

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 726 766**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2010 PCT/JP2010/063733**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11016588**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10806584 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2462225**

(54) Título: **Método para el desarrollo eficiente de células madre pluripotentes inducidas**

(30) Prioridad:

**07.08.2009 US 232402 P
23.02.2010 US 307306 P**

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

09.10.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**OKITA, KEISUKE;
NAKAGAWA, MASATO y
YAMANAKA, SHINYA**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 726 766 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el desarrollo eficiente de células madre pluripotentes inducidas

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para desarrollar eficientemente células madre pluripotentes artificiales (en lo sucesivo en este documento denominadas iPS) y un reactivo para ello; más concretamente, a un método de producción de una célula iPS mediante la incorporación de (a) Oct3/4 o un ácido nucleico que lo codifica, (b) Klf4 o un ácido nucleico que lo codifica, (c) Sox2 o un ácido nucleico que lo codifica, (d) L-Myc o un ácido nucleico que lo codifica, (e) un inhibidor funcional de p53, y (f) Lin 28 o Lin 28B o un ácido nucleico que lo codifica, en contacto con una célula somática in vitro, y a un agente promotor de la inducción de la célula iPS que comprende (a) a (f), según lo definido por las reivindicaciones anexas. También se describe un vector episómico que comprende los factores de ácido nucleico de (a) a (c) más arriba, así como los factores de ácido nucleico de (d) y/o (e), o un vector que es una combinación del vector episómico y una secuencia loxP, particularmente a un vector episómico del tipo de pronta auto-eliminación, y un método para desarrollar rápidamente una célula iPS privada de un factor de ácido nucleico exógeno sin someterse a la integración del factor de ácido nucleico en el genoma utilizando el vector episómico.

15 Antecedentes de la invención

En los últimos años, se han desarrollado otras células iPS humanas y de ratón. Yamanaka et al. indujeron células iPS mediante la introducción de los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en fibroblastos derivados de ratón, y obligaron a las células a expresar los genes [documento WO 2007/069666 A1; Takahashi, K. y Yamanaka, S., Cell, 126:663-676 (2006)]. A partir de ahí, se reveló que las células iPS también podían ser producidas con 3 factores que no fueran el gen c-Myc [Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26:101-106 (2008)]. Además, Yamanaka et al. lograron desarrollar células iPS introduciendo los mismos 4 genes que los utilizados en ratón en fibroblastos dérmicos humanos [documento WO 2007/069666 A1; Takahashi, K. et al., Cell, 131:861-872 (2007)]. Por otro lado, un grupo de Thomson et al. produjo células iPS humanas utilizando Nanog y Lin28 en lugar de Klf4 y c-Myc [documento WO 2008/118820 A2; Science, 318:1917-1920 (2007)].

25 Sin embargo, la eficiencia del desarrollo de células iPS es tan baja como menos del 1%. Especialmente, un problema de la extremadamente baja eficiencia del desarrollo de células iPS se produce cuando éstas se producen mediante la introducción de 3 factores (Oct3/4, Sox2 y Klf4) distintos a c-Myc, que se teme causa la tumorigénesis en los tejidos o individuos diferenciados de iPS células, en células somáticas.

30 Los vectores virales, como los retrovirus y los lentivirus, ofrecen una mayor eficiencia de la transfección que los vectores no virales y, por lo tanto, son favorables porque permiten una generación más fácil de células iPS. Sin embargo, los retrovirus y los lentivirus se integran en el cromosoma, lo que plantea un problema de seguridad en vista de la aplicación clínica de las células iPS. Por esta razón, se han notificado células iPS generadas con vectores de adenovirus o vectores no virales tales como plásmidos sin integración vectorial en el cromosoma [Stadtfeld, M. et al., Science, 322:945-949 (2008); Okita, K. et al., Science, 322:949-953 (2008); Science, 324:797-801 (2009)]. Sin embargo, estos vectores son más pobres en la eficiencia del desarrollo de células iPS que los retrovirus y los lentivirus. Posiblemente, debido al requisito de la alta expresión persistente del factor de reprogramación bajo condiciones de selección de células iPS, hay algunos casos en los que una línea de expresión estable que tiene un factor de reprogramación incorporado en el cromosoma en una determinada frecuencia se obtiene incluso cuando se utiliza un vector plasmídico, que generalmente se reconoce como poco probable que cause la incorporación [Okita, K. et al., Science, 322:949-953 (2008); Kaji, K. et al., Nature, 458:771-775 (2009)].

40 Por lo tanto, se han hecho intentos para conciliar la alta eficiencia de lo desarrollado y la seguridad estableciendo primero una célula iPS utilizando un retrovirus o lentivirus y luego eliminando los genes exógenos del cromosoma. Por ejemplo, se han mostrado técnicas que comprenden una combinación de un lentivirus y el sistema Cre-loxP [Chang, C.W. et al., Stem Cells, 27:1042-1049 (2009); Soldner, F. et al., Cell, 136:964-977 (2009)]. En estos informes, sin embargo, se utiliza una construcción compleja en la que se inserta una secuencia loxP en el LTR para minimizar el riesgo de activación de un oncogén en la vecindad por una secuencia de LTR fuera de la secuencia loxP que permanece después del tratamiento con Cre recombinase, y en donde se inserta otro promotor como CMV o EF1α para transcribir un factor de reprogramación; por lo tanto, hay una demanda para el desarrollo de un vector que se puede construir más fácilmente. Aunque los factores de ácido nucleico exógeno pueden eliminarse completamente del uso del transposón piggyBac [Kaji, K. et al., Nature, 458:771-775 (2009)] no se puede descartar la posibilidad de perturbar los genes endógenos porque la integración temporal en el genoma es inevitable.

50 Mientras tanto, en el método que implica el uso de un vector episómico capaz de auto-replicación estable fuera del cromosoma, además de la eficiencia de desarrollo de células pobres en iPS descritas más arriba, el aclaramiento espontáneo del vector tras la interrupción de la selección del fármaco es de poca eficiencia y tarda mucho tiempo [Yu, J. et al., Science, 324:797-801 (2009)]. Por esta razón, existe una necesidad de lograr un método para eliminar el vector en poco tiempo con alta eficiencia, a la vez que se mejora la eficiencia del desarrollo de células iPS.

Además, surge otro problema en la búsqueda de aplicaciones clínicas para las células iPS humanas; las células pueden contaminarse con ingredientes derivados de otras especies animales como las células séricas y alimentadoras

durante el desarrollo de las células iPS y el cultivo de mantenimiento. Es deseable, por lo tanto, que todas las operaciones, desde la transferencia del factor de reprogramación al cultivo del desarrollo y mantenimiento de las células iPS humanas, se realicen bajo condiciones "Xeno-libres" (sin ingredientes heterólogos contenidos). Sin embargo, ha sido una práctica tradicional que en las células iPS humanas desarrolladas en condiciones libres de virus, los ingredientes heterólogos se utilizaran en al menos un paso de la transferencia del factor de reprogramación al cultivo de desarrollo y mantenimiento de las células iPS [Okita, K. et al., *Science*, 322:949-953 (2008); Yu et al., *Science*, 324:797-801 (2009); Kaji, K. et al., *Nature*, 458:771-775 (2009)]. Mientras tanto, todas las células iPS humanas desarrolladas bajo condiciones Xeno-libres han sido transfectadas con los genes de reprogramación por medio de un retrovirus o lentivirus, y ninguno de ellas ha sido preparada bajo condiciones libres de virus [Rodriguez-Piza, I. et al., *Stem Cells*, 28:36-44 (2010); Ross, P.J. et al., *Stem Cells Dev.*, 23 de dic., 2009. (Epub antes de la impresión)].

El documento WO 2009/057831 se refiere a un procedimiento para generar células madre pluripotentes inducidas que comprenden el uso de genes de la familia Oct, Klf y Sox.

Zhao Y. et al., *Cell Stem Cell*, (2008), Vol. 3, no. 5, páginas 475-479, describen el uso de un p53 siRNA y UTF1 para la generación de iPSC.

Woltjen K. et al., *Nature*, (abril de 2009), Vol. 458, Nº 7239, páginas 766-770, describen el uso de transposones de piggybac para reprogramar fibroblastos en células madre pluripotentes inducidas.

Swistowski A. et al., E6233, *PLOS ONE*, (julio 2009), Vol. 4, no. 7, describe las condiciones definidas sin Xeno para el cultivo de células madre embrionarias humanas.

"Improved efficiency of establishment of iPS cells" en la página 11 de Kahoku-Shinpo, 2009-02-11, se refiere a una eficiencia mejorada del desarrollo de células iPS.

Dorigo O. et al., *J. Virol.*, (2004), Vol. 78, Nº 12, páginas 6556-6566, describen el desarrollo de un sistema híbrido de virus adenovirus-Epstein-Barr dependiente de las células ayudantes para la transformación estable de células de mamíferos.

Unger C. et al., *Human Reprod.*, (2009), Vol. 24, no. 10, páginas 2567-2581, describen que las células alimentadoras de fibroblastos de la piel humana inmortalizadas propician el crecimiento y el mantenimiento de las células madre pluripotentes inducidas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a desarrollar eficientemente células iPS humanas seguras adecuadas para aplicaciones clínicas, como se define en las reivindicaciones anexas. En consecuencia, un primer objeto de la presente invención es proporcionar un medio para mejorar la eficiencia del desarrollo de las células iPS, en particular las células iPS humanas, y un método de producción eficiente de células iPS mediante el uso de ese medio. Es un segundo objeto de la presente invención proporcionar un método para desarrollar rápidamente células iPS que han perdido factores de ácido nucleico exógeno sin someterlas a la integración de factores de ácido nucleico en el genoma. Es un tercer objeto de la presente invención generar células iPS humanas sin utilizar virus o ingredientes heterólogos durante el período comprendido entre la transferencia del factor de reprogramación y el cultivo de desarrollo y mantenimiento de las células iPS (es decir, en condiciones que carecen de xeno y de virus) para proporcionar de este modo células iPS humanas que se puedan utilizar de forma segura en entornos clínicos humanos.

Para resolver los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores investigaron primero para encontrar combinaciones adecuadas de genes de reprogramación utilizando un vector retroviral. Basado en los 6 factores utilizados por Yu, J. et al. para desarrollar una célula iPS humana utilizando un vector episómico [Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28 (antígeno T grande SV40 manejado como un mejorador de la eficiencia del desarrollo, y excluido de los genes de reprogramación)] [Science, 324:797-801 (2009)], los presentes inventores intentaron inducir células iPS humanas a partir de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) usando 5 factores excepto Nanog, o usando 5 factores excepto Nanog, que incluían L-Myc en lugar de c-Myc. Inesperadamente, se desarrollaron células iPS humanas más eficientemente con el uso de los 5 factores que no eran Nanog que con los 6 factores. Además, como consecuencia de la sustitución de c-Myc por L-Myc, la eficiencia del desarrollo mejoró notablemente. Por lo tanto, la eficiencia de desarrollo de células iPS humanas se comparó exactamente entre el uso de los 6 factores y el uso de los 5 factores incluyendo L-Myc en lugar de c-Myc, utilizando un vector episómico. Como consecuencia, se descubrió que la eficiencia del desarrollo aumentó notablemente con el uso de los 5 factores que incluían L-Myc en lugar de c-Myc, en comparación con los 6 factores.

A continuación, los 6 factores o los 5 factores diferentes de Nanog y que incluían L-Myc en lugar de c-Myc, junto con un vector episómico que codificaba un shRNA contra p53, fueron transferidos a HDF. Como consecuencia de la inhibición funcional de p53, se obtuvieron células iPS con el uso de los 6 factores en un grado similar comparando con los 5 factores que incluían L-Myc en lugar de c-Myc. Cuando los 5 factores se combinaron con la inhibición funcional de p53, la eficiencia del desarrollo aumentaba aún más notablemente. También se descubrió que mediante el uso de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), en lugar de células SNL, como células de alimentación en el momento del

paso de HDF después de la transfección, la eficiencia de desarrollo de células iPS humanas mejoró drásticamente.

Los presentes inventores han diseñado un vector episómico para permitir que el constituyente esencial para la autoreplicación de los mismos sea cortado por la acción de Cre recombinasa con una secuencia loxP colocada en ambos extremos del componente vectorial con el fin de permitir que el vector episómico transferido sea retirado de la

5 célula iPS rápidamente después del desarrollo de la célula iPS. Tras el desarrollo de la célula iPS humana, el ADN genómico y el ADN extracromosómica de las células fueron aislados y examinados por separado para detectar la presencia o ausencia de transgenes. Como consecuencia, el vector transferido no se detectó en ninguno de los dos ADN; inesperadamente, se descubrió que el vector era un vector de autoeliminación temprana que rápidamente se desprendía de la célula, sin usar CRE recombinasa.

10 Además, los presentes inventores lograron generar células iPS humanas bajo condiciones completamente libres de virus y sin Xeno desde la transferencia del factor de reprogramación al cultivo de desarrollo y mantenimiento de células iPS, utilizando el vector episómico descrito anteriormente.

15 A partir de estos resultados, los presentes inventores descubrieron que la eficiencia del desarrollo de células iPS humanas puede mejorarse notablemente excluyendo a Nanog de los factores de reprogramación y utilizando L-Myc en lugar de c-Myc, o utilizando un inhibidor funcional de p53 en su lugar, o además de esto, que una célula iPS que ha perdido factores de ácido nucleico exógeno sin someterse a la integración de los factores de ácido nucleico en el genoma se pueda adquirir rápidamente mediante la elaboración del diseño de un vector episómico, y que células iPS humanas puedan ser generadas sin virus y sin Xeno combinando los factores de reprogramación descritos anteriormente y los vectores episómicos, habiendo así desarrollado la presente invención.

20 En consecuencia, la presente invención proporciona:

[1] Un método para producir células iPS, como se define en las reivindicaciones anexas 1, 2 y 4-14.

[2] Un agente de promoción de la inducción de células iPS como se define en las reivindicaciones anexas 3-10 y 14.

25 El uso de L-Myc en lugar de c-Myc y el uso de un inhibidor funcional de p53, así como el no uso de Nanog, hace posible aumentar notablemente la eficiencia del desarrollo de células iPS y, por lo tanto, es particularmente útil en la generación de células iPS humanas, particularmente células iPS humanas del tipo no implicadas en la integración de los genes de reprogramación en el genoma, con el uso de 6 factores que han sido extremadamente bajos en la eficiencia del desarrollo (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Nanog, Lin28). Además, el uso de un vector episómico desarrollado de forma independiente hace posible desarrollar células iPS sin involucrar la integración de factores de ácidos nucleicos exógenos en el genoma, y haciendo que los episomas se eliminen rápidamente de la célula iPS después de su desarrollo, por lo que el vector puede ser retirado de la célula antes que los vectores episómicos convencionales. Además, debido a que una célula iPS humana puede generarse bajo condiciones completamente libres de virus y sin Xeno durante el período comprendido entre la transferencia del factor de reprogramación al desarrollo y mantenimiento de las células iPS, el método de la presente invención es muy útil en la aplicación de células iPS humanas a la medicina regenerativa.

30 35 En lo siguiente, las células iPS desarrolladas por el uso de un vector episómico a veces se abrevia como "células epi-iPS" o "epi-iPSC" en la presente memoria descriptiva.

Además, cuando la combinación de genes introducidos se abrevia como "Y1, Y2, Y3, Y4, T1, T2 o T3", la combinación es como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Resumen de las mezclas de plásmidos.

Nombre de la mezcla	Nombre plásmido	Cantidad (μg)	Genes
Y1	pCXLE-hOct4	1	OCT3/4
	pCXLE-hSK	1	Sox2, KLF4
	pCXLE-hMLN	1	C-Myc, LIN28, Nanog
Y2	pCXLE-hOct4shp53	1	OCT3/4, shRNA para p53
	pCXLE-hSK	1	Sox2, KLF4
	pCXLE-hMLN	1	C-Myc, LIN28, Nanog
Y3	pCXLE-hOct4	1	OCT3/4

Nombre de la mezcla	Nombre plásmido	Cantidad (μg)	Genes
	pCXLE-hSK	1	Sox2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-Myc, UN28
Y4	pCXLE-hOct4shp53	1	OCT3/4, shRNA para p53
	pCXLE-hSK	1	Sox2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-Myc, UN28
T1	pEP4EO2SET2K	1,125	OCT3/4, Sox2. SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SEN2K	1,125	OCT3/4, Sox2, Nanog, KLF4
	pCEP4-M2L	0,75	C-Myc, LIN28
T2	pEP4EO2SET2K	0,91	OCT3/4, Sox2, SV40LT. KLF4
	pEP4EO2SCK2MEN2L	2,09	OCT3/4, Sox2. KLF4. C-Myc, Nanog. LIN28
T3	pEP4EO2SET2K	0,8	OCT3/4, Sox2. SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SEN2L	1,05	OCT3/4, Sox2, Nanog, LIN28
	IpEP4EO2SEM2K	1,15	OCT3/4, Sox2, C-Myc, KLF4

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 es una representación fotográfica de colonias de células iPS humanas desarrolladas transfiriendo varios genes a fibroblastos dérmicos humanos neonatales utilizando un retrovirus, caracterizado porque O representa Oct3/4, S para Sox2, K para Klf4, L para Lin28, N para Nanog, M para c-Myc , y U para L-Myc. Una representación conjunta de factores como "O-M-L" indica una construcción preparada uniendo las regiones traducidas de los factores a través de una secuencia 2A. El número debajo de cada fotografía indica el número de colonias no tipo ES/el número de colonias tipo ES.
- La Fig. 2 es una representación gráfica de algunos de los resultados mostrados en la Fig. 1. El número de colonias tipo ES se indica por barras en negro, y el número de colonias tipo no ES como barras delineadas. En la Fig. 2, "6 factores" indica un caso en el que se transfirieron los genes Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28, Nanog y c-Myc o L-Myc; "ctrl" indica un caso en el que se transfirieron 5 genes que no eran Nanog en los 6 genes anteriores; "L-M", "M-L", "L-U", y "U-L" indican casos en los que se unió una construcción con cada factor (L representa Lin28, M para c-Myc, U para L-Myc) y Oct3/4, Sox2 y Klf4 fueron transferidos.
- La Fig. 3 es una representación fotográfica de las colonias de una célula iPS desarrollada transfiriendo los cinco plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO, pCXLE-hMLN, y pCX-SV40LT a los fibroblastos dérmicos humanos adultos. La placa izquierda muestra una fotografía a partir del momento de desarrollo de la célula iPS; la placa derecha muestra una fotografía a partir del 3er paso (P3).
- La Fig. 4 es una representación fotográfica de las colonias de una célula iPS desarrollada mediante la transferencia de los cuatro plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO y pCXLE-hMLN a los fibroblastos dérmicos humanos adultos. La placa izquierda es una fotografía a partir del momento de desarrollo de la célula iPS; la placa derecha es una fotografía a partir del 2º paso (P2).
- La Fig. 5 es una representación fotográfica de las colonias de células iPS desarrolladas transfiriendo los tres plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, y pCXLE-hUL (panel superior izquierdo), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, y pCXLE-hMLN (panel superior derecho), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL (panel inferior izquierdo), a los fibroblastos dérmicos humanos adultos. La fila superior de cada panel muestra los resultados obtenidos utilizando MEF como células alimentadoras. La fila inferior de cada panel muestra los resultados obtenidos utilizando células MSTO como células alimentadoras. Las fotografías en el lado más a la derecha sin número de colonia en el lado izquierdo son fotografías de colonias tipo no ES.
- La Fig. 6 es una representación gráfica de los resultados mostrados en la tabla 2. El número de colonias tipo ES indicado por una barra en negro, y el número de colonias tipo no ES por una barra delineada. A partir de la izquierda

se muestran los resultados obtenidos transfiriendo cada una de las siguientes combinaciones:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (3) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (4) pCXLE-GFP.

La Fig. 7 es una representación fotográfica de colonias de células iPS desarrolladas transfiriendo los tres plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, y pCXLE-hMLN (panel superior izquierdo), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, y pCXLE-hUL (panel inferior izquierdo), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, y pCXLE-hMLN (panel superior derecho), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL (panel inferior derecho), a los fibroblastos derivados de una piel de un niño de 6 años de edad humano. La fila superior de cada panel muestra los resultados obtenidos utilizando MEF como células alimentadoras. La fila inferior de cada panel muestra los resultados obtenidos utilizando células MSTO como células alimentadoras.

La Fig. 8 es una representación fotográfica de las colonias de células iPS desarrolladas transfiriendo los tres plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, y pCXLE-hMLN (panel superior izquierdo), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL (panel inferior izquierdo), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, y pCXLE-hMLN (panel superior derecho), o los tres plásmidos diferentes, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL (panel inferior derecho), a fibroblastos derivados de una piel de un ser humano de 8 meses. La fila superior de cada panel muestra los resultados obtenidos utilizando MEF como células alimentadoras. La fila inferior de cada panel muestra los resultados obtenidos utilizando células MSTO como células alimentadoras.

La Fig. 9 es una representación gráfica de los resultados mostrados en la Tabla 3 (TIG120 usado). El número de colonias tipo ES indicado por una barra en negro, y el número de colonias tipo no ES por una barra delineada. A partir de la izquierda se muestran los resultados obtenidos transfiriendo cada una de las siguientes combinaciones:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (3) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (4) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (5) pCXLE-GFP.

La Fig. 10 es una representación gráfica de los resultados mostrados en la Tabla 3 (TIG121 usado). El número de colonias tipo ES indicado por una barra en negro, y el número de colonias tipo no ES por una barra delineada. Se muestra desde la izquierda como (1) a (5) en la explicación de la Fig. 9.

La Fig. 11 es una representación gráfica de los resultados mostrados en la Tabla 3 (TIG120 usado) para cada tipo de célula de alimentación. Se muestra desde la izquierda como (1) a (5) en la explicación de la Fig. 9.

La Fig. 12 muestra los resultados de un examen de 5 células iPS diferentes para detectar la presencia o ausencia de la integración de genes exógenos (Klf4, c-Myc, OriP) en el genoma por PCR genómica, en donde "L" indica los resultados para el ADN largo, y "S" para el ADN corto. Se indica con "347A1" los resultados para la colonia iPS desarrollada en el ejemplo 2; "349A1" indica los resultados de la colonia iPS desarrollada en el ejemplo 3; "341A5" indica los resultados de una colonia iPS desarrollada mediante la transferencia de 6 genes que consisten en Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 y Nanog a los fibroblastos humanos fetales; "345A1" indica los resultados de otra colonia iPS obtenida transfiriendo los mismos genes que los de "347A1"; y "352A3" indica los resultados de otra colonia iPS obtenida transfiriendo los mismos genes que los de "341A5". HDF indica los resultados del genoma de un fibroblasto humano fetal no transfectado, y "retro" para las colonias iPS desarrolladas mediante la transferencia de 4 genes que consisten en Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc a los fibroblastos humanos fetales usando un vector retroviral. En la Fig. 12, "endo" (punta de flecha delineada) significa un gen endógeno, y TG (punta de flecha en negro) para un gen exógeno.

La Fig. 13 muestra fotografías de fluorescencia (imágenes de observación GFP) de las células obtenidas transfiriendo pCX-EGFP, pCXE-EGFP y pCXLE-EGFP a HDF, tomadas los días 6 y 14 después de la transferencia.

La Fig. 14 es una representación gráfica de los resultados de un examen para determinar si se puede desarrollar una célula iPS incluso cuando se transfiere un shRNA de p53 utilizando un vector plasmídico (un vector plasmídico que carece de EBNA-1 y oriP). El número de colonias tipo ES indicado por una barra en negro, y el número de colonias tipo no ES por una barra delineada. A partir de la izquierda se muestran los resultados obtenidos transfiriendo cada una de las siguientes combinaciones:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (3) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pSilencer-shp53,
- (4) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- 5 (5) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (6) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, pSilencer-shp53,
- (7) pCXLE-EGFP.

La Fig. 15 es una representación fotográfica de las colonias de una célula iPS desarrollada mediante la transferencia de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a las líneas de células madre de pulpa dental DP74 y DP94 de un humano sano con el genotipo homo-HLA 4.

La Fig. 16 es una representación gráfica de los resultados del conteo de colonias tipo ES obtenidas transfiriendo varios genes de reprogramación a la línea de células madre de pulpa dental DP74. El número de colonias tipo ES indicado por una barra en negro, y el número de colonias tipo no ES por una barra delineada. A partir de la izquierda se muestran los resultados obtenidos transfiriendo cada una de las siguientes combinaciones:

- 15 (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (3) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (4) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (5) pEP4-EO2S-ET2K, pEP4-EO2S-EN2K, pCEP4-M2L (mezcla de Thomson 1 en la Fig. 16),
- 20 (6) pEP4-EO2S-ET2K, pEP4-EO2S-Ck2M-EN2L (mezcla de Thomson 2 en la Fig. 16),
- (7) pEP4-EO2S-ET2K, pEP4-EO2S-EN2L, pEP4-EO2S-EM2K (mezcla de Thomson 3 en la Fig. 16),
- (8) pCXLE-GFP.

La Fig. 17 es una representación gráfica de los resultados del mismo experimento que la Fig. 16, pero utilizando la línea DP94.

- 25 La Fig. 18 muestra los resultados de las mediciones semanales de la cantidad expresada (intensidad de fluorescencia) de EGFP transferida utilizando un vector episómico. El panel superior: gráficos de intensidad de fluorescencia analizados por FACS. El eje de abscisas indica la intensidad de la fluorescencia; el eje de coordenadas indica el número de células. Cada valor en % en el gráfico indica una proporción de células GFP positivas. El panel inferior: fotografías de fluorescencia de las células (imágenes GFP-positivas).
- 30 La Fig. 19 es una representación gráfica de los resultados de un examen de 18 clones de células iPS desarrolladas para el número de copias del vector episómico poseído por PCR en tiempo real. El eje de coordenadas indica el número de copias de vectores episómicos por células 1×10^4 . "elepo 6D" significa células en el día 6 después de reprogramar la transferencia de genes, y "origen" para el HDF utilizado para la transferencia.
- 35 La Fig. 20 es una representación gráfica de los resultados de un examen de la cantidad de Oct3/4 expresada en 9 clones de células iPS desarrolladas por PCR cuantitativa. La barra delineada indica la suma de las cantidades de genes exógenos y endógenos expresados (cantidad total expresada), y la barra en negro indica la cantidad de genes exógenos expresados. En la Fig. 20, "elepoD4" representa las células en el día 4 después de la transfección, y "KhES1" y "KhES3" para las células ES humanas.
- 40 La Fig. 21 es una representación gráfica de los resultados del mismo experimento que la Fig. 20 realizado en Sox2, Klf4, L-Myc y Lin28.
- La Fig. 22 muestra los resultados de un análisis de agrupamiento basado en las diferencias en la cantidad expresada de cada gen por el análisis de micromatrices de ADN en células iPS humanas desarrolladas a partir de fibroblastos dérmicos (TIG y HDF), el TIG inicial y HDF, y las células humanas de ES.
- 45 La Fig. 23 muestra los diagramas de dispersión de los resultados del análisis de micromatrices de ADN, realizados para determinar si el patrón de expresión génica difiere entre una célula ES humana (KhES3) y HDF (gráfico izquierdo), o una célula ES humana (KhES3) y una célula iPS humana desarrollada utilizando un vector episómico (gráfico de la derecha).

- La Fig. 24 muestra los resultados del análisis de matriz CGH de la célula iPS humana desarrollada utilizando el vector episómico. Los datos se muestran como variación contra las células TIG utilizadas para la transfección (TIG120).
- 5 La Fig. 25 es una representación fotográfica que muestra la morfología de las células a partir del 1er paso obtenido por el cultivo de una célula iPS desarrollada utilizando un vector episómico con la línea DP74 utilizada como células alimentadoras, utilizando el medio ReproCELL (derecha). La placa izquierda muestra una fotografía obtenida con el uso de MSTO como células alimentadoras.
- 10 La Fig. 26 es una representación fotográfica que muestra la morfología de las células a partir del 1er paso obtenido por el cultivo de una célula iPS desarrollada utilizando un vector episómico bajo condiciones sin Xeno (medio sin Xeno utilizado, y sin células alimentadoras utilizadas). La placa izquierda muestra una fotografía obtenida con el uso del medio ordinario ReproCELL.
- 15 La Fig. 27 es una representación fotográfica que muestra la morfología de las células a partir del 1er paso obtenido por el cultivo de una célula iPS desarrollada utilizando un vector episómico bajo condiciones sin Xeno (medio sin Xeno utilizado, y la línea DP74 utilizada como células alimentadoras).
- 20 La Fig. 28 muestra los resultados de la transferencia de pCXLE-EGFP a DP74 bajo condiciones sin Xeno. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la transferencia en condiciones ordinarias (control). Paneles superiores: imágenes de contraste de fases, paneles inferiores: imágenes de observación GFP.
- 25 La Figura 29 es una representación fotográfica de la morfología de las colonias de células tipo ES que surgieron el día 26 después de la transfección en condiciones libres de Xeno después del cultivo celular bajo las seis condiciones diferentes que se muestran en la Tabla 9.
- 30 La Fig. 30 muestra las estructuras de los vectores de expresión episómicos. Se utilizaron tres plásmidos para la mezcla Y4 (en esta figura, pCXLE-hOct4-shp53 se describe como pCXLE-hOct3/4-shp53). Los factores de reprogramación (OCT3/4, Sox2, KLF4, L-Myc, LIN28 y shRNA para p53) se muestran en negro. También se muestran los promotores (CAG), WPRE, señal de poliadenilación (pA), EBNA-1, OriP y dos sitios loxP.
- 35 La Fig. 31 muestra números de copias de vectores episómicos que permanecieron en clones de epi-iPSC. A: los resultados de las células epi-iPS derivadas del DP. B: los resultados de las células epi-iPS derivadas de fibroblastos. Los números entre paréntesis indican los números de paso de cada clon. También se muestran los números de células que se usan para cada clon. Como un control positivo, fueron analizados el clon iPS derivado de retrovirus (253G-4) y los fibroblastos 6 días después de la electroporación de la mezcla Y4 (fibro-D6).
- 40 La Fig. 32 muestra expresiones de genes de marcadores celulares pluripotentes mediante un análisis RT-PCR. A: los resultados de las células epi-iPS derivadas del DP. B: los resultados de las células epi-iPS derivadas de fibroblastos. El ARN total se aisló de los clones epi-iPSC desarrollados con las combinaciones Y1 (454B-1), Y2 (454C-2), Y3 (454D-1), y Y4 (454E-2, 451F-3, 457C-1, 453F-2, 404C-2, 409B-2, 414C-2, 418C-1, 421C-1, 426C-2, 427D-4, y 428C-2). También se examinaron clones iPSC derivados de retrovirus (201B-7 y 253G-4) y líneas hESC (KhES-3 y H9). En los carriles OCT3/4 y Sox2 marcados, los cebadores PCR sólo amplificaron los genes endógenos, mientras que en el carril Ret-Oct, los cebadores PCR amplificaron específicamente el transgénico Oct3/4 retroviral. G3PDH se analizó como un control de carga. Como controles negativos, el ARN total se aisló de los fibroblastos dérmicos humanos 4 días después de la electroporación de la mezcla Y4 (HDF-elepo).
- 45 La Fig. 33 muestra el estado de metilación de ADN de la región del promotor Nanog. Los círculos abiertos y cerrados indican CpG no metilado y metilado, respectivamente.
- 50 La Fig. 34 muestra el teratoma derivado de un clon epi-iPSC. Fig. 34A: los resultados de 454E-2. Se muestra la tinción de hematoxilina y eosina del tejido neural (A), el cartílago (B), el músculo (C) y epitelios tipo intestinal (D). Barras de escala = 50 µm. Fig. 34B: los resultados de 404C-2, 409B-2, 418C-1, 421C-1, 428C-2 y 454D-1. Se muestra la tinción de hematoxilina y eosina de tejido neural, cartílago y epitelios tipo intestinal. Barra de escala (esquina inferior derecha) = 50 µm.
- 55 La Fig. 35 muestra la diferenciación en las neuronas dopaminérgicas de un clon epi-iPSC (clon 454E-2). Fig. 35A: se muestran las imágenes de inmunotinción para Tuj1 (verde, E), TH (rojo, F) y una imagen fusionada con tinción nuclear utilizando Hoechst 33342 (azul, G). Barras de escala = 20 µm. 35B: (A-C) doble inmunotinción para nestin (verde) y Ki67 (rojo) con tinción nuclear DAPI (azul). Se muestra una imagen de alta amplificación en (D). (E y F) Doble inmunotinción para Pax6 (rojo) y TH (verde). (G) doble inmunotinción para TH (rojo) y Tuj1 (verde) con DAPI. (H e I) Doble inmunotinción para TH (rojo) y MAP2ab (verde). (J y K) Doble inmunotinción para TH (rojo) y el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2, verde). Barras de escala: 100 µm in (A-C, E-G); 20 µm en (D, H-K).
- La Fig. 36 muestra el desarrollo de células iPS a partir de células mononucleares de sangre periférica humana. La Fig. 36A muestra un esquema del procedimiento experimental. La Fig. 36B es una representación fotográfica de colonias de células iPS desarrolladas mediante la transferencia de los tres plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL en células mononucleares de sangre periférica humana.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para producir células iPS tal como se define en la reivindicaciones anexas 1, 2 y 4-14.

(A) Fuentes de células somáticas

5 Puede utilizarse como material de partida para la producción de células iPS células que no sean células germinales con origen mamífero (p. ej., seres humanos, ratones, monos, cerdos, ratas, etc.). Algunos ejemplos son las células epiteliales queratinizantes (p. ej., células epidérmicas queratinizadas), células epiteliales de la mucosa (p. ej., células epiteliales de la capa superficial de la lengua), células epiteliales de las glándulas exocrinas (p. ej., células de las glándulas mamarias), células secretantes de hormonas (p. ej., células adrenomedulares), células para el metabolismo o almacenamiento (p. ej., células hepáticas), células epiteliales íntima que constituyen interfaces (p. ej., células alveolares tipo I), células epiteliales íntima del canal obturador (p. ej., células endoteliales vasculares), células que tienen cilios con capacidad de transporte (p. ej., células epiteliales de las vías respiratorias), células para la secreción de matrices extracelulares (p. ej., fibroblastos), células constrictivas (p. ej., células musculares lisas), células sanguíneas y del sistema inmunitario (p. ej., linfocitos T), células relacionadas con los sentidos (p. ej., células bacilares), neuronas del sistema nervioso autónomo (p. ej., neuronas colinérgicas), células sustentaculares de órganos sensoriales y neuronas periféricas (p. ej., células satelitales), células nerviosas y células de la glia del sistema nervioso central (p. ej., células de la astrogliá), células pigmentarias (p. ej., células epiteliales pigmentarias de la retina), células progenitoras (células progenitoras de tejido) y otras. No hay limitación en el grado de diferenciación celular, la edad de un animal a partir del cual se recogen las células, etc.; incluso las células progenitoras no diferenciadas (incluidas las células madre somáticas) y las células maduras finalmente diferenciadas pueden utilizarse por igual como fuentes de células somáticas en la presente invención.

Algunos ejemplos de células progenitoras no diferenciadas son las células madre de tejido (células madre somáticas), como las células madre nerviosas, las células madre hematopoyéticas, las células madre mesenquimales, las células del estroma (madre) derivadas del tejido adiposo y las células madre de la pulpa dental. Las células madre hematopoyéticas y mesenquimales están contenidas abundantemente en la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y la placenta. Dado que la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y la placenta se han depositado en muchos bancos de sangre, tanto públicos como privados, y se utilizan para el tratamiento de enfermedades sanguíneas como la leucemia, la médula ósea depositada, la sangre del cordón umbilical y la placenta también pueden ser utilizadas como fuentes de células somáticas para los bancos de células iPS. En particular, dado que la sangre del cordón umbilical se puede recoger fácilmente a partir de los cordones umbilicales obtenidos en el momento del parto, las células madre hematopoyéticas y mesenquimales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical son fuentes preferibles de células somáticas para los bancos de células iPS. También se espera que las células madre de la pulpa dental sirva como fuente de células somáticas para los bancos de células iPS, ya que se encuentran fácilmente disponibles como aisladas y preparadas a partir de muelas del juicio y otros dientes extraídos para el tratamiento de la enfermedad periodontal y similares.

Ejemplos de células maduras finalmente diferenciadas incluyen células mononucleares de sangre periférica tales como células T y células B. El muestreo de sangre periférica es mínimamente invasivo y se realiza rutinariamente en ensayos clínicos. Dado que un pequeño volumen de muestras de sangre periférica que se dejan sin usar después de los ensayos clínicos generalmente se desechan, éstas son fuentes preferibles de células somáticas para los bancos de células iPS. En particular, ya que las células T se pueden propagar *in vitro* con relativa facilidad, las células iPS se pueden desarrollar a partir incluso de un pequeño volumen de muestras de sangre periférica. La generación de células iPS a partir de células T de sangre periférica humana ha sido recientemente reportada por varios grupos (Seki et al., *Cell Stem Cell*, 7:11-14 (2010); Loh et al., *Cell Stem Cell*, 7:15-19 (2010); Staerk et al., *Cell Stem Cell*, 7:20-24 (2010)).

45 La elección del individuo mamífero como fuente de células somáticas no está particularmente limitada; sin embargo, cuando las células iPS obtenidas son para utilizarse en medicina regenerativa con seres humanos, es preferible, desde el punto de vista de la prevención del rechazo de injertos, recoger las células somáticas de un paciente u otra persona con el mismo o sustancialmente el mismo tipo HLA que el del paciente. "Sustancialmente el mismo tipo de HLA", según se utiliza en el presente documento significa que el tipo HLA de donante coincide con el del paciente hasta un grado en el que las células trasplantadas, que se han obtenido induciendo la diferenciación de las células iPS derivadas de las células somáticas del donante, pueden ser injetadas al trasplantarse al paciente con el uso de agentes inmunodepresores, etc. Por ejemplo, incluye un tipo HLA en el que las HLA principales (por ejemplo, los tres loci principales de HLA-A, HLA-B y HLA-DR, los cuatro loci principales que incluyen HLA-Cw) son idénticos (en lo sucesivo en este documento se aplicará el mismo significado), etc. Cuando las células iPS obtenidas no son para administrarse (trasplantarse) a un ser humano, sino que se utilizan, por ejemplo, como una fuente de células para el cribado para evaluar la susceptibilidad a los fármacos o las reacciones adversas del paciente, también se desea recolectar las células somáticas del paciente u otra persona con el mismo polimorfismo genético que se correlaciona con la sensibilidad frente a medicamentos o con las reacciones adversas producidas por los fármacos.

