

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 827 248**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/029537**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14144932**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14762788 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020** **EP 2968392**

54 Título: **Métodos de uso de Zscan4 para rejuvenecer células humanas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361800668 P

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

20.05.2021

73 Titular/es:

ELIXIRGEN THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
855 North Wolfe Street, Suite 619
Baltimore, MD 21205, US

72 Inventor/es:

KO, MINORU S.H.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 827 248 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de Zscan4 para rejuvenecer células humanas

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a métodos para aumentar la longitud de los telómeros en una o más células humanas y/o aumentar la estabilidad del genoma de una o más células humanas, por ejemplo, poniendo en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas. La presente divulgación proporciona además métodos para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de los telómeros, para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía genómica y/o cromosómica, para rejuvenecer una o más células humanas, para rejuvenecer tejidos u órganos y para rejuvenecer a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, poniendo en contacto una o más células humanas en el sujeto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 o administrando a un sujeto que lo necesite, un agente que aumenta la expresión de Zscan4.

15 **Antecedentes**

Los telómeros son secuencias de ADN repetitivas acompañadas de proteínas que tapan y protegen el extremo de cada cromosoma de la degradación continua en cada ciclo celular, asegurando y protegiendo así la integridad cromosómica. El acortamiento de los telómeros también puede provocar cáncer al contribuir a la inestabilidad genómica (Raynaud *et al.*, Crit. Rev Oncol Hematol 66:99-117, 2008) y se ha asociado con el envejecimiento y la senescencia celular (Yang, Cytogenet Genome Res 122: 211-218, 2008). Está bien establecido que los telómeros se acortan gradualmente durante el transcurso del envejecimiento normal. Se ha notificado que se pierden hasta 200 pares de bases de ADN de telómero con cada ronda de replicación del ADN. Por ejemplo, en seres humanos recién nacidos, los linfocitos de sangre periférica tienen aproximadamente 10 kb de ADN de telómero en ambos extremos de cada cromosoma, que se acortan gradualmente a aproximadamente 6 kb a la edad de 70 años. También se sabe que los factores ambientales y los factores del estilo de vida pueden acelerar el acortamiento de los telómeros. Se cree que tal acortamiento de los telómeros está asociado con el deterioro celular relacionado con la edad. También se cree que el acortamiento de los telómeros limita el número de divisiones celulares, lo que en última instancia resulta en una limitación de la duración de la vida humana. También se sabe que los seres humanos nacen con diferentes longitudes de telómeros. Por ejemplo, algunos seres humanos comienzan con aproximadamente 8 kb de telómeros, mientras que otros comienzan con aproximadamente 12 kb de telómeros. Por consiguiente, los seres humanos con telómeros más cortos pueden ser más susceptibles a desarrollar ciertas condiciones patológicas relacionadas con la edad a una edad más temprana que aquellos con telómeros más largos. Tales condiciones patológicas incluyen, por ejemplo, deficiencias inmunológicas, úlceras crónicas, aterosclerosis, ceguera relacionada con la edad debido a una disminución proliferativa de las células epiteliales pigmentadas de la retina y cáncer.

Además, existen diversas enfermedades y trastornos que también están asociados con el acortamiento de los telómeros (Armanios y Blackburn, Nat Rev Genet. 2012 Oct;13(10):693-704; Shahinaz *et al.*, Blood Reviews, vol. 25, n.º 6, p. 261-269, 2011). Los ejemplos de enfermedades genéticas que pueden causar el acortamiento de los telómeros incluyen disqueratosis congénita, síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, síndrome de Revesz y síndrome de Coats plus. Además, recientemente se ha demostrado que una fracción significativa de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) está causada por el acortamiento de los telómeros. De manera similar, algo de cirrosis hepática y fibrosis pancreática puede deberse al acortamiento de los telómeros. Considerando la prevalencia de tales afecciones patológicas, parece que las enfermedades causadas por el acortamiento de los telómeros son más comunes de lo que se pensaba.

Otro ejemplo de una enfermedad asociada con el acortamiento de los telómeros es la anemia de Fanconi. La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente. La anemia de Fanconi es un síndrome hereditario de insuficiencia de la médula ósea que se caracteriza por pancitopenia progresiva y susceptibilidad al cáncer (Bogliolo *et al.*, Mutagenesis. 2002 Nov;17(6):529-38). Se ha informado que los pacientes con anemia de Fanconi muestran un acortamiento acelerado de los telómeros (Leteurte *et al.*, Br. J. Haematol., 1999; Ball *et al.*, Blood, 1998; Hanson *et al.*, Cytogenet. Cell Genet. 2001; y Callén, *et al.*, Hum Mol Genet. 2002 Feb 15;11(4):439-44).

Un posible método para tratar estas diversas enfermedades y trastornos asociados al acortamiento de los telómeros es utilizar la telomerasa para alargar los telómeros acortados. La telomerasa se ha identificado como la principal enzima que se sabe que participa en el mantenimiento del alargamiento de los telómeros. Si bien la telomerasa está activa en las células madre embrionarias, la telomerasa generalmente no se expresa en células no embrionarias (es decir, células adultas), tales como las células somáticas. Por tanto, la reactivación de la telomerasa o la expresión forzada de la telomerasa en células adultas puede usarse para aumentar la longitud de los telómeros. Sin embargo, un posible problema con el uso de telomerasa es que la expresión continua de telomerasa a menudo se asocia con tumorigénesis y transformación cancerosa. Por consiguiente, la expresión de la telomerasa no es una forma ideal de aumentar la longitud de los telómeros en pacientes que padecen enfermedades o afecciones asociadas con el acortamiento de los telómeros.

Otro posible método para alargar los telómeros es utilizar un componente recientemente descubierto de una hierba china (TA-65) que potencialmente puede aumentar la longitud de los telómeros (Harley *et al.*, Rejuvenation Research

14:45-56, 2011). Sin embargo, no está bien establecido que esta hierba pueda alargar eficazmente los telómeros. Además, el uso de esta hierba requeriría la administración continua a largo plazo de medicamentos para tratar a los pacientes que necesitan alargamiento de los telómeros.

- 5 Además, recientemente se ha demostrado que Zscan4 (proteína 4 que contiene el dominio de dedo de cinc y Scan) es necesario para el mantenimiento de la estabilidad del genoma y el cariotipo normal en células madre embrionarias de ratón y se expresa en embriones de ratón y células madre embrionarias (Falco *et al.*, Dev Biol 307:539-550, 2007; Zalzman *et al.*, Nature 464:858-863, 2010; Jiang *et al.*, Cell Research -Xibao Yanjiu. Nature Publishing Group, REINO UNIDO, CN, vol. 23, n.º 1, Spec. Número, 1, pág. 92-106, 2013; los documentos de publicación PCT n.º WO 2008/118957, WO 2011/02880, WO 2012/103235, WO 2012/129342, WO 2012/158561 y WO 2012/158564; y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2010/0105043, US 2012/0129161 y US 2012/0156305). También se ha demostrado que la expresión de Zscan4 en células madre embrionarias de ratón está asociada con el alargamiento de los telómeros (Zalzman *et al.*, Nature 464:858-863, 2010; los documentos de publicación PCT n.º WO 2011/02880, WO 2012/129342 y WO 2012/158564; y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2012/0156305). Aunque, se ha demostrado que el genoma humano también contiene un gen ZSCAN4, ninguno de Falco *et al.*, Dev Biol 307:539-550, 2007; Zalzman *et al.*, Nature 464:858-863, 2010; los documentos de publicación PCT n.º WO 2008/118957, WO 2011/02880, WO 2012/103235, WO 2012/129342, WO 2012/158561 y WO 2012/158564; o las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2010/0105043, US 2012/0129161 y US 2012/0156305 proporcionan apoyo experimental que demuestra que la expresión de Zscan4 conduce a los mismos efectos en las células humanas que en las células embrionarias de ratón. No está claro si el ZSCAN4 humano tendría la misma función que el Zscan4 de ratón, ya que el genoma de ratón contiene seis genes Zscan4 y tres pseudogenes Zscan4, mientras que el genoma humano solo contiene un gen ZSCAN4 (publicación PCT n.º WO 2008/118957). Además, se desconoce si la expresión de ZSCAN4 en células humanas, tales como las células somáticas implicadas en enfermedades y afecciones asociadas con el acortamiento de los telómeros, tendría el mismo efecto que se muestra para las células madre embrionarias de ratón.

Sumario

- 30 Por consiguiente, existe la necesidad de enfoques mejorados para aumentar la longitud de los telómeros y corregir anomalías genómicas y/o cromosómicas en células humanas con el fin de tratar enfermedades o afecciones asociadas con el acortamiento de los telómeros y anomalías genómicas.

- 35 Para satisfacer la necesidad anterior, la presente divulgación proporciona una proteína Zscan4 o una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros de acuerdo con la reivindicación 1 y una o más células humanas para su uso en el tratamiento de una afección asociada con una anomalía en los telómeros de acuerdo con la reivindicación 2. Las realizaciones adicionales se proporcionan en las reivindicaciones dependientes.

- 40 En el presente documento también se presentan métodos para aumentar la longitud de los telómeros, aumentar la estabilidad cromosómica y/o genómica en células humanas, corregir las anomalías cromosómicas y/o del cariotipo (por ejemplo, trisomía 21), en células humanas, y/o rejuvenecer las células humanas, poniendo en contacto las células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 (proteína 4 que contiene el dominio de dedo de zinc y Scan) en las células. Como se usa en el presente documento, el término "Zscan4" se refiere a polipéptidos y polinucleótidos de Zscan4, tales como genes, que codifican polipéptidos Zscan4 de cualquier especie, incluyendo ratón y ser humano. Como se usa en el presente documento, el término "ZSCAN4" se refiere específicamente a polipéptidos y polinucleótidos Zscan4 humanos, tales como genes, que codifican polipéptidos Zscan4.

- 50 La presente divulgación también proporciona métodos para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros, cromosómica y/o en el cariotipo, aumentar la estabilidad genómica y corregir las anomalías en el cariotipo en células ovocitos humanos, ovocitos humanos fertilizados y embriones humanos preimplantación, rejuvenecer un tejido u órgano y/o rejuvenecer a un sujeto que lo necesite, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4. En algunas realizaciones, las células humanas son células humanas adultas (es decir, células no embrionarias).

- 55 Además, la presente divulgación está basada, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la expresión de Zscan4 en células humanas, tales como células fibroblastos, aumenta rápida y drásticamente la longitud de los telómeros en las células después de solo dos días. En particular, tal y como se desvela a continuación en el Ejemplo 8, la expresión de Zscan4 en fibroblastos humanos dio como resultado un aumento de aproximadamente un 40 % en la longitud de los telómeros en tres días. Además, la expresión de Zscan4 en fibroblastos humanos aislados de un paciente con anemia de Fanconi dio como resultado un aumento de aproximadamente un 160 % en la longitud de los telómeros en tres días. Sorprendentemente, la expresión de Zscan4 en una población de células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Down también pudo reducir drásticamente el porcentaje de células en la población con trisomía 21. En particular, como se desvela en el Ejemplo 15 a continuación, la expresión de Zscan4 en una población de células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Down pudo corregir la anomalía de la trisomía 21 en aproximadamente el 55 % de las células.

Los resultados desvelados en el presente documento son particularmente sorprendentes dado que se cree que nunca antes se ha demostrado que la expresión de Zscan4 pueda aumentar la longitud de los telómeros en células humanas. Los resultados desvelados en el presente documento también son inesperados. Si bien se ha demostrado anteriormente que la expresión de Zscan4 aumenta la longitud de los telómeros en las células madre embrionarias (ME) de ratón, las diferencias no solo entre el ZSCAN4 humano y el Zscan4 de ratón, sino también entre la biología de las células humanas y las células de ratón, así como entre las células ME y las células no ME, tales como las células adultas, no llevaría a uno a esperar que la expresión de Zscan4 en células humanas también aumentara la longitud de los telómeros. Esto es particularmente relevante dado que se ha demostrado previamente que los elementos reguladores de la transcripción en los genomas humano y de ratón difieren drásticamente. Esto es excepcionalmente sorprendente cuando se considera que incluso los factores de transcripción con función conservada tanto en seres humanos como en ratones exhiben un grado significativo de preferencias de eventos de unión específicos de la especie (Odom *et al.*, Nature Genetics 6:39, 2007).

Ventajosamente, utilizando agentes que aumentan la expresión de Zscan4, tales como las moléculas de ácido nucleico que codifican Zscan4, se pueden utilizar para aumentar la tasa de éxito de la fertilización *in vitro* (FIV) y el éxito de embarazos en mujeres mayores rejuveneciendo y/o corrigiendo anomalías genómicas y/o cromosómicas, tal como aneuploidía, en ovocitos, ovocitos fertilizados o embriones preimplantación. Además, utilizando agentes que aumentan la expresión de Zscan4, tales como las moléculas de ácido nucleico que codifican Zscan4, pueden usarse para tratar a un paciente que padece una enfermedad o afección asociada con el acortamiento de los telómeros, tal como la anemia de Fanconi, aumentando la longitud de los telómeros en las células del paciente afectado por la enfermedad o afección. Adicionalmente, también se pueden usar agentes que aumentan la expresión de Zscan4, tales como las moléculas de ácido nucleico que codifican Zscan4, para rejuvenecer las células de un individuo, tejidos en un individuo u órganos en un individuo; o para rejuvenecer a los individuos aumentando la longitud de los telómeros en las células, tejidos, órganos e individuos envejecidos a causa del acortamiento de los telómeros.

Por consiguiente, ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la longitud de los telómeros en una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de telómeros, poniendo en contacto una o más células humanas en el sujeto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de telómeros, mediante: i. aislar del sujeto una o más células humanas que necesiten alargamiento de telómeros; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, mediante: i. aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, mediante: i. aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la

expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

5 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía en el cariotipo en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo.

10 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo, mediante: i. aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía en el cariotipo en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo.

20 En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la anomalía en el cariotipo se selecciona de entre una nulisomía cromosómica, una monosomía cromosómica, una trisomía cromosómica, una tetrasomía cromosómica y una pentasomía cromosómica. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la anomalía en el cariotipo se selecciona de entre trisomía 21, trisomía 16, trisomía 18, trisomía 13, monosomía X, aneuploidía XXX, aneuploidía XXY, aneuploidía XYY y duplicación de 1p36. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo se selecciona de entre síndrome dup(17)(p11.2p11.2), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome dup(22)(q11.2q11.2), síndrome del ojo de gato, síndrome de cri-du-chat, Wolf-Hirschhorn, síndrome de Williams-Beuren, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía hereditaria con tendencia a sufrir parálisis por presión, síndrome de Smith-Magenis, neurofibromatosis, síndrome de Alagille, síndrome velocardiofacial, síndrome de DiGeorge, deficiencia de esteroides sulfatasa, síndrome de Kallmann, microftalmia con defectos cutáneos lineales, hipoplasia suprarrenal, deficiencia de glicerol quinasa, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, factor determinante del testículo en Y, azoospermia (factor a), azoospermia (factor b), azoospermia (factor c) y delección de 1p36. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre enfermedades de acortamiento de los telómeros, síndromes de insuficiencia de la médula ósea, enfermedades o trastornos relacionados con el acortamiento de los telómeros relacionados con la edad y enfermedades o trastornos del envejecimiento prematuro. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad del acortamiento de los telómeros seleccionada de entre disqueratosis congénita, síndrome de Hoyerall-Hreidarsson, síndrome de Revesz, síndrome de Coats plus, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática, enfermedad de Alzheimer y artrosis. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea seleccionado de entre anemia de Fanconi, trombocitopenia amegacariocítica, anemia aplásica, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Pearson, síndrome de Shwachman Diamond, trombocitopenia y síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad o trastorno del acortamiento de los telómeros relacionada con la edad, una enfermedad o trastorno del envejecimiento prematuro o ambos seleccionados de entre síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de Cockayne, xerodermia pigmentosa, telangiectasia ataxia, síndrome de Rothmund Thomson, tricotodistrofia, síndrome de Juberg-Marsidi y síndrome de Down. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o condición es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre deficiencias inmunológicas, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno autoinmunitario, úlceras crónicas, aterosclerosis, cáncer, una lesión neurológica, un trastorno degenerativo, un trastorno neurodegenerativo, cicatrización de heridas, reparación muscular, reparación del músculo cardíaco, reemplazo de cartilago, artritis, artrosis, regeneración dental, ceguera, ceguera relacionada con la edad debido a la disminución proliferativa de las células epiteliales pigmentadas de la retina, sordera, insuficiencia de la médula ósea, trasplante de médula ósea, diabetes, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad genética, una mutación genética y daño en el ADN. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es un cáncer seleccionado de entre cánceres del corazón (por ejemplo, angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma), cánceres de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico (escamocelular, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma); cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago (carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, leiomioma, linfoma); cánceres de estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma, sarcoma); cánceres de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma); cánceres de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma); cánceres de intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomioma); cánceres del tracto

