tamaño de los tumores de melanoma en 57% en comparación con animales de control correspondientes que recibían inyecciones intravenosas de PBS (véase la Tabla 3).

55 Estos vectores no integrantes, aunque funcionales, con frecuencia resultan en eficiencias de reprogramación reducidas, como resultado de su mecanismo de acción específico o debido a la compleja naturaleza de su práctica. Debido a que los enfoques basados en moléculas no integrantes y/o pequeñas para la generación o trans-

diferenciación de CMPi en un tipo celular somático diferente son vectores clínicamente relevantes, se vuelve importante para incrementar la robustez, eficiencia y facilidad de utilización de dichos métodos. La presente invención resuelve estas cuestiones.

Compendio de la invención

5 Un aspecto de la invención se refiere a un método de reprogramación nuclear de una célula somática de mamífero, comprendiendo el método: poner en contacto una población de células somáticas de mamífero con (a) una dosis eficaz de moléculas de patrón molecular asociado al daño (DAMP, por sus siglas en inglés), en el que DAMP es una composición de aluminio seleccionada del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio, y (b) un cóctel de factores de reprogramación, durante un periodo de tiempo suficiente para reprogramar las células somáticas de mamífero en tipo celular de interés deseado, en el que el tipo celular deseado es una célula madre pluripotente inducida (CMPi).

10 En una realización de dicho aspecto de la invención, el DAMP es una composición de aluminio. En otra realización, la composición de aluminio y cóctel de factores de reprogramación no integrantes se proporcionan simultáneamente. En otra realización, la composición de aluminio y el cóctel de factores de reprogramación no integrantes se proporcionan secuencialmente. En una realización todavía adicional, la composición de aluminio se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio. En todavía otra realización, la composición de aluminio es hidróxido de aluminio. En todavía otra realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de aproximadamente o por lo menos 40 a 80 microgramos/ml. En todavía una realización adicional, la dosis eficaz del hidróxido de aluminio es de por lo menos o aproximadamente 30 a 60 microgramos/ml. En todavía otra realización, la composición de aluminio es fosfato de aluminio. En todavía otra realización, la composición de aluminio es sulfato de aluminio.

15 En una realización adicional, las células somáticas humanas son células humanas. En una realización todavía adicional, el cóctel de factores de reprogramación comprende la utilización de Oct4, Sox2, Lin28 y Nanog, y las células se reprograman para que sean pluripotentes. En todavía otra realización, el cóctel de factores de reprogramación comprende la utilización de Oct4, Sox2, c-Myc y klf4, y las células se reprograman para que sean pluripotentes. En todavía otra realización, el tipo de célula somática es una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), células mononucleares de sangre del cordón, o fibroblastos. En una realización todavía adicional, los factores de reprogramación se proporcionan como proteínas que penetran en las células. En una realización adicional, los factores de reprogramación se proporcionan como ácidos nucleicos codificantes de proteínas de reprogramación. En todavía otra realización, el tipo celular de interés deseado es una célula madre pluripotente inducida (CMPi).

20 Otro aspecto de la descripción implica un método de reprogramación nuclear en el que la eficiencia de reprogramación nuclear es mayor que si el método se llevase a cabo sin la composición de aluminio. En una realización de este aspecto de la descripción, la eficiencia de reprogramación nuclear es aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces mayor que la expresión de por lo menos un marcador de pluripotencialidad clave. Tal como se describe en la presente memoria, la eficiencia de reprogramación nuclear es aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces mayor que la cantidad de tipo celular de interés deseado que se produce.

25 Otro aspecto de la descripción se refiere a una población de células madre pluripotentes inducidas producidas mediante cualquiera de los métodos de la descripción. En una realización, las células madre pluripotentes inducidas son células humanas.

30 Otro aspecto de la descripción se refiere a un kit para la puesta en práctica de los métodos de la invención. Tal como se describe en la presente memoria, el kit comprende factores de reprogramación y una composición de aluminio. Tal como se describe en la presente memoria, el kit además comprende células somáticas. Un aspecto todavía adicional de la descripción se refiere a una composición terapéutica que comprende una composición DAMP, tal como una composición de aluminio, y uno o más factores de reprogramación y/o ácidos nucleicos codificantes de los mismos y/o moléculas pequeñas, para la administración in vivo, para la modulación terapéutica del fenotipo celular y/o tisular. Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos de tratamiento de un paciente que lo necesita mediante la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones terapéuticas de la descripción.

50 Breve descripción de las figuras

Puede alcanzarse una comprensión más completa de la presente invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos, al considerarlos junto con la descripción detallada a continuación. Las realizaciones ilustradas en los dibujos pretenden únicamente ejemplificar la invención y no deben interpretarse como limitativos de la invención a las realizaciones ilustradas.

55 La figura 1 muestra una imagen del procedimiento de obtención de CMPi utilizando métodos descritos en la presente memoria.

Las figuras 2, 3, 4 y 5 ilustran resultados experimentales de utilización de concentraciones variables de hidróxido de

aluminio para obtener CMPi procedentes de diversos donantes bajo condiciones hipóxicas y normóxicas utilizando los métodos descritos en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

5 En la presente memoria se describen métodos para potenciar la reprogramación nuclear de células somáticas para convertirlas en células madre pluripotentes inducidas. En particular, los métodos descritos en la presente memoria implican la utilización de moléculas de patrón molecular asociado al daño (DAMP). En determinadas realizaciones, las DAMP son composiciones de aluminio, tales como hidróxido de aluminio. Se ha encontrado inesperada y sorprendentemente que tales DAMP potencian la eficiencia de reprogramación nuclear de los factores de reprogramación habitualmente utilizados para inducir células somáticas para que se conviertan en células madre pluripotentes inducidas. Por consiguiente, esta descripción describe métodos de reprogramación nuclear, así como células obtenidas de tales métodos, junto con métodos terapéuticos para utilizar tales células en el tratamiento de enfermedades susceptibles de tratamiento mediante terapia de células madre, así como kits para dichos usos.

15 Debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos particulares indicados, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria se proporciona a fin de describir realizaciones particulares exclusivamente, y que no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas.

20 La utilización de las palabras “un” o “una” utilizadas junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria puede significar “uno”, aunque también es consistente con el significado de “uno o más”, “por lo menos uno” y “uno o más de uno”.

En toda la presente solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación de error inherente del dispositivo, utilizando el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Típicamente, el término pretende comprender una variabilidad aproximadamente igual o inferior a 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20%, según la situación.

25 La utilización del término “o” en las reivindicaciones se utiliza para referirse a “y/o” a menos que se indique explícitamente que hace referencia a alteARNtivas exclusivamente o que las alteARNtivas sean mutuamente excluyentes, aunque la descripción proporciona una definición que se refiere alteARNtivas exclusivamente e “y/o”.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria y en la reivindicación o reivindicaciones, los términos “comprendiendo” (y cualquier forma de comprendiendo, tal como “comprende”), “presentando” (y cualquier forma de presentando, tal como “presenta”), “incluyendo” (y cualquier forma de incluyendo, tal como “incluye”) o “conteniendo” (y cualquier forma de conteniendo, tal como “contiene”) son inclusivas y de significado abierto y no excluyen elementos o etapas del método no indicadas adicionales. Esta contemplado que pueda implementarse cualquier realización comentada en la presente memoria con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, pueden utilizarse composiciones de la invención para conseguir métodos de la invención.

35 Se hace referencia a “totipotencia” en la presente memoria como la capacidad de una célula individual de dividirse y/o diferenciarse para producir todas las células diferenciadas en un organismo, incluyendo tejidos extraembrionarios. Entre las células totipotentes se incluyen esporas y cigotos. En algunos organismos, las células pueden desdiferenciarse y recuperar la totipotencia.

40 Se hace referencia a “pluripotencialidad” en la presente memoria como al potencial de diferenciarse en cualquier de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso).

45 Las “células madre pluripotentes” incluyen las células madre pluripotentes naturales y las células madre pluripotentes inducidas. Pueden producir cualquier tipo celular fetal o adulto. Sin embargo, solas generalmente no pueden desarrollarse en un organismo fetal o adulto debido a que no poseen el potencial de contribuir a tejido extraembrionario, tal como la placenta.

50 Las “células madre pluripotentes inducidas” o (“CMPi”) son similares a las células madre pluripotentes naturales, tales como las células madre (CM) embrionarias, en muchos aspectos, tales como la expresión de determinados genes y/o proteínas de la célula madre, los patrones de metilación de la cromatina, el tiempo de duplicación, la formación de cuerpos embrioides, la formación de teratoma, la formación de quimeras viables y la potencia y diferenciabilidad. Las células pluripotentes inducidas pueden derivarse de, por ejemplo, células adultas de estómago, hígado, piel y sangre. Las CMPi pueden derivarse mediante transfección de determinados genes asociados a célula madre en células no pluripotentes, tales como fibroblastos adultos. En determinadas realizaciones, la transfección puede conseguirse mediante vectores víricos, tales como retrovirus, por ejemplo, y vectores no víricos o episómicos. Entre los genes transfectados pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, transgenes de los factores transcripcionales maestros Oct-3/4 (Pou5fl), Klf4, c-myc, Sox2, Oct-4, Nanog y Lin28. Las subpoblaciones de células transfectadas pueden empezar a ser morfológica y bioquímicamente similares a células madre pluripotentes, y pueden aislarse mediante selección morfológica, tiempo de duplicación o mediante un gen informador y selección con antibiótico.

Entre los “marcadores de pluripotencialidad clave” conocidos por el experto ordinario en la materia se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la expresión génica y/o proteica de fosfatasa alcalina, SSEA3, SSEA4, Sox2, Oct3/4, Nanog, TRA160, TRA181, TDGF1, Dnmt3b, FoxD3, GDF3, Cyp26a1, TERT y zfp42.

5 Se hace referencia a la “multipotencialidad” en la presente memoria como células progenitoras multipotentes que presentan el potencial de producir múltiples tipos celulares, aunque un número de linajes más limitado que una célula madre pluripotente. Por ejemplo, una célula madre multipotente es una célula hematopoyética que puede desarrollarse en varios tipos de células sanguíneas, pero no puede desarrollarse en células cerebrales o en otros tipos de células.

10 La expresión “factores de reprogramación”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o a un cóctel de polipéptidos biológicamente activos (o ácidos nucleicos, p.ej., ADN o ARN, codificantes de los mismos) o moléculas pequeñas que actúan sobre una célula alterando la transcripción y que, con la expresión, reprograman una célula somática en un tipo celular diferente, o a multipotencialidad o a pluripotencialidad. En algunas realizaciones, los factores de reprogramación pueden ser no integrantes, es decir, proporcionados a la célula somática receptora en una forma que no resulta en la integración de ADN exógeno en el genoma de la célula receptora.

15 En algunas realizaciones, el factor de reprogramación es un factor de transcripción, incluyendo, aunque sin limitación, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc y Nanog. También resulta de interés como factor de reprogramación Lin28, que es una proteína de unión a ARNm que se cree que influye sobre la traducción o estabilidad de los ARNm específicos durante la diferenciación.

20 Entre los factores de reprogramación de interés se incluyen además factores útiles en la trans-diferenciación, en la que una célula somática se reprograma en una célula somática diferente. Para el propósito de la trans-diferenciación de una célula somática en otro tipo celular somático sustancialmente diferente, encuentra utilidad un conjunto diferente de factores de reprogramación. Por ejemplo, para trans-diferenciar un fibroblasto en un cardiomiocito, podrían utilizarse los péptidos que penetran en las células Gata4, Mef2c y Tbx5 (Leda et al., Cell, volumen 142, n° 3, 375-386, 6 de agosto, 2010).

25 Los factores de reprogramación pueden proporcionarse en forma de composiciones de polipéptidos aislados, es decir, en una forma libre de células, que son biológicamente activos o en forma de ácidos nucleicos (p.ej., ADN o ARN) codificantes de los mismos. La actividad biológica puede determinarse mediante ensayos de unión a ADN específicos, o mediante la determinación de la eficacia del factor en la alteración de la transcripción celular. Una composición de la invención puede proporcionar uno o más factores de reprogramación biológicamente activos. La composición puede comprender por lo menos aproximadamente 50 µg/ml de factor de reprogramación soluble, por lo menos aproximadamente 100 µg/ml, por lo menos aproximadamente 150 µg/ml, por lo menos aproximadamente 200 µg/ml, por lo menos aproximadamente 250 µg/ml, por lo menos aproximadamente 300 µg/ml o más.

30 Un polipéptido Klf4 es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Klf4 humana, es decir, el factor 4 similar a Kruppel, la secuencia del cual se encuentra en GenBank n° de acceso NP_004226 (SEC ID n° 1) y NM_004235 (SEC ID n° 2). Los polipéptidos Klf4, p.ej. los que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 99% o 100% idénticos a la secuencia proporcionada en GenBank n° de acceso NM_004235 (SEC ID n° 2) y los ácidos nucleicos que los codifican encuentran utilidad como factor de reprogramación en la presente invención.

35 Un polipéptido c-Myc es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de c-Myc humana, es decir, el homólogo del oncogén vírico de la mielocitomatosis, la secuencia del cual puede encontrarse en GenBank n° de acceso NP_002458 (SEC ID n° 3) y NM_002467 (SEC ID n° 4). Los polipéptidos c-Myc, p.ej., los que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 99% o 100% idénticos a la secuencia proporcionada en GenBank n° de acceso NM_002467 (SEC ID n° 4) y los ácidos nucleicos que los codifican encuentran utilidad como factor de reprogramación en la presente invención.