60 Las células somáticas aisladas a partir de mamíferos pueden ser cultivadas previamente utilizando un medio conocido per se adecuado para su cultivo de acuerdo con la elección de las células y antes de ser sometidas al paso de la reprogramación nuclear. Ejemplos de tales medios incluyen, entre otros, medio esencial mínimo (MEM) que contiene

de aproximadamente 5 a 20% suero de ternera fetal (FCS), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio RPMI1640, medio 199, medio F12, etc. Cuando se utiliza una célula madre de pulpa dental como las células somáticas, por ejemplo, es preferible utilizar un medio para células madre mesenquimales, como el medio basal de células madre mesenquimales (Lonza). Cuando un reactivo de transferencia, tal como un liposoma catiónico, se utiliza, por ejemplo, para poner la célula somática en contacto con sustancias de reprogramación nuclear y un inhibidor funcional de p53 (y otro mejorador de la eficiencia del desarrollo de células iPS, si es necesario), a veces es preferible que el medio haya sido reemplazado por un medio sin suero para evitar que la eficiencia de la transferencia disminuya.

Para obtener células iPS humanas completamente libres de Xeno adecuadas para aplicaciones clínicas humanas, es más deseable que se utilice un medio que no contenga ningún ingrediente derivado de animales no humanos, como FCS. Los medios que comprenden un medio basal complementado con ingredientes de origen humano adecuados para el cultivo de diversas células somáticas (en particular, proteínas humanas recombinantes como factores de crecimiento), aminoácidos no esenciales, vitaminas y demás están comercialmente disponibles; los expertos en la técnica son capaces de elegir un medio adecuado sin Xeno de acuerdo con la fuente de las células somáticas. Las células somáticas precultivadas utilizando un medio sin Xeno se disocian del recipiente de cultivo utilizando una solución de disociación celular sin Xeno adecuada, y se recuperan, después de lo cual entran en contacto con sustancias de reprogramación nuclear y un inhibidor funcional de p53.

(B) Sustancias de reprogramación nuclear

Como se utiliza en el presente documento, "una sustancia de reprogramación nuclear" puede ser un factor o factores proteicos capaces de inducir células iPS a partir de células somáticas o de un ácido nucleico que las codifica (incluyendo formas integradas en un vector). Las sustancias de reprogramación nuclear utilizadas en la presente invención consisten en al menos (a) Oct3/4 o un ácido nucleico que lo codifica, (b) Klf4 o un ácido nucleico que codifica el mismo, (c) Sox2 o un ácido nucleico que codifica el mismo, (d) L-Myc o un ácido nucleico que codifica el mismo, y (f) Lin28 o Lin28B o un ácido nucleico que codifica el mismo, y además se utiliza (e) un inhibidor funcional de p53, según lo definido por las reivindicaciones anexas. Cuando no se utiliza ningún inhibidor funcional de p53 en combinación como también se describe en el presente documento, L-Myc o un ácido nucleico que codifica el mismo, y Lin28 o Lin28b o un ácido nucleico que lo codifica, se combinan como sustancias de reprogramación nuclear adicionales. Las sustancias de reprogramación nuclear utilizadas en la presente invención excluyen a Nanog o a un ácido nucleico que lo codifica. Concretamente, las sustancias de reprogramación nuclear utilizadas se ilustran mediante las siguientes combinaciones (aquí, sólo se muestran los nombres de los factores proteicos):

(1) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc (aquí, Sox2 es reemplazable con Sox1, Sox3, Sox15, Sox17 o Sox1B; Klf4 es reemplazable con Klf1, Klf2 o Klf5), como se describe en este documento

(2) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, SV40 antígeno T grande (en adelante, SV40LT), tal como se describe en el presente documento

(3) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6, tal como se describe en este documento

(4) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E7, tal como se describe en el presente documento

(5) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7, tal como se describe en este documento

(6) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, Bmi1, tal como se describe en el presente documento

(7) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, según se utiliza de conformidad con la presente invención

(8) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, SV40LT, tal como se utiliza de conformidad con la presente invención

(9) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, TERT, SV40LT, tal como se utiliza de conformidad con la presente invención

(10) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, SV40LT, tal como se describe en el presente documento

(11) Oct3/4, Esrrb, Sox2, L-Myc (Esrrb es reemplazable con Esrrg), como se describe en este documento

(12) Oct3/4, Klf4, Sox2, como se describe en el presente documento

(13) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, SV40LT, tal como se describe en el presente documento

(14) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6, tal como se describe en el presente documento

(15) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E7, tal como se describe en el presente documento

(16) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7, tal como se describe en el presente documento

(17) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, bmil, tal como se describe en el presente documento

(18) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, como se describe en el presente documento

- (19) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, SV40LT, tal como se describe en el presente documento
- (20) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, TERT, SV40LT, tal como se describe en el presente documento
- (21) Oct3/4, Klf4, Sox2, SV40LT, como se describe en el presente documento
- (22) Oct3/4, Esrrb, Sox2 (Esrrb es reemplazable con Esrrg), como se describe en este documento

5 En las combinaciones anteriores, Lin28b se puede utilizar en lugar de Lin28. Al utilizar Esrrb o Esrrg [(11) y (22) anterior], Klf4 puede utilizarse en combinación con el mismo.

10 Cualquier combinación que no se encuentre entre (1) y (22) supra, sino que comprenda todos los constituyentes de cualquiera de (1) a (22) y comprenda además alguna otra sustancia elegida opcionalmente también puede incluirse en el ámbito de "sustancias de reprogramación nuclear", tal como se utiliza en el presente documento. Siempre que la célula somática que se somete a una reprogramación nuclear esté expresando endógenamente uno o más de los constituyentes de cualquiera de (1) a (22) supra a un nivel suficiente para causar reprogramación nuclear, también pueden incluirse alguna combinación de sólo los componentes restantes excluyendo a uno o más constituyentes en el ámbito de las "sustancias de reprogramación nuclear" de acuerdo con la presente descripción.

15 De estas combinaciones, 5 factores que consisten en Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28 (Lin28b) y L-Myc son sustancias de reprogramación nuclear utilizadas de acuerdo con la invención. También se prefieren 6 factores que consisten en los 5 factores anteriores y el antígeno adicional de SV40 T grande.

20 La información sobre las secuencias de ratones y cDNA humanas de las sustancias de reprogramación nuclear antes mencionadas está disponible con referencia a los números de adhesión de la NCBI mencionados en el WO 2007/069666 (en la publicación, Nanog se describe como ECAT4). La información de la secuencia del ratón y del cDNA humana sobre Lin28, Lin28b, Esrrb, Esrrg, L-Myc se puede adquirir haciendo referencia a los siguientes números de adhesión de NCBI, respectivamente); los expertos en la técnica son bastante capaces de aislar estos ADNc.

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

25 Se puede preparar un factor proteico para su uso como sustancia de reprogramación nuclear insertando el cDNA obtenido en un vector de expresión apropiado, introduciendo el vector en una célula huésped, y recuperando el factor proteico recombinante de la célula cultivada o su medio condicionado. Entretanto, cuando la sustancia de reprogramación nuclear utilizada es un ácido nucleico que codifica un factor proteico, el cDNA obtenido se inserta en un vector viral, un vector plasmídico, un vector episómico, etc. para construir un vector de expresión, y el vector se somete al paso de reprogramación nuclear.

(c) Método de transferencia de una sustancia de reprogramación nuclear en una célula somática

30 La transferencia de una sustancia de reprogramación nuclear en una célula somática se puede lograr utilizando un método conocido per se para la transferencia de proteínas en células, siempre que la sustancia sea un factor proteico. Estos métodos incluyen, por ejemplo, el método que utiliza un reactivo de transferencia de proteínas, método que utiliza un dominio de transferencia de proteínas (PTD) o péptido de penetración de células (CPP) proteína de fusión, método de microinyección y otros semejantes. Los reactivos de transferencia de proteínas están disponibles comercialmente, incluidos los que se basan en un lípido catiónico, como el reactivo de administración de proteínas BiOPOTER (Gene Therapy Systems), el reactivo de transfección de proteínas Pro-Ject™ (PIERCE) y el ProVectin (IMGENEX); los que se basan en lípidos, como Profect-1 (Targeting Systems); los que se basan en un péptido permeable a la membrana, como el péptido Penetrain (Q biogene) y el kit Chariot (Active Motif), GenomONE (ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.) que utilizan la cobertura HVJ (virus hemaglutinante inactivado de Japón) y otros semejantes. La transferencia puede lograrse por los protocolos asociados a estos reactivos, siendo un procedimiento común el que se describe a continuación. La sustancia o las sustancias de reprogramación nuclear se diluyen en un disolvente adecuado (p. ej., una solución tampón como PBS o HEPES), se añade un reactivo de transferencia, la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante unos 5 a 15 minutos para formar un complejo, este complejo se añade a células después de intercambiar el medio con un medio sin suero, y las células se incuban a 37°C durante una a varias horas. A partir de entonces, el medio se retira y se sustituye por un medio que contiene suero.

Los PTD desarrollados incluyen aquellos que usan dominios transcelulares de proteínas como la AntP derivada de Drosophila, TAT derivado del VIH (Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988) o Green, M. & Loewenstein, P. M. Cell 55, 1179-88 (1988)), Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994)), Buforin II (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000)), Transportan (Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998)), MAP (péptido anfipático modelo) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998)), K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995)), Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003)), Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Commun. 299, 85-90 (2002)), pVEC (Elmquist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001)), Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001)), Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002)), SynBl (Rousselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000)), HN-I (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000)) y VP22 derivado de HSV. Los CPP derivados de los PTD incluyen poliargininas como 11R (Cell Stem Cell, 4, 472-476 (2009)) y 9R (Cell Stem Cell, 4, 472-476 (2009)).

Se prepara un vector de expresión de proteína fusionada que incorpora cDNA de una sustancia de reprogramación nuclear y una secuencia PTD o CPP, y la expresión de recombinación se realiza utilizando el vector. La proteína fusionada se recupera y se utiliza para la transferencia. La transferencia se puede realizar de la misma manera que lo anterior, salvo que no se añade ningún reactivo de transferencia de proteínas.

La microinyección, un método para colocar una solución proteica en una aguja de vidrio con un diámetro de punta de aproximadamente 1 μm, e inyectar la solución en una célula, asegura la transferencia de la proteína a la célula.

La operación de transferencia de proteínas se puede realizar en una o más veces elegidas opcionalmente (por ejemplo, una vez o más a 10 veces o menos, o una vez o más a 5 veces o menos, etc.) Preferiblemente, la operación de transferencia se puede realizar dos veces o más (por ejemplo, 3 veces o 4 veces) repetidamente. El intervalo de tiempo para la operación de transferencia repetida es, por ejemplo, de 6 a 48 horas, preferiblemente de 12 a 24 horas.

Sin embargo, teniendo en cuenta la eficacia del desarrollo de las células iPS, la sustancia de reprogramación nuclear puede utilizarse preferentemente en forma de ácido nucleico que codifica un factor proteico, en lugar del factor tal como es. El ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN, o una quimera de ADN/ARN, y puede ser de doble cadena o de una sola hebra. Preferentemente, el ácido nucleico es un ADN de doble cadena, particularmente un ADNc.

Un ADNc de una sustancia de reprogramación nuclear se inserta en un vector de expresión adecuado que comprende un promotor capaz de funcionar en una célula somática huésped. Los vectores de expresión útiles incluyen, por ejemplo, vectores virales como los retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno asociado, virus del herpes y el virus de Sendai, los plásmidos para la expresión en las células animales (p. ej., pAI-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pADNcl/neo), etc.

El tipo de vector que se utilizará se puede elegir según corresponda de acuerdo con el uso previsto de la célula iPS que se obtendrá. Los vectores útiles incluyen el vector de adenovirus, vector plasmídico, vector de virus adeno-asociado, vector retroviral, vector lentiviral, vector del virus de Sendai, vector episómico, etc.

Algunos ejemplos de promotores utilizados en los vectores de expresión son el promotor EF1α, el promotor de CAG, el promotor de SRα, el promotor SV40, el promotor de LTR, el promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor del RSV (virus del sarcoma de Rous), el LTR de MoMuLV (virus de la leucemia de ratones Moloney), el promotor de HSV-TK (virus timidina quinasa del herpes simple) y otros como, con preferencia dada al promotor EF1α, el promotor de CAG, el LTR de MoMuLV, el promotor de CMV, el promotor de SRα, etc.

El vector de expresión puede contener, según se deseé, además de un promotor, un potenciador, una señal de poliadenilación, un gen marcador seleccionable, un origen de replicación SV40, etc. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen el gen dihidrofolato reductasa, el gen resistente a la neomicina, el gen resistente a la puromicina, etc.

Los ácidos nucleicos que son sustancias de reprogramación nuclear (genes de reprogramación) pueden integrarse por separado en diferentes vectores de expresión, o 2 o más, preferiblemente de 2 a 3, diferentes genes pueden integrarse en un vector de expresión única. Se da preferencia al primer caso con el uso de un vector retroviral o lentiviral, que ofrecen una alta eficiencia de transfección, y en este último caso con el uso de un plásmido, adenovirus, o vector episómico, etc. Además, puede utilizarse en combinación un vector de expresión que incorpore dos o más genes diferentes y otro vector de expresión que incorpore un solo gen.

En el contexto anterior, cuando se integra una pluralidad de genes de reprogramación [por ejemplo, 2 o más, preferiblemente 2 ó 3 genes diferentes, seleccionados entre Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28 (Lin28b) y SV40LT] en un vector de expresión, estos genes pueden ser preferiblemente integrados en el vector de expresión mediante una secuencia que permita la expresión policistrónica. Mediante el uso de una secuencia que permite la expresión policistrónica, es posible expresar más eficientemente una pluralidad de genes integrados en un vector de expresión. Las secuencias útiles que permiten la expresión policistrónica incluyen, por ejemplo, la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa (SEQ ID NO: 63; PLoS ONE 3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007), la secuencia de la IRES (Patente de EE.UU. No. 4.937.190), etc., dándose preferencia a la secuencia 2A. Cuando se inserta una pluralidad de genes de reprogramación en un vector de expresión según se une policistrónicamente, el orden de los genes de reprogramación no está particularmente limitado; por ejemplo, (i) Sox2 y Klf4, (II) L-Myc y Lin28 (Lin28b), (III) Klf4,

Sox2 y Oct3/4 se pueden unir en este orden en la orientación de 5' a 3'.

Un vector de expresión que está albergando un gen de reprogramación puede introducirse en una célula mediante las técnicas propiamente conocidas según la elección del vector. En el caso de un vector viral, por ejemplo, se introduce un plásmido que contiene el ácido nucleico en una célula de empaquetamiento apropiada (p. ej., células Plat-E) o una

5 línea celular complementaria (p. ej., células 293), se recupera el vector viral producido en el sobrenadante de cultivo, y el vector se infecta en una célula mediante métodos adecuados para vectores virales. Por ejemplo, medios específicos que utilizan vectores retrovirales se describen en el documento WO2007/69666, Cell, 126, 663-676 (2006) y Cell, 131, 861-872 (2007). Medios específicos que utilizan vectores lentivirales se describen en Science, 318, 1917-1920 (2007). Cuando se utilizan células iPS como fuentes celulares para medicina regenerativa, la expresión (reactivación) del gen de reprogramación aumenta potencialmente el riesgo de carcinogénesis en los tejidos regenerados a partir de las células diferenciadas derivadas de las células iPS; por lo tanto, los genes de reprogramación se expresan preferentemente de manera temporal, sin estar integrados en el cromosoma de las células. Desde este punto de vista, se prefiere el uso de vectores adenovirales, cuya integración en el cromosoma es poco común. Medios específicos que utilizan vectores adenovirales se describen en Science, 322, 945-949 (2008).

10 15 Debido a que los vectores virales adeno-asociados también tienen baja frecuencia de integración en los cromosomas, y es menor que en los vectores adenovirales en términos de citotoxicidad e inducibilidad de la inflamación, pueden ser mencionados como otros vectores preferidos. Debido a que el vector viral de Sendai es capaz de estar presente de manera estable fuera del cromosoma, y puede degradarse y eliminarse usando un siRNA según sea necesario, también se utiliza preferentemente. Con respecto a un vector viral de Sendai, se puede utilizar uno descrito en J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007), Proc. Jpn. Acad., Ser. B 85, 348-362 (2009) o el documento JP-B-3602058.

20 25 Cuando se utiliza un vector retroviral o un vector lentiviral, incluso si se ha producido silenciamiento del transgén, es posible que se vuelva a activar; por lo tanto, por ejemplo, se puede utilizar un método preferiblemente en el que un ácido nucleico que codifica una sustancia de reprogramación nuclear se recorta utilizando el sistema Cre-loxP, cuando se vuelve innecesario. Es decir, con secuencias loxP dispuestas en ambos extremos del ácido nucleico por adelantado, se inducen las células iPS, a partir de entonces la recombinasa Cre puede actuar sobre las células utilizando un vector plasmídico o un vector adenoviral, y la región intercalada por las secuencias loxP se puede recortar. Debido a que la secuencia potenciador-promotor de la región LTR U3 posiblemente estimula un gen huésped en la vecindad de la misma por mutación de inserción, es más preferible evitar la regulación de la expresión del gen endógeno por el LTR fuera de la secuencia loxP permaneciendo en el genoma sin ser recortado, usando un LTR 3'-autoinactivado (SIN) preparado eliminando la secuencia, o sustituyendo la secuencia con una secuencia de poliadenilación como la de SV40. Los medios específicos que utilizan el sistema Cre-loxP y SIN LTR se describen en Chang et al., Stem Cells, 27:1042-1049 (2009).

30 35 Al mismo tiempo, siendo vectores no virales, los vectores plasmídicos pueden ser transferidos a células usando los métodos de lipofección, con liposomas, electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, con dextrano DEAE, por microinyección, mediante pistola génica, etc. Medios específicos que utilizan plásmidos como vectores se describen, por ejemplo, en Science, 322, 949-953 (2008), etc.

40 45 Cuando se utiliza un vector plasmídico, un vector de adenovirus, etc., la transfección se puede realizar una vez o más veces elegidas opcionalmente (por ejemplo, de una vez a 10 veces, de una vez a 5 veces o similares). Cuando se introducen dos o más tipos de vectores de expresión en una célula somática, es preferible que todos estos tipos de vectores de expresión se introduzcan simultáneamente en la célula somática; sin embargo, incluso en este caso, la transfección se puede realizar una vez o más veces elegidas opcionalmente (por ejemplo, de una vez a 10 veces, de una vez a 5 veces o similares), preferiblemente la transfección se puede realizar repetidamente dos veces o más (por ejemplo, 3 veces o 4 veces).

50 55 También cuando se utiliza un adenovirus o un plásmido, el transgén puede integrarse en el cromosoma; por lo tanto, finalmente es necesario confirmar la ausencia de inserción del gen en el cromosoma mediante transferencia Southern o PCR. Por esta razón, al igual que el sistema Cre-loxP antes mencionado, puede ser ventajoso utilizar un medio en el que el transgén se integre en el cromosoma y a partir de entonces se retira el gen. En otro modo de realización preferido, se puede utilizar un método en el que el transgén se integra en el cromosoma utilizando un transposón y a partir de entonces se permite que una transposasa actúe sobre la célula utilizando un vector plasmídico o un vector adenoviral para eliminar por completo el transgén del cromosoma. Como ejemplos de transposones preferibles, puede ser mencionado el piggyBac, un transposón derivado de un insecto lepidóptero y otros. Los medios específicos que utilizan el transposón de piggybac se describen en Kaji, K. et al., Nature, 458:771-775 (2009), Wolijen et al., Nature, 458:766-770 (2009).

60 65 Otro vector del tipo no-integración preferible es un vector episómico, que es capaz de autorreplicarse fuera del cromosoma. Los medios específicos que utilizan vectores episómicos se describen en Yu et al., Science, 324, 797-801 (2009). En una realización particularmente preferida de la presente invención, se puede utilizar un vector episómico que tiene secuencias loxP colocadas en la misma orientación en los lados 5' y 3' del componente vectorial esencial para la replicación del vector episómico. Debido a que los vectores episómicos son capaces de autorreplicarse fuera del cromosoma, se puede garantizar una expresión génica estable en la célula huésped, incluso si estos no están integrados en el genoma. Es deseable, sin embargo, que el vector sea retirado rápidamente una vez que se desarrollan las células iPS. Es posible hacer que el vector episómico pierda su potencial de auto-replicación

flanqueando un componente vectorial esencial para la replicación del vector episómico entre dos secuencias loxP, y cortando el componente vectorial por la acción de recombinasa Cre, mediante la cual el vector puede ser forzado a extenderse precozmente a partir de la célula iPS.

- 5 Ejemplos de vectores episómicos que se utilizarán en la presente invención incluyen vectores que comprenden como componente vectorial una secuencia derivada de EBV, SV40 y similares, necesaria para la autorreplicación. El componente vectorial necesario para la autorreplicación se ilustra específicamente con un origen de replicación y un gen que codifica una proteína que se une al origen de replicación para controlar la replicación; ejemplos incluyen el origen de replicación oriP y el gen EBNA-1 para EBV, y el origen de replicación ori y el gen SV40 de antígeno T grande para SV40.
- 10 El vector de expresión episómico comprende un promotor que controla la transcripción de los genes de reprogramación. El promotor utilizado puede ser como se describió anteriormente. El vector de expresión episómico puede contener además, según se desee, un potenciador, una señal de poliadenilación, un gen marcador de selección, etc., como se describió anteriormente. Algunos ejemplos del gen marcador de selección son el gen de la dihidrofolato reductasa, el gen de la resistencia a la neomicina, etc.
- 15 Las secuencias loxP útiles en la presente invención incluyen, además de la secuencia loxP natural derivada del bacteriófago P1 (SEQ ID NO: 29), secuencias loxP mutantes opcionalmente elegidas capaces de eliminar la secuencia flanqueada por la secuencia loxP por recombinación cuando se colocan en la misma orientación en posiciones flanqueantes de un componente vectorial necesario para la replicación del gen de reprogramación. Ejemplos de tales secuencias mutantes loxP incluyen lox71 (SEQ ID NO: 30), mutadas en la repetición 5', lox66 (SEQ ID NO: 31), mutadas en la repetición 3', y lox2272 y lox511, mutadas en la porción espaciadora. Aunque las dos secuencias loxP colocadas en los lados 5' y 3' del componente vectorial pueden ser idénticas o no, las dos secuencias mutantes loxP mutadas en la porción espaciadora deben ser idénticas (por ejemplo, un par de secuencias lox2272, un par de secuencias lox511). Se da preferencia a una combinación de una secuencia loxP mutante mutada en la repetición 5' (por ejemplo, lox71) y una secuencia loxP mutante mutada en la repetición 3' (por ejemplo, lox66). En este caso, las secuencias loxP que permanecen en el cromosoma tienen mutaciones dobles en las repeticiones en el lado 5' y 3' como consecuencia de la recombinación, y por lo tanto es poco probable que sean reconocidas por la recombinasa Cre, reduciendo así el riesgo de causar una mutación de eliminación en el cromosoma debido a una recombinación no deseada. Cuando las secuencias mutantes loxP lox71 y lox66 se usan en combinación, cada una puede colocarse en cualquiera de los lados 5' y 3' del componente vectorial mencionado anteriormente, pero es necesario que las secuencias mutantes loxP se inserten en una orientación de tal manera que los sitios mutados se ubicarán en los extremos exteriores de las respectivas secuencias loxP. Aunque un vector episómico preferido de la presente invención es un vector de auto-eliminación que se desprende temprano de la célula incluso sin ser actuado por CRE recombinasa, hay casos excepcionales en los que se toma más tiempo para que el vector episómico sea retirado de la célula. Por lo tanto, es preferible que las secuencias loxP se diseñen en la preparación para minimizar riesgos como la recombinación no deseada debido al tratamiento con recombinasa Cre.
- 30 Cada una de las dos secuencias loxP se coloca en la misma orientación en los lados 5' y 3' de un componente vectorial esencial para la replicación del gen de reprogramación (es decir, un origen de replicación, o una secuencia génica que codifica una proteína que se une al origen de replicación para controlar la replicación). El componente vectorial flanqueado por las secuencias loxP puede ser el origen de replicación o una secuencia génica que codifica una proteína que se enlaza a un origen de replicación para controlar la replicación, o ambas.
- 35 Para aumentar la estabilidad del ARN, el vector episómico o vector plasmídico puede, por ejemplo, tener la secuencia del elemento regulador postranscripcional (WPRE) del virus de la hepatitis de la marmota insertada entre la región de codificación del factor de reprogramación y la señal de poliadenilación.
- 40 El vector epidémico permite introducir el vector en la célula utilizando, por ejemplo, los métodos de lipofección, con liposomas, electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, con dextrano DEAE, microinyección, con pistola génica, etc. Concretamente, por ejemplo, se pueden utilizar los métodos descritos en Science, 324:797-801 (2009) y en otras referencias.
- 45 Se puede confirmar si el componente vectorial necesario para la replicación del gen de reprogramación se ha eliminado de la célula iPS realizando un análisis de la transferencia Southern o un análisis PCR utilizando un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos en el componente vectorial y/o en las proximidades de la secuencia loxP como una sonda o cebador, con la fracción episómica aislada de la célula iPS como plantilla, y determinando la presencia o ausencia de una banda o la longitud de la banda detectada. La fracción episómica puede ser preparada por un método obvio en la técnica; por ejemplo, se pueden utilizar los métodos descritos en Science, 324:797-801 (2009) y en otras referencias.
- 50 Como se indica en un ejemplo a continuación, algunos de los vectores episómicos que contienen secuencias loxP, proporcionados por la presente invención, exhiben no sólo el efecto esencial de cualquier vector episómico en el que los factores de ácido nucleico exógeno (incluidos los genes de reprogramación) que constituyen el vector no están integrados, ni siquiera temporalmente, en el genoma de la célula, sino también un efecto inesperado en el que el vector en forma de un episoma se desprende pronto de la célula iPS, sin ser tratado con recombinasa Cre, cuando se

transfiere a un célula somática. En consecuencia, la presente invención también proporciona una retirada del vector episómico auto-eliminado de la célula pronto, después de ofrecer un nivel de la expresión de los factores de reprogramación suficiente para el desarrollo de una célula iPS. Este vector se caracteriza porque se desprende de la célula iPS en el 5º paso a una frecuencia de 50% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 70% o

5 más. Alternativamente, el vector episómico de autoeliminación se caracteriza porque el número de copias por 1×10^4 células en 1 semana después de la transferencia está en el orden de 10^6 células, mientras que el vector es inestable en las células en la medida en que el número de copias por 1×10^4 células en el momento del desarrollo de la célula iPS (por ejemplo, aproximadamente 4 semanas después de la transferencia vectorial) disminuye a 100 o menos, preferiblemente 50 o menos, más preferiblemente 30 o menos.

10 Concretamente, el vector de autoeliminación precoz de la presente invención tiene al menos uno, preferiblemente dos o más, preferiblemente tres o más, especialmente preferentemente todos, de las siguientes características estructurales (i) a (iv).

15 (i) Dos secuencias loxP se colocan en la misma orientación en los lados 5' y 3' de un componente vectorial esencial para la replicación del vector episómico (por ejemplo, gen EBNA-1 y gen antígeno T grande SV40, preferentemente el gen EBNA-1).

(II) El ácido nucleico que codifica el factor de reprogramación está bajo el control del promotor de CAG.

15 (III) El ácido nucleico que codifica el factor de reprogramación está bajo el control de la señal de poliadenilación de β-globina en conejo.

20 (IV) La secuencia WPRE está presente entre el ácido nucleico que codifica el factor de reprogramación y la señal de poliadenilación.

(D) Inhibidores funcionales de p53

En la presente invención, además de las sustancias de reprogramación nuclear descritas anteriormente, se entra en contacto con la célula de partida un inhibidor funcional de p53. Como se menciona en el presente documento, "un inhibidor de la función de p53" puede ser cualquier sustancia capaz de inhibir (a) la función de la proteína p53 o (b) la expresión del gen p53. Es decir, no sólo las sustancias que actúan directamente sobre la proteína p53 inhiben su función y las sustancias que actúan directamente sobre el gen p53 inhiben su expresión, sino también las sustancias que actúan sobre un factor implicado en la transducción de señales de p53 dan lugar a una inhibición de la función de la proteína p53 o la expresión del gen p53, también se incluyen en el alcance de "inhibidores de la función p53" como se menciona en el presente documento. Preferiblemente, el inhibidor funcional de p53 es una sustancia que inhibe la expresión del gen p53, más preferiblemente un vector de expresión que codifica un siRNA o shRNA contra p53.

30 Los ejemplos de sustancias que inhiben la función de la proteína p53 incluyen, entre otros, un inhibidor químico de p53, un mutante negativo dominante de p53 o un ácido nucleico que codifica el mismo, un anticuerpo antagonista anti-p53 o un ácido nucleico que codifica el mismo, un ácido nucleico señuelo que comprende una secuencia consenso de un elemento sensible a p53, una sustancia que inhibe la vía de p53, etc. Preferiblemente, se puede mencionar un inhibidor químico de p53, un mutante negativo dominante de p53 o un ácido nucleico que lo codifique, y un inhibidor de la ruta de p53.

(D1) Inhibidores químicos de p53

40 Los ejemplos de inhibidores químicos de p53 incluyen, entre otros, inhibidores de p53 tipificados por pifitrina (PFT)-α y -β, que se describen en el documento WO 00/44364, PFT-μ descrito en Storm et al. (Nat. Chem. Biol. 2, 474 (2006)), los análogos de los mismos y sus sales (por ejemplo, sales de adición ácida como hidrocloruros e hidrobromuros, etc. De estos, PFT-α y los análogos de los mismos [2-(2-imino-4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazol-3-il)-1-p-toliletanona, HBr (nombre del producto: Pifitrina-α) y 1-(4-nitrofenil)-2-(4,5,6,7-tetrahidro-2-imino-3(2H)-benzotiazolil)etanona, HBr (nombre del producto: Pifitrina-α, p-nitro)], PFT-β y análogos de los mismos [2-(4-metilfenil)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahidrobenzotiazol, HBr (nombre del producto: Pifitrina-α, cíclico) y 2-(4-nitrofenil)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahidrobenzotiazol (nombre del producto: Pifitrina-α, p-nitro, cíclico)], y PFT-μ [Fenilacetilenilsulfonamida (nombre del producto: Pifitrina-μ)] están disponibles comercialmente en Merck.

45 El contacto de un inhibidor químico de p53 con una célula somática se puede realizar disolviendo el inhibidor a una concentración adecuada en un disolvente acuoso o no acuoso, añadiendo la solución del inhibidor en un medio adecuado para el cultivo de células somáticas aisladas de un ser humano o ratón (por ejemplo, medio esencial mínimo (MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio RPMI1640, medio 199, medio F12, etc. suplementado con aproximadamente suero bovino fetal del 5 al 20%) para que la concentración de inhibidor se encuentre en un intervalo que inhiba completamente la función p53 y no cause citotoxicidad, y el cultivo de las células durante un período determinado. La concentración de inhibidor varía dependiendo del tipo de inhibidor utilizado, y se elige como apropiado sobre el intervalo de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 100 nM. La duración del contacto no es particularmente limitada, en la medida en que sea suficiente para lograr la reprogramación nuclear de las células; generalmente, se puede permitir que el inhibidor se encuentre presente también en el medio hasta que surja una colonia positiva.

El gen p53 se conoce como un gen supresor tumoral; la inhibición permanente de la función p53 aumenta potencialmente el riesgo de carcinogénesis. Los inhibidores químicos de p53 son útiles, no sólo por la ventaja de permitir la introducción en las células simplemente por la adición al medio, sino también por la capacidad de terminar la inhibición de la función p53, fácil y rápidamente, eliminando el medio que contiene el inhibidor después de la inducción de las células iPS.

5

(D2) Mutantes negativos dominantes de p53

La elección del mutante negativo dominante de p53 no está particularmente limitada, en la medida en que el mutante es capaz de actuar competitivamente contra la proteína p53 natural expresada endógenamente en células somáticas para inhibir la función de la misma; por ejemplo, se pueden mencionar p53P275S, resultante de la mutación puntual de la prolina en la posición 275 (en el caso de los seres humanos, posición 278) ubicada en la región de unión al ADN de p53 de ratón a serina (de Vries, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 2948-2953 (2002)); p53DD, resultante de la eliminación de los aminoácidos en las posiciones 14-301 del p53 de ratón (en p53 humano, corresponde a las posiciones 11-304) (Bowman, T., Genes Develop., 10, 826-835 (1996)), etc. Otros mutantes conocidos incluyen, por ejemplo, p53S58A, resultado de la mutación puntual de la serina en la posición 58 del p53 de ratón (en el caso de los seres humanos, posición 61) a alanina; p53C135Y, resultante de la mutación de punto de la cisteína en la posición 135 del p53 humano (en el caso de los ratones, posición 132) a tirosina; p53A135V, resultante de la mutación puntual de la alanina en la posición 135 del p53 de ratón (en el caso de los seres humanos, posición 138) a valina; p53R172H, resultante de la mutación de punto de la arginina en la posición 172 (en el caso de los seres humanos, posición 175) a histidina; p53R270H, resultante de la mutación de punto de la arginina en la posición 270 (en el caso de los seres humanos, posición 273) a histidina; p53D278N, resultante de la mutación puntual del ácido aspártico en la posición 278 del p53 de ratón (en el caso de los seres humanos, posición 281) a la asparagina, etc.; se pueden utilizar de la misma manera.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Un mutante negativo dominante de p53 se puede obtener, por ejemplo, mediante la técnica descrita a continuación. En primer lugar, se sintetiza un oligonucleótido apropiado como sonda o cebador con respecto a la información de la secuencia del ADNc de p53 de ratón o humana mostrada por SEQ ID NO: 1 ó 3, y se clona un ADNc de p53 de ratón o humano a partir de una biblioteca ARNm, ADNc o ADNc derivada de una célula de ratón o humana o tejido, utilizando el método de hibridación o el método PCR (RT), y se subclona en un plásmido adecuado. En una forma en la que un codón del sitio en el que se va a introducir una mutación (por ejemplo, en el caso de p53P275S, cct, que se muestra por los números de nucleótidos 951-953 en la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 1) se sustituye por un codón que codifica otro aminoácido deseado (por ejemplo, en el caso de p53P275S, tct), se sintetiza un cebador que comprende el sitio, y la PCR inversa se realiza utilizando este cebador con el plásmido incorporando el ADNc de p53 como plantilla, mediante el cual es adquirido un ácido nucleico que codifica el mutante negativo dominante deseado. En el caso de un mutante de eliminación como p53DD, puede diseñarse un cebador fuera del sitio para ser eliminado, y la PCR inversa se puede realizar como se describió anteriormente. Al introducir el ácido nucleico así obtenido que codifica el mutante negativo dominante en una célula huésped, y recuperar una proteína recombinante de la célula cultivada o de su medio condicionado, se puede adquirir el mutante negativo dominante deseado.

El contacto de un mutante negativo dominante con una célula somática puede lograrse de la misma manera que con las sustancias de reprogramación nuclear proteíticas arriba descritas. Como se describió anteriormente, la inhibición permanente de la función p53 potencialmente aumenta el riesgo de carcinogénesis. Sin embargo, debido a que el mutante negativo dominante de p53 sufre degradación por proteasa y desaparece gradualmente en la célula transfeccionada, y como consecuencia restaura la función de p53 endógenamente expresada en la célula, el uso de la proteína mutante puede ser adecuado en los casos en que se requiere una alta seguridad como en la utilización de las células iPS con fines terapéuticos.

(D3) Ácidos nucleicos que codifican los mutantes negativos dominantes de p53

45

50

55

En otro modo de realización preferido de la presente invención, el inhibidor de la función p53 es un ácido nucleico que codifica un mutante negativo dominante de p53. El ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN, o una quimera de ADN/ARN, y es preferiblemente un ADN. El ácido nucleico puede ser de doble cadena o de una sola hebra. Un ADNc que codifica un mutante negativo dominante de p53 puede ser clonado por la técnica descrita anteriormente con respecto a la preparación de la proteína mutante.

El ADNc así aislado, al igual que los ácidos nucleicos antes mencionados, que son sustancias de reprogramación nuclear (genes de reprogramación), puede insertarse en un vector de expresión apropiado y transferirse a una célula somática.

(D4) Inhibidores de la ruta p53

55

En este documento, la expresión ruta p53 se utiliza con un significado que incluye todas las cascadas de señal ascendente que pueden activar p53 y todas las cascadas de señales descendentes mediadas por el p53 activado. Por lo tanto, los inhibidores de la ruta p53 incluyen todas las sustancias que inhiben cualquiera de las vías de transducción de señal antes mencionadas, pero en un modo de realización preferido, el inhibidor de la ruta p53 es una sustancia que inhibe la expresión o función (actividad inhibitoria de Myc) de p21, cuya transcripción es activada por p53; por

ejemplo, se puede mencionar siRNA, shRNA, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas contra p21, etc. Estos ácidos nucleicos que inhiben la expresión de p21 se pueden diseñar y sintetizar de la misma manera que el método para siRNA, shRNA, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas contra p53 descritos a continuación, y se pueden introducir en una célula somática. Los ácidos nucleicos pueden proporcionarse en forma de un vector que los exprese, el vector 5 se puede construir de la misma manera que el método para un vector que exprese un siRNA, shRNA, ácido nucleico antisentido, o ribozima contra p53 descrito a continuación, y ser introducido en una célula somática.

En otro modo de realización preferido, pueden ser mencionados el inhibidor de la ruta p53 es una sustancia que inhibe 10 la ruta ARF-MDM2-p53; por ejemplo, como los inhibidores de la ruta ARF-MDM2-p53, MDM2, que se unen directamente a p53 para promover la exportación nuclear o su ubiquitinación o un ácido nucleico que lo codifica, una sustancia que inhibía la expresión o función de p19^{ARF} o ATM (ataxia-telangiectasia mutada), que inhibe la acción de MDM2 en p53, (por ejemplo, siRNA y shRNA contra estos factores), etc.

(D5) Otras sustancias

Como ejemplos de otras sustancias que inhiben la función de la proteína p53, se puede mencionar el anticuerpo 15 antagonista anti-p53 o un ácido nucleico que lo codifica. El anticuerpo antagonista anti-p53 puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. El isótipo del anticuerpo no está particularmente limitado, y es preferiblemente IgG, IgM o IgA, particularmente preferentemente IgG. El anticuerpo puede ser, además de una molécula de anticuerpos completa, por ejemplo, un fragmento como Fab, Fab', o F(ab')₂, una molécula conjugada preparada por una técnica de ingeniería genética, como scFv, scFv-Fc, minicuerpo, o diacuerpo, o sus derivados, modificada con un molécula con acción estabilizante de proteínas, como el polietilenglicol (PEG). Se puede producir un anticuerpo 20 antagonista anti-p53 utilizando p53 o un péptido parcial del mismo como antígeno, mediante métodos de producción de anticuerpos o antisérulos propiamente conocidos. Como ejemplos de anticuerpos antagonistas anti-p53 conocidos, pueden ser mencionados PAb1801 (Oncogene Science Ab-2) y DO-1 (Oncogene Science Ab-6) (Gire y Wynford-Thomas, Mol. Cell Biol., 18, 1611-1621 (1998)), etc. El ácido nucleico que codifica el anticuerpo antagonista anti-p53 25 puede aislarse de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-p53 por métodos convencionales. Los genes de cadena H y de cadena L obtenidos se pueden unir para preparar un ácido nucleico que codifique un anticuerpo de cadena única.