genitourinario (por ejemplo, riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms, nefroblastoma, linfoma, leucemia); cánceres de vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma); cánceres de próstata (adenocarcinoma, sarcoma); cánceres de testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); cánceres de hígado (por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma); cánceres de huesos (por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes); cánceres del sistema nervioso (por ejemplo, cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma, pinealoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma)); cánceres ginecológicos (por ejemplo, útero (carcinoma de endometrio), cuello de útero (carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, tumores endometrioides, tumor de Brenner, carcinoma de células claras, carcinoma no clasificado, tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma escamocelular, sarcoma botriode, rhabdomyosarcoma embrionario, trompas de Falopio (carcinoma)); cánceres hematológicos (por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma maligno)); cánceres de piel (por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma escamocelular, sarcoma de Kaposi, moles, nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis); y cánceres de la glándula suprarrenal (por ejemplo, neuroblastoma). En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de entre tiroiditis, enfermedad de Goodpasture, artritis reumatoide, oligoartritis juvenil, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por adyuvantes, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, atrofia gástrica autoinmunitaria, pénfigo vulgar, psoriasis, vitiligo, diabetes tipo 1, diabetes no obesa, miastenia grave, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, colangitis esclerosante, sialadenitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, anemia hemolítica autoinmunitaria y anemia perniciosa. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de entre adrenoleucodistrofia (ALD), alcoholismo, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Lou Gehrig, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, parálisis cerebral, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, insomnio letal familiar, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, neuroborreliosis, enfermedad de Machado-Joseph, ataxia espinocerebelosa de tipo 3, atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, narcolepsia, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, degeneración combinada subaguda de la médula espinal secundaria a anemia perniciosa, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten, enfermedad de Batten, ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, tabes dorsal y encefalopatía tóxica.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar un cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células cancerosas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 reprime el crecimiento de las una o más células cancerosas, tratando de esta manera el cáncer. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para mejorar la capacidad de respuesta a la quimioterapia en un paciente de cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que reduce la expresión de ZSCAN4 endógeno en una o más células madre cancerosas en el sujeto, donde la reducción de la expresión de ZSCAN4 endógeno reduce o elimina la resistencia a uno o más agentes quimioterapéuticos en una o más células madre cancerosas, mejorando así la capacidad de respuesta a los uno o más agentes quimioterapéuticos en el sujeto. En algunas realizaciones, el agente que reduce la expresión de ZSCAN4 endógeno es un ARNip o ARNhc específico para ZSCAN4. En algunas realizaciones, el cáncer seleccionado de entre cánceres del corazón (por ejemplo, angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, mixoma, rhabdomyoma, fibroma, lipoma y teratoma), cánceres de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico (escamocelular, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma); cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago (carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma); cánceres de estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma); cánceres de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma); cánceres de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma); cánceres de intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosos, hamartoma, leiomioma); cánceres del tracto genitourinario (por ejemplo, riñón

- (adenocarcinoma, tumor de Wilms, nefroblastoma, linfoma, leucemia); cánceres de vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma); cánceres de próstata (adenocarcinoma, sarcoma); cánceres de testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); cánceres de hígado (por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma); cánceres de huesos (por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes); cánceres del sistema nervioso (por ejemplo, cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma, pinealoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma)); cánceres ginecológicos (por ejemplo, útero (carcinoma de endometrio), cuello de útero (carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, tumores endometrioides, tumor de Brenner, carcinoma de células claras, carcinoma no clasificado, tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma escamocelular, sarcoma botrioide, rhabdomyosarcoma embrionario, trompas de Falopio (carcinoma)); cánceres hematológicos (por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma maligno)); cánceres de piel (por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma escamocelular, sarcoma de Kaposi, moles, nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis); y cánceres de la glándula suprarrenal (por ejemplo, neuroblastoma).
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la capacidad de reparación del ADN de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la capacidad de reparación del ADN en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer la piel, tratar la dermatitis atópica y/o una lesión cutánea, administrando tópicamente a la piel de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar la caída del cabello, administrando tópicamente al cuero cabelludo de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prevenir el encanecimiento del cabello, tratar el encanecimiento del cabello o ambos, administrando a uno o más folículos pilosos de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer una córnea, administrando a la córnea de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar el ojo seco, administrando a la córnea de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar la fibrosis pulmonar idiopática, administrando al pulmón de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.
- Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar la aterosclerosis, una cardiopatía coronaria, o ambas, administrando al torrente sanguíneo de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para proporcionar resistencia a uno o más agentes genotóxicos en una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la resistencia a uno o más agentes genotóxicos en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente. En algunas realizaciones, el agente genotóxico es mitomicina C o cisplatino.

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células humanas adultas. En algunas realizaciones, las una o más células humanas son células madre adultas, células madre tisulares, células progenitoras o células madre pluripotenciales inducidas. De acuerdo con algunos aspectos de la presente divulgación que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son una o más células madre adultas, células madre tisulares o células progenitoras seleccionadas de entre células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, células madre adiposas, células madre neuronales y células madre germinales. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células somáticas, células maduras o células diferenciadas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células somáticas, células maduras, o células diferenciadas seleccionadas de entre células epidérmicas, fibroblastos, linfocitos, hepatocitos, células epiteliales, miocitos, condrocitos, osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos, células β del páncreas, queratinocitos, eritrocitos, células de sangre periférica, neuronas, astrocitos, células germinales, espermatozoides y ovocitos.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para inducir un patrón de metilación de ADN similar al de las células madre embrionarias humanas en una o más células madre pluripotenciales inducidas humanas (MPi), poniendo en contacto las una o más células MPi humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células MPi humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce un patrón de metilación de ADN similar al de las células madre embrionarias humanas en las una o más células MPi humanas en comparación con una o más células MPi humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para corregir una o más anomalías en el cariotipo en una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de las una o más anomalías en el cariotipo en las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente. En algunas realizaciones, las una o más células ovocitos humanos se aíslan de un sujeto antes de ponerse en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. En algunas realizaciones, después de entrar en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4, las una o más células ovocitos humanos son sometidos a fertilización *in vitro*.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método *in vitro* para aumentar la estabilidad del genoma de uno o más ovocitos humanos fertilizados, poniendo en contacto los uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en los uno o más ovocitos humanos fertilizados, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en los uno o más ovocitos humanos fertilizados en comparación con uno o más embriones de ovocitos humanos fertilizados correspondientes que no están en contacto con el agente. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método *in vitro* para corregir una o más anomalías en el cariotipo en uno o más ovocitos humanos fertilizados, poniendo en contacto los uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en los uno o más ovocitos humanos fertilizados, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de las una o más anomalías en el cariotipo en los uno o más ovocitos humanos fertilizados en comparación con uno o más ovocitos humanos fertilizados correspondientes que no están en contacto con el agente. En algunas realizaciones, los uno o más ovocitos humanos fertilizados se fertilizaron mediante fertilización *in vitro*. En algunas realizaciones, antes de ser fertilizados, los uno o más ovocitos humanos se aislaron de un sujeto. En algunas realizaciones, los uno o más ovocitos fertilizados son embriones entre el estadio unicelular y el estadio de blastocisto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada

con una anomalía de los telómeros, mediante: i. aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros; ii. poner en contacto las células de la médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las células de médula ósea humana; y iii. injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, mediante: i. aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica; ii. poner en contacto las células de la médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana, el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las células de médula ósea humana; y iii. injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre enfermedades de acortamiento de los telómeros, síndromes de insuficiencia de la médula ósea, enfermedades o trastornos relacionados con el acortamiento de los telómeros relacionados con la edad y enfermedades o trastornos del envejecimiento prematuro. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad del acortamiento de los telómeros seleccionada de entre disqueratosis congénita, síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, síndrome de Revesz, síndrome de Coats plus, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática, enfermedad de Alzheimer y artrosis. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea seleccionado de entre anemia de Fanconi, trombocitopenia amegacariocítica, anemia aplásica, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Pearson, síndrome de Shwachman Diamond, trombocitopenia y síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una patología o enfermedad de acortamiento de los telómeros relacionada con la edad, una patología o enfermedad del envejecimiento prematuro, o ambas seleccionadas de entre síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de Cockayne, xerodermia pigmentosa, telangiectasia ataxia, síndrome de Rothmund Thomson, tricotiodistrofia, síndrome de Juberg-Marsidi y síndrome de Down.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer un tejido u órgano en un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, donde el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece el tejido u órgano.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer a un sujeto que lo necesita, administrando al sujeto un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece al sujeto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de un tejido u órgano en un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida del tejido u órgano.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas, prolongando así la vida del sujeto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de un sujeto, mediante: i. aislar una o más células humanas del sujeto; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas; y iii. administrar las una o más células humanas contactadas al sujeto para prolongar la vida del sujeto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para determinar uno o más efectos inducidos por Zscan4 en una o más células humanas, mediante: i. poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas; ii. medir los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas; y iii. comparar los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L

y/o DUX4 en las una o más células humanas con los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente, donde un aumento en los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas indica la presencia de uno o más efectos inducidos por Zscan4 en las una o más células humanas.

5

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el aumento de expresión de Zscan4 es transitorio. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente aumenta la expresión de Zscan4 durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 23 horas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente aumenta la expresión de Zscan4 durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente interacciona directamente con Zscan4 endógeno para aumentar la expresión de Zscan4. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente es una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada es un ARNm sintético. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada contiene un vector. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector es un vector vírico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector vírico es un vector paramixovírico, un vector retrovírico, un vector de lentivirus o un vector de adenovirus. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector vírico es un vector paramixovírico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector de paramixovirus es un vector de virus Sendai. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector es un vector plasmídico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector codifica Zscan4 unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el promotor es un promotor constitutivo. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el promotor es un promotor inducible. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el Zscan4 es una proteína de fusión Zscan4-ERT2. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la Zscan4 es una proteína Zscan4-ΔC. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC incluye una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, Zscan4 es Zscan4 de ratón, ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, Zscan4 se selecciona de entre Zscan4a, Zscan4b, Zscan4c, Zscan4d, Zscan4e y Zscan4f. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada contiene una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-10 y 21-30. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, Zscan4 es ZSCAN4 humana. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada contiene una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente es una proteína Zscan4. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 se fusiona con un péptido que penetra en las células. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el péptido que penetra en las células contiene un dominio de transducción de proteínas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el péptido que penetra en las células contiene un marcador peptídico de poli-arginina. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 está encapsulada en una nanopartícula. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína Zscan4 de ratón, una proteína ZSCAN4 humana, o un homólogo de la misma. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 se selecciona de entre una proteína Zscan4a, una proteína Zscan4b, una proteína Zscan4c, una proteína Zscan4d, una proteína Zscan4e y una proteína Zscan4f. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 11-20 y 31-40. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína ZSCAN4 humana. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos

el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína de fusión Zscan4-ERT2. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína Zscan4-ΔC. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC contiene una proteína Zscan4 de ratón, una proteína ZSCAN4 humana, o un homólogo de la misma, y donde una proteína Zscan4 contiene una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC contiene una proteína Zscan4 seleccionada de entre una proteína Zscan4a, una proteína Zscan4b, una proteína Zscan4c, una proteína Zscan4d, una proteína Zscan4e y una proteína Zscan4f, y donde la proteína Zscan4 contiene una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC contiene una proteína ZSCAN4 y donde la proteína Zscan4 contiene una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente es un retinoide, un agente que induce estrés oxidativo, o ambos.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la longitud de los telómeros en una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4 y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de telómeros, poniendo en contacto una o más células humanas en el sujeto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4 y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de telómeros, mediante: i. aislar del sujeto una o más células humanas que necesiten alargamiento de telómeros; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4 y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, mediante: i. aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, mediante: i. aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la

enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de la anomalía en el cariotipo en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo, mediante: i. aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de la anomalía en el cariotipo en las una o más células humanas; y iii. administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo.

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la anomalía en el cariotipo se selecciona de entre una nulisomía cromosómica, una monosomía cromosómica, una trisomía cromosómica, una tetrasomía cromosómica y una pentasomía cromosómica. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la anomalía en el cariotipo se selecciona de entre trisomía 21, trisomía 16, trisomía 18, trisomía 13, monosomía X, aneuploidía XXX, aneuploidía XXY, aneuploidía XYY y duplicación de 1p36. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo se selecciona de entre síndrome dup(17)(p11.2p11.2), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome dup(22)(q11.2q11.2), síndrome del ojo de gato, síndrome de cri-du-chat, Wolf-Hirschhorn, síndrome de Williams-Beuren, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía hereditaria con tendencia a sufrir parálisis por presión, síndrome de Smith-Magenis, neurofibromatosis, síndrome de Alagille, síndrome velocardiofacial, síndrome de DiGeorge, deficiencia de esteroides sulfatasa, síndrome de Kallmann, microftalmia con defectos cutáneos lineales, hipoplasia suprarrenal, deficiencia de glicerol quinasa, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, factor determinante del testículo en Y, azoospermia (factor a), azoospermia (factor b), azoospermia (factor c) y delección de 1p36. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre enfermedades de acortamiento de los telómeros, síndromes de insuficiencia de la médula ósea, enfermedades o trastornos relacionados con el acortamiento de los telómeros relacionados con la edad y enfermedades o trastornos del envejecimiento prematuro. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad del acortamiento de los telómeros seleccionada de entre disqueratosis congénita, síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, síndrome de Revesz, síndrome de Coats plus, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática, enfermedad de Alzheimer y artrosis. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea seleccionado de entre anemia de Fanconi, trombocitopenia amegacariocítica, anemia aplásica, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Pearson, síndrome de Shwachman Diamond, trombocitopenia y síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad o trastorno del acortamiento de los telómeros relacionada con la edad, una enfermedad o trastorno del envejecimiento prematuro o ambos seleccionados de entre síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de Cockayne, xerodermia pigmentosa, telangiectasia ataxia, síndrome de Rothmund Thomson, tricotodistrofia, síndrome de Juberg-Marsidi y síndrome de Down. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o condición es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre deficiencias inmunológicas, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno autoinmunitario, úlceras crónicas, aterosclerosis, cáncer, una lesión neurológica, un trastorno degenerativo, un trastorno neurodegenerativo, cicatrización de heridas, reparación muscular, reparación del músculo cardíaco, reemplazo de cartilago, artritis, artrosis, regeneración dental, ceguera, ceguera relacionada con la edad debido a la disminución proliferativa de las células epiteliales pigmentadas de la retina, sordera, insuficiencia de la médula ósea, trasplante de médula ósea, diabetes, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad genética, una mutación genética y daño en el ADN. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es un cáncer seleccionado de entre cánceres del corazón (por ejemplo, angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma), cánceres de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico (escamocelular, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma); cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago (carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, leiomioma, linfoma); cánceres de estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma, sarcoma); cánceres de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma); cánceres de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma); cánceres de intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomioma); cánceres del tracto

genitourinario (por ejemplo, riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms, nefroblastoma, linfoma, leucemia); cánceres de vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma); cánceres de próstata (adenocarcinoma, sarcoma); cánceres de testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); cánceres de hígado (por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma); cánceres de huesos (por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes); cánceres del sistema nervioso (por ejemplo, cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma, pinealoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma)); cánceres ginecológicos (por ejemplo, útero (carcinoma de endometrio), cuello de útero (carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, tumores endometrioides, tumor de Brenner, carcinoma de células claras, carcinoma no clasificado, tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma escamocelular, sarcoma botrioide, rhabdomyosarcoma embrionario, trompas de Falopio (carcinoma)); cánceres hematológicos (por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma maligno)); cánceres de piel (por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma escamocelular, sarcoma de Kaposi, moles, nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis); y cánceres de la glándula suprarrenal (por ejemplo, neuroblastoma). En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de entre tiroiditis, enfermedad de Goodpasture, artritis reumatoide, oligoartritis juvenil, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por adyuvantes, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, atrofia gástrica autoinmunitaria, pénfigo vulgar, psoriasis, vitiligo, diabetes tipo 1, diabetes no obesa, miastenia grave, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, colangitis esclerosante, sialadenitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, anemia hemolítica autoinmunitaria y anemia perniciosa. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de entre adrenoleucodistrofia (ALD), alcoholismo, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Lou Gehrig, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, parálisis cerebral, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, insomnio letal familiar, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, neuroborreliosis, enfermedad de Machado-Joseph, ataxia espinocerebelosa de tipo 3, atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, narcolepsia, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, degeneración combinada subaguda de la médula espinal secundaria a anemia perniciosa, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten, enfermedad de Batten, ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, tabes dorsal y encefalopatía tóxica.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar un cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células cancerosas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 reprime el crecimiento de las una o más células cancerosas, tratando de esta manera el cáncer. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para mejorar la capacidad de respuesta a la quimioterapia en un paciente de cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que reduce la expresión de ZSCAN4 endógeno en una o más células madre cancerosas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la reducción de la expresión de ZSCAN4 endógena reduce o elimina la resistencia a uno o más agentes quimioterapéuticos en una o más células madre cancerosas, mejorando así la capacidad de respuesta a los uno o más agentes quimioterapéuticos en el sujeto. En algunas realizaciones, el agente que reduce la expresión de ZSCAN4 endógeno es un ARNip o ARNhc específico para ZSCAN4. En algunas realizaciones, el cáncer seleccionado de entre cánceres del corazón (por ejemplo, angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, mixoma, rhabdomyoma, fibroma, lipoma y teratoma), cánceres de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico (escamocelular, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma); cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago (carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma); cánceres de estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma); cánceres de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma); cánceres

de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma); cánceres de intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma); cánceres del tracto genitourinario (por ejemplo, riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms, nefroblastoma, linfoma, leucemia); cánceres de vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma); cánceres de próstata (adenocarcinoma, sarcoma); cánceres de testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); cánceres de hígado (por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma); cánceres de huesos (por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes); cánceres del sistema nervioso (por ejemplo, cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma, pinealoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma)); cánceres ginecológicos (por ejemplo, útero (carcinoma de endometrio), cuello de útero (carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, tumores endometroides, tumor de Brenner, carcinoma de células claras, carcinoma no clasificado, tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma escamocelular, sarcoma botrioide, rabdomiosarcoma embrionario, trompas de Falopio (carcinoma)); cánceres hematológicos (por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma maligno)); cánceres de piel (por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma escamocelular, sarcoma de Kaposi, moles, nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis); y cánceres de la glándula suprarrenal (por ejemplo, neuroblastoma).