45 Un polipéptido Nanog es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Nanog humano, es decir, la caja homeo de Nanog, la secuencia del cual puede encontrarse en GenBank n° de acceso NP_079141 (SEC ID n° 5) y NM_024865 (SEC ID n° 6). Los polipéptidos Nanog, p.ej., los que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 99% o 100% idénticos a la secuencia proporcionada en GenBank n° de acceso NM_024865 (SEC ID n° 6) y los ácidos nucleicos que los codifican encuentran utilidad como factor de reprogramación en la presente invención.

50 Un polipéptido Lin-28 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Lin-28 humano, es decir, homólogo de Lin-28 de *C. elegans*, la secuencia del cual puede encontrarse en GenBank n° de acceso NP_078950 (SEC ID n° 7) y NM_024674 (SEC ID n° 8). Los polipéptidos Lin-28, p.ej. los que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntico a la secuencia proporcionada en GenBank n° de acceso NM_024674 (SEC ID n° 8) y los ácidos nucleicos que los codifican encuentran utilidad como un factor de reprogramación en la presente invención.

Un polipéptido Oct3/4 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Oct3/4 humano, también conocido como caja homeo 1 de clase 5 POU de

Homo sapiens (POU5F1), la secuencia del cual puede encontrarse en GenBank nº de acceso NP_002692 (SEC ID nº 9) y NM_002701 (SEC ID nº 10). Los polipéptidos Oct3/4, p.ej., los que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 99% o 100% idénticos a la secuencia proporcionada en GenBank nº de acceso NM_002701 (SEC ID nº 10) y los ácidos nucleicos que los codifican encuentran utilidad como un factor de reprogramación en la presente invención.

Un polipéptido Sox2 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Sox2 humano, es decir, la proteína de la caja 2 de la región Y determinante del sexo, la secuencia del cual puede encontrarse en GenBank nº de acceso NP_003097 (SEC ID nº 11) y NM_003106 (SEC ID nº 12). Los polipéptidos Sox2, p.ej. los que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 99% o 100% idénticos a la secuencia proporcionada en GenBank nº de acceso NM_003106 (SEC ID nº 12) y los ácidos nucleicos que lo codifican encuentran utilidad como un factor de reprogramación en la presente invención.

Moléculas pequeñas, incluyendo, aunque sin limitación, ácido valproico, ácido hidroxámico, tricostatina A, suberoilánilida de ácido hidroxámico, BIX-01294 y BayK8644 se han descrito como útiles en la reprogramación de células (véase Shi et al. (2008), Cell Stem Cell 6; 3(5):568-574, y Huangfu et al. (2008), Nature Biotechnology 26:795-797).

Las "moléculas de patrón molecular asociado al daño" (DAMP) también conocidas como moléculas de patrón molecular asociado al daño, tal como se utilizan en la presente memoria son moléculas que pueden iniciar y perpetuar respuestas inmunológicas en una respuesta inflamatoria no infecciosa. En contraste, las moléculas de patrón molecular asociadas a patógenos (PAMP) inician y perpetúan la respuesta inflamatoria a patógenos infecciosos. Las DAMP pueden ser proteínas nucleares o citosólicas. Al liberarse fuera de la célula o exponerse sobre la superficie de la célula tras la lesión de un tejido, pueden desplazarse de un medio reductor a uno oxidante, lo que puede resultar en su desnaturalización. Tras la necrosis, el ADN tumoral se libera al exterior del núcleo y al exterior de la célula, pudiéndose convertir en una DAMP. Entre los ejemplos de DAMP pueden incluirse, aunque sin limitación, moléculas de HMGB1, ADN, ARN, S100, metabolitos purinas, ácido úrico, nanopartículas, asbesto, composiciones de aluminio tales como sales de aluminio, beta-amiloide, sílice, cristales de colesterol, hemozoína, dehidrato de pirofosfato de calcio y similares. En determinadas realizaciones, la presencia de DAMP puede potenciar la eficiencia de la reprogramación como resultado de la exposición a los factores de reprogramación.

La expresión "composiciones de aluminio" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a moléculas que contiene aluminio elemental, sales de aluminio, iones de aluminio y/o aluminio unido covalente o iónicamente a otro elemento. En algunas realizaciones, la expresión se refiere a sales de aluminio, hidróxidos de aluminio, sulfato de aluminio y fosfatos de aluminio.

"Aluminio" es un elemento químico en el grupo del boro con símbolo Al y número atómico 13. Es un metal blanco plateado, blando y dúctil. El aluminio es el tercer elemento más abundante (después del oxígeno y el silicio) y el metal más abundante en la corteza de la Tierra. La mayoría de compuestos, incluyendo todos los minerales que contienen Al y todos los compuestos de aluminio comercialmente significativos, presentan aluminio el estado de oxidación 3+. El número de coordinación de tales compuestos varía, aunque generalmente Al^{3+} es hexacoordinado o tetracoordinado. Prácticamente todos los compuestos de aluminio (III) son incoloros. El aluminio forma un óxido estable, conocido por el nombre de mineral corindón. El zafiro y el rubí son corindón impuro contaminado con cantidades traza de otros metales. Los dos óxidos-hidróxidos, $AlO(OH)$, son boehmita y diáspora. Existen tres trihidróxidos: bayerita, gibbsita y nordstrandita, que difieren en su estructura cristalina (polimorfos). La mayoría se producen a partir de menas mediante una diversidad de procedimientos húmedos utilizando ácidos y bases. El calentamiento de los hidróxidos conduce a la formación de corindón.

El "hidróxido de aluminio" tal como se utiliza en la presente memoria es $Al(OH)_3$, ATH, en ocasiones denominado erróneamente hidrato de alúmina, y se encuentra en la naturaleza como el mineral gibbsita (también conocido como hidrargilita) y sus tres polimorfos más raros: bayerita, doyleita y nordstrandita. El hidróxido de aluminio recién precipitado forma geles, que es la base para la aplicación de sales de aluminio como floculantes en la purificación de agua. Este gel cristaliza con el tiempo. Los geles de hidróxido de aluminio pueden deshidratarse (p.ej., utilizando solventes no acuosos miscibles en agua como el etanol), formando unos polvos amorfos de hidróxido de aluminio, que son fácilmente solubles en ácidos. Los polvos de hidróxido de aluminio que se calientan a una temperatura elevada bajo condiciones cuidadosamente controladas se conocen como alúmina activada y se utilizan como desecante, un adsorbente, en la purificación de gases, como un soporte de catalizador de Claus, en la purificación de agua y como adsorbente para la catálisis durante la fabricación de polietileno mediante el procedimiento de Sclairtech. La gibbsita presenta una estructura típica de hidróxido de metal, con enlaces de hidrógeno. Está constituido de capas dobles de grupos hidroxilo con iones de aluminio ocupando dos tercios de los orificios octaédricos entre las dos capas.

El hidróxido de aluminio puede fabricarse comercialmente mediante el procedimiento de Bayer, que implica disolver bauxita en hidróxido sódico a temperaturas de hasta 270°C. Los sólidos remanentes, que forman un lodo rojo, se separan y el óxido de aluminio se precipita de la solución remanente. El óxido de aluminio que se produce puede convertirse en hidróxido de aluminio mediante la reacción con agua.

El "fosfato de aluminio" ($AlPO_4$) es un compuesto químico cuya forma anhidra se encuentra en la naturaleza como el

mineral berlinita. También se conocen muchas formas sintéticas de fosfato de aluminio anhidro. Presentan estructuras de marco similares a las zeolitas y algunas se utilizan como catalizadores o tamices moleculares. Se conoce una forma hidratada, $\text{AlPO}_4 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$. El gel de fosfato de aluminio también se encuentra comercialmente disponible. Existe un gran número de tamices moleculares de fosfato de aluminio, genéricamente conocidos como "ALPO". Comparten la misma composición química del AlPO_4 y las estructuras de marco con cavidades microporosas y las estructuras están constituidas de tetraedros alternantes de AlO_4 y PO_4 . El mineral de AlPO_4 cristalino sin cavidades, más denso, de la berlinita comparte los mismos tetraedros alternantes de AlO_4 y PO_4 . Las estructuras de marco de aluminofosfato difieren entre sí en la orientación de los tetraedros de AlO_4 y los tetraedros de PO_4 , formando cavidades de diferente tamaño y, en este aspecto, son similares a las zeolitas aluminosilicato, que difieren en que presentan marcos eléctricamente cargados. Una preparación típica de un aluminofosfato implica la reacción hidrotérmica de ácido fosfórico y aluminio en forma de hidróxido, una sal de aluminio tal como la sal o alcóxido de nitrato de aluminio bajo pH controlado en presencia de aminas orgánicas. Estas moléculas orgánicas actúan como moldes (ahora denominados agentes directores de estructura, al dirigir el crecimiento del marco poroso).

"Sulfato de aluminio" es un compuesto químico con la fórmula $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Es soluble en agua y se utiliza principalmente como agente floculante en la purificación de agua potable. El sulfato de aluminio en ocasiones se considera un tipo alumbre. Los alumbres son una clase de compuestos relacionados tipificados por $\text{AB}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. La forma anhidra se observa naturalmente como el mineral raro milosevichita, observado en, p.ej., medios volcánicos y al incinerar pilas de residuos de minería del carbón. El sulfato de aluminio raramente, si alguna vez, se encuentra en forma de la sal anhidra. Forma varios hidratos diferentes, de los cuales el hexadecahidrato $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ y el octadecahidrato $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ son los más comunes. El heptadecahidrato, la fórmula del cual se escribe como $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se encuentra naturalmente en forma del mineral alunógeno.

La dosis de un DAMP (p.ej., una composición de aluminio) que resulta eficaz en los métodos de la invención es una dosis que incrementa la eficiencia de reprogramación de una célula o población celular, respecto al mismo método llevado a cabo en ausencia del DAMP. El término "reprogramación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la reprogramación nuclear de una célula somática en una célula pluripotente (p.ej., un fibroblasto en una célula pluripotente inducida) o la reprogramación nuclear de una célula somática en una célula somática sustancialmente diferente (p.ej., un fibroblasto en una célula endotelial) in vitro o in vivo. El último procedimiento también se conoce como trans-diferenciación.

En determinadas realizaciones, las células que se reprograman se exponen a una concentración de DAMP, tal como una composición de aluminio, que presenta una concentración de aproximadamente, o por lo menos, o exactamente 1, 10, 102 o 103 veces 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 nanogramos, microgramos, miligramos o gramos por ml de medio de cultivo celular. En otra realización, las células se exponen a dicha concentración durante aproximadamente o por lo menos o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 minutos, horas o días antes, después o durante la exposición de las células somáticas en factores de reprogramación.

La expresión "eficiencia de reprogramación" puede utilizarse para referirse a la capacidad de las células de producir colonias de células CMPi al ponerlas en contacto con factores de reprogramación. Las células somáticas que demuestran una eficiencia incrementada de reprogramación en pluripotencialidad demuestran una capacidad potenciada de producir las CMPi al ponerse en contacto con factores de reprogramación respecto a un control. La expresión "eficiencia de reprogramación" puede referirse también a la capacidad de las células somáticas de reprogramarse en un tipo celular somático sustancialmente diferente, un procedimiento conocido como trans-diferenciación. La eficiencia de reprogramación con los métodos de la invención varía con la combinación particular de células somáticas, el método de introducción de factores de reprogramación y el método de cultivo después de la inducción de la reprogramación.

En determinadas realizaciones, la presencia de un DAMP resulta en aproximadamente o por lo menos o exactamente 1, 10, 102 o 103 veces 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 porcentaje de incremento de: 1) el nivel de expresión de uno o más marcadores de pluripotencialidad clave, o 2) el número de CMPi formadas, cada uno en comparación con el mismo método de reprogramación pero sin el DAMP (es decir, un control).

Métodos de inducción de pluripotencialidad in vitro

Se pone en contacto una población inicial de células somáticas con factores de reprogramación, tal como se ha definido anteriormente, en una combinación y cantidad suficientes para reprogramar la célula en pluripotencialidad antes, concurrentemente o después de la activación de la célula somática con una dosis eficaz de un DAMP. En una realización de la invención, la composición de aluminio s hidróxido de aluminio. Los factores de reprogramación pueden proporcionarse a las células somáticas individualmente o en forma de una única composición, es decir, una composición premezclada, de factores de reprogramación. En otra realización, la población inicial de células somáticas

es de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células mononucleares de sangre del cordón o fibroblastos.

En algunas realizaciones, la población inicial de células se pone en contacto con una dosis eficaz de un DAMP durante un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 18 días, p.ej., de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 días, y puede ser de aproximadamente 2 a 3 días.

5 Los factores de reprogramación pueden añadirse a las células sujeto simultánea o secuencialmente en diferentes tiempos, y pueden añadirse en combinación con el DAMP. En algunas realizaciones, se añade un conjunto de por lo menos tres factores de reprogramación purificados, p.ej., un polipéptido Oct3/4, un polipéptido Sox2 y un polipéptido Klf4, c-myc, Nanog o lin28. En algunas realizaciones, se proporciona a las células un conjunto de cuatro factores de reprogramación purificados, p.ej., un polipéptido Oct3/4, un polipéptido Sox2, un polipéptido Klf4 y un polipéptido c-Myc, o un polipéptido Oct3/4, un polipéptido Sox2, un polipéptido lin28 y un polipéptido Nanog.