Como otra sustancia que inhibe la función de la proteína p53, se puede mencionar un anticuerpo antagonista anti-p21 o un ácido nucleico que lo codifique. Un anticuerpo antagonista anti-p21 y un ácido nucleico que lo codifique también se pueden preparar como con el anticuerpo antagonista anti-p53 antes mencionado y el ácido nucleico que lo codifica.

30 Otra sustancia más que inhibe la función de la proteína p53 es un ácido nucleico señuelo que comprende una secuencia consenso del elemento sensible a p53 (p. ej., Pu-Pu-Pu-G-A/T-T/A-C-Py-Py-Py (Pu: base purina, Py: base pirimidina); SEQ ID NO: 27. Tal ácido nucleico puede ser sintetizado con respecto a la información de la secuencia de nucleótidos antes mencionada utilizando un sintetizador de ADN/ARN automatizado. Alternativamente, este tipo de ácido nucleico señuelo está disponible comercialmente (p. ej., el señuelo del factor de transcripción de p53 35 (GeneDetect.com)).

Un anticuerpo antagonista anti-p53 y un anticuerpo antagonista anti-p21, o un ácido nucleico que codifica el anticuerpo se pueden introducir en una célula con el método descrito en la declaración de un mutante negativo dominante de p53 o un ácido nucleico que codifica el mutante, respectivamente. El ácido nucleico señuelo antes mencionado se puede introducir en una célula por el método de la lipofección, etc.

40 No obstante, como ejemplos de sustancias que inhiben la expresión del gen p53, siRNA o shRNA contra p53, pueden ser mencionados vectores que expresan un siRNA o shRNA contra p53, ácidos nucleicos antisentido contra p53 y ribozimas frente a p53, etc., y siRNA y shRNA contra p53 y los vectores que expresan un siRNA o un shRNA son preferibles.

(D6) siRNA y shRNA contra p53

45 Un siRNA contra p53 puede diseñarse con respecto a la información de la secuencia del ADNc de p53 de ratón o humana mostrada en SEQ ID NO: 1 ó 3, de acuerdo, por ejemplo, con las reglas propuestas por Elbashir et al. (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)). La secuencia diana para el siRNA es, como regla general, AA+(N)₁₉, pero puede ser AA+(N)₂₁ o NA+(N)₂₁. El extremo 5' de la hebra de sentido no tiene que ser AA. Aunque la posición de la secuencia diana 50 no está particularmente limitada, es deseable que la secuencia diana sea seleccionada de una región que no sea 5'-UTR, unas 50 bases desde el codón de inicio, o 3'-UTR. El contenido de GC de la secuencia diana tampoco está particularmente limitado, pero el contenido es preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 50%; es deseable una secuencia sin irregularidad en la distribución GC y con sólo unas cuantas repeticiones. Cuando un promotor polIII se utiliza como promotor en el diseño de un vector que expresa un siRNA o shRNA de (b2) a continuación, no se debe elegir una secuencia de 4 o más bases T o A, a fin de evitar la transcripción de la polimerasa.

55 Los candidatos a la secuencia diana seleccionados con respecto a las reglas descritas anteriormente se examinan para determinar su homología con las secuencias de 16-17 bases en sucesión en ARNm que no sean dianas, utilizando un programa de software de búsqueda de homología como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), con el fin de confirmar la especificidad de las secuencias diana seleccionadas. Para las secuencias diana para las que

se ha confirmado la especificidad, se diseña como un siRNA un ARN de doble cadena que consiste en una hebra de sentido que tiene un saliente del extremo 3'-terminal de TT o UU en 19-21 bases después de AA (o NA) y una hebra antisentido que tiene una secuencia complementaria a las 19-21 bases y un saliente del extremo 3'-terminal de TT o UU. Además, puede diseñarse un shRNA eligiendo según corresponda una secuencia enlazante elegida opcionalmente capaz de formar una estructura de bucle (por ejemplo, de aproximadamente 8-25 bases), y ligando la hebra sentido y antisentido antes mencionada a través de la secuencia enlazante.

Las secuencias de siRNA y/o shRNA se pueden buscar utilizando programas de software de búsqueda disponibles sin coste en varios sitios Web. Ejemplos de tales sitios incluyen, entre otros, el localizador de dianas siRNA (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) y la herramienta de diseño de inserción para el vector de expresión pSilencer™ (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.htm 1), ambos proporcionados por Ambion, y GeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>), proporcionado por el Codex de RNAi; y una búsqueda similar es posible en los sitios web de QIAGEN, Takara Bio, SiSearch, Dharmacon, Whitehead Institute, Invitrogen, Promega y similares.

A continuación se muestran las secuencias de shRNA contra p53 de ratón diseñadas utilizando programas de software disponibles en los sitios web de AMBION (SEQ ID NO: 5-24) y el Codex de RNAi (SEQ ID NO: 25 y 26). Las secuencias subrayadas son hebras de sentido (lado 5') y hebras antisentido (lado 3') de dsRNAs resultantes después de la división con un dicer (que no contiene el 3'-saliente "TT"). Las letras pequeñas indican una discordancia o un bucle.

[SEQ ID NO: 5] 5'-TTTGACTGGATGACTGCCATGGttaagagaCCATGGCAGTCATCCAGTCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 6] 5'-TTTGATATCCTGCCATCACCTCttaagagaGAGGTGATGGCAGGATATCTTTTT-3'

20 [SEQ ID NO: 7] 5'-TTTGGCCAAGTGAAGGCCCTCttaagagaGGAGGGCTTCACTGGGCCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 8] 5'-TTTGTGAAGCCCTCCGAGTGTCAAGGAGttaagagaGACACTCGGAGGGCTTCACTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 9] 5'-TTTGCCTCCGAGTGTCAAGGAGttaagagaCTCCTGACACTCGGAGGGCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 10] 5'-TTTGTCTGTTATGTGCACGTACttaagagaGTACGTGCACATAACAGACTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 11] 5'-TTTGTACTCTCCCTCCCTCAAtttaagagaATTGAGGGGAGGAGAGTACTTTTT-3'

25 [SEQ ID NO: 12] 5'-TTTGCTATTCTGCCAGCTGGCGttaagagaCGCCAGCTGGCAGAATAGCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 13] 5'-TTTGACGTGCCCTGTGCAGTTttaagagaCAACTGCACAGGGCACGTCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 14] 5'-TTTGAAGTCACAGCACATGACGttaagagaCGTCATGTGCTGTGACTTCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 15] 5'-TTTGTACAGCACATGACGGAGttaagagaCTCCGTATGTGCTGTGACTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 16] 5'-TTTGGAAATTGTATCCGAGTttaagagaACTCGGGATACAAATTCCCTTTTT-3'

30 [SEQ ID NO: 17] 5'-TTTGTACATGTGAATAGCTCttaagagaGGAGCTATTACACATGTACTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 18] 5'-TTTGACTCCAGTGGAACCTCttaagagaGAAGGTTCCCCTGGAGTCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 19] 5'-TTTGTCTTGCCTGAACCTGCttaagagaGCAGTTCAGGGCAAAGGACTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 20] 5'-TTTGATCCGGGGCGTAAACGCttaagagaGCGTTACGCCCGCGGATCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 21] 5'-TTTGACCAAGAAGGCCAGTCTttaagagaAGACTGGCCCTTGGTCTTTTT-3'

35 [SEQ ID NO: 22] 5'-TTTGAAGTGGGCCTGACTCAttcaagagaTGAGTCAGGCCCACTTCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 23] 5'-TTTGTGGGAATAGGTTGATttaagagaTATCACCTATTCCCCAACTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 24] 5'-TTTGATTCTATCTGGGCCCTCttaagagaGAGUGGCCAAGATAGAATCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 25] 5'-TTTGCAGTACAgGTACGtGTGAGtgctgtccTACACATGTACTTGTAGTGTCTTTTT-3'

[SEQ ID NO: 26] 5'-TTTGCAGTuTACTTuCCGCCgTAgtgtgtccTATGGCGGGAAAGTAGACTGTCTTTTT-3'

40 Un siRNA contra p53 se puede preparar mediante la síntesis de un oligonucleótido de cadena sentido y un oligonucleótido de cadena antisentido diseñados como se describió anteriormente utilizando un sintetizador de ADN/ARN automatizado por separado, y, por ejemplo, desnaturizando los oligonucleótidos en un solución tampón de recocido adecuada de aproximadamente 90 a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 1 minuto, y después hibridándolos entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70°C durante aproximadamente 1 y aproximadamente 8 horas. Un shRNA contra p53 se puede preparar mediante la síntesis de oligonucleótidos que

tienen una secuencia de shRNA, diseñado como se describió anteriormente, utilizando un sintetizador de ADN/ARN automatizado, y permitiendo que el mismo se auto-híbride como se describió anteriormente.

Aunque las moléculas de nucleótidos que constituyen el siRNA y el shRNA pueden ser ARN naturales, las moléculas pueden comprender diversas modificaciones químicas para aumentar la estabilidad (química y/o contra la enzima) o la actividad específica (afinidad frente al ARNm). Por ejemplo, para evitar la degradación por hidrolasas como la nucleasa, el residuo de ácido fosfórico (fosfato) de cada nucleótido que constituye el siRNA o el shRNA puede sustituirse, por ejemplo, por un residuo de ácido fosfórico modificado químicamente, como el fosforotioato (PS), metilfosfonato, o fosforoditionato. El grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar (ribosa) de cada nucleótido puede ser reemplazado con -OR (R representa, por ejemplo, CH₃(2'-O-Me), CH₂CH₂OCH₃ (2'-O-MOE), CH₂CH₂NHC (NH) NH₂, CH₂CONHCH₃, CH₂CH₂CN, etc.) Además, una fracción de base (pirimidina, purina) puede modificarse químicamente; por ejemplo, se puede mencionar la introducción de un grupo metilo o un grupo funcional catiónico en la posición 5 de la base de pirimidina, sustitución del grupo carbonílico de la posición 2 con tiocarbonilo, etc.

En cuanto a la conformación de la fracción de azúcar del ARN, dos tipos son dominantes: C2'-endo (tipo S) y C3'-endo (tipo N); en un ARN de una sola hebra, la fracción de azúcar se produce en un equilibrio de ambos, pero cuando se forma una hebra doble, la conformación se fija en el tipo N. Por lo tanto, también se puede utilizar preferentemente BNA (LNA) (Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004) y ENA (Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003), que son derivados de ARN en los que la conformación de la fracción de azúcar se fija en el tipo N mediante el puente de oxígeno de 2' y el carbono de 4' con el fin de conferir una fuerte capacidad de unión al ARN diana.

Sin embargo, debido a que la sustitución de todas las moléculas de ribonucleósido en un ARN natural con moléculas tipo modificadas puede conducir a la pérdida de la actividad del ARNi, es necesario introducir un nucleósido modificado en la mínima medida posible que permita que el complejo RISC funcione.

También se puede comprar un siRNA contra p53, por ejemplo, Ambion (p. ej., Ambion Nº de cat. AM16708, un siRNA Nº de ID 69659, 69753, 69843, 187424, 187425, 187426), Santa Cruz (p. ej., Santa Cruz Nº de cat. SC-29436, 44219), etc.

Un siRNA y un shRNA contra p53 humano también se pueden diseñar y sintetizar utilizando uno de los programas de búsqueda mencionados anteriormente, introduciendo la secuencia del ADNc humano p53 mostrada por SEQ ID NO: 3 o RefSeq. No. (NM_000546) y similares como problema, o también se pueden comprar en Ambion, etc. Concretamente, se puede mencionar un shRNA contra p53 humano que tiene la secuencia 5'-GACTCCAGTGGTAATCTACTGctcgagCAGTAGATTACCACTGGAGTC-3' (SEQ ID NO: 28; la parte subrayada indica la secuencia diana para p53; las letras mayúsculas indican las porciones donde se forma un dsRNA), el shRNA contra p53 descrito en Science, 296, 550-553 (2002), etc.

El contacto de un siRNA o shRNA contra p53 con una célula somática puede lograrse, como en el caso del ADN plásmido, introduciendo el ácido nucleico en la célula utilizando el método de liposomía, método de poliamina, método de electroporación, método de perlas, etc. El método que utiliza un liposoma catiónico es el más común y ofrece una alta eficiencia de transferencia. Además de los reactivos de transfección comunes como Lipofectamine2000 y Oligofectamina (Invitrogen), por ejemplo, los reactivos de transferencia adecuados para la introducción de un siRNA, como el reactivo de transfección de siRNA GeneEraser™ (Stratagene), también están disponibles comercialmente.

(D7) Vectores que expresan un siRNA o shRNA contra p53

Vectores que expresan un siRNA están disponibles en el tipo tandem y el tipo bucle madre (horquilla). El primero es el tipo en el que un casete de expresión para una hebra sentido de un siRNA y un casete de expresión para una hebra antisentido son un tandem ligado, siendo cada hebra expresada en la célula y siendo sometida a hibridación para formar un siRNA de doble cadena (dsRNA). Sin embargo, este último es el tipo en el que se inserta un casete de expresión para un shRNA en un vector, expresándose el shRNA en la célula y sometiéndose a un procesamiento por Dicer para formar un dsRNA. Aunque un promotor polII (por ejemplo, promotor inmediato temprano de CMV) pueda ser utilizado como promotor, es una práctica común utilizar un promotor polIII para permitir la transcripción exacta del ARN corto. Como promotor del polIII, se pueden mencionar los promotores de ratón y humanos U6-snRNA, el promotor H1-RNase P RNA humano, el promotor de valina-tRNA humano, etc. Como señal de terminación de la transcripción, se utiliza una secuencia de 4 o más residuos de T en sucesión.

El casete de expresión de siRNA o shRNA así construido se inserta entonces en un vector plasmídico o un vector viral. Estos vectores que se pueden utilizar preferentemente son los mismos que los mencionados anteriormente en relación con los ácidos nucleicos que son sustancias de reprogramación nuclear (genes de reprogramación) (vectores virales como retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes y virus de Sendai; plásmidos de expresión de células animales; vectores episómicos y otros). Un vector, como los genes de reprogramación, se puede elegir según corresponda de acuerdo con el uso previsto de la célula iPS obtenida. El gen p53 se conoce como un gen de supresión del cáncer, y la inhibición funcional permanente de p53 aumenta potencialmente el riesgo de carcinogénesis. Por lo tanto, teniendo en cuenta la aplicación médica de la célula iPS generada, es deseable que el siRNA o shRNA contra p53 esté diseñado para ser temporalmente expresado en la célula. Por esta razón, se da una mayor preferencia a los vectores plásmicos y a los que son incapaces de autorreplicarse para su uso como vectores

para albergar un ácido nucleico que codifique el siRNA o shRNA contra p53. Cuando se combina con los factores de reprogramación de la presente invención, el siRNA o shRNA contra p53 da una suficiente eficiencia de desarrollo de células iPS incluso en la expresión temporal del plásmido.

Alternativamente, como vector de expresión que codifica el shRNA contra p53, se pueden utilizar también un vector viral de retrovirus o semejantes, un vector plasmídico, un vector episómico y otros, preparado con respecto a un plásmido comercialmente disponible (por ejemplo, pMKO.1-puro p53 shRNA2: Nº. 10672, comercialmente disponible en Addgene, etc. El sistema Cre-loxP o el sistema transposón de piggybac mencionados anteriormente también se pueden utilizar según sean necesarios.

El contacto de un vector que expresa el siRNA o shRNA contra p53 con una célula somática se logra introduciendo un vector plasmídico, vector episómico o vector viral preparado como se describió anteriormente en la célula. Estas transfecciones pueden lograrse mediante las mismas técnicas que las descritas anteriormente con respecto a los genes de reprogramación.

(D8) Otras sustancias

Como otras sustancias que inhiben la expresión del gen p53, pueden mencionarse ácidos nucleicos antisentido y ribozimas contra p53.

El ácido nucleico antisentido puede ser un ADN o un ARN, o una quimera de ADN/ARN. Cuando el ácido nucleico antisentido es un ADN, un híbrido de ARN:ADN formado por un ARN diana y el ADN antisentido es capaz de ser reconocido por la RNasa H endógena, dando origen a una degradación selectiva del ARN diana. Por lo tanto, en el caso de un ADN antisentido que dirija la degradación por la RNase H, la secuencia diana puede ser no sólo una secuencia en el ARNm de p53, sino también una secuencia en la región del intrón de la transcripción primaria del gen p53. La longitud de la región diana para el ácido nucleico antisentido no está particularmente limitada, en la medida en que la hibridación del ácido nucleico antisentido produce una inhibición de la traducción en la proteína p53; la región diana puede ser la secuencia completa o una secuencia parcial de ARNm de p53, y puede ser una secuencia de aproximadamente 15 bases para el más corto, o de toda la secuencia del ARNm o transcripción principal para el más largo. Considerando la facilidad de síntesis, antigenicidad, transferibilidad en células y otros aspectos, es preferible un oligonucleótido que comprenda entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 bases, particularmente aproximadamente de 18 a aproximadamente 30 bases. Las posiciones de la secuencia diana incluyen, entre otras vecindades las 5'-y 3'-UTR del codón de inicio, etc.

Una ribozima se refiere a un ARN que posee cierta actividad enzimática para cortar un ácido nucleico en un sentido directo, y en este sentido se entiende que se utiliza como un concepto que abarca un ADN, en la medida en que posee actividad de escisión de ácido nucleico específica de la secuencia. Uno de los ribozimas más versátiles es un ARN autofusionante que se encuentra en ARN infecciosos tales como viroides y virusoides, y son conocidos el tipo de cabeza de martillo, el tipo de horquilla, etc.. El tipo de cabeza de martillo exhibe actividad enzimática con aproximadamente 40 bases de longitud y es posible cortar específicamente el ARNm diana haciendo que varias bases en ambos extremos adyacentes a la porción de la estructura del cabeza de martillo (aproximadamente 10 bases en total) sean una secuencia complementaria al sitio de división deseado del ARNm.

Un ácido nucleico antisentido o un ribozima pueden ser sintetizados usando un sintetizador de ADN/ARN automatizado. Las moléculas de nucleótido que las constituyen también pueden tener las mismas modificaciones que las descritas anteriormente para siRNA, con el fin de aumentar la estabilidad, la actividad específica y otras.

Alternativamente, el ácido nucleico antisentido o ribozima también se puede utilizar en forma de un ácido nucleico que lo codifica, como en el caso de siRNA.

Un inhibidor de la función de p53 debe ponerse en contacto con una célula somática de una manera suficiente para inhibir la función de p53 en el paso de la reprogramación nuclear de células somáticas. En la medida en que se cumpla este requisito, la sustancia de reprogramación nuclear y el inhibidor de la función p53 pueden ponerse en contacto con la célula somática al mismo tiempo, o bien uno puede ponerse en contacto con antelación. En un modo de realización, por ejemplo, cuando la sustancia de reprogramación nuclear sea un ácido nucleico que codifique un factor proteico, y el inhibidor de la función p53 sea un inhibidor químico, el primero implica un período de tiempo dado del tratamiento de transfección a la expresión de masa del factor proteico, mientras que el último es capaz de inhibir rápidamente la función p53, de modo que después de que la célula sea cultivada durante un período de tiempo dado después del tratamiento de transfección, el inhibidor químico de p53 se puede añadir al medio. En otro modo de realización, por ejemplo, cuando la sustancia de reprogramación nuclear y el inhibidor de la función p53 se utilizan en forma de vectores virales, vectores plasmídicos, vectores episómicos y otros, ambos pueden introducirse simultáneamente en la célula.

(E) Mejoradores de la eficiencia del desarrollo celular iPS

Al poner en contacto, además de un inhibidor de la función p53, otro mejorador de la eficiencia de desarrollo de células iPS generalmente conocido, con una célula somática, se espera un mayor aumento en la eficiencia de desarrollo de las células iPS. Ejemplos de mejoradores de la eficiencia del desarrollo de células iPS incluyen, entre otros, inhibidores

de la histona desacetilasa (HDAC) [por ejemplo, ácido valproico (VPA) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795-797 (2008)), inhibidores de bajo peso molecular como la tricostatina A, butirato de sodio, MC 1293, y M344, inhibidores de la expresión a base de ácido nucleico tales como siRNA y shRNA contra HDAC (por ejemplo, HDAC1 siRNA SmartPool® (Millipore), construcciones HuSH 29mer shRNA contra HDAC1 (OriGene), etc.), etc.], inhibidores de la G9a histona metiltransferasa [p. ej., inhibidores de bajo peso molecular como BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2:525-528 (2008)), inhibidores de la expresión a base de ácidos nucleicos como siRNA y shRNA contra G9a (p. ej., G9a siRNA (humano) (Santa Cruz Biotechnology) etc.) y otros agonistas del canal L-calcio (p. ej., Bayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008)), UTF1 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)), modificadores de la transfección de señal intracelular [p. ej., activadores de la señalización Wnt (p. ej., Wnt3a soluble) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008)), inhibidores del TGF- β , inhibidores de MEK, 2i/LIF (2i es un inhibidor de la señalización de la proteína quinasa mitógeno activada y glucógeno sintasa quinasa-3, PLoS Biology, 6 (10), 2237-2247 (2008))], otros compuestos de bajo peso molecular naturales o sintéticos (por ejemplo, 5'-azaciclidina, tiazovivin, vitamina C y demás), y miRNAs específicos de células ES [e.g., el grupo miR-302-367 (Mol. Cell Biol. doi: 10.1128/MCB.00398-08, documento WO2009/075119), miR-302 (RNA (2008) 14:1-10), miR-291-3P, miR-294 y miR-295 (Nat. Biotechnol. 27:459-461 (2009))]. Como se mencionó anteriormente, los inhibidores de la expresión a base de ácidos nucleicos pueden estar en forma de vectores de expresión que albergan un ADN que codifica el siRNA o el shRNA.

De los componentes antes mencionados de las sustancias de reprogramación nuclear, SV40 T grande, por ejemplo, también puede incluirse en el alcance de los mejoradores de la eficiencia de desarrollo de células iPS porque son factores auxiliares no esenciales para la reprogramación nuclear de las células somáticas. Si bien el mecanismo de reprogramación nuclear sigue siendo incierto, no importa si los factores auxiliares, aparte de los factores esenciales para la reprogramación nuclear, se consideran sustancias de reprogramación nuclear o mejoradores de la eficiencia del desarrollo de células iPS. Por lo tanto, debido a que el proceso de reprogramación nuclear de las células somáticas se toma como un evento global resultante del contacto de sustancias de reprogramación nuclear y un mejorador de la eficiencia del desarrollo de las células iPS con células somáticas, no parece siempre esencial para los expertos en la técnica distinguir entre los dos.

El contacto de estos otros mejoradores de la eficiencia del desarrollo celular de iPS con células somáticas puede lograrse como se describió anteriormente con respecto a los inhibidores funcionales de p53, correspondientes al caso donde el mejorador es (a) un factor proteico, (b) un ácido nucleico que codifica el factor proteico, o (c) un compuesto de bajo peso molecular, respectivamente.

El otro mejorador de la eficiencia de desarrollo de célula iPS puede ser puesto en contacto con la célula somática simultáneamente con la sustancia de reprogramación nuclear, y cualquiera de ellos puede ser puesto en contacto por adelantado, siempre que la eficiencia del desarrollo de la célula iPS de una célula somática mejore significativamente en comparación con la eficiencia obtenida en ausencia de la sustancia; según las propiedades de la sustancia, la sustancia puede ponerse en contacto con la célula somática al mismo tiempo que la descrita anteriormente en relación con un inhibidor funcional de p53.

(F) Mejorar la eficiencia del desarrollo por las condiciones del cultivo

La eficiencia del desarrollo de células iPS puede mejorarse aún más cultivando las células bajo condiciones hipoxicas en el proceso de reprogramación nuclear para células somáticas. Como se menciona en el presente documento, la expresión "condiciones hipoxicas" significa que la concentración de oxígeno ambiental en el momento del cultivo celular es significativamente menor que la de la atmósfera. Específicamente, se pueden mencionar condiciones que implican concentraciones de oxígeno más bajas que las concentraciones de oxígeno ambiente en la atmósfera de aire 5-10% CO₂/95-90%, que se utiliza comúnmente para el cultivo celular ordinario; ejemplos incluyen condiciones que implican una concentración de oxígeno ambiental del 18% o menos. Preferiblemente, la concentración de oxígeno ambiental es del 15% o menos (por ejemplo, 14% o menos, 13% o menos, 12% o menos, 11% o menos y demás), 10% o menos (por ejemplo, 9% o menos, 8% o menos, 7% o menos, 6% o menos, etc.), o 5% o menos (p. ej., 4% o menos, 3% o menos, 2% o menos, etc.). La concentración de oxígeno ambiental es preferiblemente del 0,1% o más (por ejemplo, 0,2% o más, 0,3% o más, 0,4% o más, etc.), 0,5% o más (por ejemplo, 0,6% o más, 0,7% o más, 0,8% o más, 0,95% o más, etc.), o 1% o más (p. ej., 1,1% o más, 1,2% o más, 1,3% o más, 1,4% o más, etc.).

Aunque se puede utilizar cualquier método de creación de un estado hipoxico en un entorno celular, la forma más fácil es cultivar las células en una incubadora de CO₂ permitiendo ajustes de la concentración de oxígeno, y esto representa un caso adecuado. Las incubadoras de CO₂ que permiten el ajuste de la concentración de oxígeno están disponibles comercialmente en varios fabricantes (por ejemplo, incubadoras de CO₂ para cultivos hipoxicos fabricadas por Thermo Scientific, Ikemoto Scientific Technology, Juji Field, Wakenyaku, etc.).

El momento de iniciar el cultivo celular bajo condiciones hipoxicas no está particularmente limitado, siempre que la eficiencia del desarrollo celular iPS no impida que se mejore en comparación con la concentración normal de oxígeno (20%). Aunque el cultivo puede iniciarse antes de que la célula somática sea contactada con la sustancia de reprogramación nuclear, o al mismo tiempo que el contacto, o después del contacto, es preferible, por ejemplo, que el cultivo bajo condiciones hipoxicas se inicie justo después de que la célula somática sea puesta en contacto con la sustancia de reprogramación nuclear, o en un intervalo de tiempo dado después del contacto [por ejemplo, de 1 a 10 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9) días].

La duración del cultivo de células bajo condiciones hipóxicas no está particularmente limitada, siempre que la eficiencia del desarrollo celular iPS no impida que se mejora en comparación con la concentración normal de oxígeno (20%); los ejemplos incluyen, entre otros, períodos de 3 días o más, 5 días o más, 7 días o más o 10 días o más, y 50 días o menos, 40 días o menos, 35 días o menos o 30 días o menos, etc. La duración preferida del cultivo bajo condiciones hipóxicas varía dependiendo de la concentración de oxígeno ambiental; los expertos en la técnica pueden ajustar según corresponda la duración del cultivo de acuerdo con la concentración de oxígeno utilizada. En una realización de la presente invención, si las colonias candidatas a células iPS se seleccionan con resistencia a fármacos como índice, es preferible restaurar una concentración normal de oxígeno a partir de condiciones hipóxicas antes de iniciar la selección de fármacos.

10 Además, el tiempo de inicio preferido y la duración preferida del cultivo para cultivos celulares bajo condiciones hipóxicas también varían dependiendo de la elección de la sustancia de reprogramación nuclear utilizada, la eficiencia del desarrollo de células iPS a concentraciones normales de oxígeno, etc.

Después de ser puesto en contacto con sustancias de reprogramación nuclear y un inhibidor funcional de p53 (y otro mejorador de la eficiencia del desarrollo de células iPS si es necesario), la célula puede, por ejemplo, cultivarse en condiciones adecuadas para el cultivo de células ES. En el caso de células de ratón, el cultivo se lleva a cabo con la adición del factor inhibitorio de leucemia (LIF) como un factor de supresión de la diferenciación a un medio ordinario. No obstante, en el caso de las células humanas, es deseable que el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y/o el factor de células madre (SCF) se agreguen en lugar de LIF. Por lo general, la célula se cultiva en presencia de fibroblastos embrionarios de ratón tratados con radiación o un antibiótico para terminar la división celular, como células alimentadoras. Los fibroblastos embrionarios de ratón en uso común como alimentadores incluyen la línea celular STO (ATCC CRL-1503), etc; para la inducción de una célula iPS, se utiliza comúnmente la célula de SNL generada por la integración estable del gen de resistencia a la neomicina y el gen LIF en la célula STO (célula SNL76/7 STO; ECACC 07032801) [McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)], etc. Sin embargo, en la presente invención, es más preferible utilizar un fibroblasto primario embrionario de ratón (MEF) porque su uso ofrece una mayor mejora de la eficiencia de desarrollo de células iPS humanas. Los MEF tratados con mitomicina C están disponibles comercialmente en Millipore y ReproCELL. El cultivo conjunto con estas células alimentadoras se puede iniciar antes del contacto de la sustancia de reprogramación nuclear, en el momento del contacto, o después del contacto (por ejemplo, 1-10 días después).

30 Los presentes inventores lograron proporcionar por primera vez un método de generación de una célula iPS humana utilizando sustancias de reprogramación nuclear de la presente invención y un inhibidor funcional de p53 en combinación con un vector no viral, preferiblemente un vector episómico, especialmente del tipo de auto-eliminación precoz, en el que no se utiliza ningún ingrediente de animal no humano (es decir, bajo condiciones completamente sin xeno) en el cultivo de la transferencia de las sustancias de reprogramación nuclear y el inhibidor funcional de p53 para la célula somática para el desarrollo y el mantenimiento de una célula iPS. Para inducir una célula iPS humana bajo condiciones sin xeno, la célula de partida se cultiva en un medio libre de FCS y otros ingredientes de animales no humanos después de haber entrado en contacto con sustancias de reprogramación nuclear y un inhibidor funcional de p53 (y otro mejorador de la eficiencia de desarrollo de células iPS si es necesario). Las sustancias útiles que se añadirán como factores de supresión de diferenciación al medio (p. ej., bFGF, SCF y otros) se encuentran en forma de una proteína humana purificada, preferiblemente una proteína recombinante. Opcionalmente, las células somáticas humanas elegidas pueden utilizarse como células alimentadoras; ejemplos de células alimentadoras preferidas incluyen fibroblastos dérmicos humanos (HDF), células madre de pulpa dental humana y otras. También es posible inducir una célula iPS humana sin utilizar células alimentadoras. En este caso, se puede utilizar un agente de recubrimiento sin xeno disponible comercialmente para recubrir el recipiente de la célula en lugar de Matrigel y gelatina.

45 Una colonia candidata de células iPS puede ser seleccionada por un método con resistencia a fármacos y actividad indicadora como indicadores, y también por un método basado en el examen macroscópico de la morfología. Como ejemplo de la primera, una colonia positiva para la actividad de farmacorresistencia y/o indicadora se selecciona usando una célula recombinante en la que un gen de resistencia a fármacos y/o un gen indicador está dirigido al locus de un gen altamente expresado específicamente en células pluripotentes (por ejemplo, Fbx15, Nanog, Oct3/4, etc., preferiblemente Nanog o Oct3/4). Como ejemplos de tales células recombinantes, se puede mencionar un MEF derivado de ratón en el que el gen de β geo (que codifica una proteína de fusión de β -galactosidasa y neomicina fosfotransferasa) es eliminado en el locus del gen Fbx15 (Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)), o un MEF transgénico derivado de ratón en el que se integran el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) y el gen de la resistencia a la puromicina en el locus del gen Nanog (Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007)), etc. No obstante, los métodos para seleccionar una colonia candidata mediante un examen macroscópico de la morfología incluyen, por ejemplo, el método descrito por Takahashi et al. en Cell, 131, 861-872 (2007). Aunque los métodos que utilizan células reporteras son convenientes y eficientes, la selección de colonias por examen macroscópico es deseable desde el punto de vista de la seguridad cuando las células iPS se preparan con el propósito de un tratamiento humano.

60 La identidad de las células de la colonia seleccionada como células iPS puede confirmarse mediante respuestas positivas a los indicadores de Nanog (o Oct3/4) (resistencia a la puromicina, positividad de GFP, etc.), así como por la formación de una colonia de células ES visible, como se describió anteriormente; sin embargo, para aumentar la precisión, es posible realizar pruebas como la tinción de fosfatasa alcalina, analizar la expresión de varios genes específicos de células ES, y trasplantar las células seleccionadas a un ratón y confirmar la formación de teratoma.

Las células iPS así desarrolladas se pueden utilizar para diversos propósitos. Por ejemplo, mediante la utilización de un método de inducción de la diferenciación reportado con respecto a las células ES, puede ser inducida la diferenciación en varias células (por ejemplo, células miocárdicas, células sanguíneas, células nerviosas, células endoteliales vasculares, células secretantes de insulina, etc.) de las células iPS. Por lo tanto, inducir células iPS 5 utilizando una célula somática recogida de un paciente u otra persona del mismo, o sustancialmente el mismo, tipo HLA permitiría una terapia de células madre por trasplante autógenico o alogénico, caracterizado porque las células iPS se diferencian en las células deseadas (es decir, las células de un órgano afectado del paciente, las células que tienen un efecto terapéutico sobre la enfermedad, etc.), que se trasplantan al paciente. Además, debido a que las 10 células funcionales (p. ej., hepatocitos) diferenciadas de las células iPS se cree que reflejan mejor el estado real de las células funcionales *in vivo* que las líneas celulares existentes, también se pueden utilizar adecuadamente para el cribado *in vitro* para aumentar la efectividad y la toxicidad de los compuestos farmacéuticos candidatos, etc.

La presente invención se describe en lo sucesivo con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos con los que, sin embargo, la invención nunca está limitada.

Ejemplos

15 Ejemplo 1 (Referencia)

Desarrollo de células iPS humanas mediante retrovirus

Se prepararon retrovirus para la reprogramación con respecto a células de empaquetamiento de plásmido pMX y Plat-E [suministradas por el Dr. Toshio Kitamura en la Universidad de Tokio; Morita, S. et al., Gene Ther. 7, 1063-1066 (2000)]. Se insertaron varias construcciones en el sitio de multiclónación de pMXs para producir vectores retrovirales 20 que se utilizarán para la reprogramación. Las construcciones insertadas se prepararon uniéndose a Oct3/4 humano (O en la Fig. 1), Sox2 humano (S en la Fig. 1), Klf4 humano (K en la Fig. 1), c-Myc humano (M en la Fig. 1), Lin28 humano (L en la Fig. 1), Nanog humano (N en la Fig. 1) y L-Myc humano (U en la Fig. 1) y la región traducida de cada gen a través de la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa [en la Fig. 1, los símbolos para los genes respectivos (mostrados anteriormente) se dividen en guiones (p. ej., O-M-L)]. GFP fue utilizado como un control negativo.

25 Cada retrovirus para la reprogramación se preparó transfiriendo cada uno de los vectores retrovirales antes mencionados a las células de Plat-E que habían sido sembradas en una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) a $0,6 \times 10^6$ células por pocillo en el día anterior. Las células se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ usando DMEM/FCS al 10% [un caldo de cultivo preparado añadiendo un 10% de suero de ternera fetal a DMEM (Nacalai Tesque)]. Para facilitar la transferencia vectorial, se colocaron 4,5 µL de reactivo de transfección FuGene6 (Roche) en 30 100 µL de medio sérico reducido de Opti-MEM I (Invitrogen), y se permitió que las células reposaran a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 1,5 µg de cada vector de expresión, y se permitió que las células reposaran más a temperatura ambiente durante 15 minutos, después de lo cual se añadieron al caldo de cultivo de Plat-E. En el día 2, el sobrenadante de Plat-E fue reemplazado con un suministro recién preparado de medio. El 35 día 3, el sobrenadante de cultivo fue recuperado y filtrado a través de un filtro estéril de 0,45 µm (Whatman), y el polibreño (Nacalai) se añadió a 4 µg/mL para producir un líquido viral.

En los experimentos, se usó un fibroblasto desarrollado a partir de una piel de un Cáucaso neonatal (Cell Applications) 40 después de ser transfectado con Slc7a1 de ratón por medio de lentivirus. Este fibroblasto fue cultivado y mantenido a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm usando DMEM/FCS al 10% como caldo de cultivo. El día antes de la transferencia de los factores de reprogramación, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y 1,3 células x10⁵ fueron sembradas a un pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon).

45 Al día siguiente, las células se mezclaron e infectaron con cada retrovirus que se había producido utilizando células de Plat-E. 24 horas más tarde, el medio fue reemplazado con un suministro recién preparado para terminar la infección. En el día 6 después del inicio de la infección, el medio fue retirado de la placa, y las células fueron lavadas por la adición de 1 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y fueron sembradas 5 x 10⁵ células en una placa de 100 mm que 50 contenía células alimentadoras previamente sembradas. Las células alimentadoras utilizadas eran células SNL que habían sido tratadas con mitomicina C para terminar la división celular. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con un medio de cultivo celular de primates ES (ReproCELL) suplementado con 4 ng/mL de bFGF (Wako); este intercambio de medio se continuó cada 2 días. En el día 35, se contaron las colonias de células humanas tipo ES. En la Fig. 1 se muestran las fotografías de las colonias y los recuentos por colonia. Los resultados del recuento de colonias se resumen en la Fig. 2. En todas las combinaciones de genes, la eficiencia del desarrollo para las colonias iPS humanas (colonias tipo ES) fue mucho mayor con el uso de L-Myc en lugar de c-Myc. Si se utilizaba c-Myc o L-Myc, la eficiencia del desarrollo era mayor con el uso de 5 genes excluyendo Nanog (Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28 y c-Myc o L-Myc; Ctrl en la Fig. 2) que con el uso de 6 genes incluyendo Nanog ("6 factores" en la Fig. 2). Cuando se utilizaba L-Myc como unido en el orden de L-Myc-Lin28 (U-L en la Fig. 2), la eficiencia del desarrollo no disminuía en comparación con el 55

nivel obtenido cuando se usaba L-Myc pero no unido (5 genes transferidos por separado: "ctrl" en la Fig. 2).