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la capacidad de reparación del ADN de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la capacidad de reparación del ADN en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer la piel, tratar la dermatitis atópica y/o una lesión cutánea, administrando tópicamente a la piel de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar la caída del cabello, administrando tópicamente al cuero cabelludo de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prevenir el encanecimiento del cabello, tratar el encanecimiento del cabello o ambos, administrando a uno o más folículos pilosos de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer una córnea, administrando a la córnea de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula

de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

5 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar el ojo seco, administrando a la córnea de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

10 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar la fibrosis pulmonar idiopática, administrando al pulmón de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

15 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar la aterosclerosis, una cardiopatía coronaria, o ambas, administrando al torrente sanguíneo de un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4.

20 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para proporcionar resistencia a uno o más agentes genotóxicos en una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la resistencia a uno o más agentes genotóxicos en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente. En algunas realizaciones, el agente genotóxico es mitomicina C o cisplatino.

25 En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células humanas adultas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células madre adultas, células madre tisulares, células progenitoras o células madre pluripotenciales inducidas. De acuerdo con algunos aspectos de la presente divulgación que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son una o más células madre adultas, células madre tisulares o células progenitoras seleccionadas de entre células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, células madre adiposas, células madre neuronales y células madre germinales. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células somáticas, células maduras o células diferenciadas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son células somáticas, células maduras o células diferenciadas. De acuerdo con algunos aspectos de la presente divulgación que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las una o más células humanas son una o más células somáticas, células maduras, o células diferenciadas seleccionadas de entre células epidérmicas, fibroblastos, linfocitos, hepatocitos, células epiteliales, miocitos, condrocitos, osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos, células β del páncreas, queratinocitos, eritrocitos, células de sangre periférica, neuronas, astrocitos, células germinales, espermatozoides y ovocitos.

45 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para inducir un patrón de metilación de ADN similar al de las células madre embrionarias humanas en una o más células madre pluripotenciales inducidas humanas (MPi), poniendo en contacto las una o más células MPi humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células MPi humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce un patrón de metilación de ADN similar al de las células madre embrionarias humanas en las una o más células MPi humanas en comparación con una o más células MPi humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

50 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente.

60 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para corregir una o más anomalías en el cariotipo en una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos

con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de las una o más anomalías en el cariotipo en las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente. En algunas realizaciones, las una o más células ovocitos humanos se aíslan de un sujeto antes de ponerse en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. En algunas realizaciones, después de entrar en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4, las una o más células ovocitos humanos son sometidos a fertilización *in vitro*.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método *in vitro* para aumentar la estabilidad del genoma de uno o más ovocitos humanos fertilizados, poniendo en contacto los uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en los uno o más ovocitos humanos fertilizados, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en los uno o más ovocitos humanos fertilizados en comparación con uno o más embriones de ovocitos humanos fertilizados correspondientes que no están en contacto con el agente. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método *in vitro* para corregir una o más anomalías en el cariotipo en uno o más ovocitos humanos fertilizados, poniendo en contacto los uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en los uno o más ovocitos humanos fertilizados, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de las una o más anomalías en el cariotipo en los uno o más ovocitos humanos fertilizados en comparación con uno o más ovocitos humanos fertilizados correspondientes que no están en contacto con el agente. En algunas realizaciones, los uno o más ovocitos humanos fertilizados se fertilizaron mediante fertilización *in vitro*. En algunas realizaciones, antes de ser fertilizados, los uno o más ovocitos humanos se aislaron de un sujeto. En algunas realizaciones, los uno o más ovocitos fertilizados son embriones entre el estadio unicelular y el estadio de blastocisto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, mediante: i. aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros; ii. poner en contacto las células de la médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las células de médula ósea humanas; y iii. injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, mediante: i. aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica; ii. poner en contacto las células de la médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las células de médula ósea humanas; y iii. injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una o más enfermedades o afecciones seleccionadas de entre enfermedades de acortamiento de los telómeros, síndromes de insuficiencia de la médula ósea, enfermedades o trastornos relacionados con el acortamiento de los telómeros relacionados con la edad y enfermedades o trastornos del envejecimiento prematuro. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una enfermedad del acortamiento de los telómeros seleccionada de entre disqueratosis congénita, síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, síndrome de Revesz, síndrome de Coats plus, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática, enfermedad de Alzheimer y artrosis. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea seleccionado de entre anemia de Fanconi, trombocitopenia amegacariocítica, anemia aplásica, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Pearson, síndrome de Shwachman Diamond, trombocitopenia y síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la enfermedad o afección es una patología o enfermedad de acortamiento de los telómeros relacionada con la edad, una patología o enfermedad del envejecimiento prematuro, o ambas seleccionadas de entre síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de Cockayne, xeroderma pigmentosa, telangiectasia ataxia, síndrome de Rothmund Thomson, tricotiodistrofia, síndrome de Juberg-Marsidi y síndrome de Down.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer un tejido u órgano en un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de

virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece el tejido u órgano.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para rejuvenecer a un sujeto que lo necesita, administrando al sujeto un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece al sujeto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de un tejido u órgano en un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 prolonga la vida del tejido u órgano.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas, prolongando así la vida del sujeto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la vida de un sujeto, mediante: i. aislar una o más células humanas del sujeto; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4, y donde la expresión aumentada de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas; y iii. administrar las una o más células humanas contactadas al sujeto para prolongar la vida del sujeto.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para determinar uno o más efectos inducidos por Zscan4 en una o más células humanas, mediante: i. poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas, donde el agente es una molécula de ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector vírico, preferentemente un vector de virus Sendai, que codifica Zscan4; ii. medir los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas; y iii. comparar los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas con los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente, donde un aumento en los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas indica la presencia de uno o más efectos inducidos por Zscan4 en las una o más células humanas.

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el aumento de expresión de Zscan4 es transitorio. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente aumenta la expresión de Zscan4 durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 23 horas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente aumenta la expresión de Zscan4 durante aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente interacciona directamente con Zscan4 endógeno para aumentar la expresión de Zscan4. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector codifica Zscan4 unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el promotor es un promotor constitutivo. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el promotor es un promotor inducible. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el Zscan4 es una proteína de fusión Zscan4-ERT2. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la Zscan4 es una proteína Zscan4-ΔC. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC incluye una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, Zscan4 es Zscan4 de ratón, ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, Zscan4 se selecciona de entre Zscan4a, Zscan4b, Zscan4c, Zscan4d, Zscan4e y Zscan4f. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada contiene una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-10 y 21-30.

En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, Zscan4 es ZSCAN4 humana. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada contiene una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente es una proteína Zscan4. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 se fusiona con un péptido que penetra en las células. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el péptido que penetra en las células contiene un dominio de transducción de proteínas. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el péptido que penetra en las células contiene un marcador peptídico de poli-arginina. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 está encapsulada en una nanopartícula. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína Zscan4 de ratón, una proteína ZSCAN4 humana, o un homólogo de la misma. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 se selecciona de entre una proteína Zscan4a, una proteína Zscan4b, una proteína Zscan4c, una proteína Zscan4d, una proteína Zscan4e y una proteína Zscan4f. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 11-20 y 31-40. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína ZSCAN4 humana. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína de fusión Zscan4-ERT2. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4 es una proteína Zscan4-ΔC. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC contiene una proteína Zscan4 de ratón, una proteína ZSCAN4 humana, o un homólogo de la misma, y donde una proteína Zscan4 contiene una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC contiene una proteína Zscan4 seleccionada de entre una proteína Zscan4a, una proteína Zscan4b, una proteína Zscan4c, una proteína Zscan4d, una proteína Zscan4e y una proteína Zscan4f, y donde la proteína Zscan4 contiene una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína Zscan4-ΔC contiene una proteína ZSCAN4 y donde la proteína Zscan4 contiene una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. En algunas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente es un retinoide, un agente que induce estrés oxidativo, o ambos.

Lo anterior y otros objetivo y características de la divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** describe la corrección de anomalías cromosómicas en células ME de ratón transfectadas con ARNm de hZSCAN4. La **figura 1A** representa el procedimiento experimental. La **figura 1B** representa el porcentaje de células ME de ratón euploides transfectadas con ARNm de hZSCAN4.

La **figura 2** representa la corrección de anomalías cromosómicas en células ME de ratón infectadas con vectores de virus Sendai que expresan mZscan4 o hZSCAN4. La **figura 2A** representa el porcentaje de células ME de ratón euploides infectadas con SeVmZscan4 o SeVhZSCAN4. La **figura 2B** representa el porcentaje de células ME de ratón euploides infectadas con SeVmZERT2 o SeVhZERT2.

La **figura 3** representa la corrección de anomalías cromosómicas en células ME de ratón infectadas con vectores de virus Sendai sensibles a la temperatura que expresan mZscan4 o hZSCAN4. La **figura 3A** representa el porcentaje de células ME euploides de ratón infectadas con SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15, seguido de cultivo a 35 °C durante tres días. La **figura 3B** representa el porcentaje de células ME de ratón euploides infectadas con SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15, seguido de cultivo a 35 °C durante seis días. La **figura 3C** representa el porcentaje de células ME euploides de ratón infectadas con SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15, seguido de cultivo a 35 °C durante tres días y, después, a 37 °C durante tres días.

La **figura 4** representa los efectos de los agentes biológicos de Zscan4 en células ME de ratón. La **figura 4A** representa los efectos de la transfección de células ME de ratón con ARNm de hZSCAN4. La **figura 4B** representa

los efectos de infectar células ME de ratón con vectores de virus Sendai que expresan Zscan4. La **figura 4C** describe los efectos de infectar células ME de ratón con vectores de virus Sendai sensibles a la temperatura que expresan mZscan4 o hZSCAN4.

La **figura 5** representa los efectos de los agentes biológicos de Zscan4 en células MPi humanas. La **figura 5A** representa los efectos de la transfección de células MPi humanas con ARNm de Zscan4. La **figura 5B** representa los efectos de infectar células MPi humanas con vectores de virus Sendai que expresan Zscan4. La **figura 5C** representa los efectos de infectar células MPi humanas con vectores de virus Sendai sensibles a la temperatura que expresan mZscan4 o hZSCAN4.

La **figura 6** representa los resultados de un ensayo de crecimiento de células fibroblastos humanos de un paciente con DKC transfectado con ARNm de hZSCAN4 o ARNm de GFP.

La **figura 7A** representa los resultados de un ensayo de crecimiento de células fibroblastos humanos de un paciente con DKC infectado con SeVhZScan4. La **figura 7B** muestra micrografías que representan la morfología celular de células fibroblastos humanos de un paciente con DKC infectado con SeVhZScan4.

La **figura 8A** representa el procedimiento experimental. La **figura 8B** representa los resultados de un ensayo de longitud de los telómeros de células fibroblastos humanos de un paciente con DKC transfectado con ARNm de hZSCAN4 o ARNm de GFP.

La **figura 9** representa los resultados de un ensayo de crecimiento de células fibroblastos de un paciente con síndrome de Werner (WS) transfectado con ARNm de hZSCAN4 o ARNm de GFP.

La **figura 10** representa un esquema de tratamiento de ejemplo usando Zscan4.

La **figura 11** representa un gráfico de barras que muestra que la sobreexpresión de ZSCAN4 humano aumenta la longitud de los telómeros en células fibroblastos humanos adultos normales. "N" indica el número de duplicados.

La **figura 12** representa un gráfico de barras que muestra que la sobreexpresión de ZSCAN4 humano aumenta la longitud de los telómeros en fibroblastos humanos aislados de un paciente con anemia de Fanconi, grupo de complementación A. "N" indica el número de duplicados.

La **figura 13** representa los resultados de los ensayos de crecimiento de células fibroblastos dérmicos humanos adultos (FDHa) transfectadas con ARNm de hZSCAN4, ARNm de mZscan4 o ARNm de GFP. La **figura 13A** representa los resultados de un ensayo de crecimiento de células FDHa transfectadas con ARNm de hZSCAN4 o ARNm de GFP y cultivadas durante aproximadamente 50 días. La **figura 13B** representa los resultados de un ensayo de crecimiento de células FDHa transfectadas con ARNm de hZSCAN4 o ARNm de GFP y cultivadas durante aproximadamente 30 días. La **figura 13C** representa los resultados de un ensayo de crecimiento de células FDHa transfectadas con ARNm de mZscan4, ARNm de hZSCAN4 o ARNm de GFP y cultivadas durante aproximadamente 20 días.

La **figura 14** representa los resultados de la extensión de las longitudes de los telómeros en células madre mesenquimatosas (MM) humanas infectadas con vectores de virus Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón o ZSCAN4 humano.

La **figura 15** representa los efectos de los agentes biológicos de Zscan4 sobre células diferenciadas y células madre tisulares.

La **figura 16** representa el número de ploidía del cromosoma 21 de células fibroblastos de un paciente con síndrome de Down (células de SD) transfectadas con ARNm de hZSCAN4. La **figura 16A** representa los resultados típicos de los análisis FISH. Tres puntos indican trisomía 21 y dos puntos indican cromosoma 21 diploide normal. La **figura 16B** representa células de SD transfectadas una vez con ARNm de hZSCAN4. La **figura 16C** representa células de SD transfectadas dos veces con ARNm de hZSCAN4. En la figura, "n" indica el número de núcleos examinados.

La **figura 17A** representa el procedimiento experimental. La **figura 17B** representa el número de ploidía del cromosoma 21 de células fibroblastos de un paciente con síndrome de Down (células de SD) infectado con SeVhZSCAN4-TS15 una vez, seguido de infección con SeVhZSCAN4 dos veces. La **figura 17C** representa el número de ploidía del cromosoma 21 de células fibroblastos de un paciente con síndrome de Down (células de SD) infectado con SeVhZSCAN4-TS15 una vez, seguido de infección con SeVhZSCAN4 cuatro veces.

La **figura 18** representa un esquema de tratamiento de ejemplo para rejuvenecer y/o corregir anomalías cromosómicas en ovocitos humanos, ovocitos humanos fertilizados y embriones humanos preimplantación usando Zscan4 de ratón o ZSCAN4 humano.

La **figura 19** representa la represión del crecimiento celular de células cancerosas HCT116 infectadas con SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15.