10 Entre los métodos para introducir los factores de reprogramación en células somáticas se incluye proporcionar una célula con factores proteínas purificados o ácidos nucleicos codificantes de las mismas. En algunas realizaciones, un factor de reprogramación comprenderá las secuencias polipeptídicas del factor de reprogramación fusionadas con un dominio polipéptido que penetra en las células. Se conocen de la técnica varios dominios que penetran en las células y pueden utilizarse en los polipéptidos no integrantes de acción en el núcleo de la presente invención, incluyendo portadores peptídicos, peptidomiméticos y no peptídicos. Por ejemplo, un péptido que penetra en las células puede derivarse a partir de la tercera hélice alfa del factor de transcripción *Antennapedia* de *Drosophila melanogaster*, denominado penetratina, que comprende la secuencia de aminoácidos RQIKIWFQNRRMKWKK (SEC ID nº 13). A título de otro ejemplo, el péptido que penetra en las células comprende la secuencia de aminoácidos de la región básica tat del VIH-1, que puede incluir, por ejemplo, los aminoácidos 49 a 57 de la proteína tat natural. Entre otros dominios que penetra en las células se incluyen los motivos poliarginina, por ejemplo, la región de aminoácidos 34 a 56 de la proteína Rev del VIH-1, nona-arginina (SEC ID nº 14), octa-arginina (SEC ID nº 15) y similares (véase, por ejemplo, Futaki et al. (2003), *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003, abril; 4(2):87-96, y Wender et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 21 de nov., 97(24):13003-8, solicitudes publicadas de patente US nº 2003/0220334, nº 2003/0083256, nº 2003/0032593 y nº 2003/0022831, para las enseñanzas de péptidos y peptoides de translocalización). La secuencia de nona-arginina (R9) (SEC ID nº 14) es una de las PTD más eficientes que se han caracterizado (Wender et al., 2000; Uemura et al., 2002).

20 En dichas realizaciones, las células se incuban en presencia de un factor de reprogramación purificado durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 72 horas, p.ej., 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, o cualquier otro periodo entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 72 horas. Típicamente, los factores de reprogramación se proporcionan a las células del sujeto cuatro veces, y se deja que las células incuben con los factores de reprogramación durante 48 horas, seguido de la sustitución del medio por medio fresco y se cultivan adicionalmente las células (véase, por ejemplo, Zhou et al. (2009), *Cell Stem Cells* 4(5); 381-384). Los factores de reprogramación pueden proporcionarse en las células del sujeto durante aproximadamente una a aproximadamente 4 semanas, p.ej., entre aproximadamente dos y aproximadamente 3 semanas.

30 La dosis de factores de reprogramación variará con la naturaleza de las células, los factores, las condiciones de cultivo, etc. En algunas realizaciones, la dosis será de entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 µM para cada factor, más habitualmente entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 500 nM, o aproximadamente 100 a 200 nM. En algunas realizaciones, las células se exponen inicialmente a una composición de aluminio durante la exposición a los factores de reprogramación durante por lo menos aproximadamente 1 día, por lo menos aproximadamente 2 días, por lo menos aproximadamente 4 días, por lo menos aproximadamente 6 días o una semana, y pueden exponerse durante el procedimiento de reprogramación completo, o menos. La dosis dependerá del DAMP específico, aunque puede ser de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 µg/ml, de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 500 ng/ml. Después de cada provisión pueden realizarse dos incubaciones de 16 a 24 horas con los factores de recombinación, seguido de la sustitución del medio por medio fresco, y las células se cultivan adicionalmente.

40 En algunas realizaciones, se utiliza un vector que no se integra en el genoma de la célula somática. Se encuentran disponibles muchos vectores útiles para transferir genes exógenos al interior de las células de mamífero diana. Los vectores pueden mantenerse episómicamente, p.ej., en forma de plásmidos, vectores derivados de virus, tales como citomegalovirus, adenovirus, etc. Los vectores utilizados para proporcionar factores de reprogramación a las células del sujeto en forma de ácidos nucleicos típicamente comprenderán promotores adecuados para controlar la expresión, es decir, la activación transcripcional, de los ácidos nucleicos del factor de reprogramación. Lo anterior puede incluir promotores de acción ubicua, por ejemplo, el promotor beta-actina del CMV, o promotores inducibles, tales como promotores que están activos en las poblaciones celulares particulares o que responden a la presencia de fármacos tales como la tetraciclina. Activación transcripcional pretende referirse a que la transcripción se incrementa sobre los niveles basales en la célula diana en por lo menos o aproximadamente igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100 o 1000 veces.

50 Tras la introducción de factores de reprogramación, las células somáticas pueden mantenerse en un medio de cultivo convencional que comprende células de capa de alimentación, o pueden cultivarse en ausencia de capas de

alimentación, es decir, que no presenta células somáticas diferentes de las inducidas a pluripotencialidad. Los cultivos libres de capa de alimentación pueden utilizar una superficie recubierta con proteína, p.ej., Matrigel, etc. Las células somáticas también pueden mantenerse en suspensión o unirse a microportadores.

5 Las CMPi inducidas para convertirse en CMP mediante los métodos de la invención pueden presentar una morfología de tipo CMEh, las cuales crecen en forma de colonias planas con grandes proporciones núcleo-citoplasma, bordes definidos y núcleos prominentes. Además, las CMPi pueden expresar uno o más marcadores de pluripotencialidad clave conocidos por el experto ordinario en la materia, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, fosfatasa alcalina, SSEA3, SSEA4, Sox2, Oct3/4, Nanog, TRA160, TRA181, TDGF 1, Dnmt3b, FoxD3, GDF3, Cyp26a1, TERT y zfp42. Además, las CMPi son capaces de formar teratomas. Además, son capaces de formar o contribuir a los tejidos del
10 ectodermo, mesodermo o endodermo en un organismo vivo.

Los genes pueden introducirse en las células somáticas o en las CMPi derivadas de las mismas para una diversidad de propósitos, p.ej., para sustituir genes con una mutación de pérdida de función, para proporcionar genes marcadores, etc. AlteARNtivamente, se introducen vectores que expresan ARNm antisentido ribozimas, bloqueando de esta manera la expresión e un gen no deseado. Otros métodos de terapia génica son la introducción de genes de
15 resistencia a fármaco para permitir que las células progenitoras normales presenten una ventaja y se vean sometidas a presión selectiva, por ejemplo, el gen de resistente a múltiples fármacos (RMF), o genes antiapoptosis, tales como bcl-2. Pueden utilizarse diversas técnicas conocidas para introducir ácidos nucleicos en las células diana, p.ej., electroporación, ADN precipitado con calcio, fusión, transfección, lipofección, infección y similares, tal como se ha comentado anteriormente. El modo particular en el que se introduce el ADN no resulta crucial para la práctica de la
20 invención.

Las CMPi producidas mediante los métodos anteriores pueden utilizarse para reconstituir o complementar células en diferenciación o diferenciadas en un receptor. Las células inducidas pueden diferenciarse en tipos celulares de diversos linajes. Entre los ejemplos de células diferenciadas se incluyen células diferenciadas de los linajes
25 ectodérmico (p.ej., neuronas y fibroblastos), mesodérmico (p.ej., cardiomiocitos) o endodérmico (p.ej., células pancreáticas). Las células diferenciadas pueden ser una o más de: células beta pancreáticas, células madre neurales, neuronas (p.ej., neuronas dopaminérgicas), oligodendrocitos, células progenitoras de oligodendrocitos, hepatocitos, células madre hepáticas, astrocitos, miocitos, células hematopoyéticas o cardiomiocitos.

Existen numerosos métodos de diferenciación de las células inducidas en un tipo celular más especializado. Los métodos de diferenciación de células inducidas pueden similares a los utilizados para diferenciar células madre, particularmente células ES, MSC, MAPC, MIAMI, células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés). En algunos casos, la diferenciación se produce ex vivo; en algunos casos, la diferenciación se produce in vivo.
30

Las células inducidas, o células diferenciadas a partir de células inducidas, pueden utilizarse como una terapia para tratar enfermedades (p.ej., un defecto genético). La terapia puede dirigirse a tratar la causa de la enfermedad; o
35 alteARNtivamente, la terapia puede ser para tratar los efectos de la enfermedad o condición. Las células inducidas pueden transferirse a, o a un sitio próximo a, un sitio lesionado en un sujeto; o las células pueden introducirse en el sujeto de una manera que permita que las células migren o se dirijan al sitio lesionado. Las células transferidas pueden sustituir ventajosamente las células dañadas o lesionadas y permitir la mejora de la condición global del sujeto. En algunos casos, las células transferidas pueden estimular la regeneración o reparación de tejidos.

Las células transferidas pueden ser células diferenciadas a partir de células inducidas. Las células transferidas también pueden ser células madre multipotentes diferenciadas a partir de células inducidas. En algunos casos, las células transferidas pueden ser células inducidas que no se han diferenciado.
40

El número de administraciones de tratamiento en un sujeto puede variar. La introducción de las células inducidas y/o diferenciadas en el sujeto puede ser un suceso de una vez; aunque en determinadas situaciones, dicho tratamiento puede inducir la mejora durante un periodo de tiempo limitado y requerir una serie continua de tratamientos repetidos.
45 En otras situaciones, pueden requerirse múltiples administraciones de las células antes de que se observe un efecto. Los protocolos exactos dependen de la enfermedad o condición, el estado de la enfermedad y parámetros del sujeto individual que se está tratando.

Las células pueden introducirse en el sujeto mediante cualquiera de las vías siguientes: parenteral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratraqueal, intraperitoneal o en líquido espinal.

50 Las CMPi pueden administrarse en cualquier medio fisiológicamente aceptable. Pueden proporcionarse solas o con un sustrato o matriz adecuado, p.ej., para proporcionar soporte a su crecimiento y/o organización en el tejido en el que se trasplantan. Habitualmente, se administrarán por lo menos 1×10^5 células, preferentemente 1×10^6 o más. Las células pueden introducirse mediante inyección, catéter o similar. Las células pueden congelarse a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante periodos de tiempo prolongados, siendo posible su utilización tras descongelarlas. Si se congelan, las células habitualmente se almacenan en un medio de DMSO al 10%, FCS al 50%, RPMI 1640 al 40%. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse mediante la utilización de factores de crecimiento y/o células estromales asociadas a la proliferación y diferenciación de células progenitoras.
55

Pueden proporcionarse kits, en donde el kit comprende una dosis eficaz de un DAMP, tal como una composición de

aluminio. En algunas realizaciones, la composición de aluminio es un hidróxido de aluminio. El kit puede comprender además uno o más factores de reprogramación, p.ej., en forma de proteínas fusionadas con un dominio que penetra en las células.

5 “Tratar” o “tratamiento” se refiere en la presente memoria a administración de una sustancia en un sujeto con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, evitar o paliar un trastorno, síntomas del trastorno, un estado de enfermedad secundario al trastorno o una predisposición al trastorno. Una “cantidad eficaz” es una cantidad de la sustancia que es capaz de producir un resultado médicamente deseable, tal como se indica en la presente memoria, en un sujeto tratado. El resultado médicamente deseable puede ser objetivo (es decir, medible mediante algún ensayo marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto proporciona una indicación o siente un efecto).

10 “Enfermedad susceptible de tratamiento con terapia de células madre” tal como se indica en la presente memoria se refiere a cualesquiera procedimientos, condiciones, trastornos, afecciones y/o enfermedades que pueden tratarse mediante la administración de células madre, tales como CMPi. Entre dichas enfermedades se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, trasplante de médula ósea, piel, corazón y córnea, enfermedad del injerto contra el huésped, insuficiencia hepática y renal, lesión pulmonar, artritis reumatoide, tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, lupus y diabetes; prevención del rechazo de aloinjerto, trastornos neurológicos y medicina cardiovascular, así como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA), linfoma de Burkitt, leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), linfoma de no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, granulomatosis linfomatoide, síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndromes de insuficiencia de la médula ósea, trombocitopenia amegacariocítica, neutropenia autoinmunitaria (grave), anemia diseritropoyética congénita, neutropenia cíclica, anemia de Diamond-Blackfan, síndrome de Evan, anemia de Fanconi, enfermedad de Glanzmann, dermatomiositis juvenil, síndrome de Kostmann, aplasia de células rojas, síndrome de Schwachman, anemia aplásica grave, anemia sideroblástica congénita, trombocitopenia con radio ausente (síndrome TAR), disqueratosis congénita, trastornos sanguíneos, anemia de células falciformes (hemoglobina SS), enfermedad HbSC, talasemia falciforme β^0 , α -talasemia mayor (hidropesía fetal), β -talasemia mayor (anemia de Cooley), β -talasemia intermedia, E- β^0 talasemia, E- β^+ talasemia, trastornos metabólicos, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Gaucher (infantil), leucodistrofia metacromática, enfermedad de Krabbe (leucodistrofia de células globoides), enfermedad de Gunther, síndrome de Hermansky-Pudlak, síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo, síndrome de Maroteaux-Lamy, mucopolidosis tipo II, III, alfa-manosidosis, síndrome de Niemann-Pick, tipo A y B, síndrome de Sandhoff, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Batten (lipofuscinosis neuronal ceróide hereditaria), enfermedad de Lesch-Nyhan, inmunodeficiencias, ataxia telangiectasia, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de DiGeorge, deficiencia de IKK gamma, poliendocrinopatía de desregulación inmunológica, mucopolidosis ligada al X, tipo II, mielocatexis, inmunodeficiencia ligada al X, inmunodeficiencia combinada grave, deficiencia de adenosina desaminasa, síndrome de Wiskott-Aldrich, agammaglobulinemia ligada al X, enfermedad linfoproliferativa ligada al X, síndrome de Omenn, displasia reticular, displasia tímica, deficiencia de adhesión de los leucocitos, otra osteopetrosis, histiocitosis de las células de Langerhans, linfocitosis hemofagocítica, enfermedad renal aguda y crónica, enfermedad de Alzheimer, antienvjecimiento, artritis, asma, terapia de células madre cardíacas, infarto cerebral (ictus), parálisis cerebral (ictus), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad cardíaca congestiva, diabetes mellitus (tipo I y II), fibromialgia, deficiencias inmunológicas, enfermedad cardíaca isquémica, lupus, esclerosis múltiple, infarto de miocardio, osteoartritis, osteoporosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad arterial periférica, artritis reumatoide, terapia de células madre en cirugía plástica, lesión cerebral traumática y enfermedades neurológicas.