Ejemplo 2 (Referencia)

Desarrollo de células iPS humanas mediante plásmidos episómicos (1)

Se preparó un plásmido para la reprogramación con respecto a pCX-EGFP (suministrado por el Dr. Masaru Okabe en la Universidad de Osaka; FEBS Letters, 407, 313-319, 1997). En primer lugar, la secuencia del elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) se insertó al final de EGFP. Se preparó un casete para replicar este vector en la célula insertando una secuencia loxP en ambos extremos del EBNA-1 de pCEP4 (Invitrogen). Este casete que contenía el EBNA-1 y el oriP se integró en el sitio de BamHI del mencionado pCX-EGFP incorporando el WPRE, y esto se llamó pCXLE-EGFP. Este pCXLE-EGFP fue tratado con EcoRI, y varias construcciones, en lugar de EGFP, se insertaron para producir plásmidos para la reprogramación. Las cinco construcciones insertadas fueron: 1) Oct3/4 humano, 2) un constructo preparado uniendo las regiones traducidas de Sox2 humana y Klf4 humana a través de la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa, 3) un constructo preparado uniendo las regiones traducidas del Klf4 humano, Sox2 humano y Oct3/4 humano a través de la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa, 4) un constructo preparado uniendo las regiones traducidas de c-Myc humano, Lin28 humano y Nanog a través de la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa, y 5) antígeno T grande SV40 (cada construcción está bajo el control del promotor de CAG y la secuencia de polyA de β-globina de conejo), que fueron denominadas como pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO, pCXLE-hMLN, y pCX-SV40LT, respectivamente (pCX-SV40LT es un plásmido que no tiene ninguna de las secuencias WPRE, casete EBNA-1 y la secuencia loxP).

En los experimentos, se usó un fibroblasto desarrollado a partir de piel facial de una mujer caucásica de 36 años de edad (Cell Applications, Lot1388). Este fibroblasto fue cultivado y mantenido a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm usando DMEM/FCS al 10% [un caldo de cultivo preparado añadiendo un 10% de suero bovino fetal a DMEM (Nacalai Tesque)]. En el momento de la transferencia del plásmido, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Despues de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Despues de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y 6 x 10⁵ células se recuperaron en un tubo de centrifuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Un total de 3 µg de plásmidos (0,5 µg de pCXLE-hOct4, 1 µg de pCXLE-hSK, 0,5 µg de pCXLE-hKSO, 0,5 µg de pCXLE-hMLN, 0,5 µg de pCX-SV40LT) fue transferido a las células usando un Microporator (AR BROWN). Esta transferencia se realizó utilizando un chip de 100 µL con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. Las células transfectadas fueron transferidas a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) que contenía 3 mL de DMEM/FCS al 10%, y fueron cultivadas a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 6 días. Posteriormente, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 2 mL de PBS. Despues de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Despues de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y 2 x 10⁵ células fueron sembradas en una placa de 100 mm que contenía células alimentadoras previamente sembradas. Las células alimentadoras utilizadas fueron MEF tratado con mitomicina C. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con un medio de cultivo celular de primates tipo ES (ReproCELL) suplementado con 4 ng/mL de bFGF (Wako); este intercambio de medio se continuó cada 2 días. En el día 26, surgió una colonia humana de células tipo ES. Una fotografía de la colonia en el momento del desarrollo se muestra en la Fig. 3 (izquierda). Una fotografía de la colonia en el 3er paso se muestra en la Fig. 3 (derecha). Una colonia tipo ES se podría desarrollar a partir de 2 x 10⁵ células.

Ejemplo 3 (Referencia)

Desarrollo de células iPS humanas mediante plásmidos episómicos (2)

Se utilizaron cuatro plásmidos diferentes, distintos de pCX-SV40LT, que se utilizaron en el ejemplo 2, para la reprogramación: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO y pCXLE-hMLN.

En los experimentos, se usó un fibroblasto desarrollado a partir de piel facial de una mujer caucásica de 36 años de edad (Cell Applications, Lot1388). Este fibroblasto fue cultivado y mantenido a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm usando DMEM/FCS al 10% [un caldo de cultivo preparado añadiendo un 10% de suero bovino fetal a DMEM (Nacalai Tesque)]. En el momento de la transferencia del plásmido, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Despues de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Despues de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y se recuperaron 6 x 10⁵ células en un tubo de centrifuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Un total de 3 µg de plásmidos (1 µg de pCXLE-hOct4, 1 µg de pCXLE-hSK, 0,5 µg de pCXLE-hKSO, 0,5 µg de pCXLE-hMLN) fue transferido a las células usando un Microporator (AR BROWN). Esta transferencia se realizó utilizando un chip de 100 µL con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. Las células transfectadas fueron transferidas a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) que contenía 3 mL de DMEM/FCS al 10%, y fueron cultivadas a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 6 días. Posteriormente, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 2 mL de PBS. Despues de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Despues de que las células crecieran, se añadió

DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y fueron sembradas 1×10^5 células en una placa de 100 mm que contenía células alimentadoras previamente sembradas. Las células alimentadoras utilizadas fueron MEF tratada con mitomicina C o SNL76/7. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con un medio de cultivo celular tipo ES de primates (ReproCELL) suplementado con 4 ng/mL de bFGF (Wako); este intercambio de medio se continuó cada 2 días. Cuando

5 MEF fue utilizado como alimentador, una colonia humana tipo células ES surgió el día 24. Una fotografía de la colonia en el momento del desarrollo se muestra en la Fig. 4 (izquierda). Una fotografía de la colonia en el 2º paso se muestra en la Fig. 4 (derecha). Una colonia tipo ES se pudo desarrollar a partir de 1×10^5 células. Cuando se usaba SNL76/7 como alimentador, no se podían desarrollar colonias iPS.

Ejemplo 4

10 Desarrollo de células iPS humanas mediante plásmidos episómicos (3)

Como se muestra en los ejemplos 2 y 3, cuando 6 genes que consistían en Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 y Nanog, o 7 genes que consisten en los mismos 6 y otros SV40 T grandes, eran transferidos a las células utilizando un plásmido episómico, sólo aproximadamente de 0 a 1 célula iPS pudo desarrollarse a partir de 1 a 2×10^5 células. Esta baja eficiencia en la inducción con el uso de los mismos 7 genes también se describe en Science, 324, 797-801 (2009).

15 Por lo tanto, para mejorar la eficiencia del desarrollo, se utilizó L-Myc (construcción conjunta L-Myc-Lin28), que dio resultados favorables en el experimento preliminar del Ejemplo 1, mientras que Nanog, que había sido juzgado como innecesario, no se utilizaba. Además, un ADN que codifica un shRNA contra p53 humano [5'-GACTCCAGTGGTAATCTACttcaagagaGTAGATTACCACTGGAGTC-3' (SEQ ID NO: 32): la parte subrayada es la secuencia diana para p53; las letras en mayúscula indican la porción en la que se forma dsRNA; en lo sucesivo en 20 este documento denominado también p53 shRNA].

Además de pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, y pCXLE-hMLN como se preparó en el Ejemplo 2, fueron preparados y utilizados 1) un plásmido preparado por el tratamiento de pCXLE-EGFP como se preparó en el Ejemplo 2 con EcoRI, e incorporando un constructo preparado uniendo las regiones traducidas de L-Myc humano y Lin28 humano a través de la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa, en lugar de EGFP (pCXLE-hUL) y 2) un plásmido que incorporaba una construcción que expresaba un shRNA contra p53 (impulsado por el promotor del U6) insertado en el sitio de BamHI de pCXLE-hOct4 (pCXLE-hOct4-shp53). pCXLE-EGFP se usó como control. Las estructuras de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL se muestran en la Fig. 30 (en esta figura, pCXLE-hOct4-shp53 se describe como pCXLE-hOct3/4-shp53).

25 En los experimentos, un fibroblasto desarrollado a partir de la piel de una mujer japonesa de 21 años (JCRB, TIG113) fue utilizado después de ser transfectado con Slc7a1 de ratón por medio de lentivirus. Este fibroblasto fue cultivado y mantenido a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm usando DMEM/FCS al 10% [un caldo de cultivo preparado añadiendo un 10% de suero bovino fetal a DMEM (Nacalai Tesque)]. En el momento de la transferencia del plásmido, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante 30 aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y se recuperaron 6×10^5 células en un tubo de centrifuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Los plásmidos que se muestran en la Tabla 2 (3 µg en total) se transfirieron a las células utilizando un Microporator (AR BROWN). Esta transferencia se realizó utilizando un chip de 40 100 µL con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. Las células transfectadas fueron transferidas a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) que contenía 3 mL de DMEM/FCS al 10%, y fueron cultivadas a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 7 días. Posteriormente, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 2 mL de PBS. Despues de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante 45 aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y fueron sembradas $1,5 \times 10^5$ células en una placa de 100 mm que contenía células alimentadoras previamente sembradas. Las células alimentadoras utilizadas fueron MEF tratada con mitomicina C o SNL76/7. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con un medio de cultivo celular ES de primates (ReproCELL) suplementado con 4 ng/mL de bFGF (Wako); este intercambio de medio se continuó cada 2 días. En el día 28, se contaron las colonias de células humanas tipo ES que habían surgido. Las fotografías de las colonias se muestran en la Fig. 5. Los resultados del recuento de colonias se muestran en la Tabla 2 y en la Fig. 6 (MEF utilizado como alimentador).

Tabla 2

Exp. no.	Contenido de vector (μ g) (condiciones del Microporator: 1650V, 10ms, x3)						Alimentador MEF		Alimentador MSTO			
	pCXLE-hOct4	pCXLE-hOct4-shp53	pCXLE-hSK	pCXLE-hMLN	pCXLE-hUL	pCXLE-EGFP	tipo ES	no	tipo ES	tipo ES	no	tipo ES
375A	1		1	1			0	1	0	0	0	0
375B, D	1		1		1		10	13	3	6		
375C, E		1	1		1		71	136	87	132		
Control						3	0	0	0	0		

375A-C: alimentador MEF; 375D-E: alimentador MSTO

Aunque se pudieron desarrollar colonias de iPS (colonias tipo ES) independientemente de los alimentadores utilizados, se desarrollaron más colonias con el uso de MEF. Cuando se utilizaban 5 genes que consistían en Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc y Lin28, la eficiencia del desarrollo aumentaba en comparación con el uso de los 6 genes convencionales (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 y Nanog). A medida que se añadía el shRNA de p53, la eficiencia del desarrollo aumentaba drásticamente.

Ejemplo 5

Desarrollo de células iPS humanas mediante plásmidos episómicos (4)

- 10 Los plásmidos utilizados para la reprogramación fueron los mismos que los cinco plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pCXLE-hUL y pCXLE-hOct4-shp53 en el Ejemplo 4; pCXLE-EGFP se usó como control.
- 15 En los experimentos, se utilizó un fibroblasto desarrollado a partir de la piel de una niña japonesa de 6 años (JCRB, TIG120) y un fibroblasto desarrollado a partir de la piel de un bebé japonés de 8 meses (JCRB, TIG121) después de ser transfectados con Slc7a1 de ratón por medio de lentivirus. Estos fibroblastos fueron cultivados y mantenidos a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm usando DMEM/FCS al 10% [un caldo de cultivo preparado añadiendo un 10% de suero bovino fetal a DMEM (Nacalai Tesque)]. En el momento de la transferencia del plásmido, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y se recuperaron 6 x 10⁵ células en un tubo de centrífuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Los plásmidos que se muestran en la Tabla 3 (3 μ g en total) se transfirieron a las células utilizando un Microporator (AR BROWN). Esta transferencia se realizó utilizando un chip de 100 μ L con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. Las células transfectadas fueron transferidas a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) que contenía 3 mL de DMEM/FCS al 10%, y fueron cultivadas a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 7 días. Posteriormente, el medio fue retirado y las células fueron lavadas por la adición de 2 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió un 0,25% de tripsina/EDTA 1 mM (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió DMEM/FCS al 10% para suspender las células, y fueron sembradas 1 x 10⁵ células en una placa de 100 mm que contenía células alimentadoras previamente sembradas. Las células alimentadoras utilizadas fueron MEF tratada con mitomicina C o SNL76/7. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con un medio de cultivo celular tipo ES de primates (ReprotoCELL) suplementado con 4 ng/mL de bFGF (Wako); este intercambio de medio se continuó cada 2 días. En el día 28, se contaron las colonias de células humanas tipo ES que habían surgido. Las fotografías de las colonias se muestran en la Fig. 7 (TIG120 usada) y la Fig. 8 (TIG121 usada). Los resultados del recuento de colonias se muestran en la Tabla 3, Fig. 9 (TIG120 utilizado, MEF utilizado como alimentador) y la Fig. 10 (TIG121 utilizado, MEF utilizado como alimentador).

Tabla 3

Exp. no.	Fuente HDF	Contenido de vector (μ g) (condiciones de Microporator: 1650V, 10ms, x3)						Alimentador MEF		Alimentador MSTO	
		pCXLE-hOct4	pCXLE-shp53	pCXLE-hSK	pCXLE-hMLN	pCXLE-hUL	pCXLE-EGFP	tipo ES	no ES	tipo ES	no ES
380 ^a	TIG120	1		1	1			1	3	0	0
380B	TIG120		1	1	1			7	11	1	2
380C	TIG120	1		1		1		4	16	0	4
380D	TIG120		1	1		1		37	71	17	25
Control	TIG120						3	0	0	0	0
380E	TIG121	1		1	1			2	3	0	0
380F	TIG121		1	1	1			11	10	1	4
380G	TIG121	1		1		1		9	23	0	0
380H	TIG121		1	1		1		24	97	5	11
Control	TIG121						3	0	0	0	0

En comparación con el uso de los 6 genes convencionales (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 y Nanog), la eficiencia del desarrollo aumentó con el uso de shRNA de p53 adicional. Además, cuando se utilizaban 5 genes que consistían en Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc y Lin28, la eficiencia del desarrollo aumentaba en comparación con el uso de los 6 genes convencionales. A medida que se añadía shRNA de p53, la eficiencia del desarrollo aún aumentaba más drásticamente.

Los resultados obtenidos con el uso de MEF como células alimentadoras y los obtenidos con el uso de SNL76/7 (MSTO) se comparan en la Fig. 11 (TIG120 usado). Aunque se pudieron desarrollar colonias iPS (colonias tipo ES) independientemente de los alimentadores utilizados, un mayor número de colonias se desarrollaron con el uso de MEF.

Ejemplo 6

Confirmación de la presencia o ausencia de genes exógenos en colonias iPS (1)

Se examinaron cinco células iPS diferentes desarrolladas mediante la transferencia de genes de reprogramación utilizando un plásmido episómico para detectar la presencia o ausencia de la integración de los genes exógenos en el genoma.

Después de llegar a ser casi confluente en una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon), las células iPS fueron lavadas por la adición de 2 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadieron 400 μ L de un tampón de recuperación del genoma (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%, 50 μ g/mL de proteinasa K) para romper las células, y las células fueron recuperadas en un tubo de 1,5 mL, después de lo cual el lisado celular fue incubado a 55°C toda la noche. Esto fue mezclado con 150 μ L de PCI (una mezcla 25:24:1 de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico) durante 15 minutos, y se centrifugó a 13200 rpm durante 10 minutos. La capa acuosa (la capa superior) se recuperó y se mezcló con 1 mL de etanol. El precipitado resultante se recuperó en otro tubo, y éste se usó como ADN largo. El líquido restante privado del precipitado se centrifugó a 13200 rpm durante 15 minutos. El precipitado resultante se usó como ADN corto. Cada ADN se lavó con etanol al 70% y se disolvió en el tampón TE para obtener una plantilla de PCR. La PCR se realizó utilizando TaKaRa EX Taq (Takara Shuzo), con 50 ng de ADN largo o 250 ng de ADN corto utilizados como plantilla en cada reacción. Los siguientes cebadores se utilizaron en combinación.

Detección de Klf4: hKlf4-S1016 ACC CAT CCT TCC TGC CCG ATC AGA (SEQ ID NO: 33)

hKlf4-AS1170 ATC ACA AGT GTG GGT GGC GGT CCT (SEQ ID NO: 34)

30 Detección de c-Myc: hMyc-S547 GCC CGC GCC TCA GAG TCG ATC GAC (SEQ ID NO: 35)

hMyc-AS947 CGA GTG GAG GGA GGC GCT GCG TAG (SEQ ID NO: 36)

Detección de OriP derivada de pCEP4: pEP4-SF1 TTC CAC GAG GGT AGT GAA CC (SEQ ID NO: 37)

pEP4-SRI TCG GGG GTG TTA GAG ACA AC (SEQ ID NO: 38)

En el momento de la detección del OriP, la PCR también se realizaba en controles preparados añadiendo 200, 20 ó 2 fg del plásmido que se había transferido al genoma (50 ng) del fibroblasto inicial ("+ plásmido" en la Fig. 12). Los resultados se muestran en la Fig. 12. En cualquiera de las células iPS examinadas, no se detectó ninguna de Klf4 y c-Myc del gen exógeno (TG) y el OriP constituyente vectorial en el ADN largo (L en la Fig. 12) o en el ADN corto (S en la Fig. 12); se estimó que el plásmido episómico transferido había sido eliminado espontáneamente de la célula.

Ejemplo 7

Desarrollo de células iPS humanas mediante plásmidos episómicos (5)

- 10 Fueron transfectados fibroblastos desarrollados a partir de pieles de sujetos masculinos y femeninos japoneses y caucásicos de diversas edades (HDF) como fuentes de células somáticas con 5 genes que consistían en Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, y Lin28, junto con shRNA de p53, utilizando pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL de la misma manera que en el Ejemplo 5. MSTO o MEF sirvieron como células alimentadoras. Los fibroblastos se suministran en dos formas, una con Slc7a1 de ratón incorporada en éste, y la otra sin éste. Las colonias de células humanas tipo ES que surgieron en los días 27 a 32 después de la transfección fueron contados. Los resultados (n = de 1 a 5) se muestran juntos en la Tabla 4.
- 15

Tabla 4

Nombre	Edad	Sexo ¹	Raza ²	Colonia núm.	N
HDF1419	Feto	F	-	68,7	4
TIG121	8m	M	J	97	1
TIG120	6	F	J	41,7	4
HDF1388	36	F	C	3,4	5
TIG114	36	M	J	4	1
HDF1429	45	M	C	50	1
HDF1377	53	F	C	26	1
HDF1437	56	M	C	47	3
HDF1554	77	F	C	12	2
TIG107	81	F	J	3,5	2

¹ F: mujer, M: hombre

² J: japonés, C: caucásico

- 20 En la tabla anterior, los recuentos de colonias se muestran como el número medio de colonias desarrolladas por 1 x 10⁵ HDF. Como se desprende de la Tabla 4, se constató que las células iPS podían desarrollarse independientemente de la edad, el sexo y la raza del sujeto de la fuente celular. También se encontró que las células iPS podían desarrollarse si se transferían Slc7a1 (no se muestran los datos separados).

Ejemplo 8

Transferencia de shRNA de p53 utilizando un plásmido de expresión temporal

- 25 El gen p53 se conoce como un gen de supresión del cáncer; la inhibición funcional de p53 durante mucho tiempo aumenta potencialmente el riesgo de carcinogénesis. Por lo tanto, se realizó una investigación para determinar si las células iPS podían desarrollarse como con un vector episómico incluso cuando shRNA p53 se expresaba por medio de un vector de expresión temporal (un vector plasmídico ordinario carente de EBNA-1 y oriP: en adelante en este documento, el vector plasmídico).
- 30 Se realizó un estudio preliminar para determinar si existía alguna diferencia en el grado de desaparición de la expresión génica entre un vector episómico y el vector plasmídico. En el experimento, se utilizaron pCX-EGFP (suministrado por

el Dr. Masaru Okabe en la Universidad de Osaka; FEBS, 407, 313-319, 1997), pCXLE-EGFP como se preparó en el ejemplo 2, y pCXE-EGFP (un plásmido preparado eliminando las secuencias loxP de pCXLE-EGFP). Los días 6 y 14, después de transferir cada plásmido a HDF1419, se examinó la expresión de GFP. Esta transferencia se llevó a cabo utilizando un Microporator y un chip de 100 µL con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. Los resultados se muestran en la Fig. 13. Para todos los plásmidos, se observó la fluorescencia de GFP el día 6, pero la cantidad expresada fue menor para pCX-EGFP que para los otros dos. El día 14, todavía se observaba fluorescencia, pero la cantidad expresada fue considerablemente menor para pCX-EGFP que para los otros dos. Estos hallazgos confirmaron que la expresión génica desaparece antes en vectores plasmídicos que en vectores episómicos.

A continuación, se realizó una investigación para determinar si una célula iPS podía desarrollarse incluso cuando p53 shRNA era transferido usando un vector plasmídico. Para la transferencia se utilizaron los siguientes vectores plasmídicos o episómicos.

- (a) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN
- (b) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pSilencer-shp53 [pSilencer-shp53 preparado insertando p53 shRNA después del promotor de U6 de pSilencer™ (Ambion)]
- (c) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL
- (d) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, pSilencer-shp53

Para la transferencia, se utilizaron 0,75 µg [(b) y (d)] o 1 µg [(a) y (c)] de cada vector (3 µg en total).

Se desarrolló de la misma manera que en el ejemplo 5 células iPS usando un fibroblasto desarrollado a partir de la piel de una mujer caucásica de 36 años de edad (HDF1388) como célula somática, con MEF como células alimentadoras. La transferencia se llevó a cabo utilizando un Microporator y un chip de 100 µL con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. El día 27 después de la transferencia, se contaron las colonias de células humanas tipo ES que habían crecido. Los resultados se muestran en la Fig. 14. Comparando las combinaciones (a) y (b) (EPI versus Trans de + M-L-N en la Fig. 14), y las combinaciones (c) y (d) (Epi versus Trans de +U-L en la Fig. 14), no hubo ninguna diferencia importante en el número de colonias desarrolladas entre el uso de un vector episómico para la transferencia de shRNA p53 y el uso del vector plasmídico; se demostró que se podía desarrollar bien una célula iPS incluso utilizando el vector plasmídico para la transferencia.

Ejemplo 9

Desarrollo de células iPS a partir de células madre de pulpa dental derivadas de seres humanos sanos con genotipo homo-HLA

Fueron proporcionadas por los Dr. Takahiro Kunisada y Kenichi Tezuka de la Universidad de Gifu células madre de pulpa dental de seres humanos sanos con el homo-genotipo para los cuatro loci génicos HLA-A, HLA-B, HLA-Cw y HLA-DRB1 (líneas celulares DP74 y DP94). Estas líneas celulares se habían desarrollado como se describe en J. Dent. Res., 87 (7): 676-681 (2008) y el documento WO 2010/013359. En la Tabla 5 se muestran los cuatro genotipos HLA de las dos líneas celulares y sus frecuencias alélicas [frecuencia de cada alelo (haplotipo) que tiene los cuatro genotipos HLA en todos los alelos de los japoneses].

Tabla 5

	alelo HLA				Población
	A	B	Cw	DRB1	
DP74	2402	5201	1202	1502	10
DP94	1101	1501	0401	0406	1,5%

Se desarrollaron de la misma manera que en el ejemplo 5 células iPS usando cinco plásmidos diferentes para la reprogramación: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pCXLE-hUL y pCXLE-hOct4-shp53. También se desarrollaron células iPS mediante la transferencia del plásmido descrito en Science, 324:797-801 (2009) (mezcla de Thomson). En cada caso se utilizó un total de 3 µg de vector; esta transferencia se llevó a cabo utilizando un Microporator y un chip de 100 µL con tres pulsos a 1650 V durante 10 ms. Se usó MSTO como células alimentadoras.

Las fotografías de las células iPS desarrolladas mediante la transferencia de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL en DP74 y DP94 se muestran en la Fig. 15. Fueron contadas las colonias de células tipo ES humanas que crecieron el día 28 después de la transferencia. Los resultados se muestran en las Figs. 16 y 17 (cada figura numérica indica la media y la desviación estándar para tres experimentos). Tanto para la línea DP74 (Fig. 16) como

para la línea DP94 (Fig. 17), la mayor eficiencia en el desarrollo se obtuvo con la transferencia de 5 genes consistentes en Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc y Lin28, junto con los shRNA de p53 (pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL); se obtuvieron buenos resultados como con HDF.

Ejemplo 10

5 Confirmación de la presencia o ausencia de genes exógenos en colonias iPS (2)

En un estudio preliminar, fue transferido pCXLE-EGFP a HDF, y se realizó una investigación para determinar cómo desaparecía la expresión de EGFP. Cada semana de la 1^a a la 4^a semana después de la transferencia, la cantidad expresada (intensidad de fluorescencia) de EGFP en 1x10⁴ células fue analizada por FACS. Los resultados se muestran en la Fig. 18. La cantidad expresada de EGFP y el número de células que muestran la expresión disminuyó durante semanas; 4 semanas después de la transfección, las células GFP positivas habían disminuido hasta un 2,4%.

Posteriormente, justo después del desarrollo mediante transferencia de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a HDF, se examinaron 18 clones iPS diferentes para detectar la presencia o ausencia de genes exógenos.

Se proporcionó un tubo de 0,2 mL que contenía 5 µL de un tampón de recuperación del genoma (el tampón para TaKaRa ex Taq suplementado con 167 µg/mL de proteinasa K). El día 30 después de la transfección, las colonias de cada célula iPS se disociaron físicamente de la placa, y se recuperaron en este tubo. Después de la recuperación, el tubo se incubó a 55°C durante 3 horas para obtener un lisado celular. Después de añadir 10 µL de H₂O, el lisado se calentó a 95°C durante 3 minutos para inactivar la proteinasa K. Esto fue utilizado como una plantilla para la PCR en tiempo real. La PCR se realizó con SYBR Premix EX Taq II (Takara Shuzo). Se diseñaron un par de cebadores PCR para EBNA-1 para calcular los números de copias de los vectores episómicos, y otro par de cebadores para el locus FBXO15 endógeno para estimar el número de células.

Cebadores EBNA-1 (para la detección de vectores episómicos)

EBNA-183F ATC AGG GCC AAG ACA TAG AGA TG (SEQ ID NO: 39)

EBNA-243R GCC AAT GCA ACT TGG ACG TT (SEQ ID NO: 40)

Cebadores Fbx15 (para la detección de alelos endógenos)

25 hFbx15-2F GCC AGG AGG TCT TCG CTG TA (SEQ ID NO: 41)

hFbx15-2R AAT GCA CGG CTA GGG TCA AA (SEQ ID NO: 42)

Mientras que la cantidad de EBNA-1 amplificada fue corregida por el recuento de células en la mezcla de reacción calculada a partir de la cantidad de Fbx15 amplificada, se calculó el número de copias del vector episómico por 1 x 10⁴ células. Los resultados se muestran en la Fig. 19. La media para los 18 clones fue muy baja a 20,3 ± 13,7 copias por 1 x 10⁴ células, demostrando que sólo una cantidad muy pequeña de genes exógenos (vectores episómicos) permanecía 30 días después de la transfección.

A continuación, se realizó el mismo experimento, excepto que las células fueron cultivadas de paso.

Se prepararon soluciones de lisis celular recientes, que consistían en 1x tampón Ex Taq (Takara) y 167 µg/ml de proteinasa K. Para analizar las células iPS desarrolladas, las células cultivadas en placas de 60 mm se recogieron con un raspador celular después de la eliminación de las células alimentadoras con tratamiento con CTK. Las células se colocaron en tubos y se centrifugó, y los peletes de células se lisaron con 200 µL de solución de lisis. Después de la incubación a 55°C durante 3 h seguida de la inactivación de la proteinasa K a 95°C, se utilizaron los lisados para el análisis cuantitativo de PCR. Se utilizaron el plásmido pCXLE-hFbx15-cont2, que tiene un amplicón tanto para FBXO15 como para EBNA-1, para realizar una amplificación estándar.

40 Los resultados de las células epi-iPS derivadas de DP se muestran en la Fig. 31A. Se detectaron aproximadamente 200 copias de vectores episómicos por célula seis días después de la transfección. Por el contrario, no se pudo detectar ningún ADN de EBNA-1 en cinco clones de los siete probados. En los dos clones restantes, se detectaron -0,001 y 2 copias, respectivamente (Fig. 31A). Es probable que el clon posterior tenga integración del plásmido en un cromosoma.

45 Los resultados de las células epi-iPS derivadas de fibroblastos se muestran en la Fig. 31B. En varios clones, incluyendo 404C-2 y 409B-2, no se pudieron detectar vectores episómicos. Estos datos demostraron que en la mayoría de los clones de epi-iPSC, los vectores episómicos se perdieron espontáneamente.

Ejemplo 11

Confirmación de la presencia o ausencia de la expresión de genes exógenos en colonias iPS

50 En el paso 5 al 9 después de ser desarrollado transfiriendo pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a HDF,

se examinaron 9 clones iPS diferentes para detectar la presencia o ausencia de la expresión de los genes exógenos.

El ARN total se extrajo de las células iPS en un pocillo de una placa de 6 pocillos; 1 µg de éste, el cebador dT (20) y la transcriptasa inversa Rever Tra Ace (TOYOBO) se utilizaron para transcribir de forma inversa el ARNm a un ADN de hebra complementaria. El volumen final del producto de reacción fue de 20 µL. Se añadieron a esta transcripción inversa 60 µL de H₂O. Se realizó la PCR cuantitativa para cada transgén con 1 µL del producto de reacción (equivalente a 12,5 ng de ARN) como plantilla, y con SYBR Green II como indicador, utilizando los conjuntos de cebador mostrados en la Tabla 6 a continuación, uno para medir la suma de la cantidad de genes exógenos expresados y la cantidad de genes endógenos expresados (cantidad total expresada), y el otro para medir la cantidad de genes exógenos expresados. Las condiciones de amplificación de la PCR utilizadas fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 30 segundos, seguido de 50 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 60°C durante 10 segundos y 72°C durante 30 segundos.

Tabla 6

hOCT3/4 (total)	hOct3/4-S944	Nº. 40-56	CCCCAGGGCCCCATTTGGTACC (SEQ ID NO: 43)
	hOct3/4-as	Nº. 10-25	ACCTCAGTTGAATGCATGGGAGAGC (SEQ ID NO: 44)
hOct3/4 (TG)	hOCT4-1072F	Nº. 74-74	CATTCAACTGAGGTAAGGG (SEQ ID NO: 45)
	WPRE-70R	Nº. 74-73	TAGCGTAAAAGGAGAACATAG (SEQ ID NO: 46)
hKLF4 (total)	hKlf4-S1016	Nº. 62-88	ACCCATCCTCCTGCCGATCAGA (SEQ ID NO: 47)
	hKlf4-AS1048	Nº. 43-94	TTGGTAATGGAGCGGCGGGACTTG (SEQ ID NO: 48)
hKlf4 (TG)	hKLF4-S1380	Nº. 66-24	ccacctgccttacacatgaaga (SEQ ID NO: 49)
	WPRE-70R	Nº. 74-73	TAGCGTAAAAGGAGAACATAG (SEQ ID NO: 50)
hSox2 (total)	hSox2-S875	Nº. 66-23	ttcacatgtcccagcactaccaga (SEQ ID NO: 51)
	HsSox2-AS	Nº. 31-72	TCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGC (SEQ ID NO: 52)
hSox2 (TG)	hSox2-S875 (66-23)	Nº. 66-23	ttcacatgtcccagcactaccaga (SEQ ID NO: 53)
	FMDV-2A-R2	Nº. 74-72	TTTGTGACAGGAGCGACAAT (SEQ ID NO: 54)
hL-Myc (total)	hMYCL1-S1027	Nº. 71-59	GCGAACCCAAGACCCAGGCCTGCTCC (SEQ ID NO: 55)
	hMYCL1-AS1145	Nº. 71-60	CAGGGGGTCTGCTGGCACCGTGATG (SEQ ID NO: 56)
hLMyc (TG)	hLMyc-1005F	Nº. 74-76	GGCTGAGAAGAGGATGGCTAC (SEQ ID NO: 57)
	FMDV-2A-R2	Nº. 74-72	TTTGTGACAGGAGCGACAAT (SEQ ID NO: 58)
hLin28 (total)	hLin28S502	Nº. 49-64	AGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGC (SEQ ID NO: 59)
	hLIN28-AS	Nº. 47-6	TCAATTCTGTGCCTCCGGAGCAGGGTAGG (SEQ ID NO: 60)
hLin28 (TG)	hLin28 S502	Nº. 49-64	AGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGC (SEQ ID NO: 61)
	WPRE-70R	Nº. 74-73	TAGCGTAAAAGGAGAACATAG (SEQ ID NO: 62)

A continuación, cada uno de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL, que se había utilizado para la transfección, se preparó como una solución de 10⁶ copias/µL, y esta solución se diluyó en serie 10 veces. Con cada solución inicial y dilución serial como plantillas, la PCR cuantitativa se realizó de la misma manera. Para cada gen de reprogramación, se generó una curva estándar para cada conjunto de cebadores para medir la cantidad total expresada y el conjunto de cebadores para medir la cantidad de genes exógenos expresados. Los resultados de la PCR cuantitativa para cada célula iPS se convirtieron utilizando esta curva estándar, y el número de copias de cada gen por 12,5 ng de ARN total se calculó como la cantidad total expresada y la cantidad de genes exógenos expresados.

Las representaciones logarítmicas de este número de copias en el eje de ordenadas se muestran en la Fig. 20 (Oct3/4) y la Fig. 21 (Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28) (la zona gris indica valores bajo el límite de detección). Se observó un gran número de clones, entre ellos 409B-2 y 421C-1, en los que el nivel de expresión estaba bajo el límite de detección para todos los genes exógenos examinados. Se demostró que la elección de estas células permite la utilización de

células iPS más seguras.

Ejemplo 12

Caracterización de células humanas de Epi-iPS

1) Análisis de micromatrices y análisis de matrices CGH

- 5 Para determinar si el patrón de expresión génica difería entre las células iPS humanas desarrolladas mediante la transferencia de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a fibroblastos dérmicos (TIG y HDF), células humanas tipo ES, y TIG y HDF utilizados para la transferencia, se realizó un análisis de micromatrices de ADN como se describe en Cell, 131, 861-872 (2007). Los coeficientes de correlación entre las distintas células se muestran en la Tabla 7.

10 Tabla 7

Nombre de la matriz	409B-2 (P7)	418C-1 (P7)	421C-1 (P7)	426C-2 (P9)	428C-2 (P7)	KhES1 (7-5-4-5-4)	KhES3 (4-9-4-4-4)	KhES3 (4-9-4-4-4)	TIG107-SLC	TIG120-SLC	HDF1388-SLC
409B-2 (P7)	1,000000	0,988557	0,982883	0,982627	0,964413	0,974758	0,984130	0,984364	0,787134	0,792555	0,820612
418C-1 (P7)	0,988557	1,000000	0,980910	0,981387	0,984424	0,970780	0,982916	0,982731	0,796518	0,800264	0,827104
421C-1 (P7)	0,982883	0,980910	1,000000	0,988431	0,980966	0,978521	0,985702	0,984871	0,795027	0,801948	0,824806
426C-2 (P9)	0,982627	0,981387	0,988431	1,000000	0,983527	0,980344	0,988320	0,988782	0,797564	0,803897	0,832218
428C-2 (P7)	0,984413	0,984424	0,980966	0,983527	1,000000	0,972649	0,982585	0,983471	0,792073	0,796452	0,820714
KhES1 (7-5-4-5-4)	0,974758	0,970780	0,978521	0,980344	0,972649	1,000000	0,983036	0,983429	0,780730	0,788327	0,813383
KhES3 (4-9-4-4-4)	0,984130	0,982916	0,985702	0,988320	0,982585	0,983036	1,000000	0,993120	0,783260	0,790745	0,821393
KhES3 (4-9-4-4-4)	0,984364	0,982731	0,984871	0,988782	0,983471	0,983429	0,993120	1,000000	0,787711	0,795464	0,820877
TIG107-SLC	0,787134	0,796518	0,795027	0,797564	0,792073	0,780730	0,783260	0,787711	1,000000	0,986470	0,892890
TIG120-SLC	0,792555	0,800264	0,801948	0,803897	0,796452	0,788327	0,790745	0,795464	0,986470	1,000000	0,887098
HDF1388-SLC	0,820612	0,827104	0,824808	0,832218	0,820714	0,813383	0,821393	0,820877	0,892890	0,887098	1,000000

15 Los resultados de un análisis de agrupamiento basado en las diferencias en la cantidad expresada entre varios genes se muestran en la Fig. 22. Los resultados del análisis del diagrama de dispersión se muestran en la Fig. 23. Las células iPS desarrolladas utilizando un vector episómico exhibieron un patrón de expresión similar al de las células ES y, por lo tanto, fue probado que eran células iPS similares a las células ES.

Los resultados del análisis de matrices CGH se muestran en la Fig. 24. Una comparación con la célula TIG utilizada para la transferencia no mostró anomalías importantes. Un análisis de cariotipo por tinción de la banda G en algunas células no reveló hallazgos anormales.

En los experimentos descritos anteriormente, se utilizaron las siguientes matrices y escáneres:

- 20 • Matriz para GE Humano: kit de micromatrices G4112F de genoma humano entero, 4x44K (Agilent)
• Matriz para CGH Humano: kit de micromatrices G4426B N°. 14950 de genoma humano CGH, 4x44K (Agilent)

- Escáner: Escáner de micromatriz de ADN, Modelo G2539A

2) Análisis de RT-PCR

Se examinó la expresión de marcadores pluripotentes de células madre, como OCT3/4, Sox2, Nanog y ESG1, en las células epi-iPS. Los resultados de las células epi-iPS derivadas de DP se muestran en la Fig. 32A, y los resultados de las células epi-iPS derivadas de fibroblastos se muestran en la Fig. 32B. Los análisis RT-PCR revelaron que los clones de epi-iPSC expresaban estos genes a niveles comparables a los de los hESCs y a los clones de iPSC derivados de retrovirus.

3) Secuenciación de bisulfito

El ADN genómico se extrajo de las células iPS después de eliminar las células alimentadoras, y se analizó como se describió anteriormente (K. Takahashi et al, Cell 131, 861 (30 de noviembre de 2007)).

Los niveles de metilación de ADN de los sitios de CpG en la región promotora de Nanog eran altos en las células HDF y DP parentales, pero bajos en las células epi-iPS y ES (Fig. 33).

4) Formación de teratoma

Se examinó el potencial de diferenciación de las epi-iPSC in vivo. Las células se recogieron con la solución de CTK y se centrifugaron. Fueron vueltos a suspender los peletes de células en DMEM/F12. La mitad de las células de una placa confluente de 60 mm se inyectaron en los testículos de un ratón SCID (CREA, Japón). De 8 a 12 semanas después de la inyección, los tumores se diseccionaron y se fijaron con un 4% de paraformaldehído en PBS. Los tejidos incrustados en parafina fueron seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina. Los resultados se muestran en la Fig. 34. El examen histológico confirmó que estos tumores eran teratomas y contenían tejidos de las tres capas de gérmenes, incluyendo epitelio neural, cartílago, músculo y epitelio tipo intestino (Fig. 34 A, B).

5) Diferenciación in vitro

Se llevó a cabo la diferenciación in vitro dirigida a las neuronas dopaminérgicas utilizando el cultivo sin suero del método de los agregados de cuerpos embrioides (SFEB) combinado con la doble inhibición de SMAD por un antagonista BMP y un inhibidor de activina/nodal (M. Eiraku et al, Cell Stem Cell, 3, 519 (2008)).