Descripción detallada

5

Visión general

Como se ha analizado anteriormente, se ha demostrado previamente que la expresión de Zscan4 de ratón en células madre embrionarias de ratón está asociada al alargamiento de los telómeros. Dado que el genoma del ratón contiene seis genes Zscan4 y tres pseudogenes Zscan4, mientras que el genoma humano solo contiene un gen Zscan4, un experto en la técnica no habría podido extrapolar los resultados de la expresión de Zscan4 en células de ratón a células humanas. Sin embargo, tal y como se desvela a continuación en el Ejemplo 8, el solicitante ha demostrado por primera vez que la expresión de ZSCAN4 humano es completamente diferenciada, los fibroblastos humanos adultos dan como resultado un aumento de aproximadamente un 40 % en la longitud de los telómeros en los fibroblastos. Además, el solicitante ha demostrado que la expresión de Zscan4 en fibroblastos humanos aislados de un paciente con anemia de Fanconi dio como resultado un aumento de aproximadamente un 160 % en la longitud de los telómeros en los fibroblastos. Estos resultados demuestran sorprendentemente que Zscan4 es un efector aguas arriba, en lugar de un factor aguas abajo en el alargamiento de los telómeros, ya que se demostró que la expresión de Zscan4 de forma independiente era suficiente para aumentar la longitud de los telómeros en fibroblastos humanos aislados de un paciente con anemia de Fanconi. Como tal, activar o aumentar la expresión de Zscan4 en las células puede ser un tratamiento eficaz para la anemia de Fanconi o cualquier otra enfermedad o afección asociada con el acortamiento de los telómeros. Adicionalmente, como se desvela en el Ejemplo 15 a continuación, el solicitante también ha demostrado por primera vez que la expresión de Zscan4 va mucho más allá de la mera promoción de la estabilidad del genoma. La expresión de Zscan4 en una población de células fibroblastos humanos que tienen trisomía 21 induce la *corrección* de la anomalía de la trisomía 21 en aproximadamente el 55 % de las células. Por consiguiente, la activación o el aumento de la expresión de Zscan4 se puede utilizar para tratar la aneuploidía en las células, así como aumentar la tasa de éxito de la fertilización *in vitro* (FIV) y los embarazos con éxito en mujeres mayores rejuveneciendo y/o corrigiendo anomalías cromosómicas, tal como aneuploidía, en células ovocitos y ovocitos fertilizados.

Por consiguiente, los métodos de la presente divulgación se refieren generalmente al aumento de la expresión de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de la proteína Zscan4) en células humanas para aumentar la longitud de los telómeros y/o aumentar la estabilidad del genoma. Varios aspectos de la presente divulgación se refieren al aumento de la longitud de los telómeros en una o más células humanas, tratar a un sujeto que necesita alargamiento de los telómeros, tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, aumentar la estabilidad del genoma de una o más células humanas, rejuvenecer una o más células humanas, rejuvenecer un tejido u órgano en un sujeto y rejuvenecer a un sujeto que lo necesite.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar la longitud de los telómeros en una o más células humanas, incluido el contacto de las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en la célula humana, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de los telómeros, incluyendo poner en contacto una o más células humanas en el sujeto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de los telómeros, incluyendo: i.) aislar del sujeto una o más células humanas que necesiten alargamiento de telómeros; ii.) poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas; y iii.) administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, incluyendo administrar a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas que se van a tratar para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, incluyendo: i.) aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros; ii.) poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas; y iii.) administrar

las una o más células humanas en contacto al sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros.

5 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

10 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, mediante: i.) aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica; ii.) poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las una o más células humanas; y iii.) administrar al
15 sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

20 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía en el cariotipo en las una o más células humanas para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo.

25 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo, mediante: i.) aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo; ii.) poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce la corrección de la anomalía en el cariotipo en las una o más células humanas; y iii.) administrar al
30 sujeto la una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en el cariotipo.

35 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células cancerosas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 reprime el crecimiento de las una o más células cancerosas, tratando de esta manera el cáncer.

40 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para mejorar la capacidad de respuesta a la quimioterapia en un paciente con cáncer, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que reduce la expresión de ZSCAN4 endógeno en una o más células madre cancerosas en el sujeto, donde la reducción de la expresión de ZSCAN4 endógeno reduce o elimina la resistencia a uno o más agentes quimioterapéuticos en una o más células madre cancerosas, mejorando así la capacidad de respuesta a los uno o más agentes quimioterapéuticos en el sujeto.

45 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células humanas, incluyendo poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

50 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar la capacidad de reparación del ADN de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la capacidad de reparación del ADN en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

55 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para rejuvenecer una o más células humanas, incluyendo poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

60 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para proporcionar resistencia a uno o más agentes genotóxicos en una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la resistencia a uno o más agentes genotóxicos en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

65 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para inducir un patrón de metilación de ADN similar al

de las células madre embrionarias humanas en una o más células madre pluripotenciales inducidas (MPi) humanas, poniendo en contacto las una o más células MPi humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células MPi humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce un patrón de metilación de ADN similar al de las células madre embrionarias humanas en las una o más células MPi humanas en comparación con una o más células MPi humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para rejuvenecer una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para corregir una o más anomalías en el cariotipo en una o más células ovocitos humanos, poniendo en contacto las una o más células ovocitos humanos con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células ovocitos humanos, en el que la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de las una o más anomalías en el cariotipo en las una o más células ovocitos humanos en comparación con una o más células ovocitos humanos correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para aumentar la estabilidad del genoma de uno o más ovocitos humanos fertilizados, poniendo en contacto los uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en los uno o más ovocitos humanos fertilizados, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en uno o más ovocitos humanos fertilizados en comparación con uno o más ovocitos humanos fertilizados correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para corregir una o más anomalías en el cariotipo en uno o más ovocitos humanos fertilizados, poniendo en contacto los uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en los uno o más ovocitos humanos fertilizados, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de las una o más anomalías en el cariotipo en los uno o más ovocitos humanos fertilizados en comparación con uno o más ovocitos humanos fertilizados correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros, incluyendo: i.) aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros; ii.) poner en contacto las células de médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las células de médula ósea humana; y iii.) injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica, incluyendo: i.) aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica; ii.) poner en contacto las células de médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce la corrección de la anomalía cromosómica en las células de médula ósea humana; y iii.) injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para rejuvenecer un tejido u órgano en un sujeto, incluyendo la administración a un sujeto que lo necesite de un agente que aumente la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, donde el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece el tejido u órgano.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para rejuvenecer a un sujeto que lo necesite, incluyendo la administración al sujeto de un agente que aumenta la expresión de Zscan4, donde el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece al sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prolongar la vida de una o más células humanas, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prolongar la vida de un tejido u órgano en un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida del tejido u órgano.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prolongar la vida de un sujeto, administrando a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas, prolongando así la vida del sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prolongar la vida de un sujeto, mediante: i. aislar una o más células humanas del sujeto; ii. poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de la expresión de Zscan4 prolonga la vida de las una o más células humanas; y iii. administrar las una o más células humanas contactadas al sujeto para prolongar la vida del sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para determinar uno o más efectos inducidos por Zscan4 en una o más células humanas, mediante: i. poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas; ii. medir los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas; y iii. comparar los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas con los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente, donde un aumento en los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas indica la presencia de uno o más efectos inducidos por Zscan4 en las una o más células humanas.

Zscan4

Los genes 4 que contienen el dominio de dedo de cinc y SCAN (Zscan4) representan un grupo de genes que ya se ha descrito que exhiben expresión específica de 2 células y expresión específica de células ME (publicación PCT n.º WO 2008/118957). El gen Zscan4 se identificó mediante el perfil de expresión de todas las etapas de preimplantación de embriones de ratón utilizando un proyecto de secuenciación de ADNc a gran escala (Ko *et al.*, Development 127: 1737-1749, 2000; Sharov *et al.*, PLoS Biol 1: E74, 2003) y análisis de micromatriz de ADN (Hamatani *et al.*, Dev Cell 6:117-131, 2004). En ratones, el término "Zscan4" se refiere a un conjunto de genes que incluyen tres pseudogenes (Zscan4-ps1, Zscan4-ps2 y Zscan4-ps3) y seis genes expresados (Zscan4a, Zscan4b, Zscan4c, Zscan4d, Zscan4e y Zscan4f). Entre los seis parálogos, los marcos de lectura abiertos de Zscan4c, Zscan4d y Zscan4f codifican un dominio SCAN, que se ha predicho que participa en las interacciones proteína-proteína, así como cuatro dominios de dedo de cinc, lo que sugiriendo su papel potencial como factores de transcripción. A diferencia de los ratones, el genoma humano contiene solo una copia de Zscan4. Zscan4 puede hacer referencia a polipéptidos Zscan4 y Zscan4 puede hacer referencia a polinucleótidos que codifican los polipéptidos Zscan4.

Recientemente se ha demostrado que Zscan4 (proteína 4 que contiene el dominio de dedo de cinc y Scan), que, en ratones, se expresa específicamente en embriones en el estadio de 2 células y células ME (Falco *et al.*, Dev Biol 307: 539-550, 2007), es necesaria para el mantenimiento de la estabilidad del genoma y el cariotipo normal en las células ME (Zalzman *et al.*, Nature 464:858-863, 2010). Aunque solo una pequeña fracción (~ 1 % a ~ 5 %) de las células ME indiferenciadas expresan Zscan4 en un momento dado (Falco *et al.*, Dev Biol 307: 539-550, 2007), esencialmente todas las células ME en cultivo experimentan el estado Zscan4+ transitorio en 9 pases (Zalzman *et al.*, Nature 464:858-863, 2010). Tras la represión de Zscan4 mediada por ARN en horquilla corta (ARNhc), después de aproximadamente 8 pases, las células ME experimentan un deterioro masivo del cariotipo. Estudios anteriores también han demostrado que el estado Zscan4+ de las células ME de ratón está asociado con la extensión de los telómeros (Zalzman *et al.*, Nature 464:858-863, 2010). Aunque las células ME tienen la mejor capacidad para mantener la integridad de su genoma en cultivo, también se reconoce ampliamente que incluso las células ME, en cultivo a largo plazo, pierden gradualmente su potencia de desarrollo. Un telómero puede hacer referencia al final de un cromosoma eucariota, una estructura especializada implicada en la replicación y estabilidad del cromosoma. Los telómeros contienen muchas repeticiones de una secuencia corta de ADN en una orientación específica. Las funciones de los telómeros incluyen proteger los extremos del cromosoma para que los cromosomas no terminen uniéndose y permitir la replicación de los extremos finales de los cromosomas (por la telomerasa). El número de repeticiones de ADN telomérico al final de un cromosoma disminuye con la edad.

También se ha demostrado previamente que la expresión forzada de Zscan4 de ratón en células ME de ratón durante tres días aumenta la longitud promedio de los telómeros desde la longitud estándar de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 66 kb (Zalzman *et al.*, 2010). Esto indica que Zscan4 de forma independiente puede aumentar de manera rápida y eficiente la longitud de los telómeros. Sin embargo, se desconoce si Zscan4 puede aumentar la longitud de los telómeros en células humanas no embrionarias, tal como células madre adultas y células somáticas.

Células humanas

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren el aumento de la longitud de los telómeros en una o más células humanas, incluyendo, pero sin limitación, células adultas humanas, utilizando un agente que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de la proteína Zscan4) en las una o más células humanas. En determinadas realizaciones, las una o más células humanas están en un sujeto que necesita alargamiento de telómeros o que sufre o se le ha diagnosticado una enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros.

Varias células humanas encuentran uso en los métodos descritos en el presente documento. Como se desvela en el presente documento, la expresión "célula(s) humana(s)" se refiere a cualquier célula encontrada en el cuerpo humano durante y después del desarrollo embrionario, tal como células embrionarias humanas, células madre, células pluripotenciales, células diferenciadas, células maduras, células somáticas y células adultas. En algunas realizaciones, las células humanas de la presente divulgación son células adultas humanas. Como se desvela en el presente documento, la expresión "célula(s) humana(s) adulta(s)" se refiere a cualquier célula encontrada en el cuerpo humano después del desarrollo embrionario (es decir, células no embrionarias). Las células humanas de la presente divulgación incluyen, sin limitación, espermatoцитos, ovocitos, ovocitos fertilizados (es decir, cigotos), células embrionarias, células maduras, células diferenciadas, células somáticas, células progenitoras, células madre embrionarias (ME), células madre pluripotenciales inducidas (MPi), células madre adultas, células madre somáticas y células madre tisulares. Las células madre adultas, que también se conocen como células madre somáticas o células madre tisulares, pueden hacer referencia a células indiferenciadas, que se encuentran en el cuerpo después del desarrollo embrionario, que se multiplican por división celular para reponer las células moribundas y regenerar los tejidos dañados. Las células progenitoras pueden hacer referencia a células oligopotenciales o unipotenciales que se diferencian en un tipo específico de célula o linaje celular. Las células progenitoras son similares a las células madre, pero están más diferenciadas y exhiben una autorrenovación limitada. Los ejemplos de células madre adultas, células madre tisulares y/o células progenitoras pueden incluir, sin limitación, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, células madre adiposas, células madre neuronales, células madre intestinales, células madre de la piel y células germinales (tales como espermatozoides y ovocitos).

Las células humanas desveladas también pueden incluir, sin limitación, células somáticas, células maduras y células diferenciadas. Las células somáticas pueden hacer referencia a cualquier célula del cuerpo, incluyendo, sin limitación, células germinales, células madre tisulares, células progenitoras, células madre pluripotenciales inducidas (MPi) y células diferenciadas. Los ejemplos de células somáticas, células maduras y/o células diferenciadas pueden incluir, sin limitación, células epidérmicas, fibroblastos, linfocitos, hepatocitos, células epiteliales, miocitos, condrocitos, osteocitos, adipocitos, cardiomiocitos, células β del páncreas, queratinocitos, eritrocitos, células de sangre periférica, células de la médula ósea, neuronas, astrocitos y células germinales. Las células germinales pueden hacer referencia a las células que dan lugar a los gametos (es decir, óvulos y espermatozoides) de organismos que se reproducen sexualmente. En determinadas realizaciones, las células germinales incluyen, sin limitación, ovocitos y espermatozoides. En alguna realización, las células somáticas, las células maduras y/o las células diferenciadas de la presente divulgación también incluyen, sin limitación, embriones preimplantación.

Agentes que aumentan la expresión de Zscan4

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la utilización de un agente que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de la proteína Zscan4) en células humanas para aumentar la longitud de los telómeros en las células humanas. Un agente puede hacer referencia a cualquier molécula de ácido nucleico, proteína, compuesto, molécula pequeña, compuesto orgánico, compuesto inorgánico u otra molécula de interés. En algunas realizaciones, el agente es cualquier agente que aumente la expresión de Zscan4 ya sea interactuando directamente con el gen Zscan4 endógeno (incluida cualquiera de las secuencias reguladoras aguas arriba o aguas abajo) o interactuando con genes y/o proteínas que conducen a la inducción de la expresión de Zscan4. En algunas realizaciones, el agente puede ser una molécula de ácido nucleico que codifica Zscan4, que incluye, sin limitación, un ARNm sintético, y un vector de expresión que incluye, sin limitación, un vector vírico, tal como los vectores de virus Sendai. En otras realizaciones, el agente puede ser un polipéptido que contiene una proteína Zscan4 o una porción funcional de la misma tal como Zscan4-C. En algunas realizaciones, el agente puede ser un retinoide o un agente que induce estrés oxidativo.

En algunas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de la proteína Zscan4) en células humanas aumenta transitoriamente la expresión de Zscan4. Por ejemplo, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas puede aumentar la expresión de Zscan4 durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 23 horas (por ejemplo, durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas o aproximadamente 23 horas); o de aproximadamente de 1 día a aproximadamente 10 días (por ejemplo, aproximadamente 1 día, aproximadamente 1,25 días, aproximadamente 1,5 días, aproximadamente 1,75 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 2,25 días, aproximadamente 2,5 días, aproximadamente 2,75 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 3,25 días, aproximadamente 3,5 días,

aproximadamente 3,75 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 4,25 días, aproximadamente 4,5 días, aproximadamente 4,75 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6,25 días, aproximadamente 6,5 días, aproximadamente 6,75 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 7,25 días, aproximadamente 7,5 días, aproximadamente 7,75 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 8,25 días, aproximadamente 8,5 días, aproximadamente 8,75 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 9,25 días, aproximadamente 9,5 días, aproximadamente 9,75 días o aproximadamente 10 días).

En algunas realizaciones, los efectos beneficiosos desvelados de una mayor expresión de Zscan4 (por ejemplo, expresión de la proteína Zscan4) en células humanas pueden potenciarse mediante aumentos transitorios repetidos en la expresión de Zscan4. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de la proteína Zscan4) en células humanas puede usarse para aumentar repetidamente la expresión de Zscan4 en células humanas en un intervalo de cada 4 horas, cada 8 horas, cada 12 horas, cada 16 horas, cada 24 horas, cada 32 horas, cada 40 horas, cada 48 horas, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada mes, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada siete meses, cada ocho meses, cada nueve meses, cada 10 meses, cada 11 meses, todos los años, cada dos años, cada tres años, cada cuatro años, cada cinco años, cada seis años, cada siete años, cada ocho años, cada nueve años, cada 10 años, cada 11 años, cada 12 años, cada 13 años, cada 14 años, cada 15 años, cada 16 años, cada 17 años, cada 18 años, cada 19 años, cada 20 años, cada 21 años, cada 22 años, cada 23 años, cada 24 años, cada 25 años, cada 26 años, cada 27 años, cada 28 años, cada 29 años, cada 30 años, cada 35 años, cada 40 años, cada 45 años o cada 50 años.