45 El término “paciente” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sujeto mamífero diagnosticado o con sospecha de presentar o desarrollar una enfermedad susceptible de terapia de células madre, p.ej., enfermedad cardiovascular. Pueden ser pacientes ejemplares, seres humanos, simios, perros, cerdos, vacas, gatos, caballos, cabras, ovejas, roedores y otros mamíferos que pueden beneficiarse de las terapias de células madre.

50 “Administrar” se refiere en la presente memoria a proporcionar las CMPi de la invención en un paciente. A título de ejemplo no limitativo, la administración de composición, p.ej., inyección, puede llevarse a cabo mediante inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.), o inyección intramuscular (i.m.). Puede utilizarse una o más de dichas vías. La administración parenteral puede ser, por ejemplo, mediante inyección de bolo o mediante perfusión gradual durante el tiempo. Alternativamente, o concurrentemente, la administración puede ser por la vía oral. Adicionalmente, la administración también puede ser mediante deposición quirúrgica de un bolo o pellet de células, o la colocación de un dispositivo médico, p.ej., un stent, cargado de células. Preferiblemente, las composiciones de la invención se administran en el sitio de enfermedad, p.ej., en el sitio o en proximidad, p.ej., aproximadamente o por lo menos a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 milímetros) el sitio de una lesión patológica (p.ej., estenosis/bloqueo vascular, tejido necrótico o sitio de infección gangrenosa).

55 “Un paciente que lo necesita” se refiere en la presente memoria a un paciente en el que se ha diagnosticado o que se sospecha que presenta, una enfermedad susceptible de terapia de células madre.

60

Ejemplo

La reprogramación de las células CD34⁺ de sangre del cordón humano o células mononucleares de sangre periférica con plásmidos episómicos e hidróxido de aluminio bajo condiciones libres de células alimentadoras.

5 Este procedimiento genera células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPi) mediante reprogramación de las células CD34⁺ de sangre del cordón humana o PBMC, utilizando plásmidos episómicos, sistema 4D-Nucleofector™ de Lonza, medio de CMP n° 7 de Lonza y una matriz de vitronectina humana.

10 Entre los materiales se incluyen: células CD34⁺ de sangre del cordón humano (Lonza, n° de cat. 2C-101) o células mononucleares de sangre periférica humana (Lonza, n° de cat. CC-2702), medio celular sanguíneo que contiene medio basal libre de suero, IMDM al 50% (Invitrogen, n° de cat. 12440-053), F12 de Ham al 50% (Invitrogen, n° de cat. 11765054), concentración de lípidos definidos químicamente 1x (Invitrogen, n° de cat. 11905-031), insulina-transferrina-selenio-X 1x (ITS-X) (Invitrogen, n° de cat. 51500), ácido ascórbico 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, n° de cat. 49752), solución de fracción V de albúmina bovina 5 mg/ml (Invitrogen, n° de cat. 15260-037), GlutaMax™-I 2 mM (Invitrogen, n° de cat. 35050), así como factores de crecimiento específicos de la sangre del cordón, incluyendo SCF humano recombinante 100 ng/ml (Preprotech, n° de cat. AF-300-07), ligando de Flt3 humano recombinante 100 ng/ml (Preprotech, n° de cat. AF-300-19), TPO humano recombinante 20 ng/ml (Preprotech, n° de cat. 300-18) e IL-3 humana recombinante (Preprotech, n° de cat. 200-03), así como factores de crecimiento específicos de PBMC, tales como 1-tioglicerol 200 µM (Sigma, n° M6145), holo-transferrina 100 µg/ml (R&D Systems, n° 2914-HT), dexametasona 1 µM (Sigma, n° D1756), 100 ng/ml (Preprotech, n° 300-07), EPO 2 U/ml (R&D Systems, n° 287-TC-500), IL-3 10 ng/ml (PreproTech, n° 200-03) y Alro 40 ng/ml IGF-1 (Preprotec, n° 100-11). También se utilizan los plásmidos pEB-C5 y pEB-Tg de grado GMPc; alteARNtivamente, pCE-OCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL, pCE-p53mDD, pCE-EBNA1, Alhydrogel al 2% (Invitrogen, vac-alu-50), medio de células madre pluripotentes (CMP) n° 7 de Lonza, solución de azul tripán al 0,4% (Invitrogen, n° de cat. 15250061), 1xDPBS (Lonza, n° de cat. 17-512F), 1xDPBS⁺⁺ (Lonza, n° de cat. 17-513F) y kit 4D-Nucleofector™ X L de células primarias P3 (Lonza, n° de cat. V4XP-3012).

25 El equipo utilizado incluye un sistema 4D-Nucleofector™ de Lonza (Lonza, n° de cat. AAF-1001B, AAF-1001X), un incubador humidificado a 37°C ± 2°C con 5% de CO₂ ± 2%, 3,8% de O₂, recipiente de residuos biopeligrosos, campana de cultivo de tejidos, hemocitómetro, microscopio, baño de agua a 37°C, centrífuga capaz de 200 x g con rotores para tubos de 15 ml, pipetas serológicas de poliestireno desechables envueltas en papel Costar Stripette de 10 ml (ThermoFisher, n° de cat. 07-200-574), pipetas serológicas de poliestireno desechables envueltas en papel Costar Stripette de 10 ml (ThermoFisher, n° de cat. 07-200-573), llenadores/dispensadores Pipet-Aid portátiles Drummond XP (ThermoFisher, n° de cat. 13-681-15E), tubos de microcentrifuga libres de AARNsa Costar estériles de 1,7 ml Natural (ThermoFisher, n° de cat. 07-200-534), puntas de micropipeta con filtro de 1000 µl estériles (Rainin, n° de cat. RT-1000F), punta de micropipeta con filtro de 200 µl estériles (Rainin, n° de cat. RT-200F), puntas de micropipeta con filtro de 20 µl estériles (Rainin, n° de cat. RT-20F), puntas de micropipeta con filtro de 10 µl estériles (Rainin, n° de cat. RT-10GF), micropipeta Pipet-Lite XLS de 1000 µl (Rainin, n° de cat. SL-STARTXLS), micropipeta Pipet-Lite XLS de 200 µl (Rainin, n° de cat. SL-STARTXLS), micropipeta Pipet-Lite XLS de 20 µl (Rainin, n° de cat. SL-STARTXLS), micropipeta Pipet-Lite XLS con RFID de 0,1 a 2 µl (Rainin, n° de cat. SL-2XLS), placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos Corning (Corning, n° de cat. 3513), placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos (ThermoFisher, n° de cat. 08-772-1B), tubo de centrifuga cónico Falcon de 15 ml (ThermoFisher, n° de cat. 14-959-70C).

40 El día 0, los procedimientos incluían la nucleofección celular de la manera siguiente: recubrir placas de cultivo de tejidos (9,6 cm²/pocillo) con 1 ml de vitronectina a una concentración de 10 µg/ml. Permitir la incubación del recubrimiento durante 1 hora. Asegurarse de que el Alhydrogel está suspendido uniformemente mediante agitación con vórtex. Combinar el Alhydrogel con SFM en una proporción de 3 µl por cada ml de SFM. Para cada muestra de transfección, transferir 2 ml de SFM a 1 pocillo de una placa de 6 pocillos. Introducir la placa en un incubador humidificado a 37°C para precalentar el medio. Recoger las células sanguíneas humanas en un tubo cónico Falcon de 15 ml. Extraer 10 µl de suspensión celular y mezclar bien con 10 µl de azul tripán. Contar las células viables utilizando un hemocitómetro bajo un microscopio. Para cada muestra de transfección, introducir 10⁶ células viables en un nuevo tubo de 15 ml y centrifugar las células a 200 g durante cinco (5) minutos. Eliminar el sobrenadante. Congelar las células rápidamente sobre hielo seco y almacenar a -80°C para análisis futuros de STR. Combinar 82 µl de solución P3 y 18 µl de complemento del kit L Cell 4D-Nucleofector™ X de células primarias P3 en un tubo de microcentrifuga estéril. Añadir los plásmidos pEB-C5: pEB-Tg o pCE-OCT3/4: pCE-hSK: pCE-hUL: pCE-p53mDD: pCE-EBNA1 en las proporciones 8:2 o 0,63:0,63:0,63:0,63:0,5 µg, respectivamente, y mezclar bien. Resuspender las células con solución Nucleofection™ premezclada, preparada previamente. Mezclar bien con micropipeta y transferir a una cubeta Nucleofection™ (proporcionada con el kit). Nucleofectar células utilizando 4D-Nucleofector™ utilizando el programa EO-100. Tras la nucleofección, extraer 0,5 ml de SFM precalentado y añadir a la cubeta utilizando una micropipeta en la campana de cultivo de tejidos. A continuación, utilizar una pipeta de transferencia proporcionada con el kit Nucleofection™ para transferir las células al SFM precalentamiento en 1 pocillo de una placa de 6 pocillos. Introducir la placa en un incubador humidificado.

60 El día 2 el procedimiento fue el siguiente: diluir 40 µl de vitronectina 250 µg/ml en 1 ml de 1 x DPBS⁺⁺ y añadir lo anterior a 1 pocillo de una placa de 6 pocillos. Recubrir la placa en un incubador durante tres (3) horas. Transferir las células CD34⁺ nucleofectadas a un tubo de 15 ml y centrifugar las células a 200 g durante cinco (5) minutos. Eliminar el medio y resuspender las células en 2 ml de medio n° 7 de Lonza. Añadir 0,2 µl de A8301 10 µM (f.c. 1 µM) en la

suspensión celular. Eliminar la vitronectina mediante aspirado del pocillo y sembrar las células en el mismo. Introducir la placa en el incubador.

Los días 2 y 4, el procedimiento implica las etapas siguientes: cada dos días, añadir 1,5 ml de L7 hasta que el volumen del pocillo exceda de 5 ml.

- 5 El día 6, el procedimiento es el siguiente: al exceder el volumen del pocillo 6 ml, aspirar el sobrenadante, dejando un volumen aproximado de 1 ml de medio. Manipular con suavidad el cultivo de manera que no se perturben las células que cubren el fondo del pocillo. Añadir 1,5 ml de medio de CMP nº 7 de Lonza.

Repetir los procedimientos de los días 2, 4 y 6 hasta que aparezcan las colonias, aproximadamente entre los días 14 y 18.

- 10 El día 16, preparar las placas de 24 pocillos recubiertas con vitronectina.

Los días 18 a 20, el procedimiento implica las etapas de recolección de colonias, del modo siguiente: aspirar el recubrimiento de vitronectina de la placa de 12 pocillos. Para vaciar los pocillos, añadir 250 µl de medio L7. Bajo el microscopio de fases, marcar las colonias que se recolectarán basándose en la morfología. Llevar a cabo las etapas siguientes en una colonia cada vez. Bajo el microscopio de disección, desprender las colonias de la superficie del pocillo con una punta de micropipeta. Aspirar la colonia por la punta de micropipeta en aproximadamente 30 µl de volumen. Transferir la colonia a una placa de 24 pocillos. Tras coleccionar las colonias, introducir la placa de 24 pocillos en un incubador humidificado a 37°C, con 5% de CO₂ y 20% de O₂.

- 15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos y cualesquiera crónicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados que los entendidos por el experto ordinario en la materia en el campo de la presente invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica de la presente invención cualesquiera composiciones, métodos, kits y medios para comunicar información similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria, se describen en la presente memoria las composiciones, métodos, kits y medios preferentes para comunicar la información.