Para la inducción de las neuronas dopaminérgicas, se preparó el medio de diferenciación de la siguiente manera: DMEM/F12 suplementado con 5% de reemplazo de suero Knockout (KSR; Invitrogen), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y 2-mercaptopetanol 0,1 mM. Las células iPS se disociaron en células individuales en Accumax (Invitrogen) y se volvieron a agregar rápidamente en el medio de diferenciación suplementado con Y-27632 10 µM, 2 µM de dorsomorfos y SB431542 10 µM (Sigma) a una densidad de 9000 células/150 µL/pocillo utilizando placas de adhesión celular baja de 96 pocillos (LIPIDURE-COAT PLATE A-U96, NOF Corporation). Después de 5 días de cultivo, los agregados celulares fueron estimulados con 100 ng/ml de FGF-8 y 20 ng/ml de Wnt1. Desde el día 8, hubo en el medio 200 ng/ml de SHH. El día 12, las células agregadas fueron recogidas y transferidas a una placa recubierta de poli-ornitina/laminina de 60 mm en medio NB (medio Neurobasal que contiene el suplemento B27; Invitrogen) con 200 ng/ml de SHH. A partir de ahí, el medio se cambió a medio NB suplementado con 1 ng/ml de FGF-20 y 12,5 ng/ml de bFGF el día 15. Las células se recogieron el día 22 y se sembraron en placas de cámara de 8 pocillos a una densidad de 2×10^5 por pocillo en medio NB suplementado con 2 ng/ml de GDNF, 20 ng/ml de BDNF, dbcAMP 400 µM y 200 µM de ácido ascórbico. Las células diferenciadas fueron fijadas para los análisis de inmunotinción el día 29. Se usaron anticuerpos primarios para nestin (Chemicon), Ki67 (Novocastra), PAX6 (Covance), betalII-Tubulina (Covance Research Products), tirosina hidroxilasa (Chemicon), MAP2ab (Sigma) y VAMT-2 (PelFreeze). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa488, Alexa594 o Cy5, según procedía. Para visualizar los núcleos, se añadieron 200 ng/ml de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) al lavado final.

Los resultados se muestran en la Fig. 35. La mayoría de las células expresaban el inmaduro marcador neural nestin (Fig. 35B-A). Algunas de las células seguían proliferando y eran positivas para Ki67 (Fig. 35B-B, C, D). Los grupos de células neuronales inmaduras dieron positivo para Pax6, mientras que los grupos celulares más maduros expresaron un marcador de neuronas dopaminérgicas, tirosina hidroxilasa (TH), después del tratamiento con factores inductores, como SHH y FGF8 (Fig. 35B-E, 35B-F). Las células TH-positivas también se localizan conjuntamente con los marcadores neuronales Tuj1 y MAP2ab, y el transportador de dopamina VMAT2 (Fig. 35A-E, F, G, 35B-G, H, I, J, K). Por lo tanto, las epi-iPSC tienen el potencial de diferenciarse en neuronas dopaminérgicas. Las epi-iPSC desarrolladas por el uso de la mezcla Y3 (pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) también fueron sometidas a un análisis similar (RT-PCR, análisis del número de copias, cariotipado y formación de teratoma). Como consecuencia, se confirmó que las epi-iPSC eran comparables a las epi-iPSC desarrolladas por el uso de la mezcla Y4 (pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL). La lista de análisis de las respectivas clonaciones epi-iPSC se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Lista del clon de epi-iPS.

	Fuente					Expresión génica	Bisulfito	Análisis del número de copias	Cario-tipado	HLA	STR	Teratoma	Diferenciación	
	Clon	Origen	Edad	Sexo	Raza	Factores	RT-PCR	Micro-matriz					Dopa	RPE
404C-2	HDF1388	36	F	C	Y4	✓	✓		✓				✓	✓
409B-2	HDF1388	36	F	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
414C-2	HDF1388	36	F	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
418C-1	TIG114	36	M	J	Y4	✓			✓	✓			✓	
421C-1	TIG107	81	F	J	Y4	✓			✓	✓			✓	
426C-2	HDF1554	77	F	C	Y4	✓			✓	✓				
427D-4	HDF1437	56	M	C	Y4	✓			✓	✓				
428C-2	TIG120	6	F	J	Y4	✓			✓	✓			✓	
451F-3	DP74	16	F		Y4	✓	✓		✓	✓			✓	✓
453F-2	DP94	16	F		Y4	✓			✓	✓	✓			
454B-1	DP74	16	F		Y1	✓	✓		✓	✓				
454C-2	DP74	16	F		Y2	✓			✓	✓				
454D-1	DP74	16	F		Y3	✓			✓	✓			✓	
454E-2	DP74	16	F		Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
454F-1	DP74	16	F		T2					✓				
457C-1	DP74	16	F		Y4	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	Nd
ND, no se pudo detectar la diferenciación de RPE en el protocolo de diferenciación de los inventores (N = 1).														

Ejemplo 13**Desarrollo y cultivo de células iPS en condiciones sin Xeno (en ausencia de ingredientes heterólogos)**

- 5 En la utilización de células iPS desarrolladas utilizando un vector episómico en el campo de la medicina regenerativa, es clave el desarrollo y mantenimiento de las células iPS bajo condiciones sin Xeno. Por lo tanto, se realizaron investigaciones como se describe a continuación.
- 10 Se sabe que una célula iPS humana se puede desarrollar y mantener incluso cuando un fibroblasto dérmico humano (HDF) que se había utilizado para la transfección se utilizaba como células alimentadoras [Takahashi et al., PLoS One, Vol. 4, número 12, e8067 (2009)]. Esto es muy significativo en la consideración de aplicaciones clínicas, ya que el uso de células alimentadoras autólogas permite el mantenimiento de las células iPS bajo condiciones sin Xeno. Por lo tanto, se realizó una investigación para determinar si la línea de células madre de pulpa dental DP74 podía servir como células alimentadoras. La célula iPS utilizada era una célula iPS humana desarrollada transfiriendo pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a HDF. El caldo de cultivo utilizado fue un medio preparado añadiendo bFGF (Wako) a un medio de cultivo celular ES de primates ordinario (ReproCELL) a 4 ng/mL (en adelante en este documento, medio ReproCELL). Las fotografías de las células después de 1 paso se muestran en la Fig. 25. La morfología tipo ES se mantuvo en una medida equivalente en comparación con el uso de MSTO como células alimentadoras.
- 15 2) Mantenimiento de las células iPS en condiciones sin Xeno (1)

- 20 Se realizó una investigación para determinar si las células iPS podían mantenerse en condiciones completamente libres de Xeno utilizando el medio sin Xeno TeSR2 (StemCell Technologies) y el agente de recubrimiento de placa sin

Xeno CELLstart (GIBCO) (no utiliza células alimentadoras). Las células iPS utilizadas fueron células iPS humanas desarrolladas transfiriendo pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a HDF. Las fotografías de las células después de 1 paso se muestran en la Fig. 26. Cuando se usaba el medio ReproCELL, las células empezaban a cambiar su morfología, mientras que cuando se utilizaba TeSR2, las células mantenían la morfología no diferenciada.

5 **3) Mantenimiento de las células iPS en condiciones sin Xeno (2)**

Se realizó una investigación para determinar si las células iPS se podían mantener utilizando el medio TeSR2 sin Xeno (StemCell Technologies) y KSR-XF [KnockOut DMEM (Invitrogen) suplementado con 15% de KnockOut SR sin Xeno (Invitrogen), 2 mM de GlutaMAX-I (Invitrogen), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 0,1 mM de 2-mercaptopetanol (Invitrogen) y 8 ng/mL de bFGF (Wako)], con la línea DP74 como células alimentadoras. La célula iPS 10 utilizada fue una célula iPS humana desarrollada transfiriendo pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL a HDF. Las fotografías de las células después de 1 paso se muestran en la Fig. 27. Independientemente de los medios sin Xeno que se utilizaron, se mantuvo la morfología del tipo ES.

Ejemplo 14

Transfección bajo condiciones sin Xeno

15 Se realizó una investigación para determinar si las condiciones sin Xeno servían al propósito no sólo después del desarrollo de células iPS, sino también antes del desarrollo de células iPS, es decir, en el momento de la reprogramación de la transferencia de genes a una célula somática.

En un estudio preliminar, pCXLE-EGFP fue transferido a DP74 usando Microporator. El medio sin Xeno utilizado fue StemPro MSC-SFM (Invitrogen).

20 El DP74 se cultivó y mantuvo a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo de 100 mm recubierta con CELLstart utilizando StemPro MSC-SFM (Invitrogen) como caldo de cultivo. En el momento de la transferencia de pCXLE-EGFP, el medio fue retirado, y las células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió la solución de disociación de células sin Xeno (Invitrogen), y se realizó una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió el MSC-SFM de StemPro para suspender las células, y las células se recuperaron en un tubo de centrifuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Después de que las células se suspendieran de nuevo en MSC-SFM de StemPro, 6 x 10⁵ células se recuperaron en un tubo de 1,5 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. pCXLE-EGFP (3 µg) fue transferido a las células usando un Microporator. Esta transferencia se llevó a cabo utilizando un chip de 100 µL con un pulso a 1850 V durante 20 ms, o 25 con dos pulsos a 1200 V durante 30 ms. Las células transfectadas se transfirieron a una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon) recubierta de CELLstart que contenía 3 mL de MSC-SFM de StemPro, y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 7 días. Los resultados se muestran en la Fig. 28. Cuando se utilizaba el medio sin Xeno (MSC-SFM de StemPro), la eficiencia de transferencia era baja bajo las condiciones de 1850 V, 20 MS, 1 pulso. Sin embargo, 30 cuando las condiciones se cambiaban a 1200 V, 30 ms, 2 pulsos, la tasa de supervivencia de la célula y la eficiencia de transferencia aumentaron. Por lo tanto, estas últimas condiciones fueron empleadas para la transfección que siguió.

35 Para la reprogramación se utilizaron los tres plásmidos diferentes: pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL. En los experimentos, se usó la línea DP74 de células madre de pulpa dental. La línea DP74 se cultivó y mantuvo a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en una placa de cultivo con recubrimiento CELLstart de 100 mm, utilizando el MSC-SFM de StemPro como caldo de cultivo. En el momento de la transferencia del plásmido, el medio fue retirado, y las 40 células fueron lavadas por la adición de 5 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió TripLE Select (Invitrogen), y una reacción se llevó a cabo a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió el MSC-SFM de StemPro para suspender las células, y las células se recuperaron en un tubo de centrifuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Después de que las células se suspendieran de nuevo en MSC-SFM de StemPro, se recuperaron 6 x 10⁵ células en un tubo de 1,5 mL. 45 La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Los tres plásmidos diferentes (1 µg cada uno, 3 µg en total) fueron transferidos a las células utilizando un Microporator. Esta transferencia se llevó a cabo utilizando un chip de 100 µL con dos pulsos a 1200 V durante 30 ms. Las células transfectadas se transfirieron a una placa de cultivo de 6 pocillos con recubrimiento de CELLstart (Falcon) que contenía 3 mL de MSC-SFM de StemPro y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 7 días. El medio fue entonces retirado, y las 50 células fueron lavadas por la adición de 2 mL de PBS. Después de retirar el PBS, se añadió TripLE Select (Invitrogen), y se llevó a cabo una reacción a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Después de que las células crecieran, se añadió el MSC-SFM de StemPro para suspender las células, y las células se recuperaron en un tubo de centrifuga de 15 mL. La suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Después de que las células se suspendieran de nuevo en MSC-SFM de StemPro, 1 x 10⁵ células fueron sembradas en una placa de 100 mm bajo las diversas condiciones mostradas en la Tabla 9. Al día siguiente, el medio fue reemplazado por los medios 55 mostrados en la Tabla 9; este intercambio de medio se continuó cada 2 días. Las fotografías de las colonias de células tipo ES humanas que surgieron el día 26 después de la transferencia se muestran en la Fig. 29.

Tabla 9

Nº.	Medio	Células alimentadoras
1	Medio ReproCELL	MSTO
2	TeSR2	MSTO
3	KSR-XF	MSTO
4	TeSR2	células DP74 (autoalimentadoras, CELLstart)
5	KSR-XF	células DP74 (autoalimentadoras, CELLstart)
6	TeSR2	Sin células alimentadoras (recubiertas con CELLstart)

Cualesquiera que fueran los medios y las células alimentadoras, se pudieron desarrollar colonias iPS. Los resultados para los Nº. 4 a 6 (todos obtenidos bajo condiciones sin Xeno) en la Tabla 9, en particular, demuestran que una célula iPS puede desarrollarse y mantenerse a partir de una célula madre de pulpa dental bajo condiciones libres de virus utilizando vectores episómicos, y completamente bajo condiciones sin Xeno desde el momento de la transfección.

Ejemplo 15

Desarrollo de células iPS a partir de células mononucleares de sangre periférica humana.

Tres microgramos de plásmidos de expresión (un microgramo de pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL) fueron electroporados en células mononucleares periféricas recién aisladas ($5,0 \times 10^6$) con Nucleofector (Lonza) con el kit de células T humanas según la instrucciones del fabricante. Se usó la condición del programa V-24. Seis horas más tarde, las células sanguíneas transfectadas fueron estimuladas con citoquinas (IL-6, sIL-6R, SCF, TPO, Flit3/4-ligando e IL-2) y anticuerpos anti-CD3/CD28. Despues de 2 días, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos cubierta con un alimentador MEF. El medio de cultivo fue cambiado gradualmente de X-vivo 10 suplementado con IL-6, sIL-6R, SCF, TPO, Flit3/4-ligando e IL-2 a medio hES despues de la siembra, como se ilustra en la Fig. 36A. Las colonias fueron fotografiadas el día 29 (Fig. 36B). Se pudieron desarrollar colonias de iPS humanas con morfología plana como las hESC.

Aunque la presente invención se haya descrito con énfasis en las realizaciones preferidas, será obvio para los expertos en la técnica que las realizaciones preferidas puedan ser modificadas. La presente invención pretende que la presente invención pueda ser realizada por métodos que no sean los descritos detalladamente en la presente memoria descriptiva, siempre que sean de acuerdo con las reivindicaciones anexas. La presente invención se define en el anexo "REIVINDICACIONES".

Listado de secuencias

<110> Kyoto University

25 <120> Método para el establecimiento eficiente de células madre pluripotentes inducidas

<130> 091561

<150> US 61/232,402

<151> 2009-08-07

30 <150> US 61/307,306

<151> 2010-02-23

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1782

35 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (129)..(1301)

ES 2 726 766 T3

<400> 1

aagttctgt a gcttcaggttc attgggacca tcctggctgt aggttagcgac tacagttagg 60

gggcacccatg cattcaggcc ctcatccctcc tccttcccag cagggtgtca cgcttctccg 120

aagactgg atg act gcc atg gag gag tca cag tcg gat atc agc ctc gag 170

Met Thr Ala Met Glu Glu Ser Gln Ser Asp Ile Ser Leu Glu

1

5

10

15

ES 2 726 766 T3

ctc cct ctg agc cag aca ttt tca ggc tta tgg aaa cta ctt cct 218
 Leu Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Gly Leu Trp Lys Leu Leu Pro
 15 20 25 30

 cca gaa gat atc ctg cca tca cct cac tgc atg gac gat ctg ttg ctg 266
 Pro Glu Asp Ile Leu Pro Ser Pro His Cys Met Asp Asp Leu Leu
 35 40 45

 ccc cag gat gtt gag gag ttt ttt gaa ggc cca agt gaa gcc ctc cga 314
 Pro Gln Asp Val Glu Glu Phe Phe Glu Gly Pro Ser Glu Ala Leu Arg
 50 55 60

 gtg tca gga gct cct gca gca cag gac cct gtc acc gag acc cct ggg 362
 Val Ser Gly Ala Pro Ala Ala Gln Asp Pro Val Thr Glu Thr Pro Gly
 65 70 75

 cca gtg gcc cct gcc cca gcc act cca tgg ccc ctg tca tct ttt gtc 410
 Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro Trp Pro Leu Ser Ser Phe Val
 80 85 90

 cct tct caa aaa act tac cag ggc aac tat ggc ttc cac ctg ggc ttc 458
 Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gly Phe His Leu Gly Phe
 95 100 105 110

 ctg cag tct ggg aca gcc aag tct gtt atg tgc acg tac tct cct ccc 506
 Leu Gln Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Met Cys Thr Tyr Ser Pro Pro
 115 120 125

 ctc aat aag cta ttc tgc cag ctg gcg aag acg tgc cct gtg cag ttg 554
 Leu Asn Lys Leu Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu
 130 135 140

 tgg gtc agc gcc aca cct cca gct ggg agc cgt gtc cgc gcc atg gcc 602
 Trp Val Ser Ala Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Val Arg Ala Met Ala
 145 150 155

 atc tac aag aag tca cag cac atg acg gag gtc gtg aga cgc tgc ccc 650

ES 2 726 766 T3

Ile	Tyr	Lys	Lys	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	
160																
cac	cat	gag	cgc	tgc	tcc	gat	ggt	gat	ggc	ctg	gct	cct	ccc	cag	cat	698
His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	Gly	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	
175																
ctt	atc	cgg	gtg	gaa	gga	aat	ttg	tat	ccc	gag	tat	ctg	gaa	gac	agg	746
Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	Leu	Tyr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	
195																
cag	act	ttt	cgc	cac	agc	gtg	gtg	gta	cct	tat	gag	cca	ccc	gag	gcc	794
Gln	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Ala	
210																
ggc	tct	gag	tat	acc	acc	atc	cac	tac	aag	tac	atg	tgt	aat	agc	tcc	842
Gly	Ser	Glu	Tyr	Thr	Thr	Ile	His	Tyr	Lys	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	
225																
tgc	atg	ggg	ggc	atg	aac	cgc	cga	cct	atc	ctt	acc	atc	atc	aca	ctg	890
Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	
240																
gaa	gac	tcc	agt	ggg	aac	ctt	ctg	gga	cgg	gac	agc	ttt	gag	gtt	cgt	938
Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Asp	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	
255																
gtt	tgt	gcc	tgc	cct	ggg	aga	gac	cgc	cgt	aca	gaa	gaa	aat	ttc	986	
Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Asn	Phe		
275																
cgc	aaa	aag	gaa	gtc	ctt	tgc	cct	gaa	ctg	ccc	cca	ggg	agc	gca	aag	1034
Arg	Lys	Lys	Glu	Val	Leu	Cys	Pro	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	
290																
aga	gcg	ctg	ccc	acc	tgc	aca	agc	gcc	tct	ccc	ccg	caa	aag	aaa	aaa	1082
Arg	Ala	Leu	Pro	Thr	Cys	Thr	Ser	Ala	Ser	Pro	Pro	Gln	Lys	Lys		

ES 2 726 766 T3

305	310	315	
cca ctt gat gga gag tat ttc acc ctc aag atc cgc ggg cgt aaa cgc			1130
Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Lys Arg			
320	325	330	
ttc gag atg ttc cgg gag ctg aat gag gcc tta gag tta aag gat gcc			1178
Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala			
335	340	345	350
cat gct aca gag gag tct gga gac agc agg gct cac tcc agc tac ctg			1226
His Ala Thr Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu			
355	360	365	
aag acc aag aag ggc cag tct act tcc cgc cat aaa aaa aca atg gtc			1274
Lys Thr Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val			
370	375	380	
aag aaa gtg ggg cct gac tca gac tga ctgcctctgc atcccgccc			1321
Lys Lys Val Gly Pro Asp Ser Asp			
385	390		
cataccaggc ctccccctct ccttgcgtgc ttatgacttc agggctgaga cacaatccctc			1381
ccgggtccctt ctgctgcctt ttttaccttg tagcttagggc tcagccccct ctctgagtag			1441
tggttcctgg cccaaagtgg ggaatagggtt gatagttgtc aggtctctgc tggcccagcg			1501
aaattctatac cagccagttg ttggaccctg gcacctacaa tgaaatctca ccctacccca			1561
cacccctgtaa gattctatct tggccctca tagggccat atccctccagg gcctactttc			1621
cttccattct gcaaaggctg tctgcattta tccacccccc accctgtctc ccttttttt			1681
ttttttttac ccctttttat atatcaattt cctatittac aataaaaattt ttttatcact			1741
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a			1782

<210> 2

<211> 390

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Thr Ala Met Glu Glu Ser Gln Ser Asp Ile Ser Leu Glu Leu Pro
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Gly Leu Trp Lys Leu Leu Pro Pro Glu
20 25 30

Asp Ile Leu Pro Ser Pro His Cys Met Asp Asp Leu Leu Leu Pro Gln
35 40 45

Asp Val Glu Glu Phe Phe Glu Gly Pro Ser Glu Ala Leu Arg Val Ser
50 55 60

Gly Ala Pro Ala Ala Gln Asp Pro Val Thr Glu Thr Pro Gly Pro Val
65 70 75 80

Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro Trp Pro Leu Ser Ser Phe Val Pro Ser
85 90 95

Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gly Phe His Leu Gly Phe Leu Gln
100 105 110

ES 2 726 766 T3

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Met Cys Thr Tyr Ser Pro Pro Leu Asn
115 120 125

Lys Leu Phe Cys Gin Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gin Leu Trp Val
130 135 140

Ser Ala Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr
145 150 155 160

Lys Lys Ser Gin His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His
165 170 175

Glu Arg Cys Ser Asp Gly Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gin His Leu Ile
180 185 190

Arg Val Glu Gly Asn Leu Tyr Pro Glu Tyr Leu Glu Asp Arg Gin Thr
195 200 205

Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Ala Gly Ser
210 215 220

Glu Tyr Thr Thr Ile His Tyr Lys Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met
225 230 235 240

Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp
245 250 255

Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asp Ser Phe Glu Val Arg Val Cys

ES 2 726 766 T3

260

265

270

Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Phe Arg Lys

275

280

285

Lys Glu Val Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Gly Ser Ala Lys Arg Ala

290

295

300

Leu Pro Thr Cys Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gin Lys Lys Pro Leu

305

310

315

320

Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Lys Arg Phe Glu

325

330

335

Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala His Ala

340

345

350

Thr Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu Lys Thr

355

360

365

Lys Lys Gly Gin Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val Lys Lys

370

375

380

Val Gly Pro Asp Ser Asp

385

390

<210> 3

<211> 2586

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (198) .. (1379)

<400> 3

ES 2 726 766 T3

gattgggtt ttccctccc atgtgctcaa gactggcgct aaaagtttg agcttctcaa	60
aagtctagag ccaccgtcca gggagcaggt agctgctggg ctccggggac actttgcgtt	120
cgggctggga gcgtgcttc cacgacggtg acacgcttcc ctggattggc agccagactg	180
ccttcgggt cactgcc atg gag gag ccg cag tca gat cct agc gtc gag	230
Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu	
1 5 10	
ccc cct ctg agt cag gaa aca ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct	278
Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro	
15 20 25	
gaa aac aac gtt ctg tcc ccc ttg ccg tcc caa gca atg gat gat ttg	326
Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu	
30 35 40	
atg ctg tcc ccg gac gat att gaa caa tgg ttc act gaa gac cca ggt	374
Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly	
45 50 55	
cca gat gaa gct ccc aga atg cca gag gct gct ccc ccc gtg gcc cct	422
Pro Asp Glu Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro	
60 65 70 75	
gca cca gca gct cct aca ccg gcg gcc cct gca cca gcc ccc tcc tgg	470
Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp	

ES 2 726 766 T3

80	85	90	
ccc ctg tca tct tct gtc cct tcc cag aaa acc tac cag ggc agc tac			518
Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr			
95	100	105	
ggc ttc cgt ctg ggc ttc ttg cat tct ggg aca gcc aag tct gtg act			566
Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr			
110	115	120	
tgc acg tac tcc cct gcc ctc aac aag atg ttt tgc caa ctg gcc aag			614
Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys			
125	130	135	
acc tgc cct gtg cag ctg tgg gtt gat tcc aca ccc ccg ccc ggc acc			662
Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr			
140	145	150	155
cgc gtc cgc gcc atg gcc atc tac aag cag tca cag cac atg acg gag			710
Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu			
160	165	170	
gtt gtg agg cgc tgc ccc cac cat gag cgc tgc tca gat agc gat ggt			758
Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly			
175	180	185	
ctg gcc cct cct cag cat ctt atc cga gtg gaa gga aat ttg cgt gtg			806
Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val			
190	195	200	
gag tat ttg gat gac aga aac act ttt cga cat agt gtg gtg gtg ccc			854
Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro			
205	210	215	
tat gag ccg cct gag gtt ggc tct gac tgt acc acc atc cac tac aac			902
Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn			
220	225	230	235

ES 2 726 766 T3

tac atg tgt aac agt tcc tgc atg ggc ggc atg aac cgg agg ccc atc Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile			950
240	245	250	
ctc acc atc atc aca ctg gaa gac tcc agt ggt aat cta ctg gga cgg Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg			998
255	260	265	
aac agc ttt gag gtg cgt gtt tgt gcc tgt cct ggg aga gac cgg cgc Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg			1046
270	275	280	
aca gag gaa gag aat ctc cgc aag aaa ggg gag cct cac cac gag ctg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu			1094
285	290	295	
ccc cca ggg agc act aag cga gca ctg ccc aac aac acc acc agc tcc tct Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser			1142
300	305	310	315
ccc cag cca aag aag aaa cca ctg gat gga gaa tat ttc acc ctt cag Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln			1190
320	325	330	
atc cgt ggg cgt gag cgc ttc gag atg ttc cga gag ctg aat gag gcc Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala			1238
335	340	345	
ttg gaa ctc aag gat gcc cag gct ggg aag gag cca ggg ggg agg agc agg Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg			1286
350	355	360	
gct cac tcc agc cac ctg aag tcc aaa aag ggt cag tct acc tcc cgc Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg			1334
365	370	375	

ES 2 726 766 T3

cat aaa aaa ctc atg ttc aag aca gaa ggg cct gac tca gac tga	1379
His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp	
380 385 390	
cattctccac ttcttgttcc ccactgacag cctcccaccc ccatctctcc ctccccctgcc	1439
attttgggtt ttgggtcttt gaacccttgc ttgcaatagg tgtgcgtcag aagcacccag	1499
gacttccatt tgctttgtcc cggggctcca ctgaacaagt tggcctgcac tggtgttttg	1559
tttgtgggag gaggatgggg agtaggacat accagcttag atttaaggt ttttactgtg	1619
agggatgtt gggagatgta agaaaatgttc ttgcagttaa gggtagttt acaatcagcc	1679
acattctagg tagggccca ctteacogta ctaaccagg aagctgtccc tcactgttga	1739
attttctcta acttcaaggc ccatatctgt gaaatgctgg catttgcacc tacctcacag	1799
agtgcattgt gagggtaat gaaaataatgt acatctggcc ttgaaaccac cttttattac	1859
atggggtcta gaacttgacc cccttgaggg tgcttgttcc ctctccctgt tggcggtgg	1919
gttggtagtt tctacagttt ggcagctggt tagtagagg gagttgtcaa gtctctgctg	1979
gcccagccaa accctgtctg acaacctctt ggtgaacctt agtacctaaa agggaaatctc	2039
accccatccc acaccctgga ggatttcatc tcttgtatat gatgatctgg atccaccaag	2099
acttgtttta tgctcagggt caatttcttt tttctttttt tttttttttt ttctttttct	2159
ttgagactgg gtctcgcttt gttgcccagg ctggagtgga gtggcggtat ctggcattac	2219
tgcagccctt gcctccccgg ctgcgacagt cctgcctcag cctccggagt agctgggacc	2279
acaggttcat gccaccatgg ccagccaaact tttgcatttt ttgttagagat ggggtctcac	2339
agtgttgccc aggctggctt caaactccctg ggctcaggcg atccacctgt ctcaagccctcc	2399

cagagtgcgt ggattacaat tgtgagccac cacgtccagc tggaagggtc aacatcttt 2459

acattctgca agcacatctg catttcacc ccacccttcc ctccttctc cttttata 2519

tcccattttt atatcgatct ctatatttac aataaaaactt tgctgccacc tgtgtgtctg 2579

aggggtg 2586

<210> 4

<211> 393

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro

65 70 75 80

ES 2 726 766 T3

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser

ES 2 726 766 T3

225

230

235

240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr

245

250

255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val

260

265

270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn

275

280

285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr

290

295

300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys

305

310

315

320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu

325

330

335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp

340

345

350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His

355

360

365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met

370

375

380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

385

390

<210> 5

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5

<223> shRNA contra p53

<400> 5
tttgactgga tgactccat ggtcaagag accatggcag tcatccagtc tttttt 56

5 <210> 6
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

10 <400> 6
tttgatatcc tgccatcacc tcitcaagag agaggtgatg gcaggatatc tttttt 56

<210> 7
<211> 56
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

<400> 7
tttggcccaa gtgaagccct cctcaagag aggagggctt cacttgggcc tttttt 56

20 <210> 8
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> shRNA contra p53

<400> 8
tttgtaagc cctccgagtg tctcaagag agacactcg agggttcac tttttt 56

<210> 9
<211> 56
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

<400> 9
35 ttggccctcc gagtgtcagg agttcaagag actcctgaca ctggagggc tttttt 56

<210> 10
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> shRNA contra p53

<400> 10
tttgctgtt atgtcacgt acttcaagag agtacgtgca cataacagac tttttt 56

45 <210> 11
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

50 <400> 11

ttgtactct cctccctca attcaagag aattgagggg aggagagtac tttttt 56
 <210> 12
 <211> 56
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 12
 ttgctattc tgccagctgg cgttcaagag acgccagctg gcagaatagc tttttt 56
 10 <210> 13
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> shRNA contra p53
 <400> 13
 ttgacgtgc cctgtgcagt tttcaagag acaactgcac agggcacgac tttttt 56
 <210> 14
 <211> 56
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 14
 25 ttgaagtca cagcacatga cgttcaagag acgtcatgtc ctgtacttc tttttt 56
 <210> 15
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 15
 ttgtcacag cacatgacgg agttcaagag actccgtcat gtgttgac tttttt 56
 <210> 16
 35 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 40 <400> 16
 ttggaaatt tgtatcccgaa gtttcaagag aactcgggat acaaatttcc tttttt 56
 <210> 17
 <211> 56
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 17
 ttgtacatg tggtaatagct ctttcaagag aggagctttt acacatgtac tttttt 56
 50 <210> 18

<211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> shRNA contra p53
 <400> 18
 ttgactcca gtggAACCT tctcaagag agaaggTCC cactggAGTC tttttt 56
 <210> 19
 <211> 56
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 19
 15 ttgtccTTT gcccGAact gctcaagag agcagtTCAG ggcaaaggAC tttttt 56
 <210> 20
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 20
 ttgatccgc gggcgtaaac gctcaagag agcgtttacg cccgcggatc tttttt 56
 <210> 21
 25 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 30 <400> 21
 ttgaccaag aaggGCCAGT ctTCAAGAG aagactggCC ctTCTGGTC tttttt 56
 <210> 22
 <211> 56
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA contra p53
 <400> 22
 ttgaaaAGTG gggcTgact cattcaagag atgagtCAGG ccccacttC tttttt 56
 40 <210> 23
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> shRNA contra p53
 <400> 23
 ttgttgggg aataggTTGA tattcaagag atatcaacct attccccaaAC tttttt 56
 <210> 24
 <211> 56
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

<400> 24
tttgcattcta tcttggccccc tcttcaagag agagggccca agatagaatc tttttt 56

5 <210> 25
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> shRNA contra p53

<400> 25
tttgcautac aggtacgtgt gtatgtgct gtcctacaca tgtacttgta gtgtttttt 59

<210> 26
<211> 59
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

<400> 26
20 tttgcagtut acttuccgcc gtagtgtgct gtcctatggc ggaaagtaga ctgtttttt 59

<210> 27
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> elemento sensible a p53

<400> 27
rrrgwwcyyy 10

<210> 28
30 <211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> shRNA contra p53

<400> 28
35 gactccaggta gtaatctact gctcgagcag tagattacca ctggagtc 48

<210> 29
<211> 34
<212> ADN
40 <213> Bacteriófago P1

<400> 29
ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34

<210> 30
<211> 34
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia mutante de loxP (lox71)

<400> 30
50 taccgttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34

<210> 31
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia mutante de loxP (lox66)
 <400> 31
 ataacttcgt atagcataca ttatacgaac ggta 34

10 <210> 32
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> shRNA contra p53

15 <400> 32
 gactccagtg gtaatctact tcaagagagt agattaccac tggagtc 47
 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 33
 acccatcatt cctgccccat caga 24

25 <210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 34
 atcacaagtg tgggtggcg tcct 24
 <210> 35
 <211> 24

35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 35
 gccggccgcct cagagtgcat cgac 24

<210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 36
 cgagtggagg gaggcgctgc gtag 24
 <210> 37

50 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 37
 ttccacgagg gtagtgaacc 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 38
 tcgggggtgt tagagacaac 20
 <210> 39
 15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 39
 atcagggcca agacatagag atg 23
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 40
 gccaatgcaa ctggacgtt 20
 30 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Cebador
 <400> 41
 gccaggaggt cttcgctgta 20
 <210> 42
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 42
 45 aatgcacggc tagggtaaaa 20
 <210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>

<223> Cebador
 <400> 43
 ccccaaggccc ccatttttgtt acc 23
 5 <210> 44
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 44
 acctcagttt gaatgcattgg gagagc 26
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 45
 cattcaaact gaggttaagg 20
 20 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 46
 tagcgtaaaaa ggagcaacat ag 22
 <210> 47
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 47
 35 acccatcctt cctgccccat caga 24
 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 48
 ttggtaatgg aggccggggaa ctgg 24
 45 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 49

ccacctcgcc ttacacatga aga 23
 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 50
 tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22
 10 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 51
 ttcacatgtc ccagcactac caga 24
 <210> 52
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 52
 25 tcacatgtgt gagagggca gtgtgc 26
 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 53
 ttcacatgtc ccagcactac caga 24
 <210> 54
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 54
 tttgttgac aggagcgaca at 22
 <210> 55
 <211> 26
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 55
 gcgAACCCAA gACCCAGGCC TGCTCC 26
 50 <210> 56

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador
 <400> 56
 caggggtct gctgcaccc tgatg 25
 <210> 57
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 57
 15 ggctgagaag aggatggcta c 21
 <210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 58
 ttgttgac aggagcgaca at 22
 <210> 59
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 59
 acccatatgg tagcctcatg tccgc 25
 <210> 60
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 60
 tcaattctgt gcctccggga gcagggtagg 30
 40 <210> 61
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Cebador
 <400> 61
 acccatatgg tagcctcatg tccgc 25
 <210> 62
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 726 766 T3

<220>
<223> Cebador

<400> 62
tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22

5 <210> 63
<211> 81
<212> ADN
<213> Virus de la glosopeda

<400> 63
10 aaaattgtcg ctccgtcaa acaaactctt aacttgatt tactcaaact ggctgggat 60
gtagaaagca atccaggc a 81

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de producción de células iPS, que comprende poner en contacto (a) Oct3/4 o un ácido nucleico que lo codifique, (b) Klf4 o un ácido nucleico que lo codifique, (c) Sox2 o un ácido nucleico que lo codifique, (d) L-Myc o un ácido nucleico que lo codifique, (e) un inhibidor funcional de p53, y (f) Lin28 o Lin28b o un ácido nucleico que lo codifique, con una célula somática in vitro.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, que comprende transferir (a) un ácido nucleico que codifica Oct3/4, (b) un ácido nucleico que codifica Klf4, (c) un ácido nucleico que codifica Sox2, (d) un ácido nucleico que codifica L-Myc (e) un inhibidor funcional de p53, y (f) un ácido nucleico que codifica Lin28 o Lin28b, a una célula somática.
- 15 3. Un agente promotor de la inducción de células iPS que comprende (a) un ácido nucleico que codifica Oct3/4, (b) un ácido nucleico que codifica Klf4, (c) un ácido nucleico que codifica Sox2, (d) un ácido nucleico que codifica L-Myc, (e) un inhibidor funcional de p53, y (f) un ácido nucleico que codifica Lin28 o Lin28b.
- 20 4. El método según la reivindicación 1 ó 2 o el agente según la reivindicación 3, caracterizado porque el inhibidor funcional de p53 se selecciona del grupo de un siRNA contra p53, un shRNA contra p53, un ADN que codifica un siRNA o shRNA contra p53, y un ácido nucleico que codifica un mutante negativo dominante de p53.
- 25 5. El método según la reivindicación 2 ó 4 o el agente según la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque al menos un ácido nucleico seleccionado del grupo constituido por las anteriores (a), (b), (c), (d) y (f) se transfiere en forma de un vector episómico.
- 30 6. El método o agente según la reivindicación 5, caracterizado porque el vector episómico es un vector de autoeliminación que se retira de la célula iPS en el 5º paso a una frecuencia de 50% o más.
- 35 7. El método o agente según las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado porque al menos (d) y (f) se incluyen en el mismo vector episómico, y se unen policistrónicamente en el orden de (d) y (f) en la orientación de 5' a 3'.
- 40 8. El método o agente según la reivindicación 5 ó 6, caracterizado porque el número de tipos de vectores episómicos introducidos en la célula somática es de tres o más, en el que (a) se incorpora en un primer tipo de vector, (b) y (c) se incorporan en un segundo tipo de vector, así como (d) y (f) se incorporan en un tercer tipo de vector.
- 25 9. El método o agente según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado porque el vector episómico tiene secuencias loxP colocadas en la misma orientación en los lados 5' y 3' de un componente vectorial esencial para la replicación del ácido nucleico.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 4 a 9 o el agente según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, caracterizado porque la célula somática o la célula iPS es una célula humana.
- 35 11. El método según la reivindicación 10, que comprende cultivar una célula en ausencia de un ingrediente de un animal no humano durante el período comprendido entre el contacto de los factores precedentes de (a) a (f) con la célula somática y el desarrollo de las células iPS.
- 40 12. El método según la reivindicación 11, caracterizado porque las células humanas se utilizan como células alimentadoras o porque no se utilizan células alimentadoras.
- 35 13. El método según la reivindicación 12, caracterizado porque las células alimentadoras se derivan de la misma persona que la célula somática.
- 40 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 ó de 4 a 13, caracterizado porque las sustancias de reprogramación nuclear utilizadas excluyen a Nanog o al ácido nucleico que lo codifica; o el agente según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, caracterizado porque el agente excluye una sustancia de reprogramación que es Nanog o un ácido nucleico que lo codifica.