Como se desvela en el presente documento, Las células humanas generalmente no expresan la proteína ZSCAN en una cantidad significativa. Como tal, los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 aumentan la expresión de la proteína Zscan4 en las células tratadas. En algunas realizaciones, el tratamiento de una célula humana con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 puede dar como resultado un aumento de al menos 1,5 veces A un aumento de al menos 1.000.000 de veces en la expresión de la proteína Zscan4.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas, aumenta la expresión de la proteína Zscan4 en al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, al menos 2,0 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,15 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,35 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,45 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,55 veces, al menos 3,0 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4,0 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5,0 veces, al menos 5,5 veces, al menos 6,0 veces, al menos 6,5 veces, al menos 7,0 veces, al menos 7,5 veces, al menos 8,0 veces, al menos 8,5 veces, al menos 9,0 veces, al menos 9,5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 300 veces, al menos 400 veces, al menos 500 veces, al menos 600 veces, al menos 700 veces, al menos 800 veces, al menos 900 veces, al menos 1.000 veces, al menos 2.000 veces, al menos 3.000 veces, al menos 4.000 veces, al menos 5.000 veces, al menos 6.000 veces, al menos 7.000 veces, al menos 8.000 veces, al menos 9.000 veces, al menos 10.000 veces, al menos 25.000 veces, al menos 50.000 veces, al menos 75.000 veces, al menos 100.000 veces, al menos 125.000 veces, al menos 150.000 veces, al menos 175.000 veces, al menos 200.000 veces, al menos 225.000 veces, al menos 250.000 veces, al menos 275.000 veces, al menos 300.000 veces, al menos 325.000 veces, al menos 350.000 veces, al menos 375.000 veces, al menos 400.000 veces, al menos 425.000 veces, al menos 450.000 veces, al menos 475.000 veces, al menos 500.000 veces, al menos 525.000 veces, al menos 550.000 veces, al menos 575.000 veces, al menos 600.000 veces, al menos 625.000 veces, al menos 650.000 veces, al menos 675.000 veces, al menos 700.000 veces, al menos 725.000 veces, al menos 750.000 veces, al menos 775.000 veces, al menos 800.000 veces, al menos 825.000 veces, al menos 850.000 veces, al menos 875.000 veces, al menos 900.000 veces, al menos 925.000 veces, al menos 950.000 veces, al menos 975.000 veces o al menos 1.000.000 veces, por ejemplo, en relación con la expresión de la proteína Zscan4 en una célula humana que no se ha puesto en contacto con el agente.

Puede usarse cualquier método conocido en la técnica y desvelado en el presente documento para determinar la expresión de la proteína Zscan4 en una célula o para cuantificar el número de proteínas (es decir, la estequiometría proteica) por célula. En algunas realizaciones, no todas las células de una población celular o sujeto tratado con el agente se verán afectadas por el agente. Por ejemplo, en realizaciones donde el agente es un vector vírico que expresa Zscan4, es posible que el vector vírico no infecte todas las células de una población de células tratadas o de un sujeto. Como tal, un "aumento de veces" en la expresión de la proteína Zscan4 como se usa en el presente documento se refiere al aumento promedio en la expresión de la proteína Zscan4 en las células en una población de células tratadas o en un sujeto que se ven afectadas por el agente. Por ejemplo, en las realizaciones donde el agente es un vector vírico, un aumento de veces en la expresión de la proteína Zscan4 puede hacer referencia al aumento promedio en la expresión de la proteína Zscan4 en células infectadas de una población de células tratadas o sujeto.

Polinucleótidos Zscan4

En algunas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 es una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Zscan4. Un polinucleótido

puede hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico (tal como una secuencia lineal) de cualquier longitud. Por tanto, un polinucleótido incluye oligonucleótidos y también secuencias de genes que se encuentran en los cromosomas. Un oligonucleótido es una pluralidad de nucleótidos unidos a través de enlaces fosfodiéster nativos. Un oligonucleótido es un polinucleótido de entre 6 y 300 nucleótidos de longitud. Un análogo de oligonucleótido se refiere a restos que funcionan de manera similar a los oligonucleótidos pero que tienen porciones de origen no natural. Por ejemplo, los análogos de oligonucleótidos pueden contener porciones de origen no natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces entre azúcares, tal como un oligodesoxinucleótido de fosforotioato. Los análogos funcionales de polinucleótidos de origen natural pueden unirse al ARN o al ADN, e incluyen moléculas de ácido nucleico peptídico (PNA).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido Zscan4 se denominan polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico Zscan4. Estos polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN, tales como secuencias de ARNm, que codifican un Zscan4. Se entiende que todos los polinucleótidos que codifican un polipéptido Zscan4 también se incluyen en el presente documento, siempre que codifiquen un polipéptido con una actividad Zscan4 reconocida, tal como la capacidad de modular la estabilidad del genoma o la longitud de los telómeros. La estabilidad del genoma puede hacer referencia a la capacidad de una célula para replicar fielmente el ADN y mantener la integridad de la maquinaria de replicación del ADN. Se cree que los telómeros largos proporcionan un amortiguador contra la senescencia celular y son generalmente indicativos de la estabilidad del genoma y la salud celular en general. La estabilidad cromosómica (por ejemplo, pocas mutaciones, sin reordenamientos cromosómicos o cambios en el número) también se asocia con la estabilidad del genoma. La pérdida de la estabilidad del genoma está asociada con el cáncer, trastornos neurológicos y envejecimiento prematuro. Los signos de inestabilidad del genoma incluyen tasas elevadas de mutación, reordenamientos cromosómicos grandes, alteraciones en el número de cromosomas y acortamiento de los telómeros.

Las secuencias de ácido nucleico de Zscan4 se han descrito previamente en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/118957; Falco *et al.*, Dev. Biol. 307(2):539-550, 2007; y Carter *et al.*, Gene Expr. Patterns. 8(3):181-198, 2008). Los ácidos nucleicos de Zscan4 pueden incluir, sin limitación, cualquiera de un grupo de genes Zscan4 de ratón que exhiben expresión específica de células ME o estadio embrionaria de 2 células (incluyendo Zscan4a, Zscan4b, Zscan4c, Zscan4d, Zscan4e y Zscan4f), el ortólogo humano ZSCAN4 o cualquier ortólogo de otra especie de Zscan4.

Como se desvela en el presente documento, la secuencia de nucleótidos del gen Zscan4a de ratón se establece en la SEQ ID NO:1, la secuencia de nucleótidos del gen Zscan4b de ratón se establece en la SEQ ID NO:2, la secuencia de nucleótidos del gen Zscan4c de ratón se establece en la SEQ ID NO:3, la secuencia de nucleótidos del gen Zscan4d de ratón se establece en la SEQ ID NO:4, la secuencia de nucleótidos del gen Zscan4f de ratón se establece en la SEQ ID NO:5 y la secuencia de nucleótidos del gen Zscan4f de ratón se establece en la SEQ ID NO:6. Además, la secuencia de nucleótidos del gen ZSCAN4 humano se establece en la SEQ ID NO:7.

Las secuencias de ácido nucleico de Zscan4 de otras especies están disponibles públicamente, incluyendo Zscan4 de perro (números de acceso de GenBank XM-541370.2 y XM-848557.1; SEQ ID NO: 8); Zscan4 de vaca (número de acceso de GenBank XM.sub.--001789250.1; SEQ ID NO: 9); Zscan4 de caballo (número de registro de GenBank XM.sub.--001493944.1; SEQ ID NO: 10); Zscan4 de gorila (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt A1YEQ9; SEQ ID NO: 21); Zscan4 de bonobo (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt A1YFX5; SEQ ID NO: 22); Zscan4 de orangután de Borneo (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt A2T7G6; SEQ ID NO: 23); de orangután de Sumatra (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt H2P0E3; SEQ ID NO: 24); Zscan4 de panda (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt G1LE29; SEQ ID NO: 25); Zscan4 de cerdo (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt F1SCQ2; SEQ ID NO: 26); Zscan4 de gibón de mejillas blancas del Norte (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt G1RJD4; SEQ ID NO: 27); Zscan4 de macaco Rhesus (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt F7GH55; SEQ ID NO: 28); Zscan4 de conejillo de indias (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt H0V5E8; SEQ ID NO: 29); y de ardilla de tierra de trece líneas (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt I3N7T3; SEQ ID NO: 30).

En un ejemplo específico, Zscan4 es Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano. Los ácidos nucleicos de Zscan4 también pueden incluir, sin limitación, ácidos nucleicos de Zscan4, u homólogos de los mismos, que codifican polipéptidos Zscan4 que son capaces de aumentar la estabilidad del genoma y/o aumentar la longitud de los telómeros.

Un experto en la técnica puede preparar fácilmente fragmentos y variantes de polinucleótidos de Zscan4 usando técnicas moleculares. En algunas realizaciones, un fragmento de un polinucleótido Zscan4 incluye al menos 250, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, al menos 1500 o al menos 2000 ácidos nucleicos consecutivos de un polinucleótido Zscan4. En algunas realizaciones, un fragmento de Zscan4 es un fragmento que confiere una función de Zscan4 cuando se expresa en una célula de interés, tales como, pero sin limitación, aumentar la estabilidad del genoma y/o aumentar la longitud de los telómeros.

Modificaciones menores de las secuencias de polinucleótidos de Zscan4 pueden dar como resultado la expresión de péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con los polinucleótidos homólogos no

modificados descritos en el presente documento. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser espontáneas. Todos los polinucleótidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento.

- 5 Los polinucleótidos de Zscan4 pueden incluir ADN recombinante que se incorpora a un vector; en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma; o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. La expresión incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN. Un ácido nucleico o polipéptido recombinante es uno que tiene una secuencia
- 10 que no es de origen natural o tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial se consigue a menudo mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.
- 15 En algunas realizaciones, una variante degenerativa de cualquiera de los polinucleótidos de Zscan4 descritos en el presente documento puede usarse en los métodos de la presente divulgación. Una variante degenerativa puede hacer referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido, tal como un polipéptido Zscan4, que incluye una secuencia que está degenerada como resultado del código genético. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayor parte de los cuales se especifican mediante más de un codón. Por tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos
- 20 degeneradas siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos no cambie.

- Una secuencia codificante de Zscan4 puede unirse operativamente a un promotor heterólogo para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico codificante de Zscan4. Un promotor puede hacer referencia a
- 25 secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales. Un promotor constitutivo es un promotor que está continuamente activo y no está sujeto a regulación por señales o moléculas externas. Por el contrario, la actividad de un promotor inducible está regulada por una señal o molécula externa (por ejemplo, un factor de transcripción). Una
- 30 primera secuencia de ácido nucleico está operablemente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ácido nucleico unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario, para unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de
- 35 lectura. Un polipéptido o polinucleótido heterólogo se refiere a un polipéptido o polinucleótido derivado de una fuente o especie diferente. Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden ubicarse hasta varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. En un ejemplo, el promotor es un promotor constitutivo, tal
- 40 como el promotor CAG (Niwa *et al.*, Gene 108 (2): 193-9, 1991), o el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK). En algunas realizaciones, el promotor es un promotor inducible, tal como un promotor inducible por tetraciclina (Masui *et al.*, Nucleic Acids Res. 33:e43, 2005). Otros promotores de ejemplo que pueden usarse para impulsar la expresión de Zscan4 incluyen, pero sin limitaciones: sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, principales regiones
- 45 operadoras y promotoras del fago lambda, la región de control de la proteína de la cubierta fd, los promotores tempranos y tardíos de SV40, promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus, baculovirus y virus de los simios, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levadura y el promotor de los factores de apareamiento alfa de levadura. En algunas realizaciones, se usa un promotor de Zscan4 nativo. Los polinucleótidos de Zscan4 de la presente divulgación pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo, un
- 50 promotor inducible o cualquier otro promotor adecuado descrito en el presente documento u otro promotor adecuado que será fácilmente reconocido por un experto en la técnica.

- La identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en
- 55 términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de similitud (que tiene en cuenta sustituciones de aminoácidos conservadoras); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las secuencias. Los homólogos y ortólogos de secuencias de los ácidos nucleicos o de aminoácidos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean usando métodos convencionales. Esta homología es más significativa cuando las proteínas o ADNc ortólogos proceden de especies que están más estrechamente relacionadas (tales como secuencias
- 60 humanas y de ratón), en comparación con especímenes más remotamente relacionados (tales como secuencias humanas y de *C. elegans*).

- Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos), puede hacer referencia a dos o más secuencias o subsecuencias
- 65 que son iguales. Dos secuencias son sustancialmente idénticas si dos secuencias tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, el 29 % de identidad, opcionalmente, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %).

45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, el 99 % o el 100 % de identidad en una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se compara y alinea para correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Cuando se comparan dos secuencias para determinar la identidad, no es necesario que las secuencias sean contiguas, pero cualquier hueco conllevaría una penalización que reduciría el porcentaje total de identidad. Para blastp, los parámetros predeterminados son penalización de apertura por hueco = 11, y penalización de extensión por hueco = 1. Para blastn, los parámetros predeterminados son penalización de apertura por hueco = 5, y penalización de extensión por hueco = 2.

Una ventana de comparación puede incluir una referencia a un segmento de una cualquiera de las posiciones contiguas, que incluyen, pero sin limitaciones, de 20 a 600, usualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más usualmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez alineadas las dos secuencias de manera óptima. Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineación de secuencias para la comparación. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J Mol Biol 48(3):443-453, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85(8):2444-2448, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual [véase, por ejemplo, Brent *et al.*, (2003) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Inc. (Ringbou Ed)].

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res 25(17):3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) J. Mol Biol 215(3):403-410, respectivamente. El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincide o satisface algún valor umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se menciona como el umbral del valor de palabra próxima (Altschul *et al.*, citado anteriormente). Estos aciertos de palabra próxima iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo el tiempo que pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (valor de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el valor de alineación acumulada queda fuera por una cantidad X de su valor máximo obtenido; el valor acumulado llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros W, T Y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLAST usa como valores predeterminados una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 [véase Henikoff y Henikoff, (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89(22):10915-10919] alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de nucleótidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M=5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90(12):5873-5877). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y, muy preferentemente, menos de aproximadamente 0,001.

Una indicación de que dos moléculas de ácido nucleico están estrechamente relacionadas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones estrictas. No obstante, las secuencias de ácidos nucleicos que no muestran un alto grado de identidad pueden codificar secuencias de aminoácidos idénticas o similares (conservadas), debido a la degeneración del código genético. Pueden realizarse cambios en una secuencia de ácido nucleico usando esta degeneración para producir múltiples moléculas de ácido nucleico que codifican sustancialmente la misma proteína.

Una indicación alternativa (y no necesariamente acumulativa) de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que el polipéptido que codifica el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

5 Además, una indicación de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con anticuerpos producidos contra el segundo polipéptido. Por lo tanto, normalmente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras.

10 Varios aspectos de la presente divulgación se refieren a entidades aisladas, tales como ácidos nucleicos aislados o moléculas de ARNm sintéticas. Un ácido nucleico aislado se ha separado o purificado sustancialmente de otras secuencias de ácido nucleico y de la célula del organismo en el que se encuentra el ácido nucleico de forma natural, *es decir*, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos. Por tanto, el término "aislado" abarca ácidos nucleicos purificados mediante métodos estándar de purificación de ácidos nucleicos. El término también abarca ácidos nucleicos preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente. De manera similar, las proteínas aisladas se han separado o purificado sustancialmente de otras proteínas de las células de un organismo en el que la proteína se encuentra de forma natural y abarca proteínas preparadas por expresión de recombinación en una célula hospedadora así como proteínas sintetizadas químicamente. De manera similar, las células aisladas se han separado sustancialmente de otros tipos de células.

20 Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los polinucleótidos de la presente divulgación incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayor parte de los cuales se especifican mediante más de un codón. Por tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degeneradas siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido Zscan4 codificado por la secuencia de nucleótidos no cambie funcionalmente. Un polinucleótido Zscan4 codifica un polipéptido Zscan4, como se desvela en el presente documento. Las secuencias de polinucleótidos de ejemplo que codifican polipéptidos Zscan4 pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 y 21-30. Adicionalmente, pueden usarse homólogos no humanos de ZSCAN4 humano para aumentar la expresión de Zscan4 en un sujeto humano de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente divulgación, ya que la expresión de tales homólogos de Zscan4 no humanos es transitoria y, como tal, no conduciría a una respuesta inmunogénica adversa en el sujeto humano.