Listado de secuencias

- 25 <110> WALSH, PATRICK FELLNER, THOMAS

<120> MÉTODOS DE REPROGRAMACIÓN NUCLEAR DE CÉLULAS

- 30 <130> 0132-0003PR1

<140>

<141>

<160> 15

- 35 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 479

- 40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 751 403 T3

Met Arg Gln Pro Pro Gly Glu Ser Asp Met Ala Val Ser Asp Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ala Gly Arg Glu Lys
 20 25 30

Thr Leu Arg Gln Ala Gly Ala Pro Asn Asn Arg Trp Arg Glu Glu Leu
 35 40 45

Ser His Met Lys Arg Leu Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Pro Tyr Asp
 50 55 60

Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Thr Asp Leu Glu Ser Gly Gly Ala Gly
 65 70 75 80

Ala Ala Cys Gly Gly Ser Asn Leu Ala Pro Leu Pro Arg Arg Glu Thr
 85 90 95

Glu Glu Phe Asn Asp Leu Leu Asp Leu Asp Phe Ile Leu Ser Asn Ser
 100 105 110

Leu Thr His Pro Pro Glu Ser Val Ala Ala Thr Val Ser Ser Ser Ala
 115 120 125

Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Gly Pro Ala Ser Ala
 130 135 140

Pro Ser Thr Cys Ser Phe Thr Tyr Pro Ile Arg Ala Gly Asn Asp Pro
 145 150 155 160

Gly Val Ala Pro Gly Gly Thr Gly Gly Gly Leu Leu Tyr Gly Arg Glu

ES 2 751 403 T3

Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr His Cys Asp Trp Asp Gly
 420 425 430

Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg
 435 440 445

Lys His Thr Gly His Arg Pro Phe Gln Cys Gln Lys Cys Asp Arg Ala
 450 455 460

Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Phe
 465 470 475

<210> 2
 <211> 2949
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 2

agtttcccga ccagagagaa cgaacgtgtc tgcgggcgcg cggggagcag aggcggtggc 60
 gggcggcggc ggcaccggga gccgccgagt gaccctccc cgccctctg gccccacc 120
 ctcccaccg cccgtggccc gcgccatgg ccgcgcgcgc tccacacaac tcaccggagt 180
 ccgcgcttg cgccgccgac cagttcgtag ctccgcgcca cggcagccag tctcacctgg 240
 cggcaccgcc cgcccaccgc cccggccaca gccctgcmc ccacggcagc actcgaggcg 300
 accgcgacag tggtggggga cgctgctgag tggaagagag cgcagcccgg ccaccggacc 360
 tacttactcg ccttgctgat tgtctatfff tgcgtttaca acttttctaa gaacttttgt 420
 atacaaagga actttttaa aaagacgctt ccaagtata tttaatcaa agaagaagga 480
 tctcggccaa tttggggttt tgggttttgg ctfcgtttct tctcttcgtt gactttgggg 540
 ttcaggtgcc ccagctgctt cgggctgccc aggaccttct gggccccac attaatgagg 600
 cagccacctg gcgagtctga catggctgtc agcgcgcgc tgetcccatc tttctccacg 660
 ttcgcgtctg gcccgggggg aagggagaag aactgcgtc aagcaggtgc cccgaataac 720
 cgctggcggg aggagctctc ccacatgaag cgacttccc cagtgttcc cggccgcccc 780
 tatgacctgg cggcggcgac cgtggccaca gacctggaga gcggcggagc cgggtgcggct 840
 tgcggcggta gcaacctggc gccctacct cggagagaga ccgaggagt caacgatctc 900
 ctggacctgg actttattct ctccaattcg ctgacctatc ctccggagt agtggccgcc 960
 accgtgtcct cgtcagcgtc agcctcctct tcgtcgtcgc cgtcagcag cggccctgcc 1020
 agcgcgcct ccacctgcag cttcacctat ccgatccggg ccgggaacga cccgggcgtg 1080
 gcgccggggc gcacggggcg aggcctctc tatggcaggg agtccgctcc ccctccgacg 1140
 gctccctca acctggcgga catcaacgac gtgagcccct cgggcggctt cgtggccgag 1200
 ctctgcggc cagaattgga cccggtgtac attccgccgc agcagccgca gccgccaggt 1260

5

10

ES 2 751 403 T3

ggcgggctga tgggcaagtt cgtgctgaag gcgtcgctga gcgcccctgg cagcgagtac 1320
 ggcagcccgt cggtcacacag cgtcagcaaa ggcagcccctg acggcagcca cccggtggtg 1380
 gtggcgcctt acaacggcgg gccgcccgcg acgtgcccga agatcaagca ggaggcggtc 1440
 tcttcgtgca cccacttggg cgctggaccc cctctcagca atggccaccg gccggctgca 1500
 cacgacttcc ccctggggcg gcagctcccc agcaggacta ccccgaccct gggctctgag 1560
 gaagtgtgta gcagcagga ctgtcaccct gccctgcccg ttccctcccg cttccatccc 1620
 caccggggc ccaattacc atccttcctg cccgatcaga tgcagccgca agtcccgcg 1680
 ctccattacc aagagctcat gccaccgggt tcctgcatgc cagaggagcc caagccaaaag 1740
 aggggaagac gatcgtggcc ccggaaaagg accgccacc cacttgtga ttacgcggg 1800
 tgcggcaaaa cctacacaaa gagttcccat ctcaaggcac acctgcgaac ccacacaggt 1860
 gagaaacctt accactgtga ctgggacggc tgtggatgga aattcgcccg ctcatgaa 1920
 ctgaccaggc actaccgtaa acacacgggg caccgcccgt tccagtgcc aaaaatgcgac 1980
 cgagcatttt ccaggtcggg ccacctcgcc ttacacatga agaggcattt ttaaatacca 2040
 gacagtggat atgaccaca ctgccagaag agaattcagt atttttact tttcacactg 2100
 tcttcccgat gaggaagga gccagccag aaagcactac aatcatggtc aagttcccaa 2160
 ctgagtcac tctgtgagtg ataatacagga aaaaatgagga atccaaaaga caaaaatcaa 2220
 agaacagatg ggtctgtgta ctggatcttc tatcattcca attctaaatc cgacttgaat 2280
 attcctggac ttacaaaatg ccaagggggg gactggaagt tgtggatata agggatataa 2340
 ttatatccgt gagttggggg agggaagacc agaattccct tgaattgtgt attgatgcaa 2400
 tataagcata aaagatcacc ttgtattctc tttacccttc aaaagccatt attatgatgt 2460
 tagaagaaga ggaagaaatt caggtacaga aaacatggtt aaatagccta aatgatggtg 2520
 cttggtgagt cttggttcta aaggtaacca acaaggaagc caaagttttc aaactgctgc 2580
 atactttgac aaggaaaatc tatatttgtc ttccgatcaa catttatgac ctaagtcagg 2640
 taatatacct ggtttacttc tttagcattt ttatgcagac agtctgttat gcactgtggt 2700
 ttcagatgtg caataatttg tacaatggtt tattcccaag tatgccttaa gcagaacaaa 2760
 tgtgtttttc tatatagttc cttgccttaa taaatatgta atataaattt aagcaaacgt 2820
 ctattttgta tttttgtaa ctacaaagta aatgaacat tttgtggagt ttgtattttg 2880
 cataactcaag gtgagaatta agttttaaat aaacctataa tattttatct gaaaaaaaaa 2940
 aaaaaaaaaa 2949

<210> 3
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

5

ES 2 751 403 T3

Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met
 1 5 10 15

Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp
 20 25 30

Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln
 35 40 45

Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile
 50 55 60

Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg
 65 70 75 80

Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser
 85 90 95

Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp
 100 105 110

Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln
 115 120 125

Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile
 130 135 140

Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val
 145 150 155 160

Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser
 165 170 175

Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr
 180 185 190

Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val
 195 200 205

Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala
 210 215 220

Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser
 225 230 235 240

ES 2 751 403 T3

-

Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His
 245 250 255

Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu
 260 265 270

Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro
 275 280 285

Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys
 290 295 300

Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His
 305 310 315 320

Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 325 330 335

Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
 340 345 350

Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
 355 360 365

Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
 370 375 380

Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
 405 410 415

Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 420 425 430

Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
 435 440 445

Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 450

<210> 4
 <211> 2379
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4

gacccccgag ctgtgctgct cgcggccgcc accgccgggc cccggccgtc cctggctccc

60

5

10

ES 2 751 403 T3

ctcctgcctc gagaaggcca gggcttctca gaggcttggc gggaaaaaga acggagggag 120
ggatcgcgct gagtataaaa gccggttttc ggggctttat ctaactcgct gtagtaattc 180
cagcgagagg cagagggagc gagcgggcgg ccggctaggg tggaagagcc gggcgagcag 240
agctcgcgct cgggcgtcct gggaagggag atccggagcg aatagggggc ttcgcctctg 300
gccagccct cccgctgac cccagccag cggccgcaa cccttgccgc atccacgaaa 360
ctttgccat agcagcgggc gggcactttg cactggaact tacaacaccc gagcaaggac 420
gcgactctcc cgacgcgggg aggctattct gccatttgg ggacacttcc ccgcccgtgc 480
caggaccocg ttctctgaaa ggctctcctt gcagctgctt agacgctgga tttttttcgg 540
gtagtgga aaaccagcagcc tcccgcgacg atgccctca acgttagctt caccaacagg 600
aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac 660
ttctaccagc agcagcagca gagcagctg cagccccgg cgcccagcga ggatatctgg 720
aagaaattcg agctgctgcc caccocgcc ctgtccccta gcccccgtc cgggctctgc 780
tcgccctcct acgttgcggt cacacccttc tcccttcggg gagacaacga cggcggtggc 840
gggagcttct ccacggccga ccagctggag atggtgaccg agctgctggg aggagacatg 900
gtgaaccaga gtttcatctg cgaccocggac gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc 960
caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc 1020
tcctaccagc ctgcgcgcaa agacagcggc agcccgaacc cggcccggcg ccacagcgtc 1080
tgctccacct ccagcttgta cctgcaggat ctgagcgcgg ccgcctcaga gtgcatcgac 1140
ccctcggtag tcttccccta ccctctcaac gacagcagct cggccaagtc ctgcgcctcg 1200
caagactcca gcgccttctc tccgtcctcg gattctctgc tctcctcgac ggagtcctcc 1260
ccgcaggcca gcccagacc cctggtgctc catgaggaga caccgcccac caccagcagc 1320
gactctgagg aggaacaaga agatgaggaa gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg 1380
caggctcctg gcaaaaggtc agagtctgga tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct 1440
cctcacagcc cactggcct caagaggtgc cacgtctcca cacatcagca caactacgca 1500
gcgcctccct cactcggaa ggactatcct gctgccaaga ggtcaagtt ggacagtgtc 1560
agagtctga gacagatcag caacaaccga aatgcacca gcccaggtc ctcggacacc 1620
gaggagaatg tcaagaggcg aacacacaac gtcttgagc gccagaggag gaacgagcta 1680
aaacggagct tttttgccct gcgtgaccag atcccggagt tggaaaacaa tgaaaaggcc 1740
cccaaggtag ttatccttaa aaaagccaca gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag 1800
caaaagctca tttctgaaga ggacttgttg cggaaacgac gagaacagtt gaaacacaaa 1860
cttgaacagc tacggaactc ttgtgcgtaa ggaaaagtaa ggaaaacgat tccttctaac 1920

ES 2 751 403 T3

agaaatgtcc tgagcaatca cctatgaact tgtttcaaat gcatgatcaa atgcaacctc 1980
 acaaccttgg ctgagtcttg agactgaaag atttagccat aatgtaaact gcctcaaatt 2040
 ggactttggg cataaaagaa cttttttatg cttaccatct tttttttttc ttttaacagat 2100
 ttgtatttaa gaattgtttt taaaaaattt taagatttac acaatgtttc tctgtaaata 2160
 ttgccattaa atgtaaataa ctttaataaa acgtttatag cagttacaca gaatttcaat 2220
 cctagtatat agtacctagt attatagta ctataaaccc taattttttt tatttaagta 2280
 cattttgctt tttaaagttg atttttttct attgttttta gaaaaataa aataactggc 2340
 aaatatatca ttgagccaaa tcttaaaaaa aaaaaaaaa 2379

<210> 5
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5

Met Ser Val Asp Pro Ala Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Cys Lys Glu Ser Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu
 20 25 30
 Glu Asn Tyr Pro Ser Leu Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr
 35 40 45
 Glu Thr Val Ser Pro Leu Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp
 50 55 60
 Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala
 65 70 75 80
 Glu Lys Ser Val Ala Lys Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Phe Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp
 100 105 110
 Arg Phe Gln Arg Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu
 115 120 125
 Ser Asn Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln
 130 135 140
 Asn Gln Arg Met Lys Ser Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys
 145 150 155 160

10

ES 2 751 403 T3

Asn Ser Asn Gly Val Thr Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser
 165 170 175

Leu Tyr Ser Ser Tyr His Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn
 180 185 190

Leu Pro Met Trp Ser Asn Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn
 195 200 205

Gln Thr Gln Asn Ile Gln Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln
 210 215 220

Thr Trp Cys Thr Gln Ser Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe
 225 230 235 240

Tyr Asn Cys Gly Glu Glu Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro
 245 250 255

Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu
 260 265 270

Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln
 275 280 285

Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp
 290 295 300

Val
 305

<210> 6
 <211> 2098
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6

attataaatc tagagactcc aggattttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60

gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggaggtcc 120

tatttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtccac 180

ctcttaaatt ttttctcct cttcctctat actaacatga gtgtggatcc agcttgtccc 240

caaagcttgc cttgctttga agcatccgac tgtaaagaat cttcacctat gcctgtgatt 300

tgtgggcctg aagaaaacta toccatcctg caaatgtctt ctgctgagat gcctcacacg 360

gagactgtct ctctcttcc ttcctccatg gatctgctta ttcaggacag ccctgattct 420

tccaccagtc ccaaaggcaa acaaccact tctgcagaga agagtgtcgc aaaaaaggaa 480

gacaaggctc cgtcaagaa acagaagacc agaactgtgt tctcttccac ccagctgtgt 540

ES 2 751 403 T3

gtactcaatg atagatttca gagacagaaa tacctcagcc tccagcagat gcaagaactc 600
tccaacatcc tgaacctcag ctacaaacag gtgaagacct ggttccagaa ccagagaatg 660
aatctaaga ggtggcagaa aaacaactgg ccgaagaata gcaatggtgt gacgcagaag 720
gcctcagcac ctacctacc cagcctttac tcttctacc accagggatg cctggtgaac 780
ccgactggga accttccaat gtggagcaac cagacctgga acaattcaac ctggagcaac 840
cagaccaga acatccagtc ctggagcaac cactcctgga aactcagac ctggtgcacc 900
caatcctgga acaatcaggc ctggaacagt cccttctata actgtggaga ggaatctctg 960
cagtcctgca tgcagttcca gccaaattct cctgccagtg acttgaggc tgccttgaa 1020
gctgctggg aagccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtattttag tactccaca 1080
accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga 1140
gtgaaactga tattactcaa tttcagctg gacactggct gaatccttcc tctcccctcc 1200
tcccatccct cataggattt ttcttgttg gaaaccacgt gttctggttt ccatgatgcc 1260
catccagtca atctcatgga gggaggagta tggttggagc ctaatcagcg aggtttcttt 1320
ttttttttt ttctattgg atcttctgg agaaaatact ttttttttt tttttttga 1380
aacggagtct tgctctgtcg cccaggctgg agtgacgtgg cgcggctctg gctcactgca 1440
agctccgtct cccgggttca cgcattctc ctgcctcagc ctcccagca gctgggacta 1500
caggcggccg ccacctcgcc cggctaatat tttgtattt tagtagagac ggggtttcac 1560
tgtgttagcc aggatggtct cgatctctg accttgtgat ccaccgcct cggcctccct 1620
aacagctggg atttacaggc gtgagccacc gcgccctgcc tagaaaagac attttaataa 1680
ccttggtgct cgtctctggc tatagataag tagatctaact actagtttg atacttttag 1740
ggtttagaat ctaacctcaa gaataagaaa tacaagtaca aattggtgat gaagatgtat 1800
tcgtattggt tgggattggg aggctttgct tattttttaa aaactattga ggtaaagggt 1860
taagctgtaa catacttaat tgatttctta ccgtttttg ctctgtttg ctatatcccc 1920
taatttggtg gttgtgctaa tctttgtaga aagaggctc gtatttgctg catcgtaatg 1980
acatgagtac tgctttagtt ggtttaagtt caaatgaatg aaacaactat ttttcttta 2040
gttgatttta ccctgatttc accgagtgtt tcaatgagta aatatacagc ttaaacad 2098

<210> 7
<211> 209
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

10 Met Gly Ser Val Ser Asn Gln Gln Phe Ala Gly Gly Cys Ala Lys Ala
1 5 10 15

ES 2 751 403 T3

Ala Glu Glu Ala Pro Glu Glu Ala Pro Glu Asp Ala Ala Arg Ala Ala
 20 25 30

Asp Glu Pro Gln Leu Leu His Gly Ala Gly Ile Cys Lys Trp Phe Asn
 35 40 45

Val Arg Met Gly Phe Gly Phe Leu Ser Met Thr Ala Arg Ala Gly Val
 50 55 60

Ala Leu Asp Pro Pro Val Asp Val Phe Val His Gln Ser Lys Leu His
 65 70 75 80

Met Glu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu Gly Glu Ala Val Glu Phe Thr
 85 90 95

Phe Lys Lys Ser Ala Lys Gly Leu Glu Ser Ile Arg Val Thr Gly Pro
 100 105 110

Gly Gly Val Phe Cys Ile Gly Ser Glu Arg Arg Pro Lys Gly Lys Ser
 115 120 125

Met Gln Lys Arg Arg Ser Lys Gly Asp Arg Cys Tyr Asn Cys Gly Gly
 130 135 140

Leu Asp His His Ala Lys Glu Cys Lys Leu Pro Pro Gln Pro Lys Lys
 145 150 155 160

Cys His Phe Cys Gln Ser Ile Ser His Met Val Ala Ser Cys Pro Leu
 165 170 175

Lys Ala Gln Gln Gly Pro Ser Ala Gln Gly Lys Pro Thr Tyr Phe Arg
 180 185 190

Glu Glu Glu Glu Glu Ile His Ser Pro Thr Leu Leu Pro Glu Ala Gln
 195 200 205

Asn

<210> 8

<211> 4014

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

gtgcggggga agatgtagca gcttcttctc cgaaccaacc ctttgccttc ggacttctcc 60

10 ggggccagca gccgcccgc caggggcccg gggccacggg ctcagccgac gaccatgggc 120

ES 2 751 403 T3

tccgtgtcca accagcagtt tgcaggtggc tgcgccaaagg cggcagaaga ggcgcccagag 180
 gaggcgcccg aggacgcggc cggggcggcg gacgagcctc agctgctgca cggtgccggc 240
 atctgtaagt ggttcaacgt gcgcattggg ttcggcttcc tgtccatgac cgcgccgccc 300
 ggggtcgcgc tcgaccccc agtggatgtc tttgtgcacc agagtaagct gcacatggaa 360
 gggttccgga gcttgaagga ggggtaggca gtggagtcca cctttaagaa gtcagccaag 420
 ggtctggaat ccatccgtgt caccggacct ggtggagtat tctgtattgg gagtgagagg 480
 cggccaaaag gaaagagcat gcagaagcgc agatcaaaaag gagacaggtg ctacaactgt 540
 ggaggtctag atcatcatgc caaggaatgc aagctgccac cccagcccaa gaagtgccac 600
 ttctgccaga gcatcagcca tatggtagcc tcatgtccgc tgaaggccca gcagggccct 660
 agtgcacagc gaaagccaac ctactttcga gaggaagaag aagaaatcca cagccctacc 720
 ctgctcccgg aggcacagaa ttgagccaca atgggtgggg gctattcttt tgetatcagg 780
 aagttttgag gagcaggcag agtggagaaa gtgggaatag ggtgcattgg ggctagttgg 840
 cactgccatg tatctcaggc ttgggttcac accatcacc tttcttcct ctaggtgggg 900
 ggaaaggggtg agtcaaagga actccaacca tgctctgtcc aaatgcaagt gagggttctg 960
 ggggcaacca ggagggggga atcacctac aacctgcata ctttgagtct ccatcccag 1020
 aattccagc ttttgaaagt ggcctggata ggaagtgt tttccttta aagaaggata 1080
 tataataatt cccatgccag agtgaatga ttaagtataa gaccagattc atggagccaa 1140
 gccactacat tctgtggaag gagatctctc aggagtaagc attgttttt tttcacatct 1200
 tgtatcctca taccacttt tgggataggg tgctggcagc tgtccaagc aatgggtaat 1260
 gatgatggca aaaaggggtg ttgggggaac agctgcagac ctgctgctct atgctcacc 1320
 ccgcccatt ctgggccaat gtgattttat ttatttctc ccttgatac tgcacctgg 1380
 gtcccacttt ctccaggatg ccaactgcac tagctgtgtg cgaatgacgt atcttgtgca 1440
 ttttaacttt ttttcttaa tataaatatt ctggttttgt atttttgtat attttaatct 1500
 aaggccctca tttcctgcac tgtgttctca ggtacatgag caatctcagg gatagccagc 1560
 agcagctcca ggtctcgcga gcaggaatta cttttgttg tttttgccac cgtggagagc 1620
 aactatttg agtgcacagc ctattgaact acctatttt tgccaataag agctggcttt 1680
 tctgccatag tgtcctctt aaaccccc tgccttgaag atgttttatg ggagactagg 1740
 ttttaactgg gtggcccat gacttgattg ccttctactg gaagattggg aattagtcta 1800
 aacaggaaat ggtgttacac agaggctagg agaggctggg cccgggtgaa aggccagaga 1860
 gcaagccaag attaggtgag ggtgtctaa tcctatggca caggacgtgc ttacatctc 1920
 cagatctgtt cttcaccaga ttaggttagg cctaccatgt gccacaggg gtgtgtgtgt 1980
 ttgtaaaact agagttgcta aggataagtt taaagaccaa taccctgta cttaatcctg 2040

ES 2 751 403 T3

tgctgtcgag ggatggatat atgaagtaag gtgagatcct taacctttca aaatthttcg 2100
 gttccagga gacacacaag cgagggtttt gtgggtgcctg gagcctgtgt cctgccctgc 2160
 tacagtagtg attaatagtg tcatggtagc taaaggagaa aaagggggtt tcgthttacac 2220
 gctgtgagat caccgcaaac ctaccttact gtgttgaaac gggacaaatg caatagaacg 2280
 cattgggtgg tgtgtgtctg atcctgggtt cttgtctccc ctaaattgctg ccccccaagt 2340
 tactgtatth gtctgggctt tggtagactt cactacgttg attgctaggt ggcctagtht 2400
 gtgtaaatat aatgtattgg tctttctccg tgttctttgg ggtthttgtt tacaacttc 2460
 thtttgtatt gagagaaaa tagcctaaagc atctttgaca gaaggttctg caccaggcaa 2520
 aaagatctga aacattagtt tggggggccc tcttcttaa gtggggatct tgaacctacc 2580
 thttctttgt attcccctc ccctattacc tattagacca gatcttctgt cctaaaaact 2640
 tgtcttctac cctgccctct thttctgttca cccccaaaag aaaacttaca caccacaca 2700
 catacacatt tcatgcttgg agtgtctcca caactcttaa atgatgtatg caaaaatact 2760
 gaagctagga aaaccctcca tcccttgttc ccaacctcct aagtcaagac cattaccatt 2820
 tctttctttc thttthtttt thttthtaaa tggagtctca ctgtgtcacc caggctggag 2880
 tgcagtggca tgatcggctc actgcagcct ctgcctcttg ggttcaagtg attctcctgc 2940
 ctcagcctcc tgagtagctg ggatttcagg caccgccac actcagctaa thtttgtatt 3000
 thtagtagag acggggthtc accatgttgt ccaggctggt ctggaactcc tgacctcagg 3060
 tgatctgccc accttggctt cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc acctgctgg 3120
 gccaacatt tcttgggtga ttcatgcaa aactttaa gaactgtgta gccaggcgc 3180
 ggtggtcac acctgtaatc ccagcacttt ggaaggctga ggcggggcga tcacaaggtc 3240
 acgagttcaa aactatctg gccaacacag tgaacccccg tctctactaa aatacaaaaa 3300
 aattagccgg gtgtgggtgt gcatgcctth agtcctagct attcaggagg ctgaggcagg 3360
 ggaatcgctt gaaccgaga ggcagaggth gcagtgagct gagatcgac cactgcactc 3420
 cagcctggtt acagagcaag actctgtctc aaacaaaaa aaacaaaaa aaaacacact 3480
 actgtattht ggatggatca aacctcctta atthtaatth ctaactctaa agtaaagaga 3540
 tgcaattggg ggccttccat gtagaaagtg gggctcaggag gccagaaag ggaatatgaa 3600
 tgtatatcca agtcactcag gaactthtat gcagggtgta gaaactthtat gtcaaagtgg 3660
 ccacaagatt gthtaatag agacgaacga atgtaactcc atgthtactg ctaaaaacca 3720
 aagctthtg taaaatctg aatthtggg gcgggagggt aggaaagcct gtacctgtct 3780
 gththththt tgatccttht cctcattcc tgaactgcag gagactgagc cctthtggc 3840
 thtggtgacc ccatcactgg ggtgtgtht thtgatggtt gatthtgctg tactgggtac 3900
 thcctthtcc atthtctaath cattththta cacaaagtga ctcttccctt ccttctcct 3960
 thcctggga aatacaatg aataaataa gacttattgg tacgcaact gtca 4014

5 <210> 9
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

ES 2 751 403 T3

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
 20 25 30

Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
 35 40 45

Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
 50 55 60

Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
 65 70 75 80

Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
 85 90 95

Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
 100 105 110

Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
 115 120 125

Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
 130 135 140

Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
 165 170 175

Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
 180 185 190

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
 195 200 205

ES 2 751 403 T3

Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu
 210 215 220

Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
 225 230 235 240

Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
 245 250 255

Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
 260 265 270

Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
 275 280 285

Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
 290 295 300

Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
 305 310 315 320

Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
 325 330 335

Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
 340 345 350

Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
 355 360

<210> 10
 <211> 1411
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10

5 ccttcgcaag ccctcatttc accaggcccc cggcttgggg cgccttcctt ccccatggcg 60

ggacacctgg cttcggattt cgccttctcg cccctccag gtggtggagg tgatgggcca 120

ggggggccgg agccgggctg ggttgatcct cggacctggc taagcttcca aggccctcct 180

ggagggccag gaatcgggcc gggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattccccca 240

tgcccccg cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgtact gtgggccccca ggttgagtg 300

gggctagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtcggg 360

gtggagagca actccgatgg ggcctccccg gagccctgca ccgtcaccctc tggtgccgtg 420

aagctggaga aggagaagct ggagcaaac ccggaggagt cccaggacat caaagctctg 480

10 cagaaagaac tcgagcaatt tgccaagctc ctgaagcaga agaggatcac cctgggatat 540

ES 2 751 403 T3

acacaggccg atgtggggct caccctgggg gttctatttg ggaaggattt cagccaaacg 600
 accatctgcc gctttgaggc tctgcagctt agcttcaaga acatgtgtaa gctgcggccc 660
 ttgctgcaga agtgggtgga ggaagctgac aacaatgaaa atcttcagga gatatgcaaa 720
 gcagaaaccc tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga 780
 ggcaacctgg agaatttggt cctgcagtgc ccgaaaccca cactgcagca gatcagccac 840
 atgccccagc agcttgggct cgagaaggat gtggtccgag tgtggttctg taaccggcgc 900
 cagaagggca agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggattttga ggctgctggg 960
 tctcctttct cagggggacc agtgtccttt cctctggccc cagggcccca ttttgggtacc 1020
 ccaggctatg ggagccctca ctctactgca ctgtactcct cggtcctttt ccctgagggg 1080
 gaagcctttc cccctgtctc cgtcaccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt 1140
 gcctgcctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg 1200
 agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt ctctattcac taaggaagga attgggaaca 1260
 caaagggtag gggcagggga gtttggggca actggttggg ggaaggtga agttcaatga 1320
 tgctcttgat ttaaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga 1380
 cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a 1411