Fig. 1

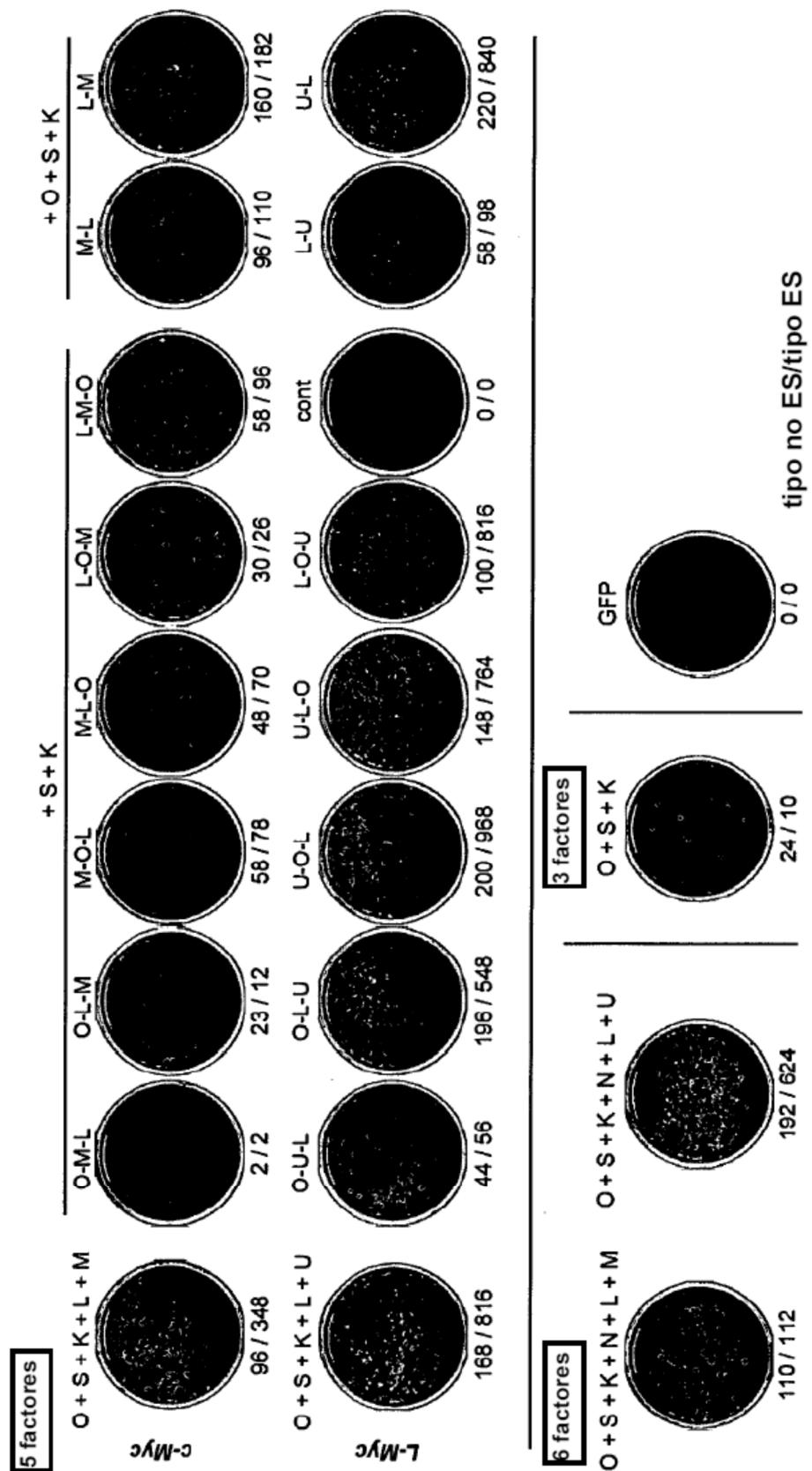


Fig. 2

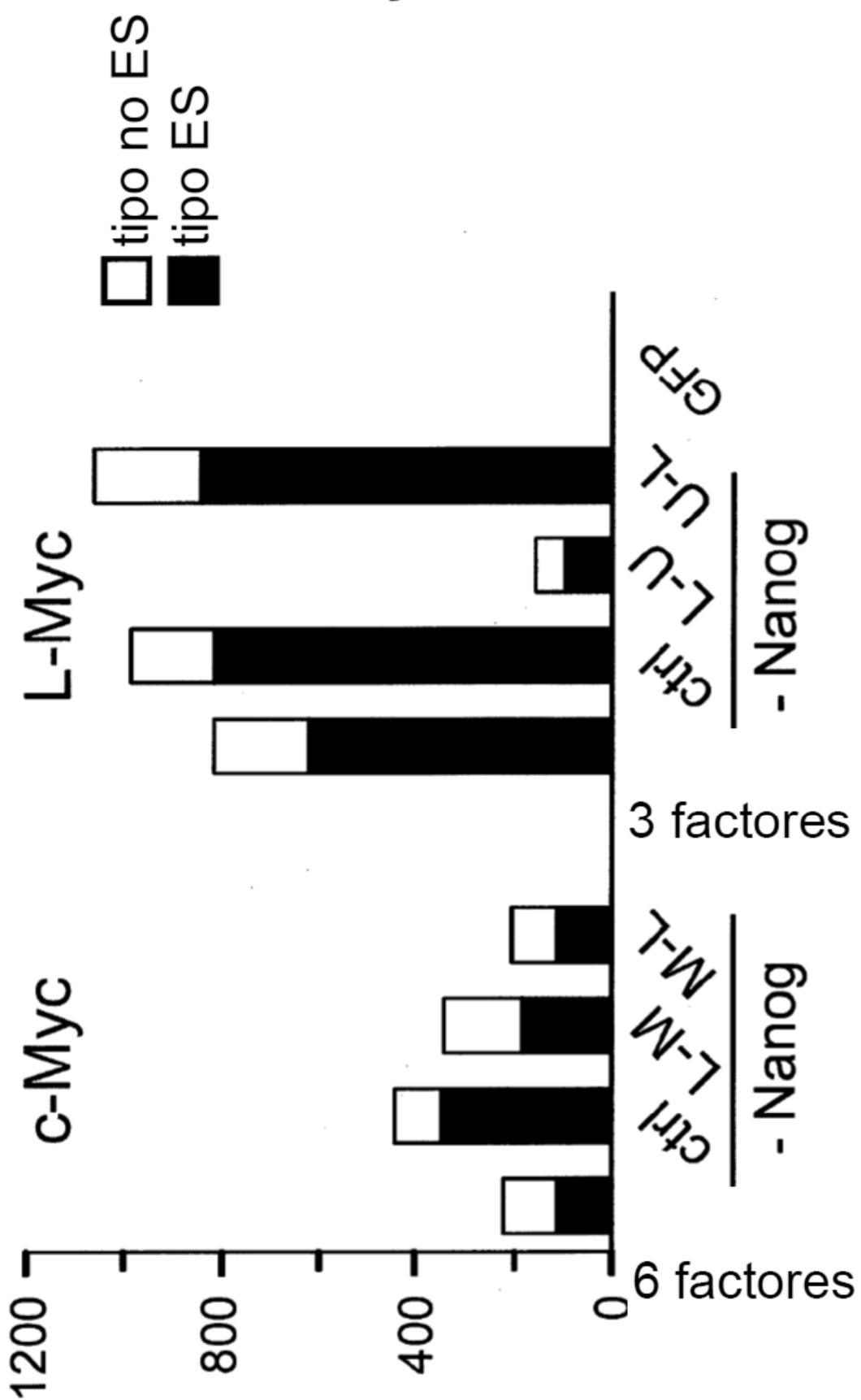
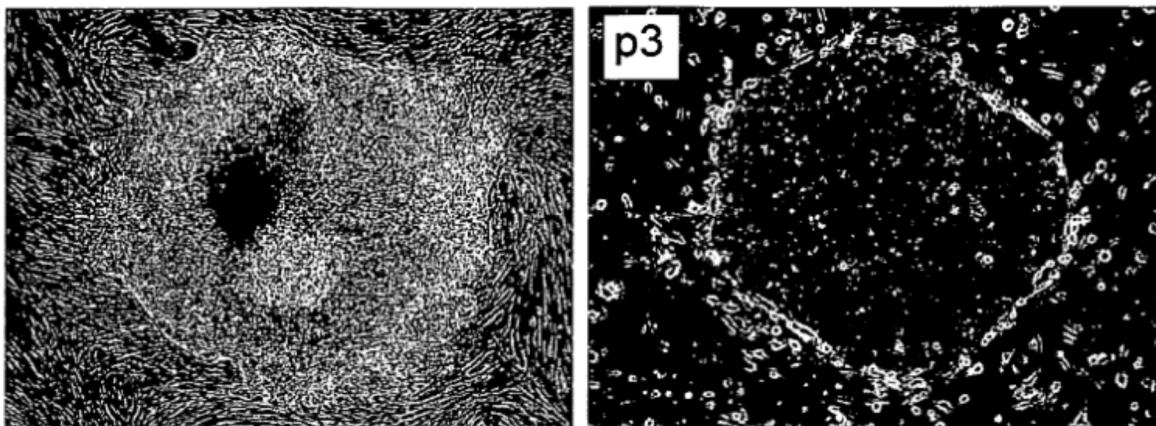
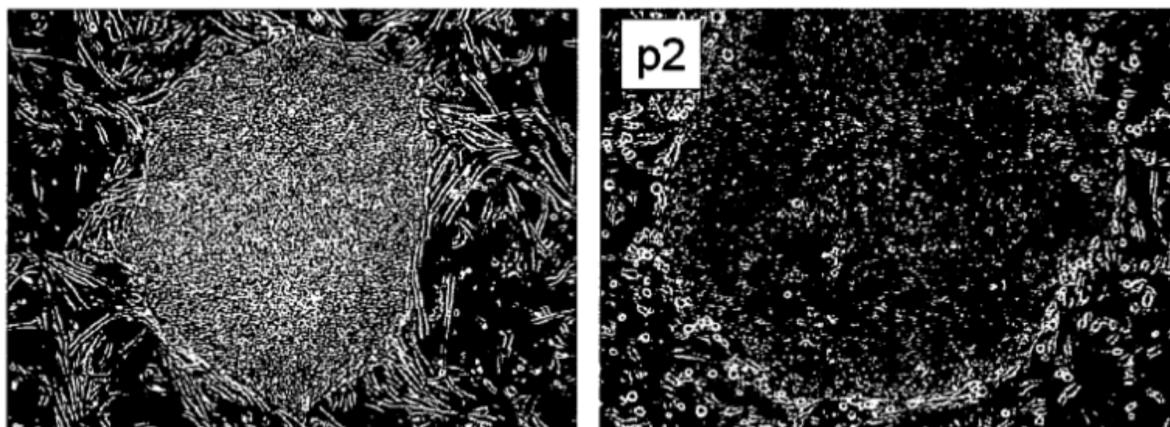