35 En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 es un polinucleótido ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 es un polinucleótido Zscan4 de ratón o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 es un polinucleótido Zscan4a, un polinucleótido Zscan4b, un polinucleótido Zscan4c, un polinucleótido Zscan4d, un polinucleótido Zscan4e o un polinucleótido Zscan4f. En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 es un polinucleótido Zscan4 de perro, un polinucleótido Zscan4 de vaca, un polinucleótido Zscan4 de caballo o un homólogo de los mismos. En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:1-10 y 21-30.

45 En determinadas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 es un polinucleótido ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 que codifica un polipéptido Zscan4 incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

Métodos para introducir polinucleótidos Zscan4 en células humanas

55 En algunas realizaciones, los polinucleótidos Zscan4 se introducen en células humanas. La introducción de una molécula de ácido nucleico o una proteína en una célula abarca cualquier medio de suministrar la molécula de ácido nucleico o la proteína a la célula. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico se pueden transfectar, transducir o electroporar en una célula. Se puede lograr la liberación de proteínas a las células, por ejemplo, fusionando la proteína con un péptido que penetra en las células, tal como un péptido con un dominio de transducción de proteínas (por ejemplo, Tat de VIH-1) o un marcador peptídico de poli-arginina (Fuchs y Raines, Protein Science 14:1538-1544, 2005). Los dominios de transducción de proteínas pueden hacer referencia a péptidos catiónicos pequeños que facilitan la entrada de moléculas más grandes (proteínas, moléculas de ácido nucleico, etc.) en una célula mediante un mecanismo que es independiente de la endocitosis clásica. Un marcador peptídico de poli-arginina puede hacer referencia a un péptido corto (generalmente de 7 a 11 restos) compuesto por restos de arginina que facilita la liberación de moléculas más grandes (tales como proteínas y moléculas de ácido nucleico) a las células (véase, por ejemplo,

Fuchs y Raines, Protein Science 14:1538-1544, 2005).

La introducción de polinucleótidos Zscan4 en células humanas puede implicar el uso de un vector vírico (tales como vectores víricos integrantes o no integrantes) o un vector plasmídico, liberar las moléculas de ARNm que codifican los polinucleótidos Zscan4 o dirigir la liberación de las proteínas Zscan4. Cada uno de estos métodos se ha descrito en la técnica y, por lo tanto, está dentro de las capacidades de un experto en la técnica. En el presente documento se proporciona un breve resumen de cada método que se puede utilizar para administrar Zscan4 a una célula humana. Un vector puede hacer referencia a una molécula de ácido nucleico introducida en una célula hospedadora, produciendo de este modo una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación (secuencias de ADN que participan en el inicio de la síntesis de ADN). Por ejemplo, un vector de expresión contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y traducción del gen o genes insertados. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores pueden incluir, por ejemplo, vectores víricos y vectores plasmídicos.

Secuencias promotoras y vectores de expresión de Zscan4

Se puede usar un vector de expresión que incluye una secuencia promotora de Zscan4 unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo (tal como un gen indicador) para identificar células que expresan Zscan4. Los métodos para detectar la expresión del gen indicador varían dependiendo del tipo de gen indicador y son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando se utiliza un indicador fluorescente, la detección de la expresión se puede lograr mediante FACS o microscopia de fluorescencia. La identificación de células humanas que expresan Zscan4 se puede lograr con métodos alternativos, incluyendo, pero sin limitación, utilizando anticuerpos específicos para Zscan4 o mediante hibridación *in situ*.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico heterólogo (tal como una molécula indicadora) se expresa bajo el control de un promotor de Zscan4 (por ejemplo, en un vector). Un promotor de Zscan4 puede ser una secuencia promotora que regula la expresión de un polinucleótido Zscan4 endógeno descrito en el presente documento. La identificación de los promotores de Zscan4 está dentro de las capacidades de un experto en la técnica y en vista de la presente divulgación. Otras secuencias de control de la expresión, incluidos los potenciadores apropiados, terminadores de la transcripción, un codón de iniciación (es decir, ATG) frente a un gen que codifica proteínas, las señales de corte y empalme para intrones y codones de terminación se pueden incluir con el promotor Zscan4 en un vector de expresión. Generalmente, el promotor incluye al menos una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica una molécula indicadora.

En algunas realizaciones, se incorpora una secuencia de ácido nucleico heterólogo (tal como una molécula indicadora) en el ADN genómico de un sujeto, tal como mediante recombinación homóloga. Por ejemplo, la secuencia de codificación de GFP podría insertarse en la región de codificación de Zscan4 o podría reemplazar la región de codificación de Zscan4, de manera que GFP se expresa de la misma manera que Zscan4 endógeno. Los métodos de "knock-in" de genes mediante recombinación homóloga son bien conocidos en la técnica.

La proteína heteróloga codificada por la secuencia de ácido nucleico heteróloga es normalmente una molécula indicadora, tal como un marcador, una enzima, una proteína fluorescente, un polipéptido que confiere resistencia a los antibióticos a la célula o un antígeno que puede identificarse usando procedimientos convencionales de biología molecular. Las moléculas indicadoras se pueden utilizar para identificar una célula o una población de células, de interés, tal como células humanas que se han puesto en contacto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una célula humana. En algunas realizaciones, la proteína heteróloga es un marcador fluorescente (tal como una proteína verde fluorescente, o una variante de la misma, por ejemplo, Emerald (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)) un marcador antigénico (tal como hormona del crecimiento humana, insulina humana, antígenos HLA humanos); un marcador de superficie celular (tal como CD4 o cualquier receptor de superficie celular); o un marcador enzimático (tal como lacZ, fosfatasa alcalina). La expresión del gen indicador indica que la célula expresa Zscan4. Los métodos para detectar la expresión del gen indicador varían dependiendo del tipo de gen indicador y son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando se utiliza un indicador fluorescente, la detección de la expresión se puede lograr mediante FACS o microscopia de fluorescencia.

Los vectores de expresión contienen normalmente un origen de replicación, así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas, tal como un gen de resistencia a los antibióticos. Los vectores adecuados para su uso en el presente documento son bien conocidos en la técnica, incluidos vectores víricos y vectores plasmídicos (tales como los descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, un potenciador se encuentra aguas arriba del promotor de Zscan4, pero los elementos potenciadores generalmente se pueden ubicar en cualquier lugar del vector y aún tener un efecto potenciador. Sin embargo, la cantidad de actividad aumentada generalmente disminuirá con la distancia. Además, dos o más copias de una secuencia potenciadora pueden unirse operativamente una tras otra para producir un aumento aún mayor en la actividad promotora.

Los vectores de expresión que incluyen un promotor de Zscan4 se pueden usar para transfectar células hospedadoras,

tales como, por ejemplo, células humanas. Los vectores de ADN plasmídico y vírico biológicamente funcionales capaces de expresarse y replicarse en un hospedador son conocidos en la técnica y pueden usarse para transfectar cualquier célula de interés. Una célula hospedadora puede hacer referencia a células en las que se puede propagar un vector y expresar su ADN. El término también incluye cualquier progenie de la célula hospedadora sujeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, dicha progenie se incluye cuando se usa el término "célula hospedadora".

Una célula transfectada puede hacer referencia a una célula hospedadora en la cual (o en un ancestro de la cual) se ha introducido una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN), tal como una molécula de ADN que incluye un elemento promotor de Zscan4. El proceso de transfectar o transfección puede hacer referencia al proceso de introducir un ácido nucleico en una célula o tejido. La transfección se puede lograr mediante uno cualquiera de varios métodos, tales como, pero sin limitación, transfección mediada por liposomas, electroporación e inyección. La transfección de una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico recombinante se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica. La transfección puede incluir la transfección mediada por liposomas, electroporación, inyección o cualquier otra técnica adecuada para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula.

Vectores víricos

En algunas realizaciones, los vectores usados en los métodos de la presente divulgación son vectores víricos. En la técnica se conocen bien varios vectores víricos y se describen en el presente documento.

Los paramixovirus pueden usarse en los métodos de la presente divulgación. Un vector de paramixovirus puede incluir, sin limitación, un vector (o portador) que deriva del paramixovirus y que se utiliza para la transferencia de genes, tal como un polinucleótido Zscan4, a las células hospedadoras, tales como células humanas. El vector de paramixovirus puede ser una ribonucleoproteína (RNP) o una partícula de virus que tenga infectividad. La infectividad puede hacer referencia a la capacidad de un vector de paramixovirus para transferir, a través de su capacidad de adhesión celular y fusión de membranas, un gen contenido en el vector a las células a las que se adhiere el vector. El vector de paramixovirus puede tener capacidad de replicación o puede ser un vector defectuoso sin capacidad de replicación. La capacidad de replicación puede hacer referencia a la capacidad de los vectores de paramixovirus para replicarse y producir partículas de virus infecciosas en células hospedadoras infectadas con los vectores de virus. (Véase, por ejemplo, el documento US 2004/0005296).

Un paramixovirus es un virus de la familia Paramyxoviridae o un derivado de la misma. Los paramixovirus pueden incluir, sin limitación, virus pertenecientes a Paramyxoviridae, tal como el virus Sendai, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus de la peste bovina, virus del moquillo, virus de la parainfluenza del simio (SV5) y virus de la parainfluenza humana de tipo I, II y III. Un vector vírico utilizado en el presente documento puede basarse en un virus del género Paramyxovirus o un derivado del mismo. Un vector vírico utilizado en el presente documento puede basarse en diversos paramixovirus, que incluyen, sin limitación, virus de la parainfluenza humana de tipo I (HPI-V-1), virus de la parainfluenza humana de tipo III (HPIV-3), virus de la parainfluenza bovina de tipo III (BPIV-3), virus Sendai (también conocido como "virus de la parainfluenza de ratón de tipo I") o virus de la parainfluenza de los simios de tipo x (SPIV-10). Estos virus pueden ser cepas de origen natural, de tipo silvestre, mutantes, pasadas en laboratorio o construidas artificialmente. También se pueden usar virus incompletos, tal como, por ejemplo, la partícula DI (Willenbrink W. y Neubert W. J., J. Virol., 1994, 68, 8413-8417) y oligonucleótidos sintetizados como material para generar un vector vírico de paramixovirus utilizado en el presente documento. (Véase, por ejemplo, el documento US 2004/0005296).

Los genes que codifican proteínas de un paramixovirus incluyen los genes NP, P, M, F, HN y L. Los genes NP, P, M, F, HN y L representan los que codifican la proteína de la nucleocápside, fosfoproteína, proteína de la matriz, proteína de fusión, hemaglutinina-neuraminidasa y proteína grande, respectivamente. El gen NP también puede indicarse como gen N. Las proteínas de paramixovirus mencionadas anteriormente son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los números de acceso de cada gen del virus Sendai, por ejemplo, clasificados como un Respirovirus de Paramyxoviridae en la base de datos de secuencias de nucleótidos, son M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046 y X17218 para el gen NP; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007 y X17008 para el gen P; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584 y X53056 para el gen M; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 y X02131 para el gen F; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808 y X56131 para el gen HN; y D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587 y X58886 para el gen L. (Véase, por ejemplo, el documento US 2004/0005296). Obsérvese que los vectores basados en paramixovirus, tales como los vectores basados en el virus Sendai, utilizados en el presente documento pueden incluir modificaciones, tales como delecciones de proteínas víricas endógenas.

Los vectores víricos basados en paramixovirus son una expresión útil de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Dado que los vectores de paramixovirus no son patógenos en seres humanos, se puede sugerir que se utilicen, preferentemente, en ensayos clínicos de terapia génica humana en vista de la seguridad. Es un obstáculo importante en la transferencia de genes de alta eficiencia que, en la mayoría de los casos, el ADN introducido debe transportarse

al núcleo o la membrana nuclear debe eliminarse para la expresión de un gen exógeno a través del ADN plasmídico o similar. En el caso del virus Sendai, sin embargo, la expresión de un gen exógeno es impulsada tanto por la tubulina celular como por su ARN polimerasa (proteína L) en el citoplasma cuando los virus se replican. Esto sugiere que el virus Sendai no interacciona con los cromosomas de las células hospedadoras, lo que evita riesgos tales como la cancerización y la inmortalización de las células. Adicionalmente, se sabe que el virus Sendai es patógeno en roedores en los que causa neumonía, pero no en seres humanos, lo que está respaldado por estudios que muestran que la administración intranasal del virus Sendai de tipo silvestre no daña a los primates no humanos (Hurwitz J. L. *et al.*, Vaccine, 1997, 15, 533-540). Estas características sugieren que el vector del virus Sendai se puede utilizar en terapia humana y, además, apoyan la noción de que los vectores de virus Sendai pueden ser una herramienta prometedora, en particular para su uso en el contacto de una célula humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una célula humana. (Véase, por ejemplo, el documento US 2004/0005296). Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el vector vírico es un vector del virus Sendai. En algunas realizaciones, el vector de Sendai es un vector de Sendai sensible a la temperatura. Por ejemplo, el vector de Sendai sensible a la temperatura TS15 es funcional a 35 °C, pero puede inactivarse cuando se cultiva a 37 °C (véase, por ejemplo, Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(34):14234-14239). Ejemplos de otros vectores de Sendai sensibles a la temperatura incluyen, sin limitación, los vectores de Sendai TS7 y TS13 S, que son funcionales a 32 °C, 35 °C y 37 °C; pero pueden inactivarse cuando se cultivan a 38 °C o 39 °C (véase, por ejemplo, Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(34):14234-14239). También puede usarse cualquier otro vector de Sendai variante conocido en la técnica para expresar una Zscan4 de la presente divulgación.

Adicionalmente, los vectores de retrovirus (por ejemplo, vectores basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV)) también se pueden usar en el presente documento (véase, por ejemplo, Takahashi *et al.*, Cell 126:663-666, 2006; Takahashi *et al.*, Cell 31:861-872, 2007; Okita *et al.*, Nature 313-317, 2007; Park *et al.*, Nature 451:141-146; la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0047263). Los estudios que utilizan vectores basados en lentivirus (Brambrink *et al.*, Cell Stem Cell 2:151-159, 2008; Wernig *et al.*, Nat Biotechnol 26:916-924, 2008; Stadtfeld *et al.*, Science 322: 945-949, 2008) demostraron la ventaja de estos vectores por ser capaces de infectar células tanto las que están en división como las que no están en división, mejorando así la tasa de transducción celular. Además, los lentivirus se pueden pseudotipar para expandir el tropismo viral. Por ejemplo, la pseudotipificación con glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVg) permite la infección de una amplia gama de tipos de células (Lai *et al.*, J Assist Reprod Genet 28(4):291-301, 2011). Los lentivirus también permiten la expresión tanto constitutiva como inducible de las proteínas. Los ejemplos de sistemas de expresión en lentivirus inducible por fármacos se describen en Hockmeyer *et al.* (Cell Stem Cell 3:346-353, 2008) y Wernig *et al.* (Nat Biotechnol 26:916-924, 2008).

Los lentivirus incluyen, aunque sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana (tal como VIH-1 y VIH-2), el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la anemia infecciosa equina y el virus de la inmunodeficiencia de los simios. Otros retrovirus incluyen, aunque sin limitación, el virus linfotrópico T humano, el virus linfotrópico T de simio, el virus de la leucemia murina, el virus de la leucemia bovina y el virus de la leucemia felina. Los métodos para generar vectores de retrovirus y lentivirus y sus usos se han descrito bien en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 7.211.247; 6.979.568; 7.198.784; 6.783.977; y 4.980.289).

Los vectores víricos no integrantes, tales como vectores de adenovirus, también se han utilizado para administrar a las células moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas. Por ejemplo, los vectores de adenovirus, que permanecen en forma episomal en las células, se han utilizado con éxito para administrar proteínas a fibroblastos de ratón y células hepáticas (Stadtfeld *et al.*, Science 322: 945-949, 2008).

En algunas realizaciones, se usan vectores que contienen las regiones promotora y potenciadora de SV40 o la repetición terminal larga (MTR) del virus del sarcoma de Rous y la señal de poliadenilación y de corte y empalme de SV40 están disponibles fácilmente (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-6; Gorman *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6777-81). En algunas realizaciones, el vector de expresión es un vector vírico, tal como un vector adenovírico, un virus adenoasociado (AAV), tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.797.368 (Carter *et al.*) y en McLaughlin *et al.* (J. Virol. 62: 1963-73, 1988) y AAV de tipo 4 (Chiorini *et al.* J. Virol. 71: 6823-33, 1997) y AAV de tipo 5 (Chiorini *et al.* J. Virol. 73:1309-19, 1999), o un vector retroviral (tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus de la necrosis del bazo y vectores procedentes de retrovirus, tales como el virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del sarcoma mieloproliferativo y virus de tumor mamario). También se pueden utilizar otros sistemas de transfección viral, incluido el virus Vaccinia (Moss *et al.*, 1987, Annu. Rev. Immunol. 5:305-24), el virus del papiloma bovino (Rasmussen *et al.*, 1987, Methods Enzymol. 139: 642-54) o miembros del grupo del virus del herpes, tal como el virus de Epstein-Barr (Margolske *et al.*, 1988, Mol. Cell. Biol. 8:2837-47). Además, los vectores pueden contener marcadores seleccionables de antibióticos (tal como neomicina, higromicina o ácido micofenólico) para permitir la selección de células transfectadas que exhiben expresión estable a largo plazo de los vectores (y, por tanto, el ácido nucleico de Zscan4).