<210> 11
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
 1 5 10 15
 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 20 25 30
 Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
 35 40 45
 Met Val Trp Ser Arg Gly Glu Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
 50 55 60
 Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
 65 70 75 80
 Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
 85 90 95
 Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro

10

ES 2 751 403 T3

100 105 110

Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125

Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
 130 135 140

Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
 145 150 155 160

Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
 165 170 175

Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
 180 185 190

Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn
 195 200 205

Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
 210 215 220

Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
 225 230 235 240

Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr
 245 250 255

Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
 260 265 270

Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
 275 280 285

Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
 290 295 300

Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
 305 310 315

<210> 12
 <211> 2520
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12

10 ggatggttgt ctattaactt gttcaaaaa gtatcaggag ttgtcaaggc agagaagaga 60

ES 2 751 403 T3

gtgtttgcaa aagggggaaa gtagtttgct gcctctttaa gactaggact gagagaaaga 120
 agaggagaga gaaagaaagg gagagaagtt tgagccccag gcttaagcct ttccaaaaaa 180
 taataataac aatcatcggc ggccggcagga tcggccagag gaggagggaa gcgctttttt 240
 tgatcctgat tccagtttgc ctctctcttt ttttcccca aattattctt cgctgattt 300
 tcctcgggga gccctcgcct cccgacacc ccgcccgcct cccctcctcc tctcccccg 360
 cccgcgggcc ccccaaagtc ccggccgggc cgagggtcgg cggccgccgg cgggcccggc 420
 ccgcgcacag cgcccgcctg tacaacatga tggagacgga getgaagccg ccgggcccgc 480
 agcaaaactc gggggcgggc ggccggcaact ccaccgcggc ggccggccggc ggcaaccaga 540
 aaaacagccc ggaccgcgtc aagcggccca tgaatgcctt catgggtgtgg tcccgcgggc 600
 agcggcgcaa gatgcccag gagaacccca agatgcacaa ctccggagatc agcaagcgc 660
 tgggcgcca gtggaactt ttgtcggaga cggagaagcg gccgttcac gacgaggcta 720
 agcggctgcg agcgtgcac atgaaggagc acccggatta taaataccgg ccccgcgga 780
 aaaccaagac gctcatgaag aaggataagt acacgctgcc cggcgggctg ctggccccg 840
 gcggcaatag catggcgagc ggggtcgggg tgggcgccgg cctgggcgcg ggcgtgaacc 900
 agcgcagga cagttacgcg cacatgaacg gctggagcaa cggcagctac agcatgatgc 960
 aggaccagct gggctaccg cagcaccgg gcctcaatgc gcacggcgca gcgcagatgc 1020
 agcccatgca ccgctacgac gtgagcggcc tgcagtacaa ctccatgacc agctcgaga 1080
 cctacatgaa cggctcggcc acctacagca tgtcctactc gcagcagggc acccctggca 1140
 tggctcttgg ctccatgggt tcgggtggtca agtccgaggc cagctccagc cccctgtgg 1200
 ttacctcttc ctcccactcc agggcgccct gccaggccgg ggacctccgg gacatgatca 1260
 gcatgtatct ccccgcgcc gaggtgccgg aaccgcggc cccagcaga cttcacatgt 1320
 cccagcacta ccagagcggc ccggtgccc gcacggccat taacggcaca ctgcccctct 1380
 cacacatgtg agggccggac agcgaactgg aggggggaga aattttcaa gaaaaacgag 1440
 ggaaatggga ggggtgcaaa agaggagagt aagaaacagc atggagaaaa cccggtacgc 1500
 tcaaaaagaa aaagaaaaa aaaaaatccc atcaccaca gcaaatgaca gctgcaaaa 1560
 agaacaccaa tcccatccac actcacgcaa aaaccgcgat gccgacaaga aaactttat 1620
 gagagagatc ctggaattct ttttgggga ctatttttgt acagagaaaa cctggggagg 1680
 gtggggaggg cgggggaatg gacctgtat agatctggag gaaagaaagc tacgaaaaac 1740
 tttttaaag ttctagtgg acggtaggag ctttgagga agtttgcaa agtctttacc 1800
 aataatatt agagctagtc tccaagcgac gaaaaaatg ttttaattt tgcaagcaac 1860
 tttgtacag tatttatcga gataaacatg gcaatcaaaa tgtccattgt ttataagctg 1920
 agaatttgcc aatatttttc aaggagaggc ttcttctga attttgatc tgcagctgaa 1980

ES 2 751 403 T3

atttaggaca gttgcaaacg tgaaaagaag aaaattattc aaatttgac attttaattg 2040
 tttaaaaaatt gtacaaaag gaaaaattag aataagtact ggcgaacat ctctgtggtc 2100
 ttgtttaaaa agggcaaaag ttttagactg tactaaattt tataacttac tgttaaaagc 2160
 aaaaatggcc atgcagggtg acaccggttg taatttataa tagcttttgt tcgatcccaa 2220
 ctttccattt tgttcagata aaaaaacca tgaaattact gtgtttgaaa tattttctta 2280
 tggtttgtaa tatttctgta aatttattgt gatattttaa ggttttcccc cctttatfff 2340
 ccgtagttgt attttaaag attcggctct gtattatttg aatcagtctg ccgagaatcc 2400
 atgtatatat ttgaactaat atcatcctta taacagggtac attttcaact taagttttta 2460
 ctccattatg cacagtttga gataaataaa tttttgaaat atggacactg aaaaaaaaaa 2520

<210> 13

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 13

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 14

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 15

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

30 <400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

35

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para potenciar la reprogramación nuclear de una célula somática de mamífero, comprendiendo el método: poner en contacto una población de células somáticas de mamífero con
- 5 (a) una dosis eficaz de una composición de aluminio, en donde la composición de aluminio se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio, y
- (b) un cóctel de factores de reprogramación, durante un periodo de tiempo suficiente para reprogramar las células somáticas de mamífero en un tipo celular de interés deseado, en donde el tipo celular de interés deseado es una célula madre pluripotente inducida (CMPi).
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la composición de aluminio y los factores de reprogramación se proporcionan secuencial o simultáneamente.
3. El método según la reivindicación 1, en donde la composición de aluminio es hidróxido de aluminio.
4. El método según la reivindicación 3, en donde la dosis eficaz de hidróxido de aluminio es aproximadamente o por lo menos 40-80 microgramos/ml.
5. El método según la reivindicación 1, en donde la composición de aluminio es fosfato de aluminio.
- 15 6. El método según la reivindicación 1, en donde las células somáticas de mamífero son células humanas.
7. El método según la reivindicación 1, en donde el cóctel de factores de reprogramación comprende la utilización de ácidos nucleicos codificantes de (i) Oct4, Sox2, Lin28 y Nanog, o sus péptidos correspondientes que penetran en las células, y las células se reprograman a pluripotencialidad, o (ii) Oct4, Sox2, c-Myc y KLF4, o sus péptidos correspondientes que penetran en las células, y las células se reprograman a pluripotencialidad.
- 20 8. El método según la reivindicación 1, en donde la célula somática de mamífero es una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula mononuclear de sangre de cordón umbilical, o un fibroblasto.
9. El método según la reivindicación 1, en donde los factores de reprogramación se proporcionan como (i) proteínas que penetran en las células, o (ii) ácidos nucleicos codificantes de las proteínas.