Fig. 3



1 colonia / 2×10^5 células

Fig. 4



1 colonia / 1×10^5 células

Fig. 5

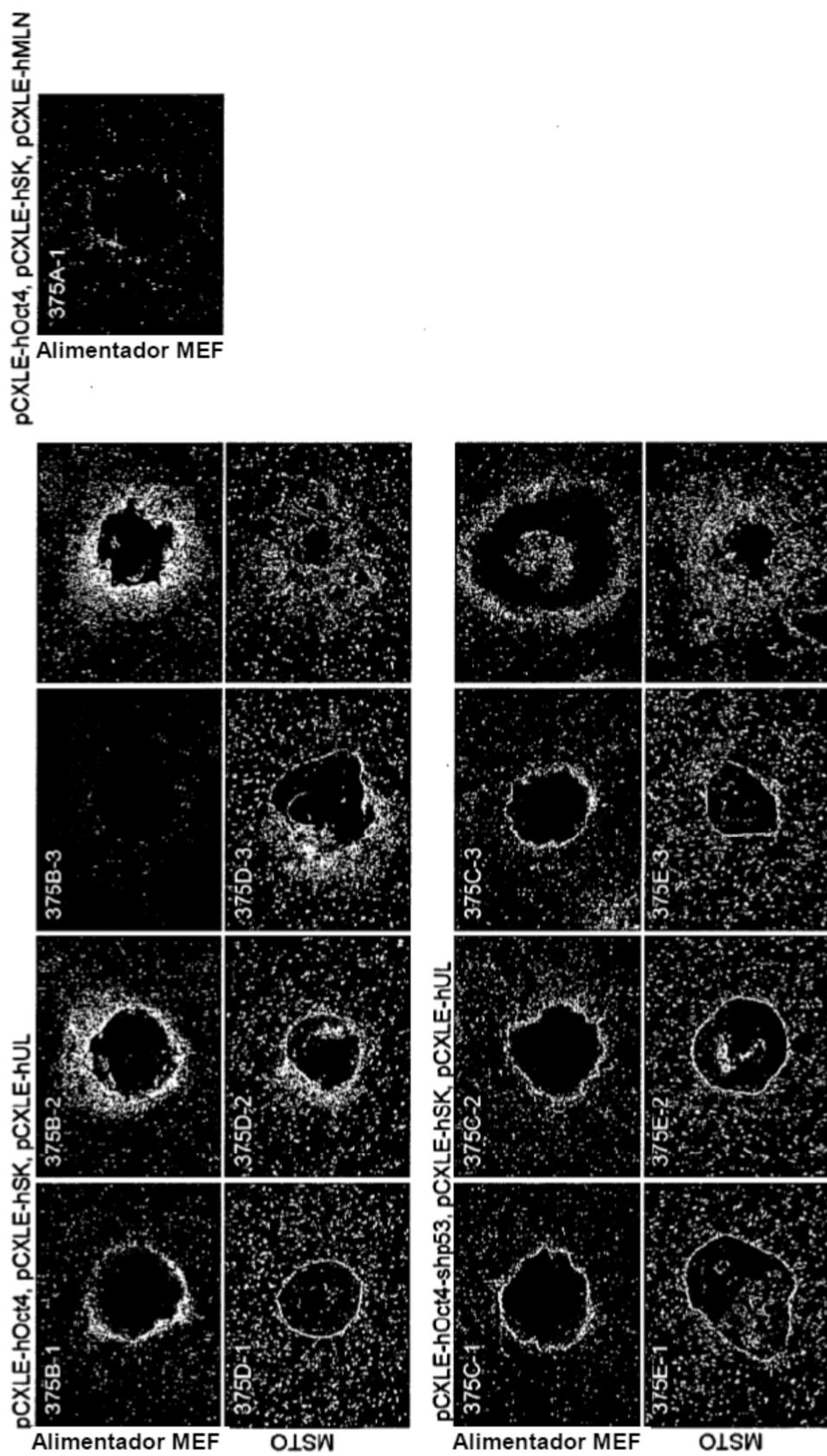


Fig. 6

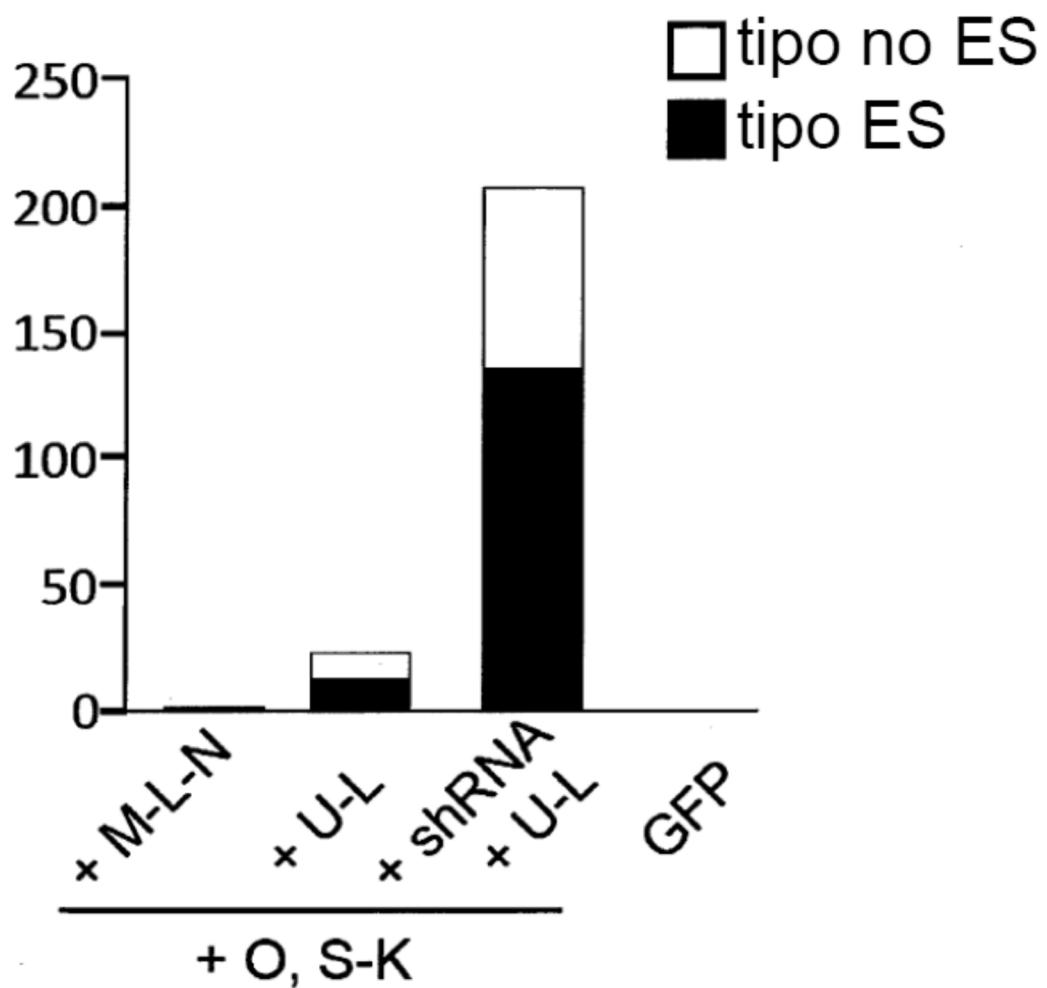


Fig. 7

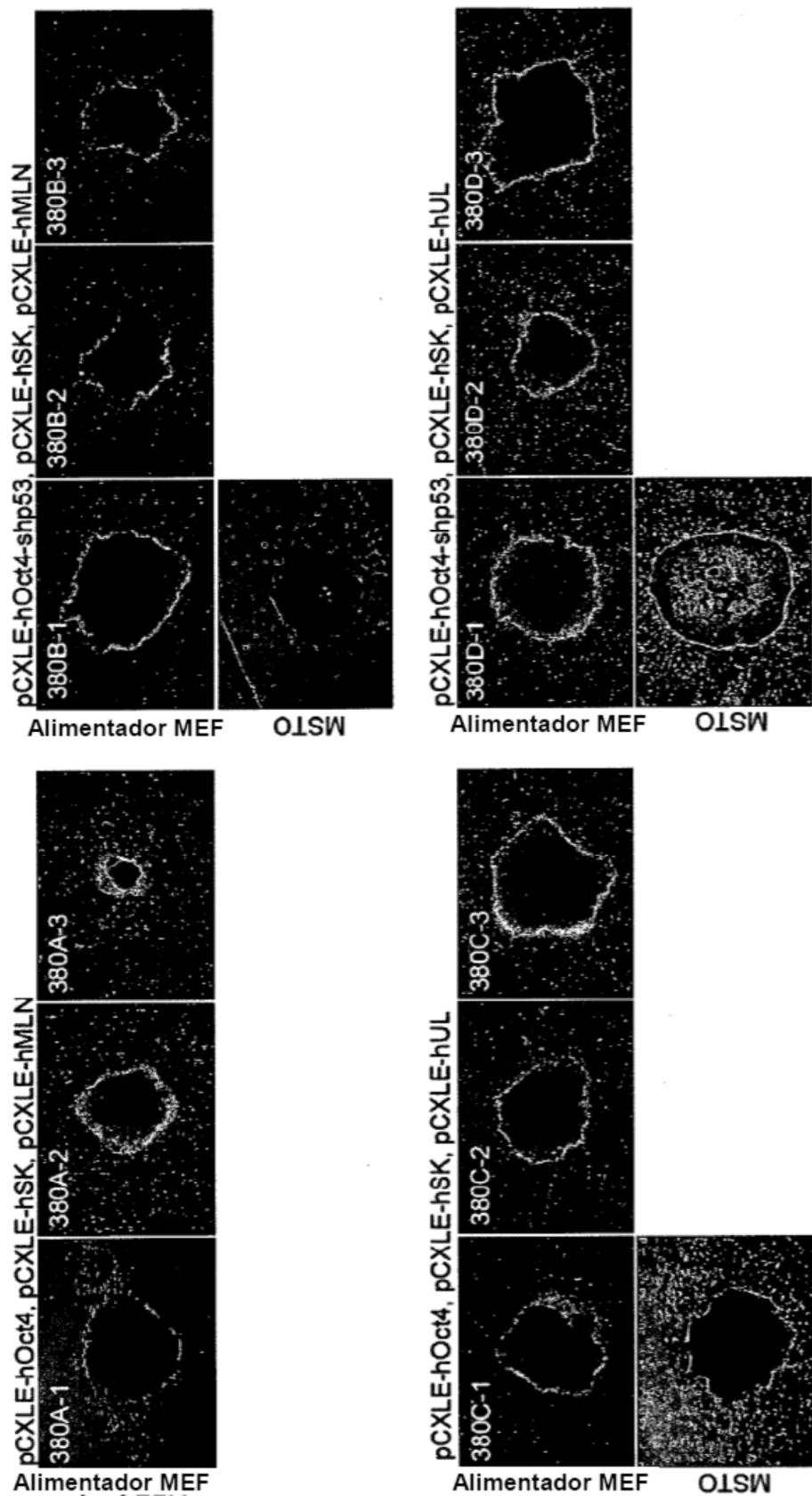


Fig. 8

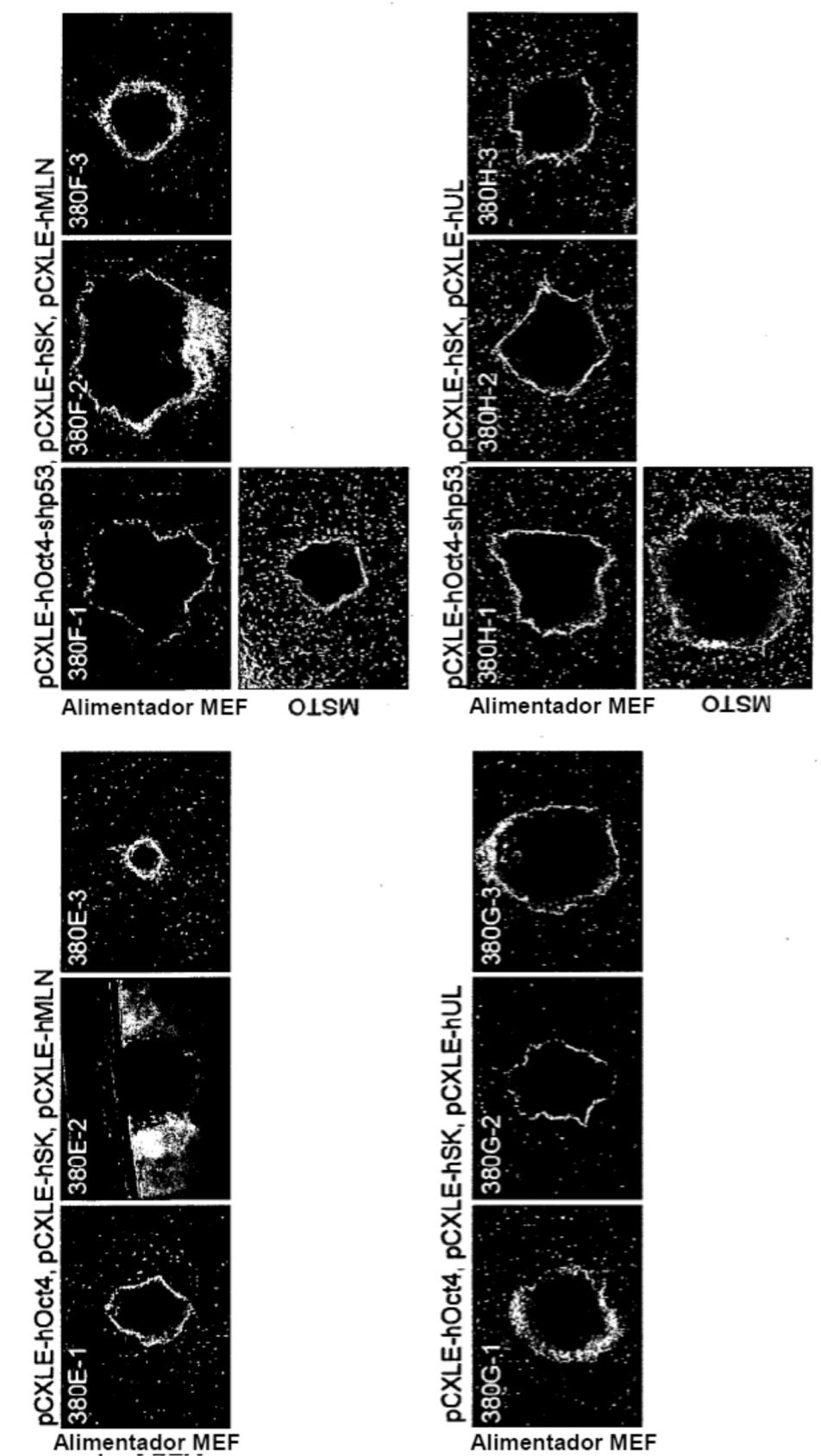


Fig. 9

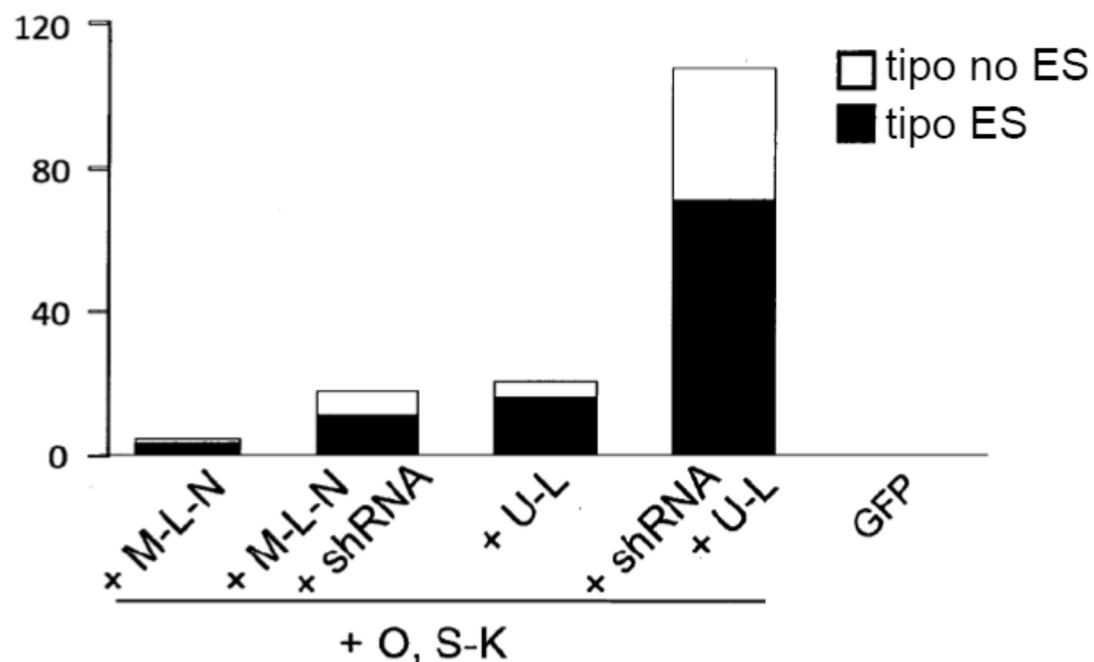


Fig. 10

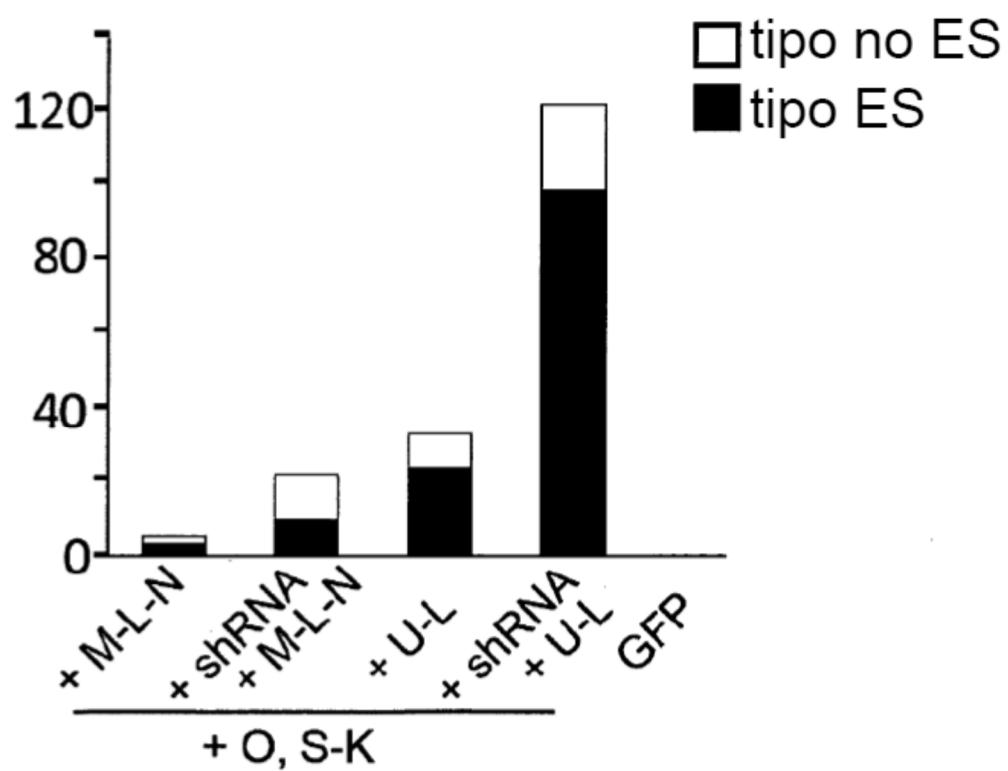


Fig. 11

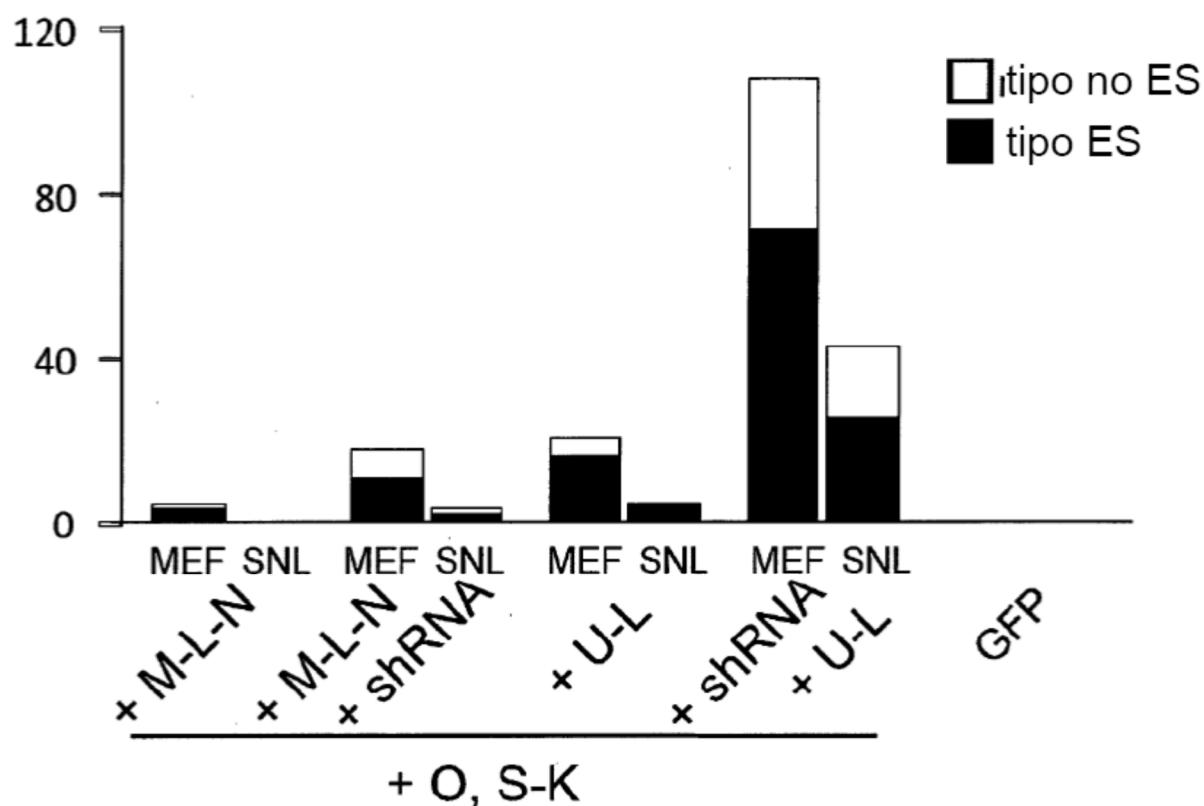


Fig. 12

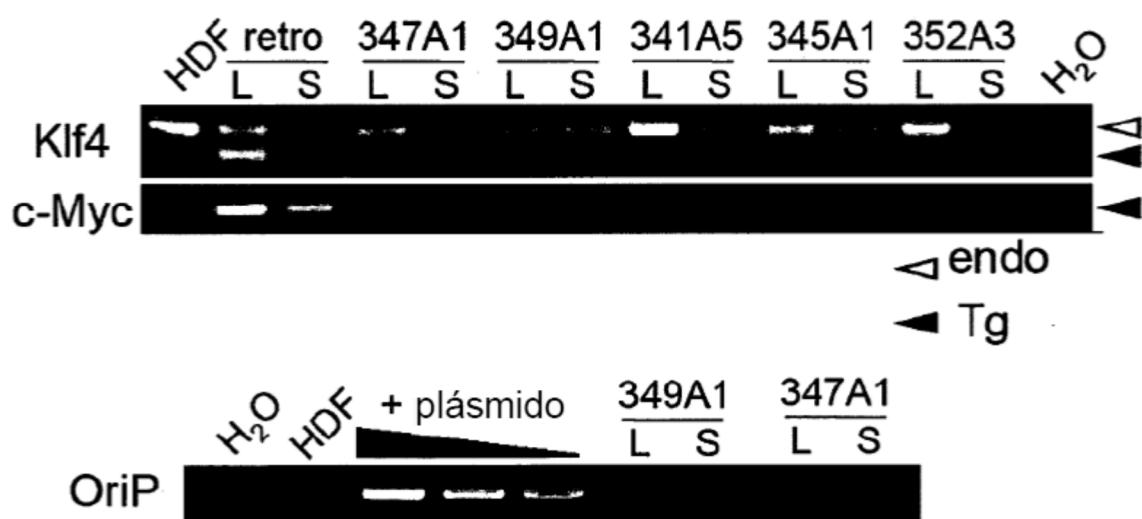


Fig. 13

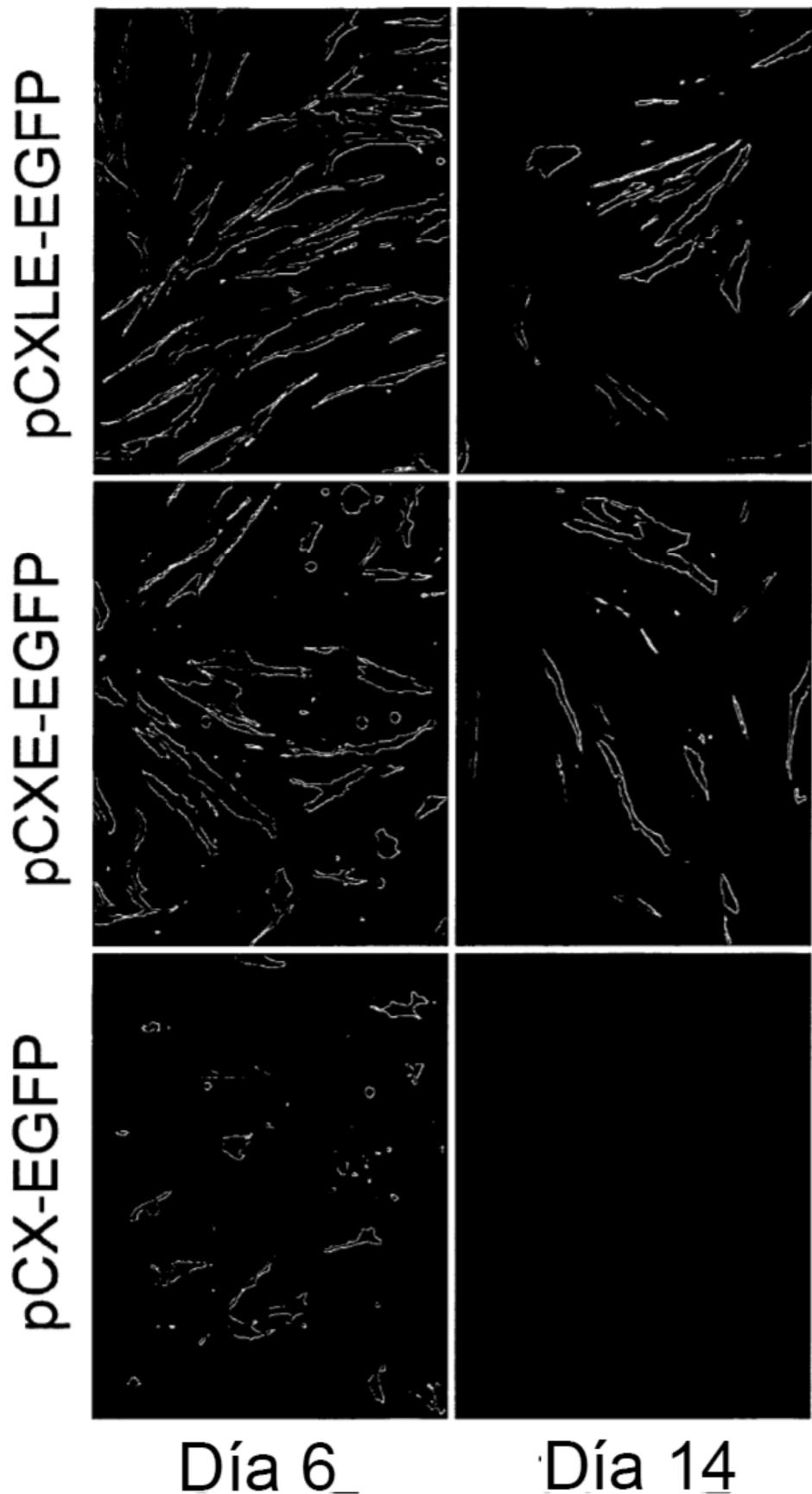


Fig. 14

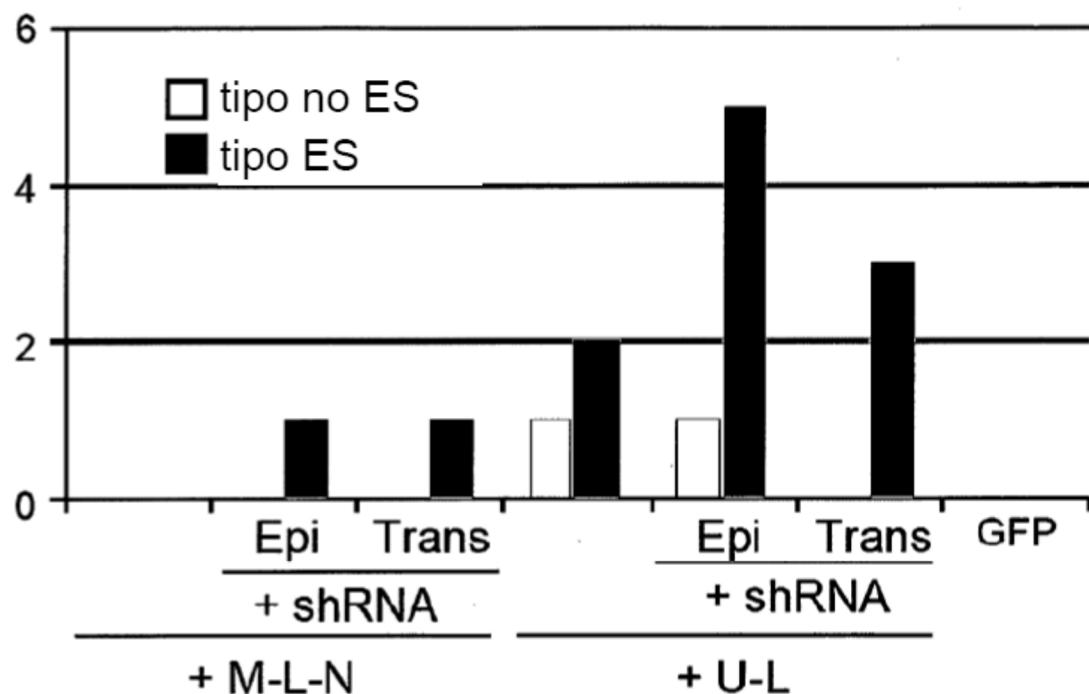


Fig. 15

DP74



DP94

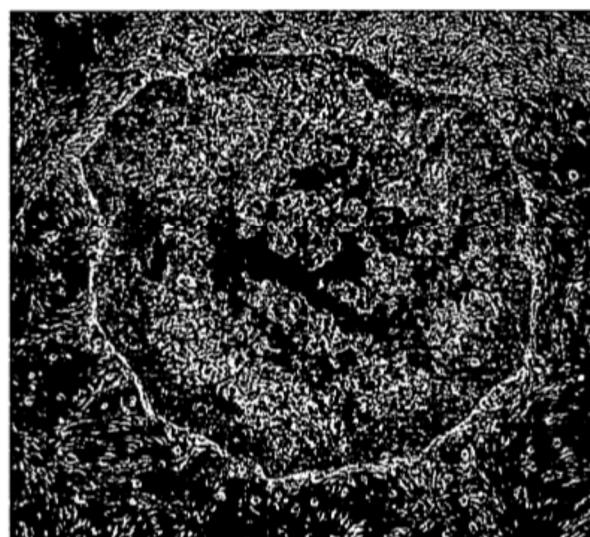


Fig. 16

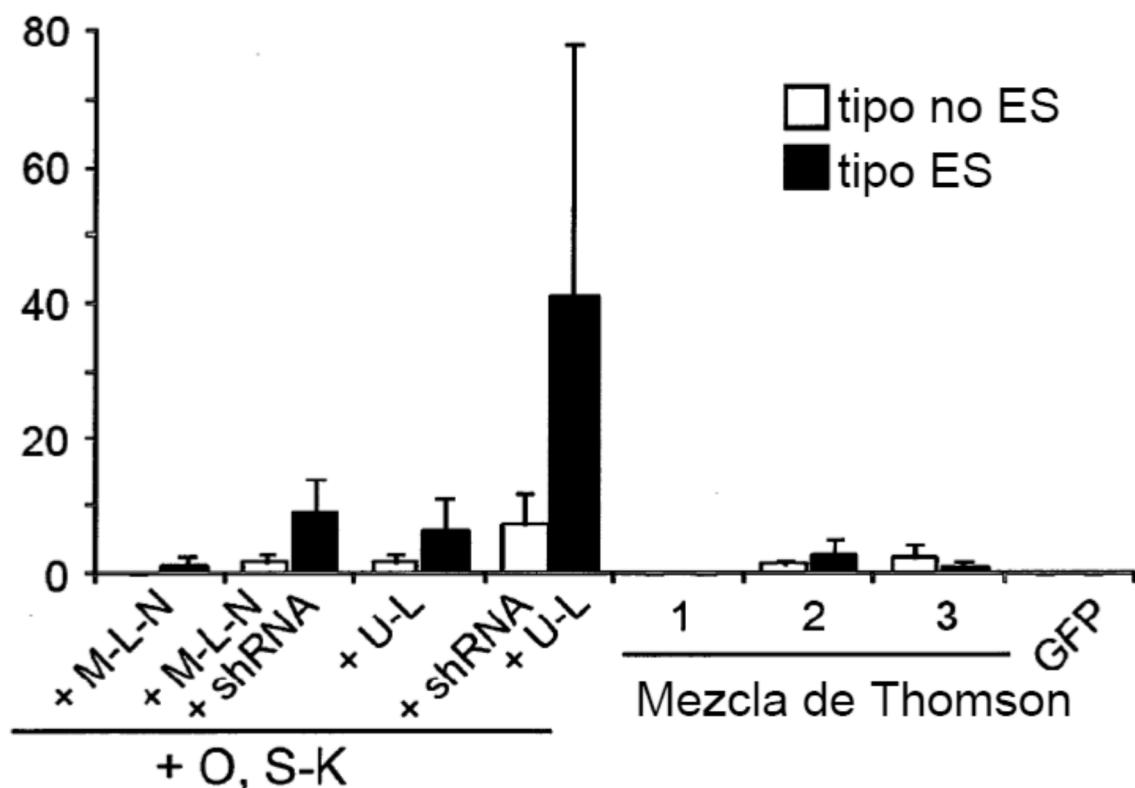


Fig. 17

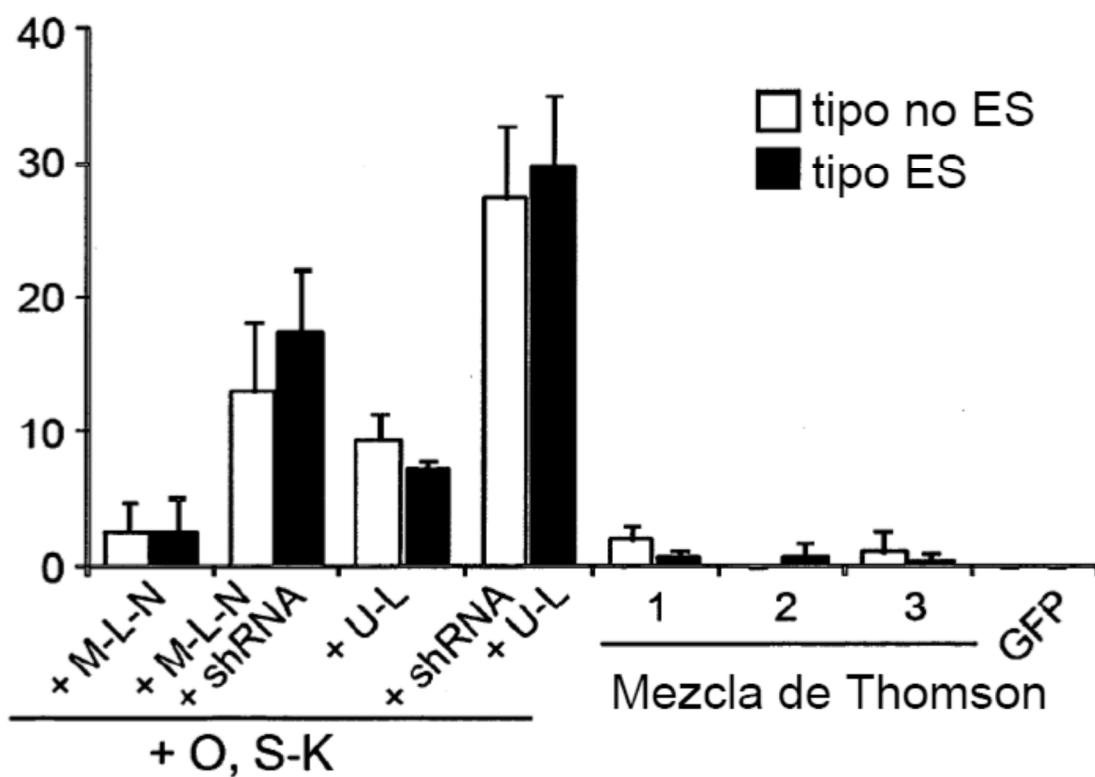
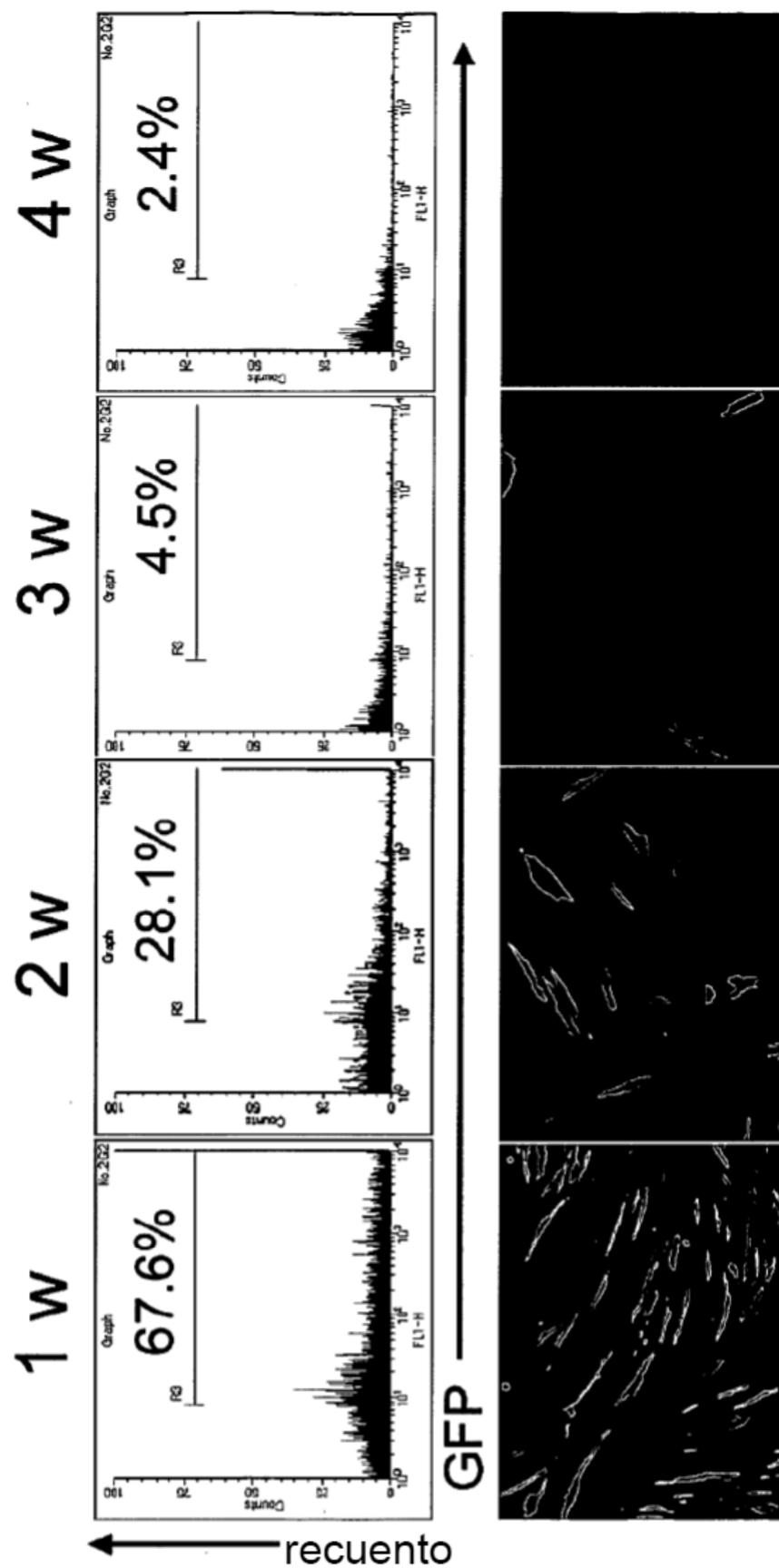


Fig. 18



CAG-EGFP (vector episómico)

Fig. 19

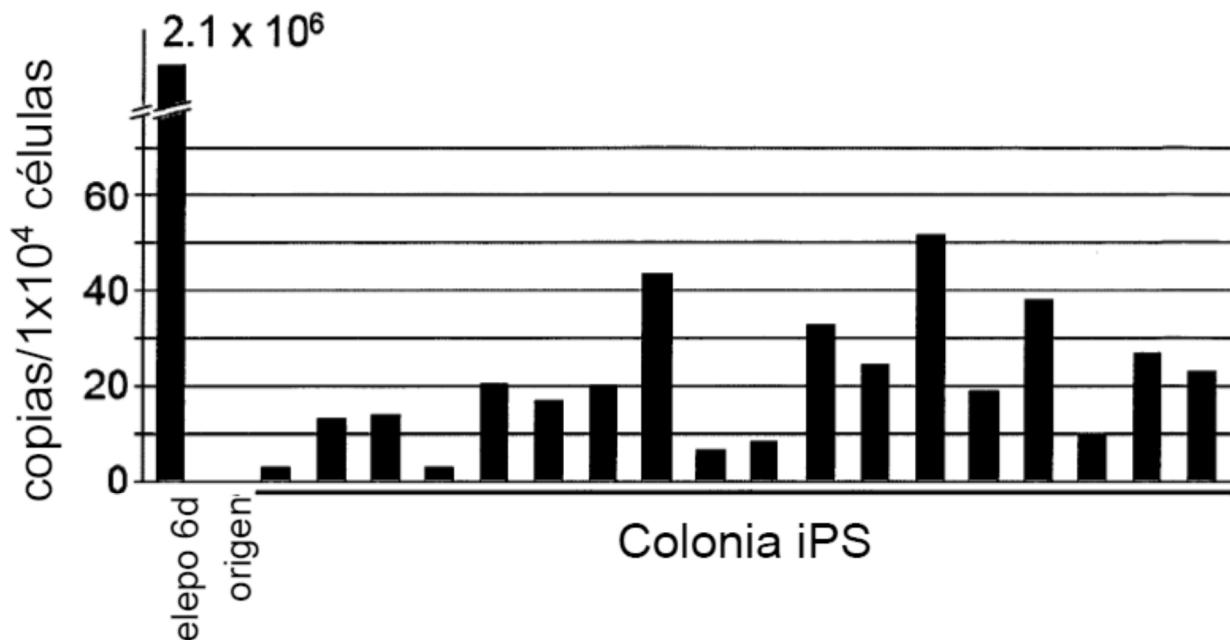


Fig. 20

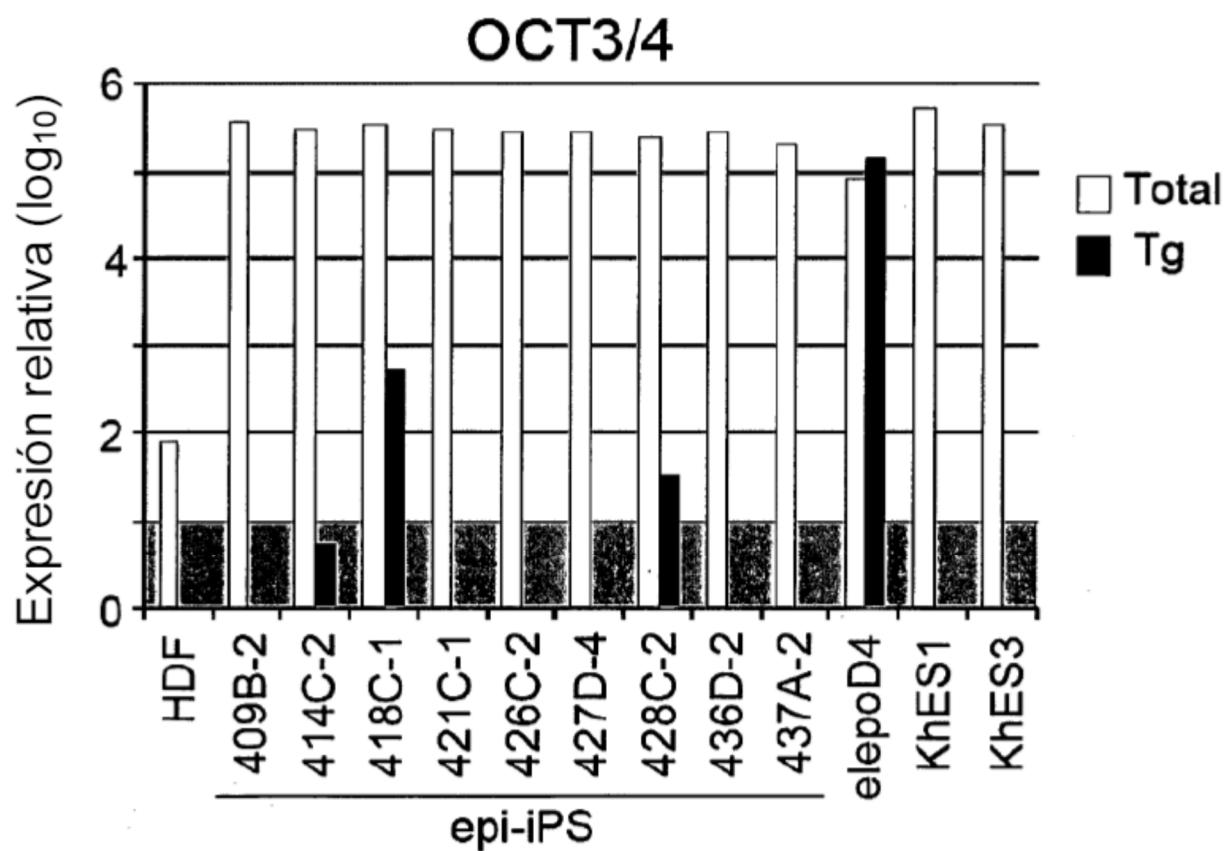


Fig. 21

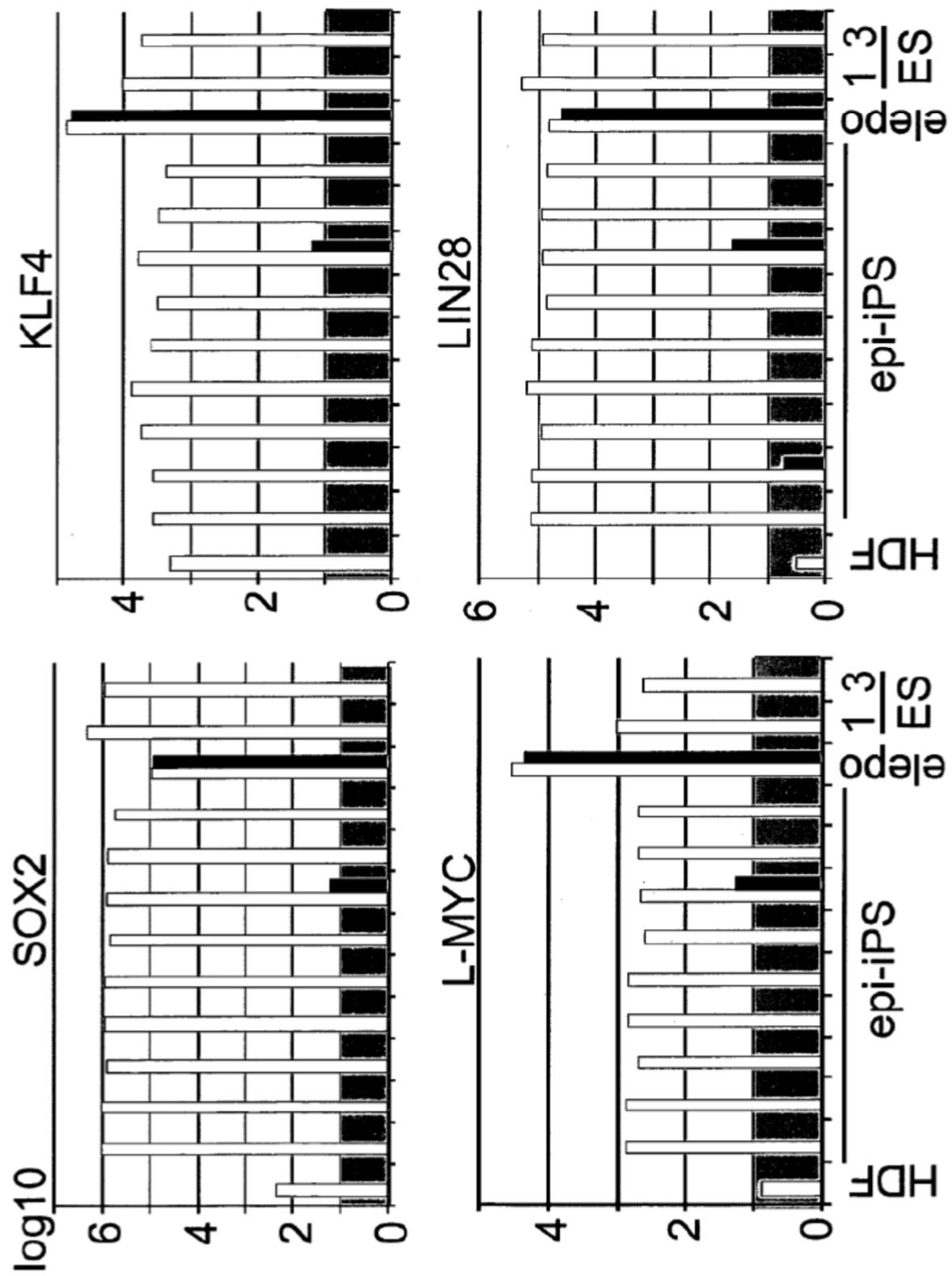


Fig. 22

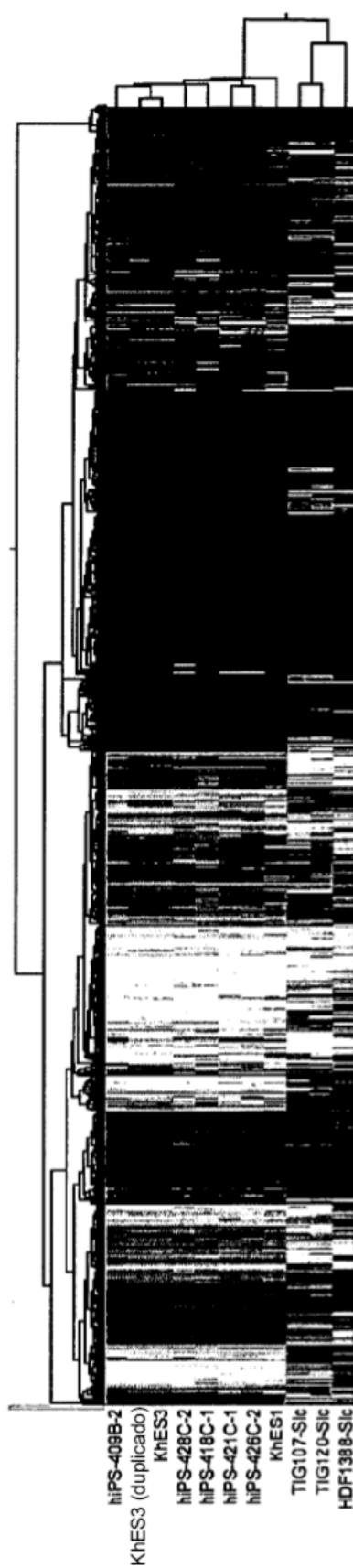
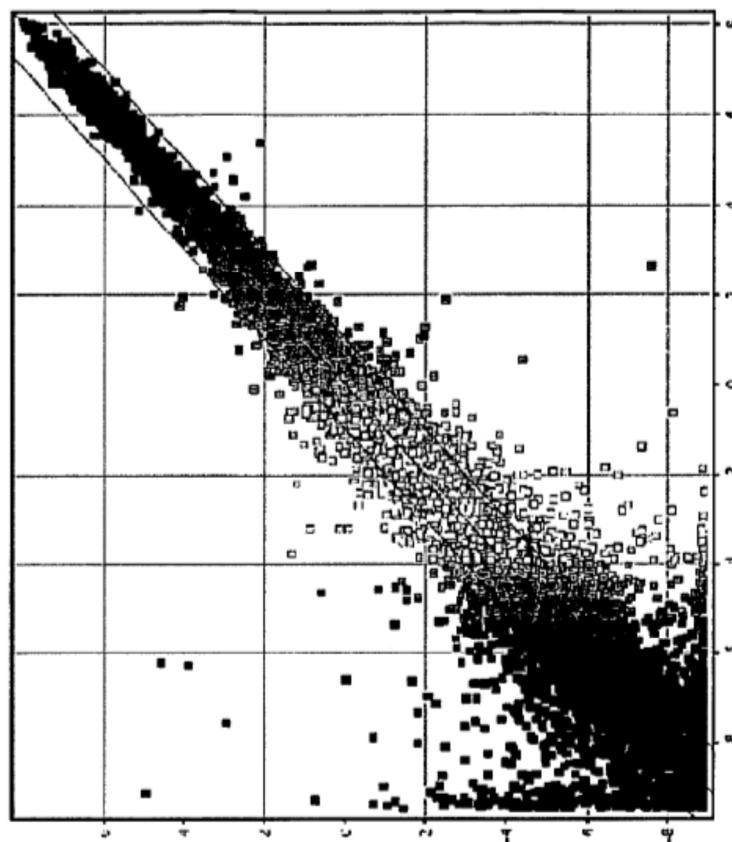


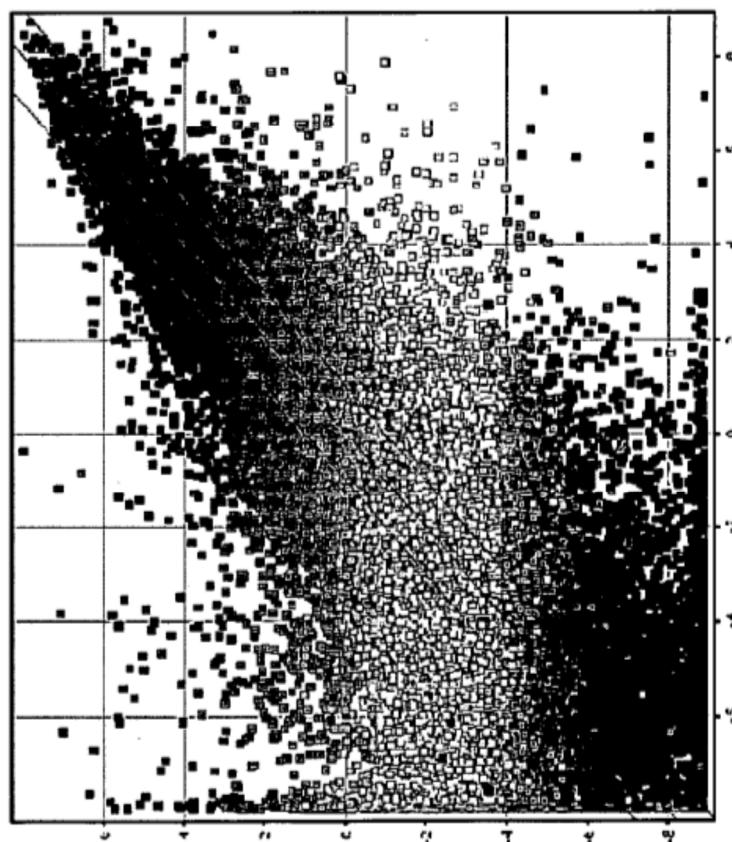
Fig. 23

hiPS



$\rho = 0,984$
- VbEco

fibroblasto



$\rho = 0,783$

Fig. 24

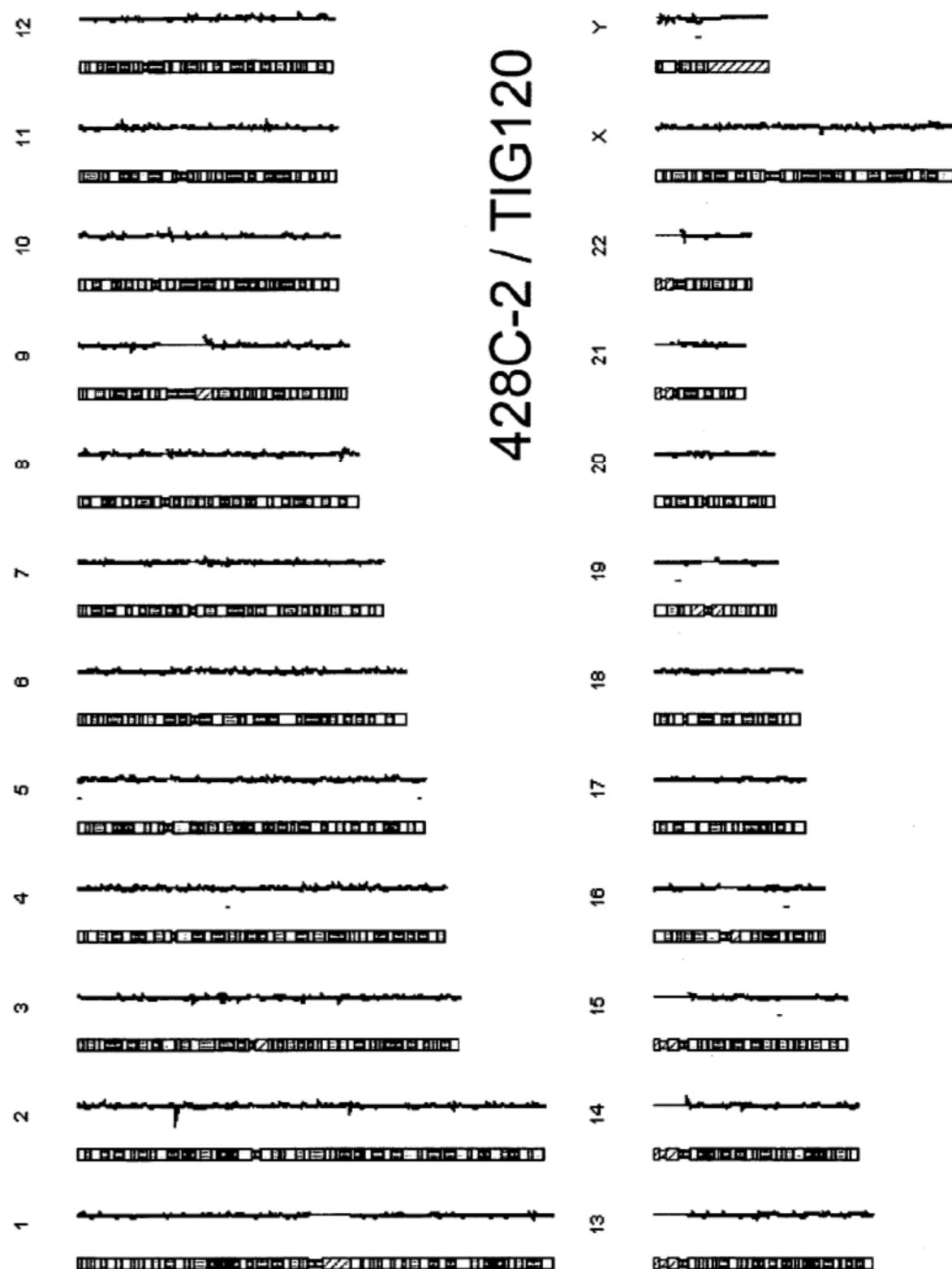
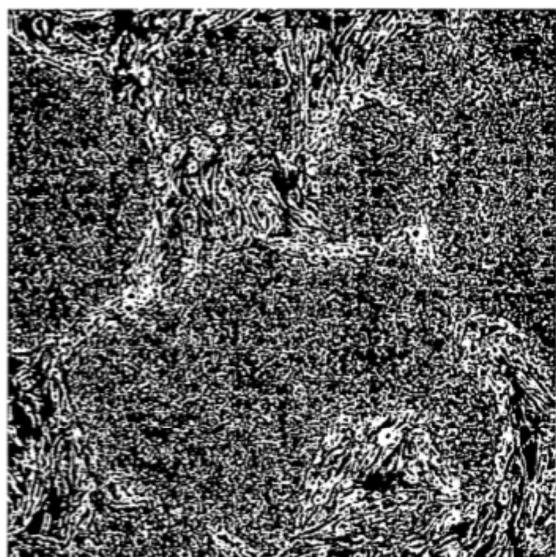
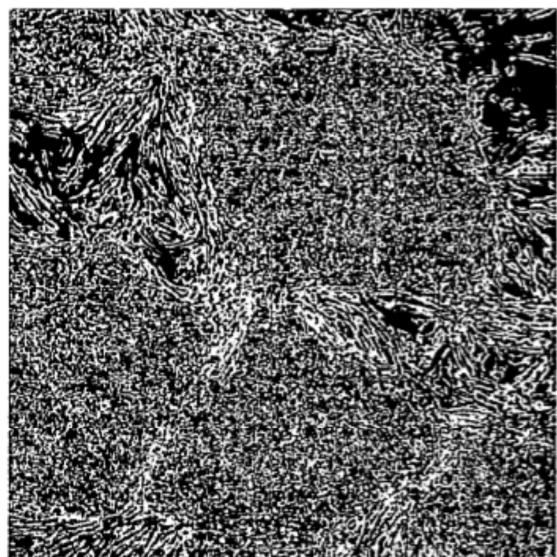