Los vectores pueden mantenerse en las células como entidades episomales que se replican libremente mediante el uso de elementos reguladores de virus, tales como el virus del papiloma (Sarver *et al.*, 1981, Mol. Cell. Biol. 1:486) o de Epstein-Barr (Sugden *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5:410). Como alternativa, también se pueden producir líneas celulares que tienen integrado el vector en el ADN genómico. Ambos tipos de líneas celulares producen el producto

génico de forma continua. También se pueden producir líneas celulares que han amplificado el número de copias del vector (y, por tanto, del ADNc también) para crear líneas celulares que pueden producir niveles altos del producto génico.

5 Vectores plasmídicos

En algunos casos, es deseable utilizar vectores no víricos, tal como para evitar la integración en el genoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, los polinucleótidos que codifican Zscan4 pueden administrarse a una célula humana usando uno o más vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se mantienen episómicamente y generalmente exhiben una corta duración de expresión génica (Lai *et al.*, J Assist Reprod Genet 28(4):291-301, 2011). Como un ejemplo, Okita *et al.* (Science 322:949-953, 2008) describen el uso del plásmido pCX, que contiene un promotor CAG, para la expresión de proteínas en células somáticas.

Los vectores plasmídicos episomales son una opción adicional para introducir polinucleótidos que codifican Zscan4 en una célula humana. Los vectores plasmídicos episomales son capaces de replicarse de forma autónoma como elementos extracromosómicos y, por tanto, exhiben una expresión génica prolongada en las células diana. Se ha utilizado un vector plasmídico episomal derivado del virus de Epstein Barr (oriP/EBNA1) para expresar proteínas en células somáticas humanas (Yu *et al.*, Science 324:797-801, 2009).

La selección de un vector apropiado está dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Los vectores de expresión generalmente contienen un origen de replicación, un promotor y opcionalmente incluyen genes específicos para permitir la selección fenotípica de las células transformadas (por ejemplo, un casete de resistencia a antibióticos). En general, el vector de expresión incluirá un promotor. El promotor puede ser inducible o constitutivo. El promotor también puede ser específico de tejido. Los ejemplos de promotores incluyen el promotor CAG, el promotor de timidina quinasa (TK), metalotioneína I, poliedro, enolasa específica de neuronas, tirosina hidroxilasa, beta-actina, el promotor temprano inmediato de CMV u otros promotores. Opcionalmente, también se incluye un elemento potenciador y generalmente se puede ubicar en cualquier parte del vector y aún así tener un efecto potenciador de la expresión génica.

Los vectores plasmídicos se pueden introducir en células humanas usando cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, el vector se administra a una célula mediante transfección utilizando un lípido de polímero catiónico. En ejemplos particulares, el reactivo de transfección es LIPOFECTAMINE™ o un reactivo similar. En otros ejemplos, la administración se logra utilizando la tecnología de transfección de nucleofección (Amaxa, Colonia, Alemania). Esta tecnología se basa en una técnica de electroporación que utiliza el dispositivo de administración NUCLEOFECTOR™ para introducir ADN directamente en el núcleo de la célula hospedadora (Lakshminpathy *et al.*, Stem Cells 22:531-543, 2004). En otro ejemplo más, el reactivo de transfección incluye poli-P-aminoésteres.

La transferencia de ADN a células humanas o de otros mamíferos es una técnica convencional. Por ejemplo, se puede introducir una secuencia de ácido nucleico de Zscan4 aislada (por ejemplo, como ADN desnudo o como parte de un vector de expresión) en las células receptoras, por ejemplo mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham y vander Eb, 1973, Virology 52: 466) o fosfato de estroncio (Brash *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:2013), electroporación (Neumann *et al.*, 1982, EMBO J. 1:841), lipofección (Felgner *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413), DEAE dextrano (McCuthan *et al.*, 1968, J. Natl. Cancer Inst. 41: 351), microinyección (Mueller *et al.*, 1978, Cell 15: 579), fusión de protoplastos (Schafner, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163-7), o pistolas de granúlos (Klein *et al.*, 1987, Nature 327:70).

Estrategias de escisión

Puede ser deseable la escisión de polinucleótidos exógenos de los sitios de integración genómica. Se han descrito previamente dos métodos basados en la escisión, recombinación CreloxP y transposición piggyBac. Soldner *et al.* (Cell 136:964-977, 2009) describieron el uso del sistema Cre-lox. Esta estrategia incluía colocar un sitio loxP en el 3'LTR de un vector de lentivirus que contenía un promotor mínimo de CMV inducible por Dox para impulsar la expresión de los factores de reprogramación. Durante la replicación proviral, loxP se duplicó en el 5' LTR, lo que dio como resultado la integración genómica de los factores de reprogramación flanqueados por dos sitios loxP. La expresión transitoria de Cre-recombinasa dio como resultado la escisión de los factores de reprogramación de flox.

El transposón piggyBac es capaz de escindirse a sí mismo sin dejar restos de ADN exógeno en el genoma celular (Elick *et al.*, Genetics 98:33-41, 1996; Fraser *et al.*, Insect Mol Biol 5:141-151, 1996). Usando este método, se han producido con éxito más de dos proteínas en células humanas mediante la administración de una construcción policistónica que lleva genes unidos con un péptido enlazador 2A situado entre las repeticiones terminales 5' y 3' del transposón piggyBac. La escisión precisa de los genes de reprogramación integrados se observa tras la expresión de la transposasa (Kaji *et al.*, Nature 458:771-775, 2009; Wang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 105:9290-9295, 2008; Yusa *et al.*, Nat Methods 6:363-369, 2009).

ARNm

Otra estrategia para introducir Zscan4 en células humanas es mediante la administración de ARNm sintéticos que codifican Zscan4. Se ha demostrado que una proteína específica se puede producir de manera eficiente mediante la transfección de ARNm sintético que codifica la proteína en las células (Warren *et al.*, Cell Stem Cell 7(5):618-630, 2010). En el estudio de Warren *et al.*, el ARNm se modificó para superar las respuestas antiviricas innatas. La transfección de los ARNm se llevó a cabo repetidamente, una vez al día durante algunas semanas para compensar la naturaleza transitoria de este método, porque los ARNm se degradaron rápidamente en las células. Esta característica particular puede ser ventajosa para Zscan4, cuya expresión se requiere solo por un corto tiempo (por ejemplo, del orden de horas y días) para lograr los efectos deseados (es decir, prolongar los telómeros y aumentar la estabilidad del genoma). En determinadas realizaciones, los ARNm sintéticos que codifican Zscan4 se encapsulan en una envoltura vírica. Preferentemente, la cubierta de la envoltura viral contiene proteínas de la envoltura que reconocen los receptores de la superficie celular y, como tal, aumentan la eficiencia de la administración de los ARNm de Zscan4 sintéticos en las células. En determinadas realizaciones, los ARNm sintéticos que codifican Zscan4 se encapsulan en nanopartículas o liposomas recubiertos con proteínas de la envoltura vírica. Se puede usar cualquier envoltura vírica adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, la envoltura vírica es una envoltura del virus Sendai. Los métodos de encapsulación de polinucleótidos, tales como los ARNm sintéticos, en las envolturas virales o las proteínas de la envoltura vírica son bien conocidos en la técnica.

Células que incluyen polinucleótidos Zscan4

También se proporcionan en el presente documento células aisladas que contienen una molécula de ácido nucleico de Zscan4 o un vector que contiene Zscan4 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. El origen de la célula humana puede ser de cualquier especie adecuada. La célula humana puede incluir cualquier tipo de célula humana descrita en el presente documento.

Polipéptidos Zscan4

En determinadas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 es un polipéptido Zscan4. Un polipéptido puede hacer referencia a un polímero en el que los monómeros son restos de aminoácidos que se unen mediante enlaces amida. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, puede usarse o bien el isómero óptico L o bien el isómero óptico D, prefiriéndose los isómeros L. Los términos "polipéptido" o "proteína" tienen por objeto abarcar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término "polipéptido" está destinado específicamente a cubrir proteínas de origen natural, así como las que se producen de forma recombinante o sintética.

Se conocen en la técnica varios polipéptidos Zscan4 y se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento. Un experto en la técnica apreciará que los diversos polipéptidos Zscan4 descritos en el presente documento que retienen la actividad de Zscan4, tal como la capacidad para aumentar la longitud de los telómeros y/o la estabilidad del genoma en una célula, pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan polipéptidos Zscan4 de ejemplo. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Zscan4a de ratón se expone en la SEQ ID NO: 11, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Zscan4b de ratón se expone en la SEQ ID NO: 12, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Zscan4c de ratón se expone en la SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Zscan4d de ratón se expone en la SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos del polipéptido Zscan4e de ratón se expone en la SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido Zscan4f de ratón se expone en la SEQ ID NO: 16. Además, la secuencia de aminoácidos del polipéptido ZSCAN4 humano se expone en la SEQ ID NO: 17.

Las secuencias de aminoácidos de Zscan4 de varias otras especies están disponibles públicamente, incluyendo Zscan4 de perro (números de acceso de GenBank XP.sub.--541370.2 y XP.sub.--853650.1; SEQ ID NO: 18); Zscan4 de vaca (número de acceso de GenBank XP.sub.--001789302.1; SEQ ID NO: 19); Zscan4 de caballo (número de acceso de GenBank XP.sub.--001493994.1; SEQ ID NO: 20); Zscan4 de gorila (número de acceso de UniProt A1YEQ9; SEQ ID NO: 31); Zscan4 de bonobo (secuencia de nucleótidos del número de acceso de UniProt A1YFX5; SEQ ID NO: 32); Zscan4 de orangután de Borneo (número de acceso de UniProt A2T7G6; SEQ ID NO: 33), Zscan4 de orangután de Sumatra (número de acceso de UniProt H2P0E3; SEQ ID NO: 34); Zscan4 de panda (número de acceso de UniProt G1LE29; SEQ ID NO: 35); Zscan4 de cerdo (número de acceso de UniProt F1SCQ2; SEQ ID NO: 36); Zscan4 de gibón de mejillas blancas del norte (número de acceso de UniProt G1RJD4; SEQ ID NO: 37); Zscan4 de Macaco Rhesus (número de acceso de UniProt F7GH55; SEQ ID NO: 38); Zscan4 de conejillo de indias (número de acceso de UniProt H0V5E8; SEQ ID NO: 39); y de ardilla de tierra de trece líneas (número de acceso de UniProt I3N7T3; SEQ ID NO: 40).

En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido ZSCAN4 humano, o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido Zscan4 de ratón o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido Zscan4a, un polipéptido Zscan4b, un polipéptido Zscan4c, un polipéptido Zscan4d, un polipéptido Zscan4e o un polipéptido Zscan4f. En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido Zscan4 de perro, o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido Zscan4 de vaca, o un homólogo u ortólogo del mismo.

En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido Zscan4 de caballo, o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11-20 y 31-40.

En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 es un polipéptido ZSCAN4 humano u homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido Zscan4 incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

Un experto en la técnica puede preparar fácilmente fragmentos y variantes de un polipéptido Zscan4 usando técnicas moleculares. Un fragmento de polipéptido puede hacer referencia a una porción de un polipéptido que exhibe al menos un epítipo útil. La expresión "fragmentos funcionales de un polipéptido" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que retienen una actividad del polipéptido, tal como un Zscan4. Los fragmentos biológicamente funcionales, por ejemplo, pueden variar en tamaño desde un fragmento de polipéptido tan pequeño como un epítipo capaz de unir una molécula de anticuerpo a un polipéptido grande capaz de participar en la inducción o programación característica de cambios fenotípicos dentro de una célula, incluyendo afectar a la proliferación o diferenciación celular. Un epítipo es una región de un polipéptido capaz de unirse a una inmunoglobulina generada en respuesta al contacto con un antígeno. Por lo tanto, los péptidos más pequeños que contienen la actividad biológica de Zscan4, o variantes conservadoras de Zscan4, por tanto, se incluyen como útiles. En algunas realizaciones, un fragmento de un polipéptido Zscan4 incluye al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450 o al menos 500 aminoácidos consecutivos del polipéptido Zscan4. En algunas realizaciones, un fragmento de Zscan4 es un fragmento que confiere una función de Zscan4 cuando se transfiere a una célula de interés, tales como, pero sin limitación, aumentar la estabilidad del genoma y/o aumentar la longitud de los telómeros.

Las modificaciones menores de las secuencias de aminoácidos primarias del polipéptido Zscan4 pueden dar como resultado péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido homólogo no modificado descrito en el presente documento. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser espontáneas. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento.

Un experto en la técnica puede producir fácilmente proteínas de fusión, que incluyen un polipéptido Zscan4 y un segundo polipéptido de interés. Opcionalmente, se puede incluir un enlazador entre el polipéptido Zscan4 y el segundo polipéptido de interés. Las proteínas de fusión incluyen, aunque sin limitación, un polipéptido que incluye un polipéptido Zscan4 y una proteína marcadora. En algunas realizaciones, la proteína marcadora puede usarse para identificar o purificar un polipéptido Zscan4. Las proteínas de fusión de ejemplo incluyen, aunque sin limitación, proteína fluorescente verde, seis restos de histidina, o myc y un polipéptido Zscan4.

Un experto en la técnica apreciará que tales variantes, fragmentos y fusiones de Zscan4 útiles para los métodos desvelados son aquellos que retienen la actividad de Zscan4 (tal como la capacidad para aumentar la estabilidad del genoma y aumentar la longitud de los telómeros o ambos en una célula humana).

Varios aspectos de la presente divulgación se refieren a polipéptidos sustancialmente purificados. Un polipéptido sustancialmente purificado puede hacer referencia a un polipéptido que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está naturalmente asociado. En una realización, el polipéptido está al menos un 50 %, por ejemplo, al menos un 80 % libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está naturalmente asociado. En otra realización, el polipéptido está al menos en un 90 % libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está naturalmente asociado. En otra realización más, el polipéptido está al menos en un 95 % libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está naturalmente asociado.

Los polipéptidos de la presente divulgación, tales como polipéptidos Zscan4, también puede incluir sustituciones conservadoras de los aminoácidos que componen el polipéptido. Las sustituciones conservadoras reemplazan un aminoácido con otro aminoácido de similar tamaño, hidrofobicidad, etc. A continuación se muestran ejemplos de sustituciones conservadoras:

Resto original	Sustituciones conservadoras
Ala	Ser
Arg	Lys

(continuación)

Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Las variaciones en la secuencia de ADNc que dan como resultado cambios de aminoácidos, ya sean conservadoras o no, deben minimizarse para preservar la identidad funcional e inmunológica de la proteína codificada. Por lo tanto, en varios ejemplos no limitativos, un polipéptido Zscan4 incluye como máximo dos, como máximo cinco, como máximo diez, como máximo veinte o como máximo cincuenta sustituciones conservadoras. La identidad inmunológica de la proteína puede evaluarse determinando si es reconocida por un anticuerpo; una variante que es reconocida por tal anticuerpo está conservada inmunológicamente. Cualquier variante de secuencia de ADNc introducirá, preferentemente no más de veinte y, preferentemente, menos de diez sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos Zscan4 de la presente divulgación están encapsulados en una envoltura vírica. Preferentemente, la cubierta de la envoltura vírica contiene proteínas de la envoltura que reconocen los receptores de la superficie celular y, como tales, aumentan la eficiencia de la administración del polipéptido Zscan4 en las células. En determinadas realizaciones, los polipéptidos Zscan4 se encapsulan en nanopartículas o liposomas recubiertos con proteínas de la envoltura vírica. Se puede usar cualquier envoltura vírica adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, la envoltura vírica es una envoltura del virus Sendai. Los métodos para encapsular polipéptidos en envolturas víricas o proteínas de la envoltura vírica son bien conocidos en la técnica.

Células que incluyen polipéptidos Zscan4

En el presente documento también se proporcionan células aisladas que contienen un polipéptido Zscan4 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. El origen de la célula humana puede ser de cualquier especie adecuada. La célula humana puede incluir cualquier tipo de célula humana descrita en el presente documento.