25

Figura 1

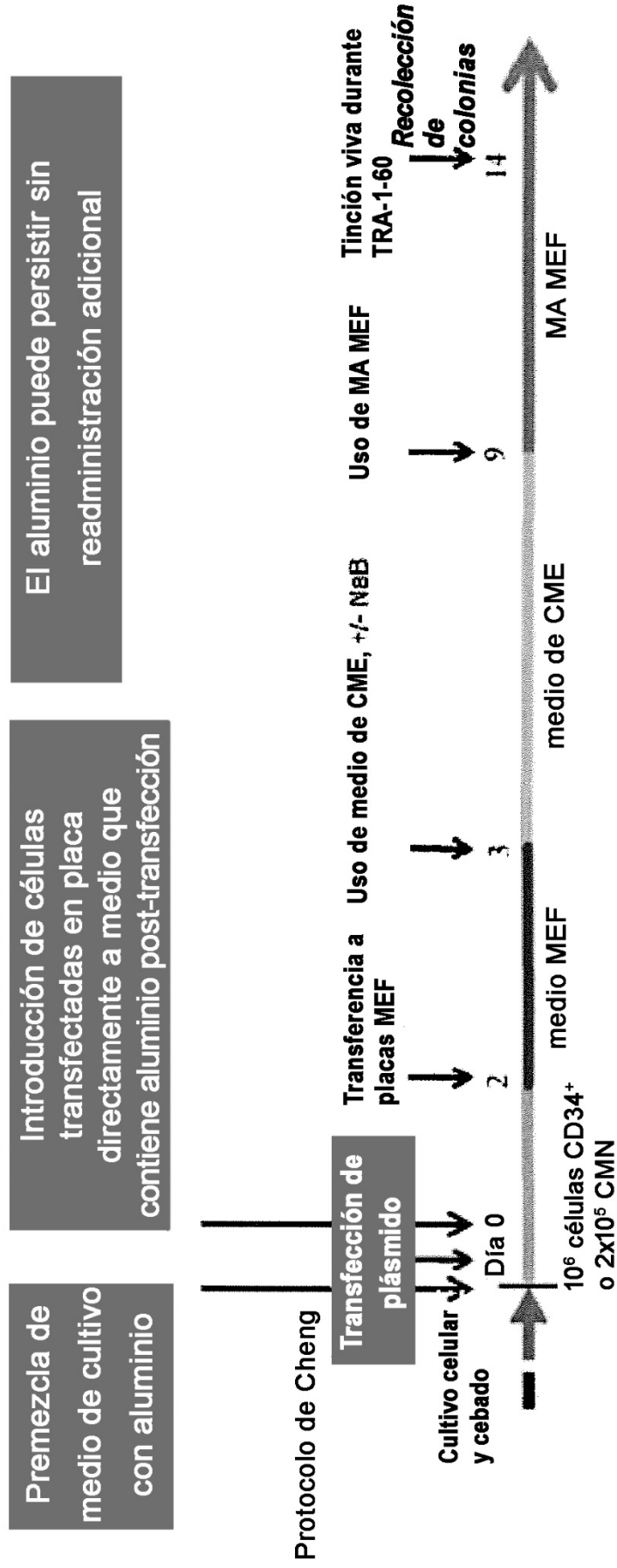


Figura 2

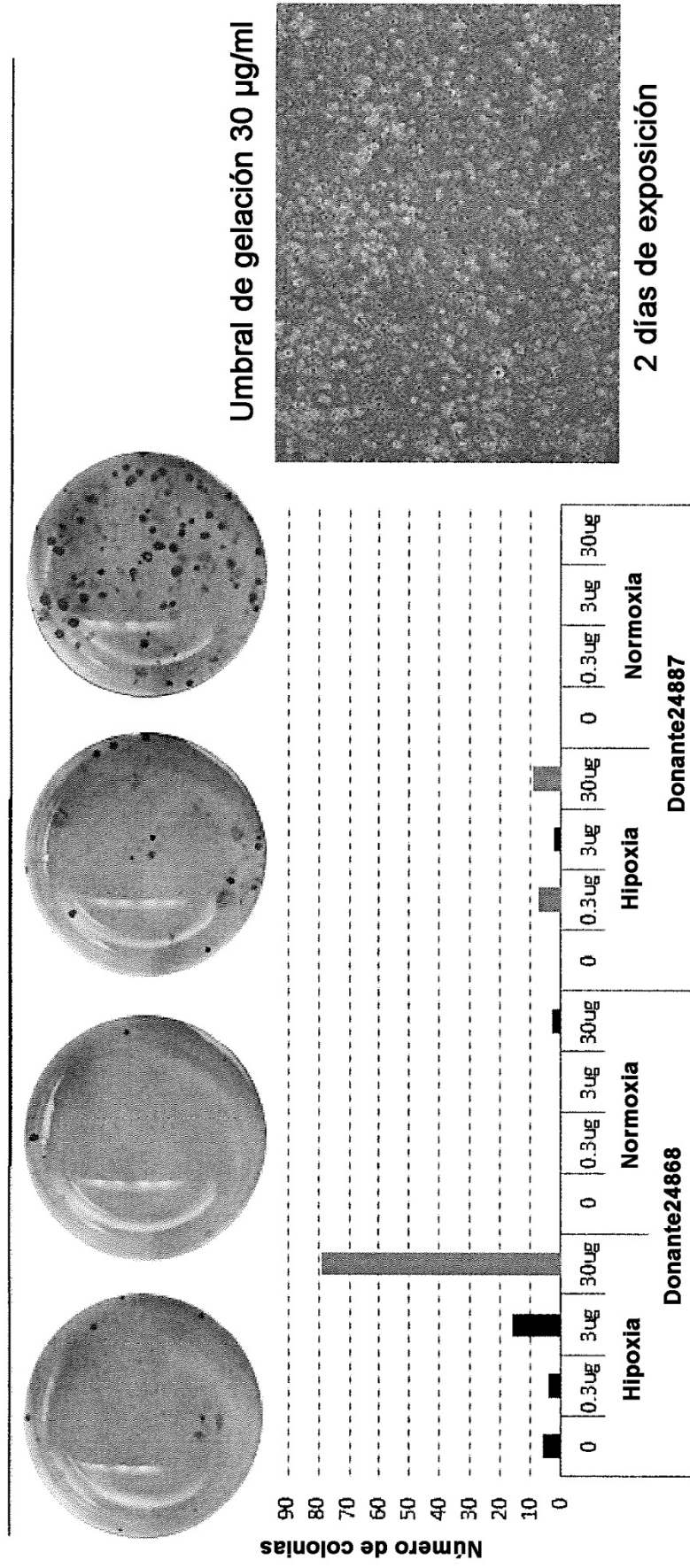


Figura 3

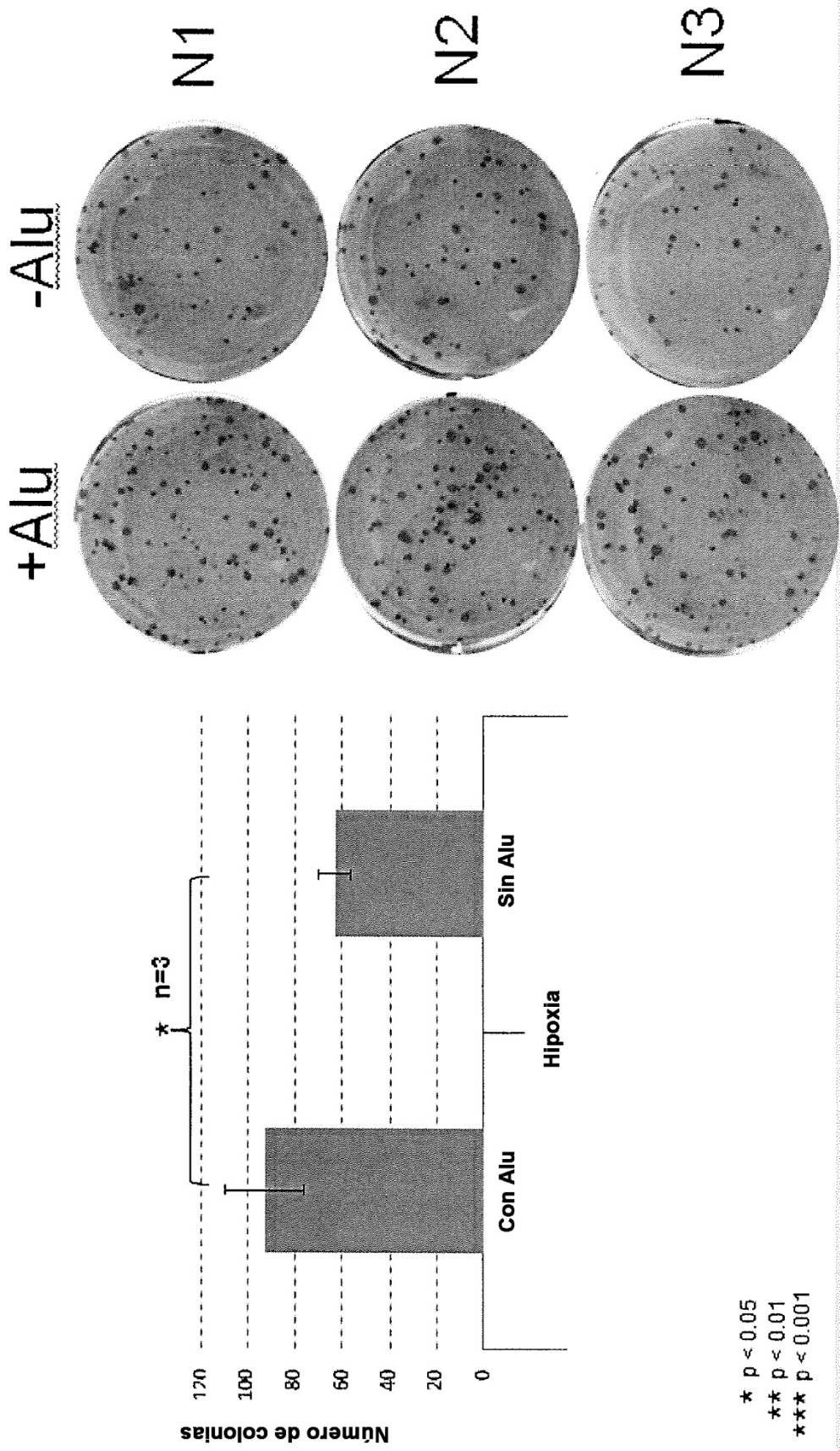


Figura 4

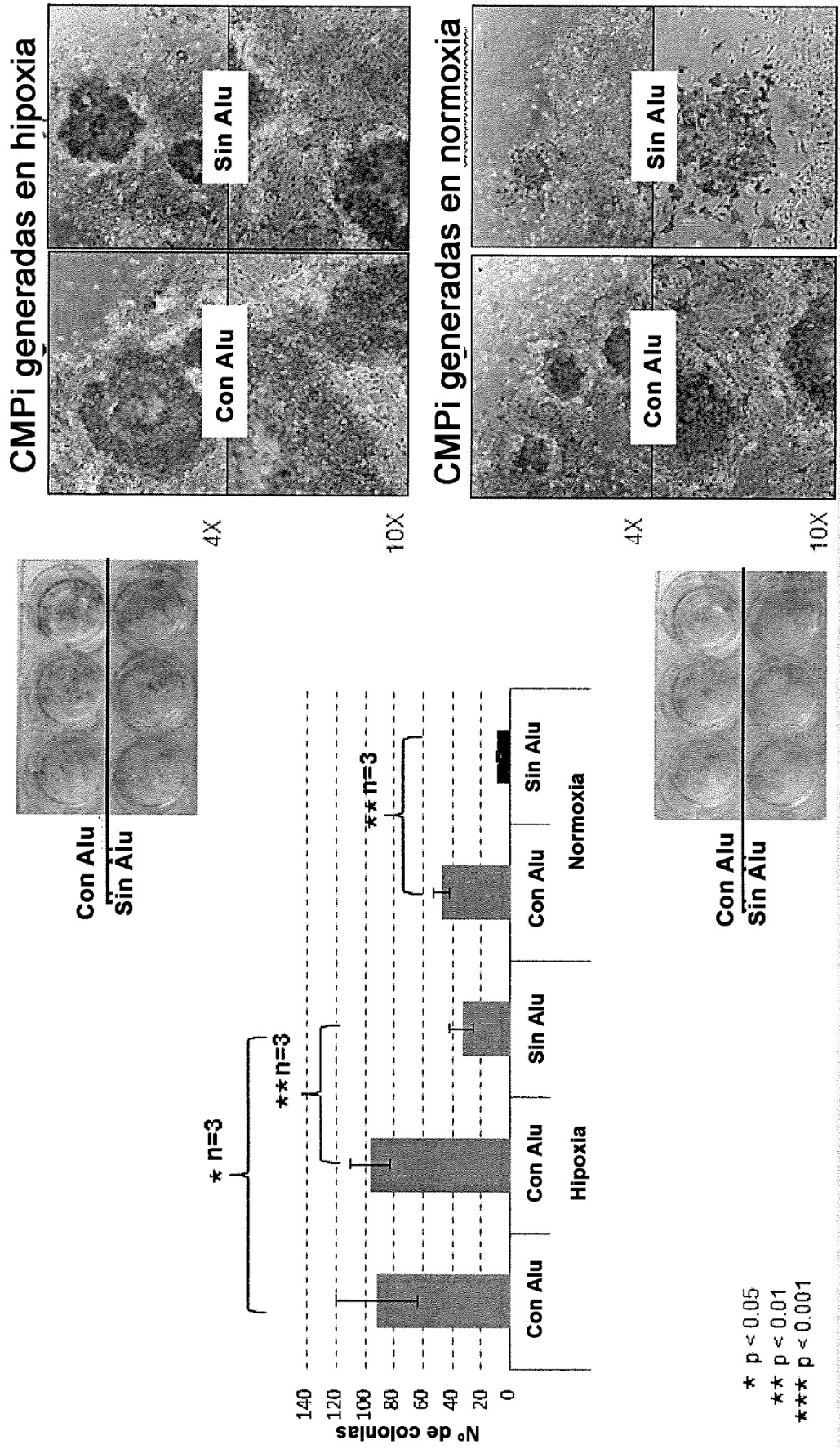
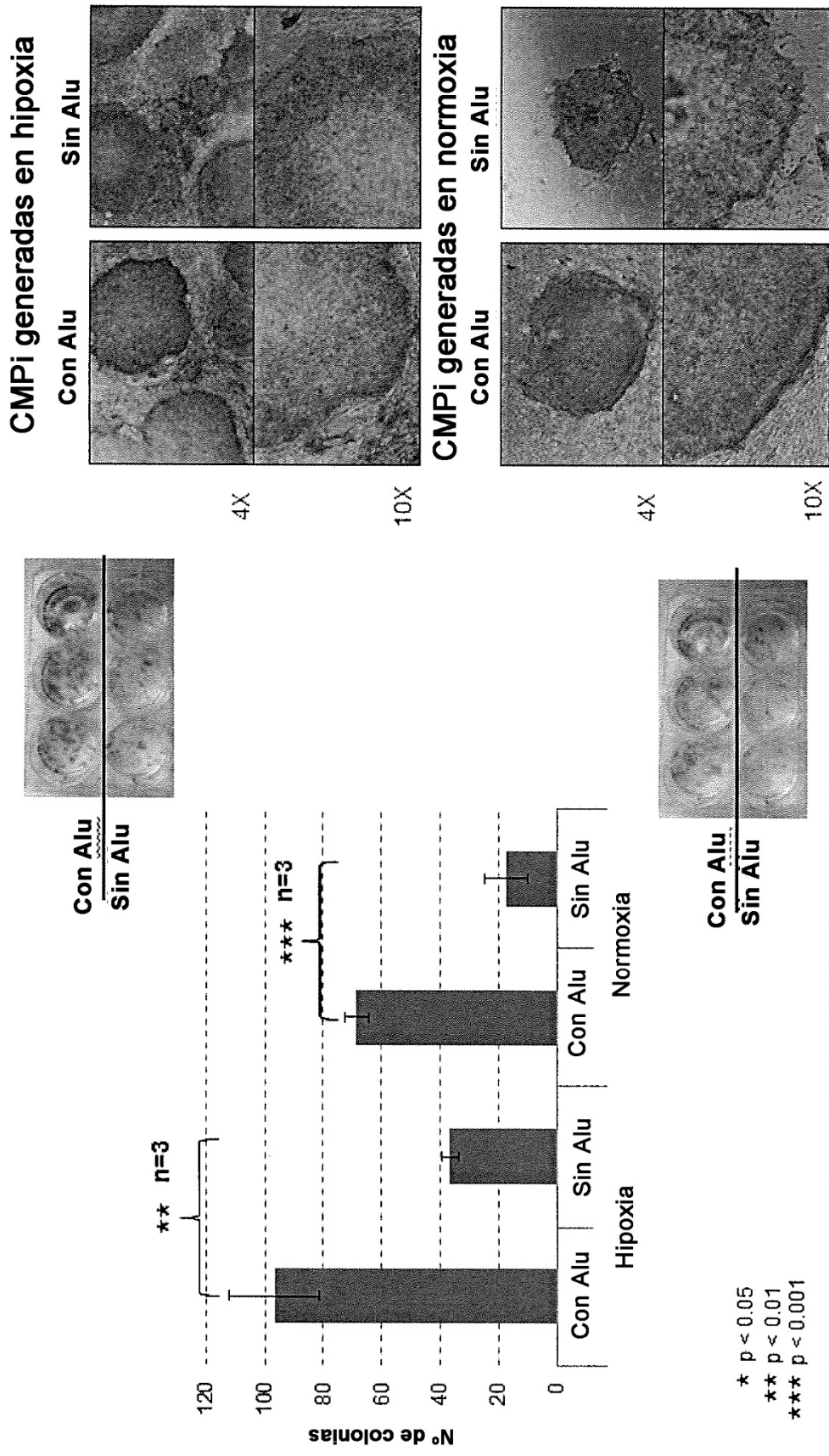


Figura 5



* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001