Fig. 25

MSTO



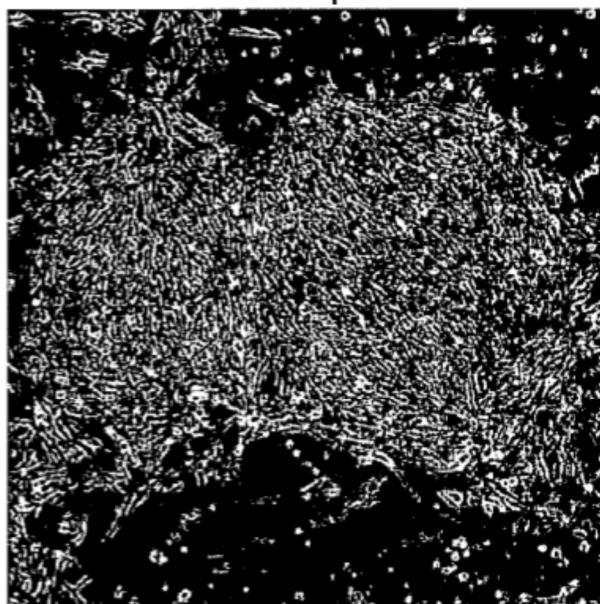
Alimentador DP74



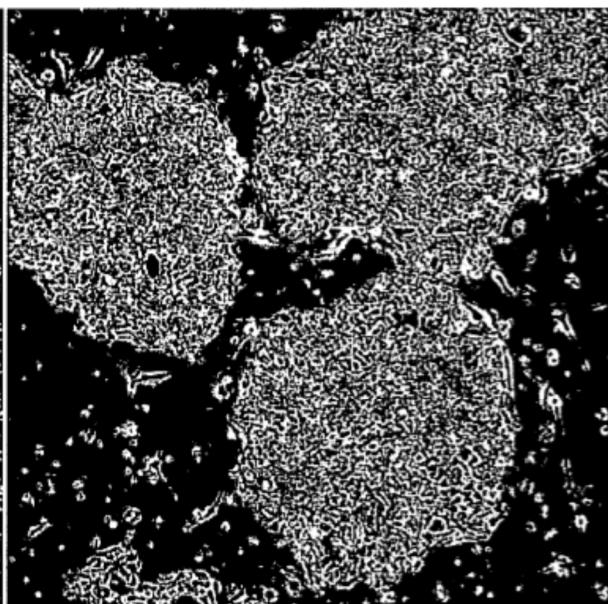
Medio ReproCell

Fig. 26

Medio ReproCell



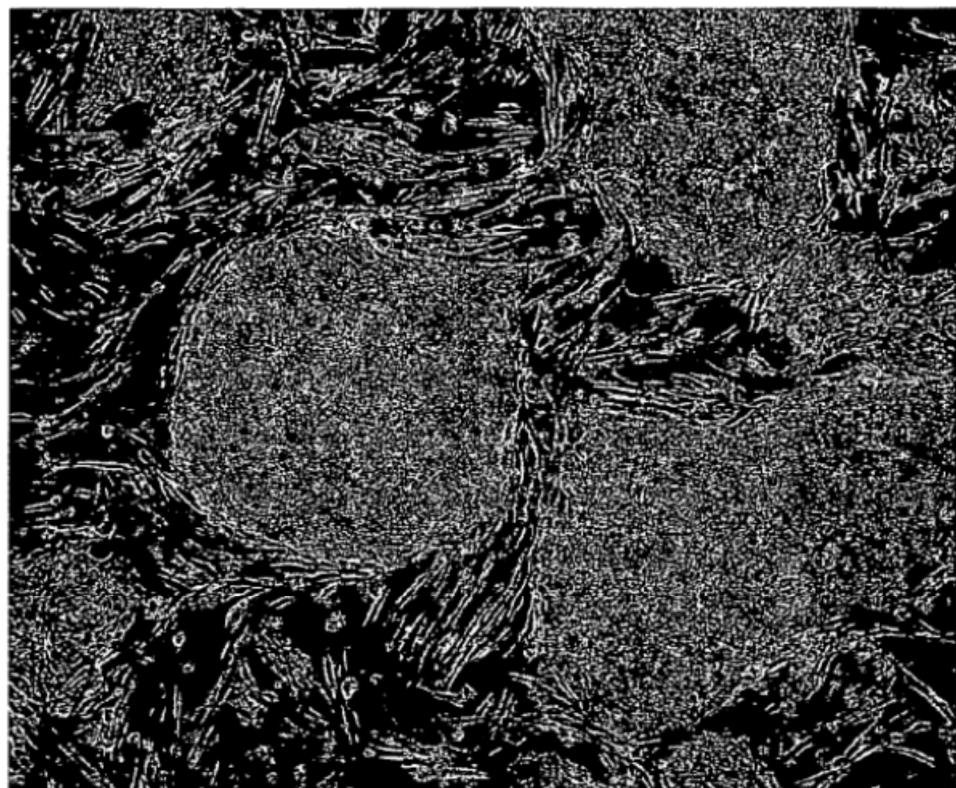
TeSR2



Capa CellStart

Fig. 27

TeSR2



KSR-XF

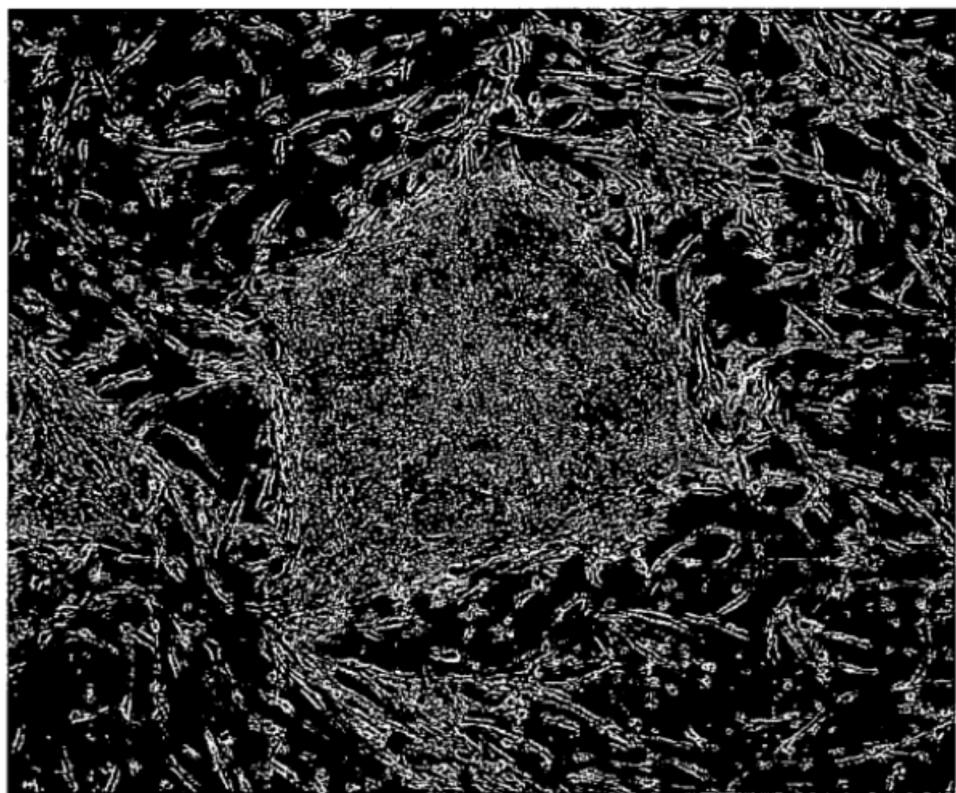


Fig. 28

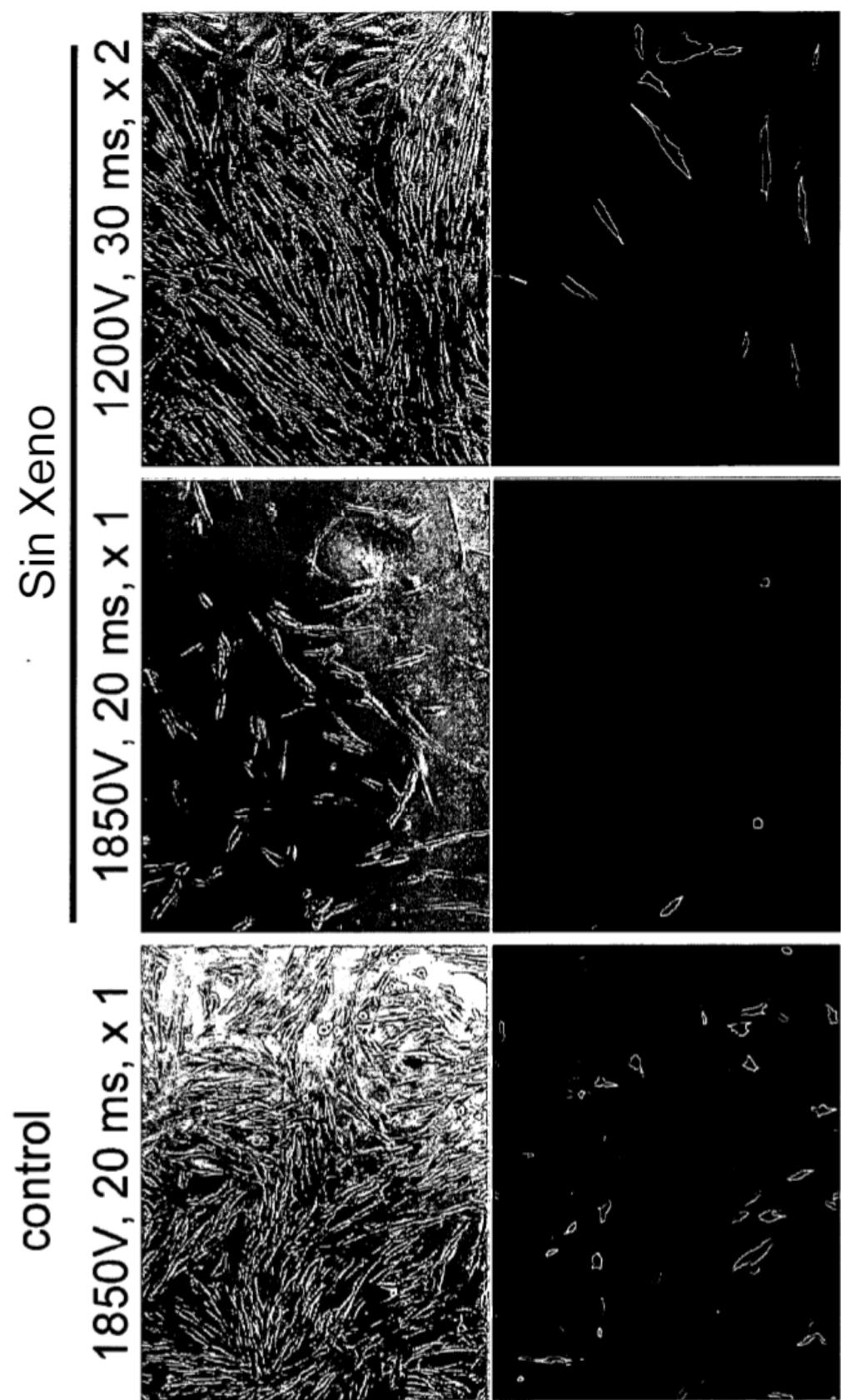
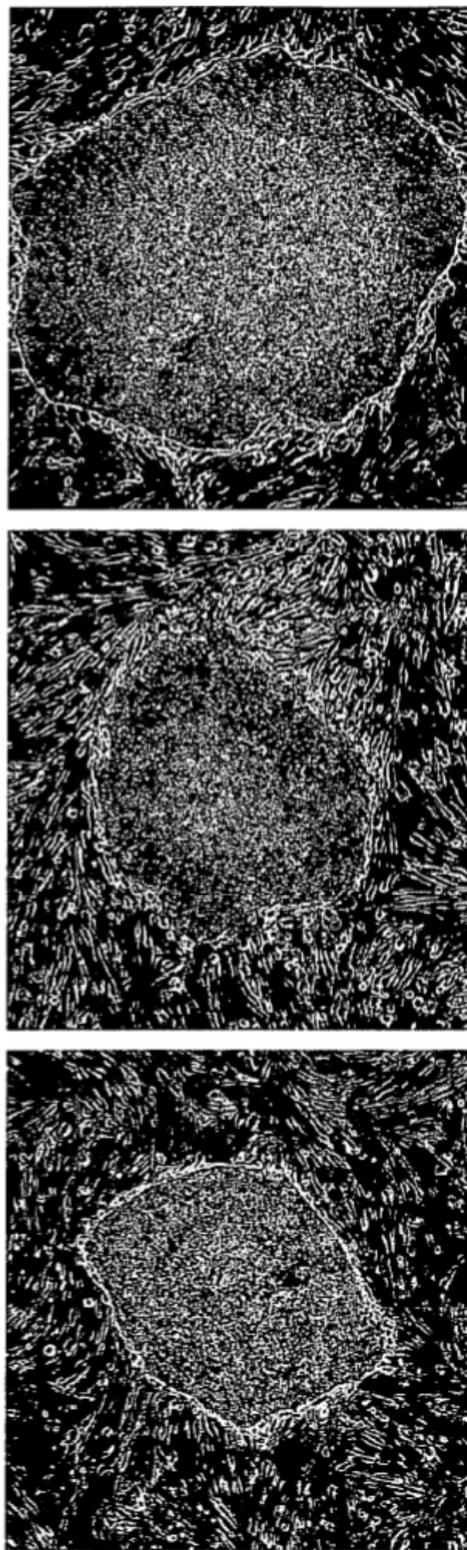
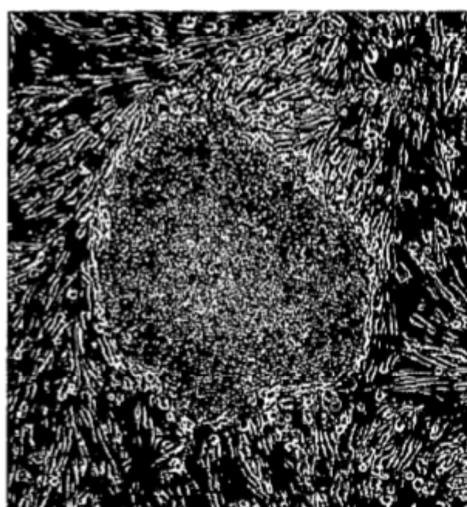


Fig. 29

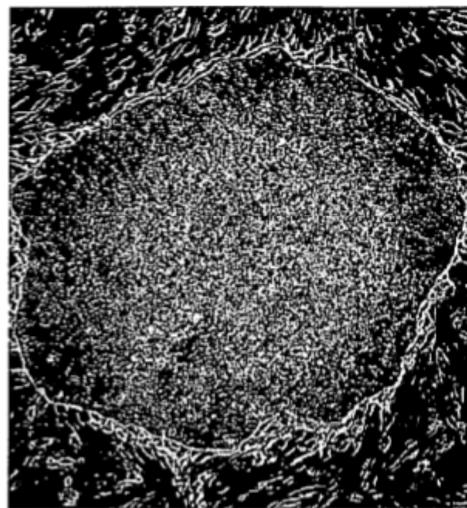
ReproCell
MSTO



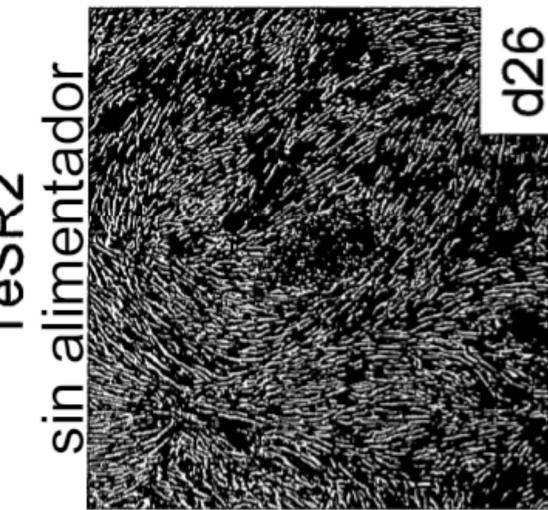
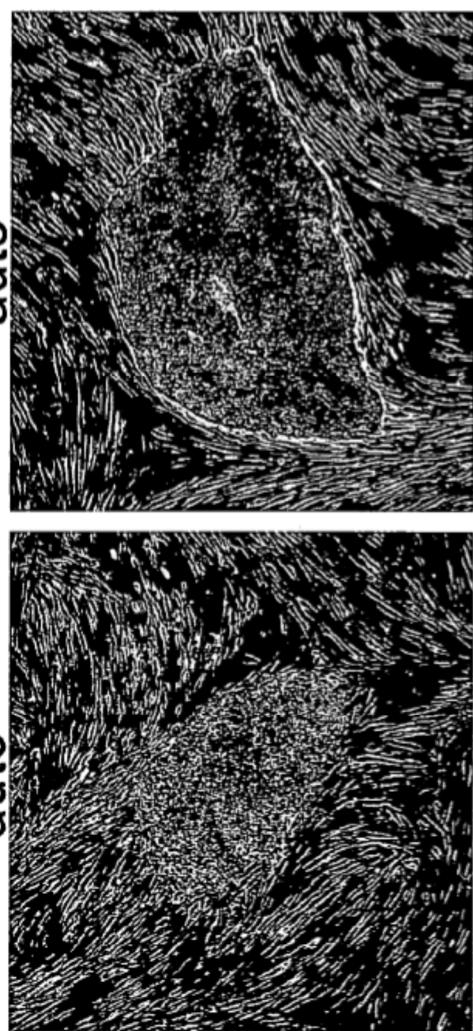
TeSR2
MSTO



KSR-XF
MSTO



TeSR2
auto



d26

Fig. 30

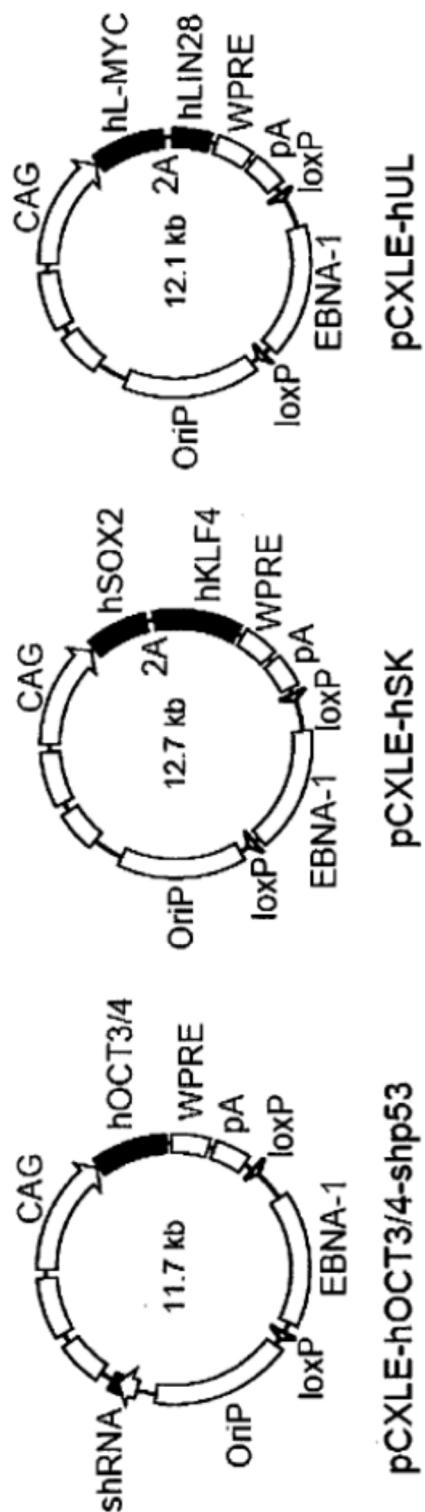


Fig. 31

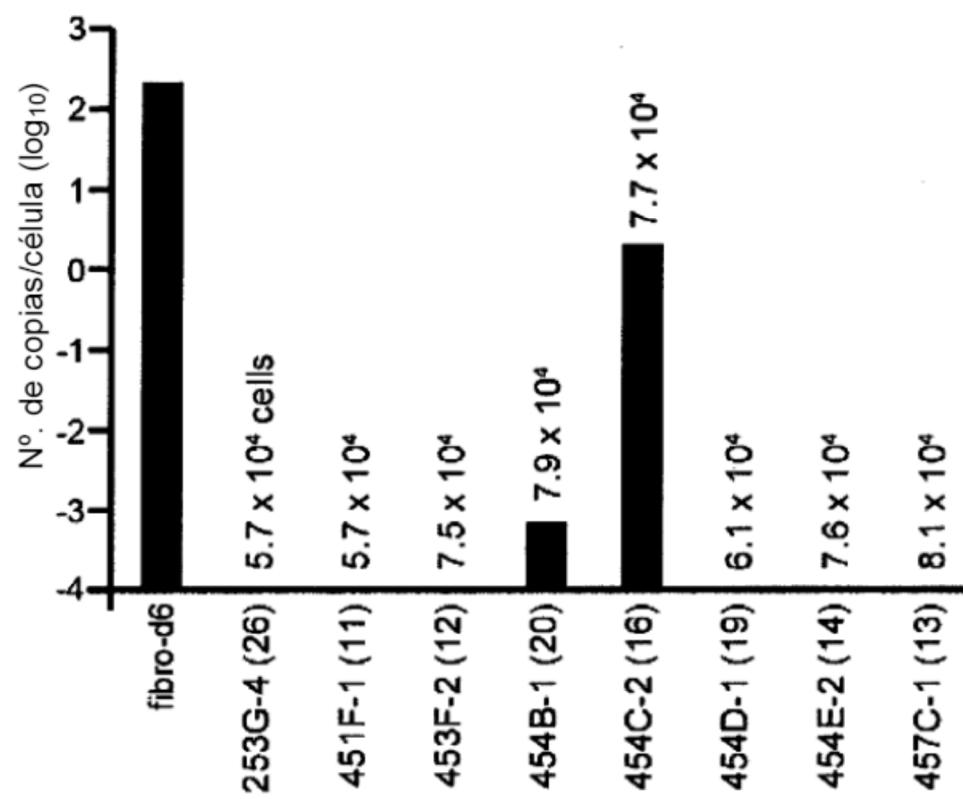
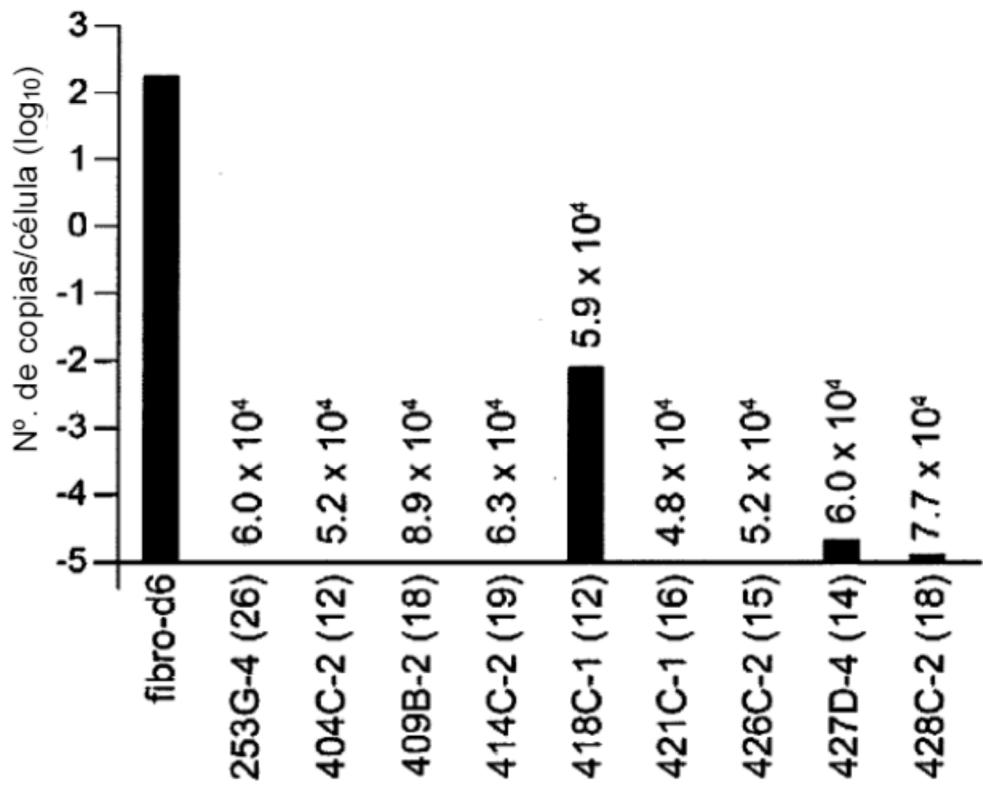
A**B**

Fig. 32

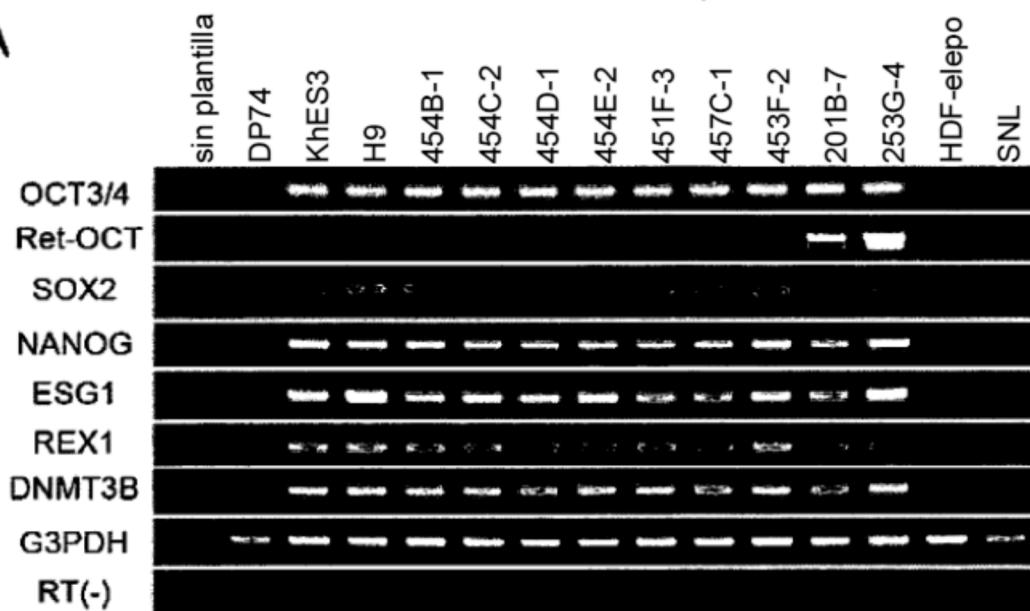
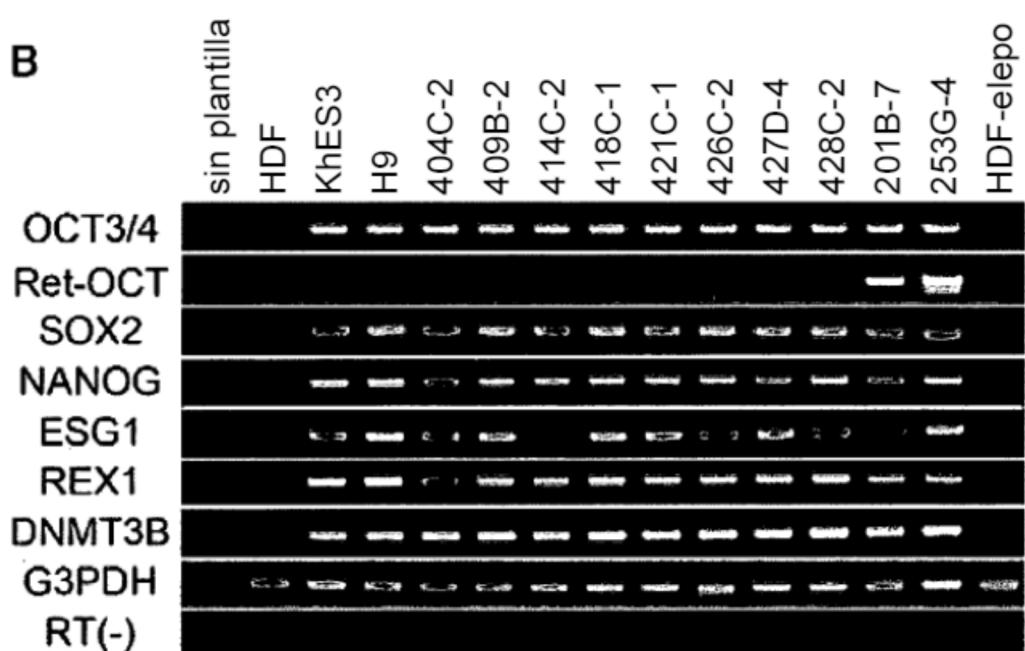
A**B**

Fig. 33

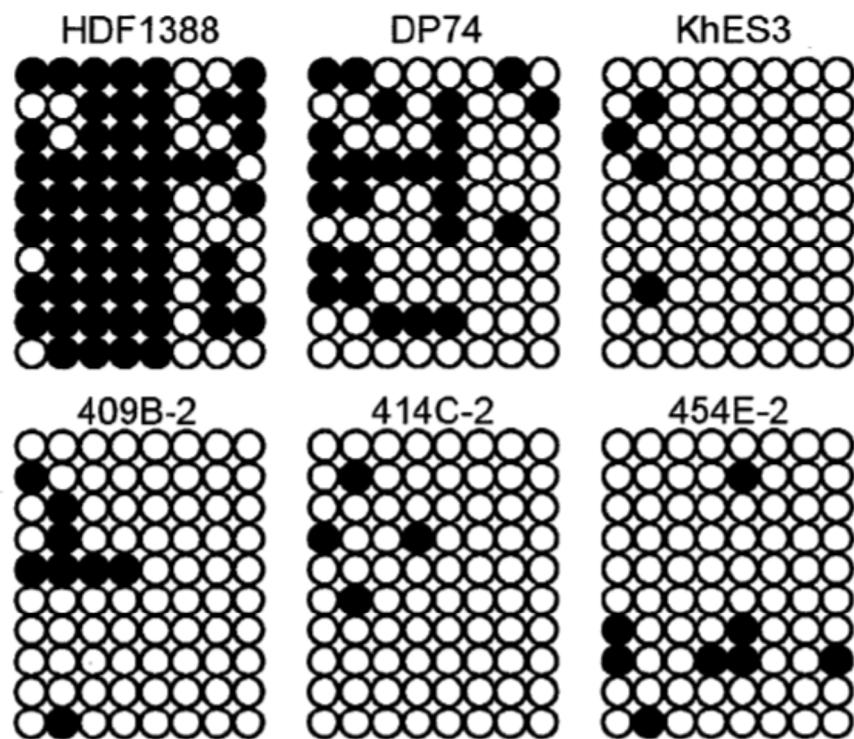


Fig. 34A

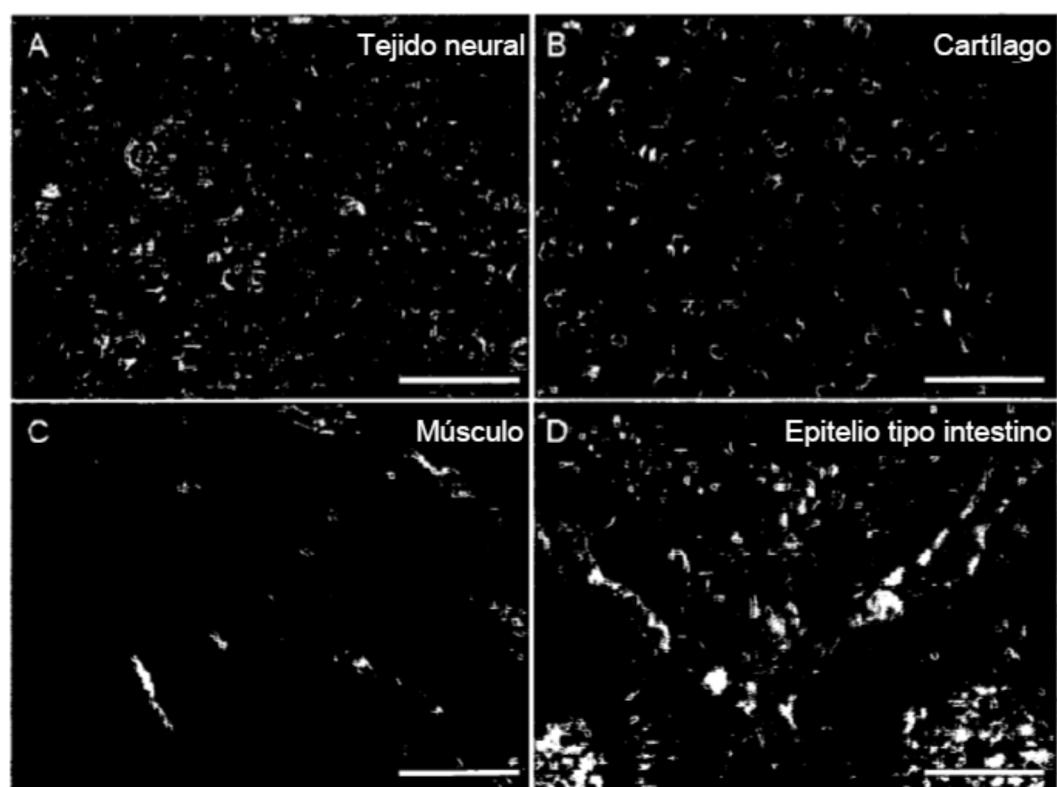


Fig. 34B

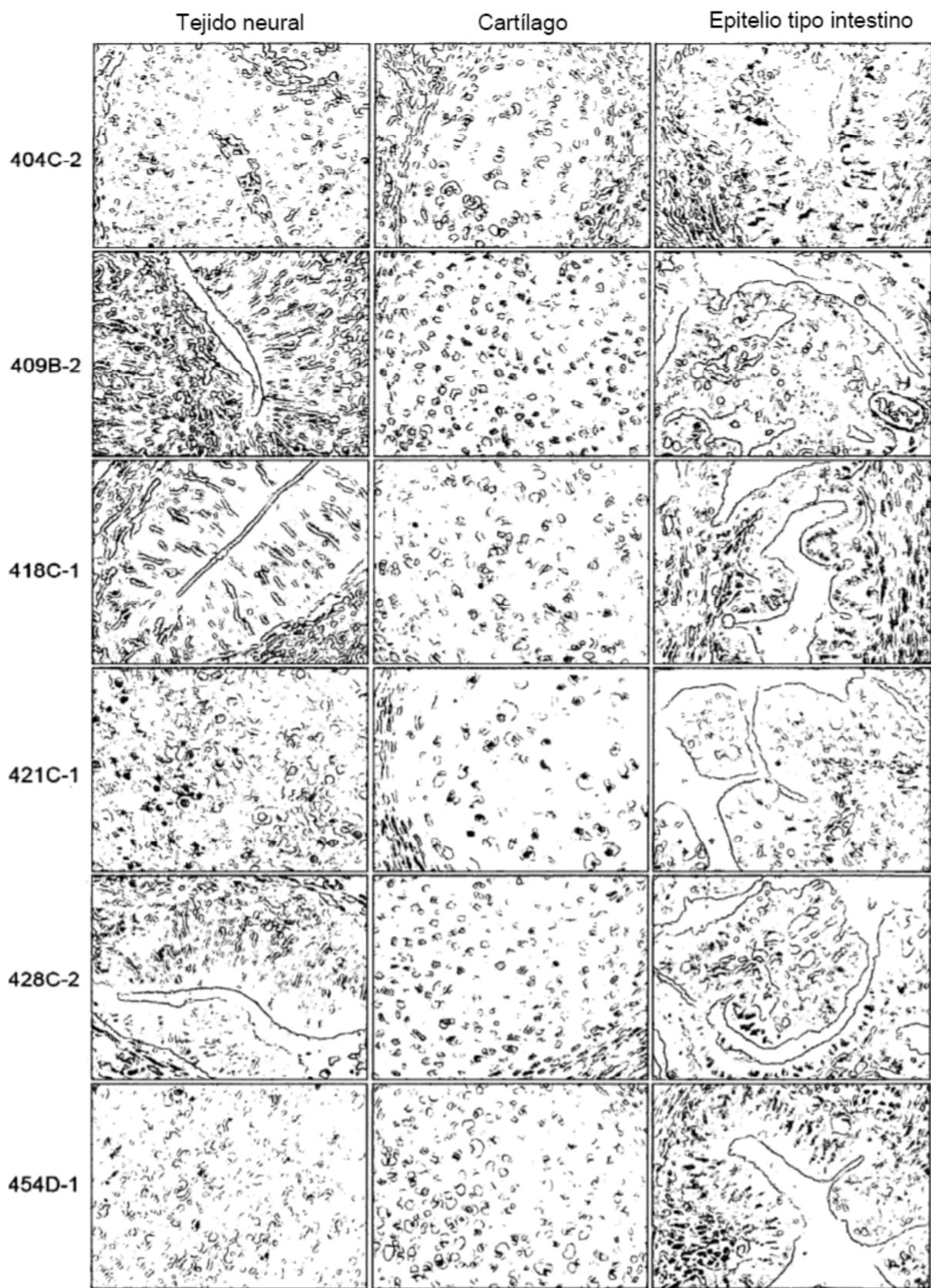


Fig. 35A

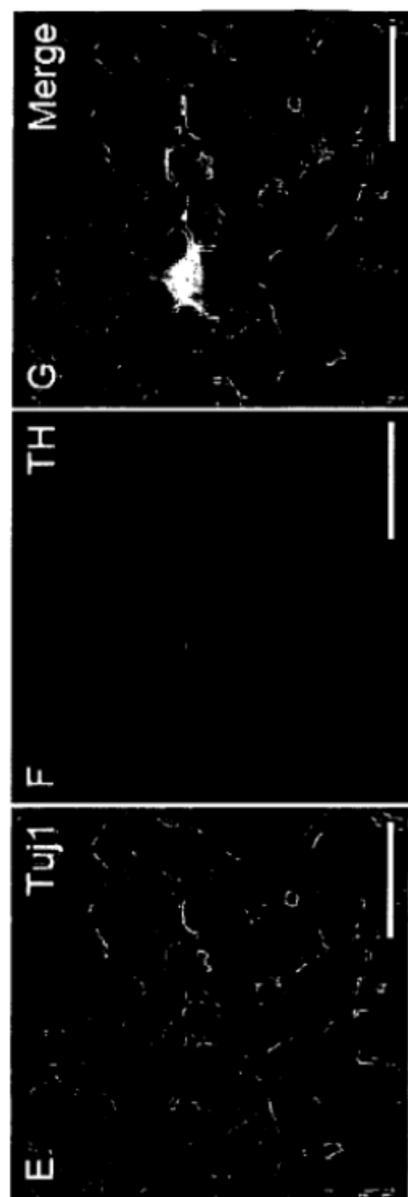


Fig. 35B

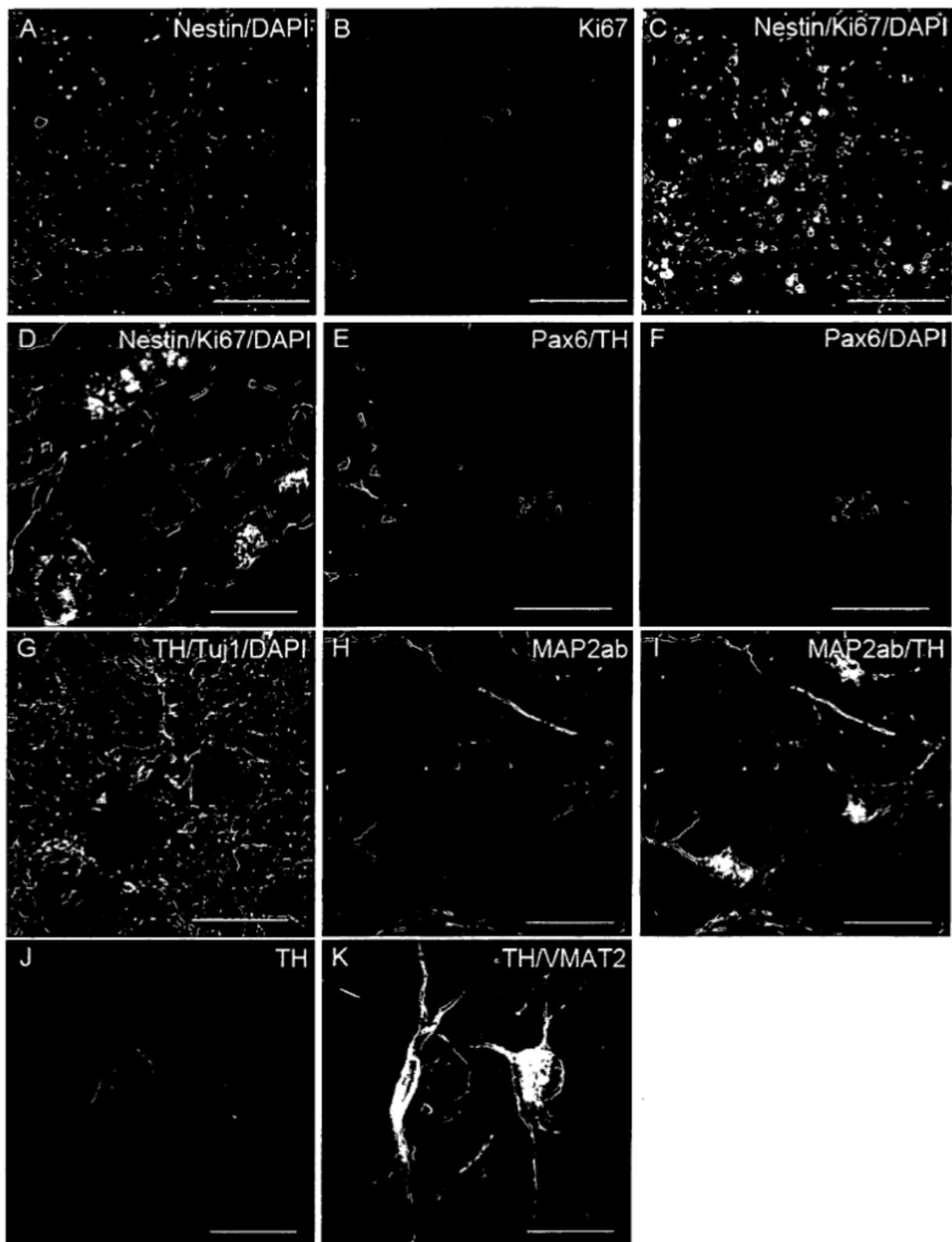
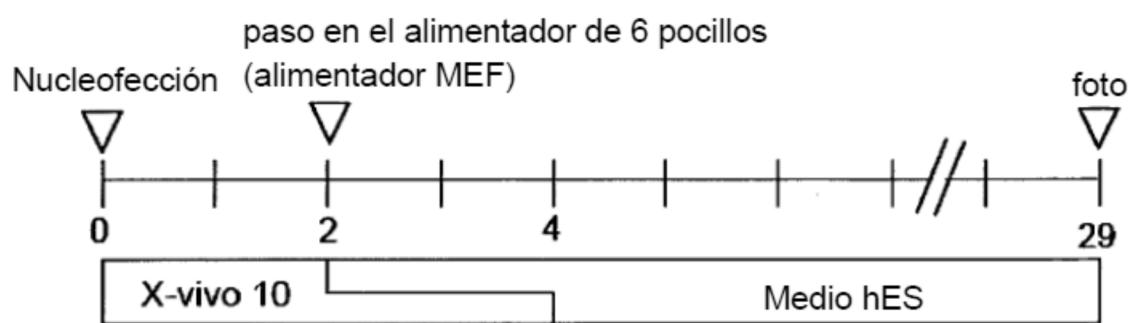


Fig. 36

a



b