Composiciones, vectores y células que incluyen una Zscan4 modificada

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína Zscan4 modificada, donde la proteína ha sido modificada para que la actividad de la proteína sea regulable (es decir, inducible o reprimible). Por ejemplo, la proteína Zscan4 puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio de unión a ligando o receptor inducible. Puede usarse cualquier dominio de unión a ligando y/o receptor inducible conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el dominio de unión a ligando y/o receptor inducible puede incluir, sin limitación, un receptor de estrógenos (ER); un receptor de estrógenos mutante que es sensible al tamoxifeno o su metabolito 4-hidroxi-tamoxifeno (4OHT), tal como ERT o ERT2; un receptor de glucocorticoides (GR) que es un receptor de glucocorticoides que es sensible a la mifepristona (MIFEPREX); un dominio de unión a ligando regulable por fármacos; y un receptor inducible por esteroides, tal como un receptor inducible por ecdisona.

En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente divulgación codifican una proteína de fusión, en las que la proteína de fusión incluye una proteína Zscan4 fusionada con una proteína ERT2. ERT2 es una versión mutada del dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos humano. ERT2 no se une a su ligando natural (17 β -estradiol) en concentraciones fisiológicas, pero es muy sensible a concentraciones nanomolares de tamoxifeno o su metabolito 4-hidroxi-tamoxifeno (4OHT) (Feil *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 237(3):752-757, 1997). Una proteína de fusión puede hacer referencia a una proteína que contiene al menos una porción de dos proteínas diferentes (heterólogas). En algunos ejemplos, tales proteínas se generan mediante la expresión de una secuencia de ácido nucleico diseñada a partir de secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una porción de dos proteínas diferentes (heterólogas). Para crear una proteína de fusión, las secuencias de ácido nucleico deben estar en el mismo marco de lectura y no contener codones de terminación internos.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es una ZSCAN4 humana, Zscan4c de ratón, Zscan4d de ratón o Zscan4f de ratón, o un fragmento funcional o variante de los mismos. La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, puede incluir cualquier polinucleótido Zscan4 u homólogo, fragmento o variante del mismo descrito en el presente documento. Los fragmentos funcionales y variantes de Zscan4 incluyen, por ejemplo, cualquier fragmento o variante de Zscan4 que conserve una o más actividades biológicas de Zscan4, tal como la capacidad de aumentar la pluripotencia de una célula madre, estimular la estabilidad genómica o aumentar la longitud de los telómeros.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, puede incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 y 21-30. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polinucleótido Zscan4 de ratón o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polinucleótido ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polinucleótido Zscan4a, un polinucleótido Zscan4b, un polinucleótido Zscan4c, un polinucleótido Zscan4d, un polinucleótido Zscan4e o un polinucleótido Zscan4f. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 y 21-30.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polinucleótido ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la porción Zscan4 de una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión-Zscan4, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, incluye una secuencia enlazadora entre Zscan4 y la secuencia del dominio de unión a ligando y/o receptor inducible, tal como la secuencia de codificación de ERT2. Los enlazadores son bien conocidos en la técnica y la selección de un enlazador apropiado está dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Un enlazador puede hacer referencia a uno o más nucleótidos o aminoácidos que sirven como espaciador entre dos moléculas, tal como entre dos moléculas de ácido nucleico o dos péptidos (tal como en una proteína de fusión). En algunas realizaciones, un enlazador es de 1 a 100 aminoácidos, tal como de 1 a 50 o de 5 a 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene al menos 2 aminoácidos (aa), al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50 o al menos 100 aa, tal como de 2 a 50 o de 2 a 10 aa. En algunas realizaciones, el enlazador incluye la secuencia de aminoácidos Ala-Ser.

También se proporcionan vectores que incluyen una Zscan4 modificada, tal como Zscan4-ERT2, que codifica la molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento. Se contempla cualquier vector de expresión adecuado, tal como un vector de expresión (plásmido) (por ejemplo, pPyCAG-BstXI-IP) o un vector vírico (por ejemplo, un paramixovirus, tal como un vector de virus Sendai, un adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus o retrovirus). Se conocen en la técnica numerosos vectores de expresión y vectores víricos y la selección de un vector apropiado está dentro de las capacidades de un experto en la técnica.

También se proporcionan en el presente documento células aisladas que contienen una Zscan4 modificada, tal como una Zscan4-ERT2, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. El origen de la célula humana puede ser de cualquier especie adecuada. La célula humana puede incluir cualquier tipo de célula humana descrita en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan composiciones que incluyen una molécula de ácido nucleico o un vector que codifica una proteína Zscan4 modificada, tal como una proteína de fusión Zscan4-ERT2. Las composiciones pueden incluir además un vehículo o diluyente, tal como un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En el presente documento se proporcionan además proteínas Zscan4 modificadas, tales como proteínas de fusión Zscan4-ERT2, codificadas por las moléculas de ácido nucleico y los vectores descritos en el presente documento.

También se proporcionan en el presente documento proteínas Zscan4 modificadas recombinantes, tales como

proteínas de fusión Zscan4-ERT2. En algunas realizaciones, la proteína Zscan4 modificada recombinante, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es ZSCAN4 humano, Zscan4c de ratón, Zscan4d de ratón o Zscan4f de ratón, o un fragmento funcional o variante de los mismos. La porción Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión recombinante Zscan4-ERT2, puede incluir cualquier polipéptido Zscan4, homólogo, ortólogo, fragmento o variante descritos en el presente documento. Los fragmentos funcionales y variantes de Zscan4 incluyen, por ejemplo, cualquier fragmento o variante de Zscan4 que conserve una o más actividades biológicas de Zscan4, tal como la capacidad de aumentar la estabilidad genómica o aumentar la longitud de los telómeros.

En algunas realizaciones, la porción de la proteína Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polipéptido Zscan4 de ratón o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción de la proteína Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polipéptido ZSCAN4 humano o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción de la proteína Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polipéptido Zscan4a, un polipéptido Zscan4b, un polipéptido Zscan4c, un polipéptido Zscan4d, un polipéptido Zscan4e o un polipéptido Zscan4f. En algunas realizaciones, la porción de la proteína Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11-20 y 31-40.

En algunas realizaciones, la porción de la proteína Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, es un polipéptido ZSCAN4 humano u homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción de la proteína Zscan4 de la proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2, incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

Un experto en la técnica puede preparar fácilmente fragmentos y variantes de una proteína Zscan4 usando técnicas moleculares. En algunas realizaciones, un fragmento de una proteína Zscan4 incluye al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450 o al menos 500 aminoácidos consecutivos del polipéptido Zscan4. En una realización adicional, un fragmento de Zscan4 es un fragmento que confiere una función de Zscan4, tales como, pero sin limitación, aumentar la estabilidad del genoma y/o aumentar la longitud de los telómeros.

En el presente documento también se proporcionan composiciones que incluyen una proteína Zscan4 modificada, tal como la proteína de fusión Zscan4-ERT2. Las composiciones pueden incluir además un vehículo o diluyente, tal como un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina.

Composiciones, vectores y células que incluyen Zscan4-ΔC

También se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína Zscan4 con un truncamiento en C-terminal (denominado en el presente documento Zscan4-ΔC). La Zscan4 truncada en el extremo C-terminal incluye una delección de al menos un dominio de dedo de cinc. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la proteína Zscan4-ΔC tiene una delección de uno, dos, tres o cuatro dominios de dedo de cinc.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC es una ZSCAN4 humana truncada en el extremo C-terminal, Zscan4c de ratón, Zscan4d de ratón o Zscan4f de ratón. En algunas realizaciones, la proteína Zscan4-ΔC es ZSCAN4 humana o Zscan4c de ratón con una delección de los cuatro dominios de dedos de cinc. La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC puede contener un truncamiento en C-terminal de cualquier polinucleótido Zscan4 descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC puede incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID No: 1-10 y 21-30. En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC es un polinucleótido Zscan4a de ratón o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC es un polinucleótido ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC es un polinucleótido Zscan4a, un polinucleótido Zscan4b, un polinucleótido Zscan4c, un polinucleótido Zscan4d, un polinucleótido Zscan4e o un polinucleótido Zscan4f. En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 y 21-30.

- En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC es un polinucleótido ZSCAN4 humano o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción Zscan4 de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Zscan4-ΔC incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.
- Las secuencias de ácido nucleico Zscan4-ΔC contempladas en el presente documento incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayor parte de los cuales se especifican mediante más de un codón. Por tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degeneradas siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido Zscan4-ΔC codificado por la secuencia de nucleótidos no cambie funcionalmente.
- También se proporcionan vectores que incluyen una molécula de ácido nucleico que codifica Zscan4-ΔC desvelada en el presente documento. Se contempla cualquier vector de expresión adecuado, tal como un vector de expresión (plásmido) (por ejemplo, pPyCAG-BstXI-IP) o un vector vírico (por ejemplo, un paramixovirus, tal como un vector de virus Sendai, un adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus o retrovirus). Se conocen en la técnica numerosos vectores de expresión y vectores víricos y la selección de un vector apropiado está dentro de las capacidades de un experto en la técnica.
- También se proporcionan en el presente documento células aisladas que contienen una molécula de ácido nucleico de Zscan4-ΔC o un vector como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. El origen de la célula humana puede ser de cualquier especie adecuada. La célula humana puede incluir cualquier tipo de célula humana descrita en el presente documento.
- En el presente documento también se proporcionan composiciones que incluyen una molécula de ácido nucleico o un vector que codifica una proteína Zscan4ΔC. Las composiciones pueden incluir además un vehículo o diluyente, tal como un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- En el presente documento se proporcionan además proteínas Zscan4-ΔC codificadas por las moléculas de ácido nucleico y los vectores descritos en el presente documento.
- En el presente documento también se proporcionan proteínas Zscan4-ΔC recombinantes. En algunas realizaciones, la proteína Zscan4-ΔC recombinante es una ZSCAN4 humana truncada en el extremo C-terminal, Zscan4c de ratón, Zscan4d de ratón o Zscan4f de ratón. La porción Zscan4 de una proteína Zscan4-ΔC recombinante puede incluir cualquier polipéptido Zscan4, homólogo, ortólogo, fragmento o variante descritos en el presente documento.
- En algunas realizaciones, la porción de proteína Zscan4 de la proteína Zscan4-ΔC recombinante es un polipéptido Zscan4a de ratón o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, una porción de proteína Zscan4 de la proteína Zscan4-ΔC recombinante es un polipéptido ZSCAN4 humano, o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción de proteína Zscan4 de la proteína Zscan4-ΔC recombinante es un polipéptido Zscan4a, un polipéptido Zscan4b, un polipéptido Zscan4c, un polipéptido Zscan4d, un polipéptido Zscan4e o un polipéptido Zscan4f. En algunas realizaciones, la porción de proteína Zscan4 de la proteína Zscan4-ΔC recombinante incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11-20 y 31-40.
- En algunas realizaciones, una porción de proteína Zscan4 de la proteína Zscan4-ΔC recombinante es un polipéptido ZSCAN4 humano o un homólogo u ortólogo del mismo. En algunas realizaciones, la porción de proteína Zscan4 de la proteína Zscan4-ΔC recombinante incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.
- En el presente documento se proporcionan además células aisladas que incluyen una proteína Zscan4-ΔC desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, las células son células humanas. El origen de la célula humana puede ser de cualquier especie adecuada. La célula humana puede incluir cualquier tipo de célula humana descrita en el presente documento.
- En el presente documento también se proporcionan composiciones que incluyen una proteína Zscan4-ΔC. Las composiciones pueden incluir además un vehículo o diluyente, tal como un vehículo o diluyente farmacéuticamente

aceptable, por ejemplo, solución salina.

Métodos para introducir el polipéptido Zscan4 en células humanas

Es posible introducir polipéptidos Zscan4 administrando directamente las respectivas proteínas a las células, tales como células humanas. La administración de proteínas se puede conseguir usando, por ejemplo, electroporación, microinyección, lípidos catiónicos o nanopartículas de acuerdo con métodos estándar. Como alternativa, las proteínas se pueden modificar mediante fusión con un péptido que penetra en la célula (PPC) para facilitar la entrada de la proteína en la célula. El uso de PPC y nanopartículas se trata con mayor detalle en el presente documento.

Péptidos que penetran en las células (PPC)

Los PPC son una familia de polipéptidos que facilitan la transducción de proteínas, ácidos nucleicos u otros compuestos a través de las membranas de una manera independiente del receptor (Wadia y Dowdy, Curr. Protein Pept. Sci. 4(2):97-104, 2003). Normalmente, las PPC son secuencias policatiónicas cortas que pueden facilitar la captación celular de compuestos a los que están unidos en los endosomas de las células. Los ejemplos de PPC incluyen marcadores de poli-arginina y dominios de transducción de proteínas. Puede usarse cualquier dominio de transducción de proteínas conocido en la técnica. Los ejemplos de dominios de transducción de proteínas adecuados incluyen, sin limitación, Tat de VIH, Vpr de VIH, Vp22 de VIH, homeodominios (HD) de proteínas que contienen HD y dominios de transducción de proteínas sintéticas.

La capacidad de ciertos péptidos para administrar proteínas o ácidos nucleicos a las células se describió originalmente para la proteína Tat codificada por el VIH, que se demostró que atraviesa las membranas e inicia la transcripción. Luego se descubrió que la porción de la proteína Tat que se requería para la transducción de la proteína era solo un polipéptido de 11 aminoácidos, conocido como el péptido Tat. Cuando se fusiona con otras proteínas, se ha demostrado que el péptido Tat libera estas proteínas, de tamaño variable de 15 a 120 kDa, en las células en el cultivo de tejidos (Frankel y Pabo, Cell 55 (6): 1189-93, 1988; Green y Loewenstein, J. Gen. Microbiol. 134(3):849-55, 1988; Vives *et al.*, J. Biol. Chem. 272(25):16010-7, 1997; Yoon *et al.*, J. Microbiol. 42(4):328-35, 2004; Cai *et al.*, Eur. J. Pharm. Sci. 27(4):311-9, 2006).

Otros PPC conocidos incluyen PENETRATIN™, un péptido de 16 aminoácidos derivado de la tercera hélice del gen homeobox de *Drosophila antennapedia* (patente de Estados Unidos n.º 5.888.762; Derossi *et al.*, J. Biol. Chem. 269:10444-10450, 1994; Schwarze *et al.*, Trends Pharmacol. Sci. 21:45-48, 2000); transportan, un péptido quimérico de 27 aminoácidos compuesto por 12 aminoácidos del extremo N del neuropéptido galanina y la proteína mastoparín de 14 aminoácidos, conectado a través de una lisina (patente de Estados Unidos n.º 6.821.948; Pooga, FASEB J. 12:67-77, 1998; Hawiger, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:89-94, 1999); péptidos de la proteína VP22 del virus del herpes simple (VHS) tipo 1 (Elliott *et al.*, Cell 88:223-233, 1997); la proteína UL-56 del VHS-2 (publicación de Estados Unidos previa a la concesión n.º 2006/0099677); y la proteína Vpr del VIH-1 (publicación de Estados Unidos previa a la concesión n.º 2005/0287648). Además, También se sabe que varios péptidos artificiales funcionan como PPC, tales como poli-arginina, poli-lisina y otros (véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos previas a la concesión n.º 2006/0106197; 2006/0024331; 2005/0287648; y 2003/0125242; Zhibao *et al.*, Mol. Ther. 2:339-347, 2000; y Laus *et al.* Nature Biotechnol. 18:1269 -1272, 2000).

Zhou *et al.* (Cell Stem Cell 4:381-384, 2009) describen el uso con éxito de marcadores peptídicos de poliarginina. Además, Kim *et al.* (Cell Stem Cell 4:472-476, 2009) describen el uso con éxito del dominio de transducción de la proteína TAT del VIH para administrar proteínas a fibroblastos fetales humanos.

Nanopartículas

Las nanopartículas son vehículos de administración de fármacos de tamaño submicrónico (menos de aproximadamente 1.000 nm) que pueden transportar fármacos encapsulados, tales como agentes bioterapéuticos sintéticos basados en moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, células y ácidos nucleicos para liberación rápida o controlada. Diversas moléculas (por ejemplo, proteínas, péptidos y moléculas de ácido nucleico) pueden encapsularse eficazmente en nanopartículas usando procesos bien conocidos en la técnica. Una molécula encapsulada en una nanopartícula puede hacer referencia a una molécula (tal como un ácido nucleico o proteína Zscan4) que está contenida dentro de la nanopartícula o unida a la superficie de la nanopartícula, o una combinación de las mismas.

En algunos ejemplos, un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una célula humana es encapsulado por una nanopartícula para ayudar en la administración a las células. Las nanopartículas adecuadas para su uso con los métodos desvelados son conocidas en la técnica y se describen brevemente a continuación.

Las nanopartículas para su uso con los métodos aquí descritos pueden ser cualquier tipo de nanopartícula biocompatible, tales como nanopartículas biodegradables, tales como nanopartículas poliméricas, incluyendo, pero sin limitaciones, nanopartículas de poliamida, policarbonato, polialqueno, éteres de polivinilo y éter de celulosa. En algunas realizaciones, las nanopartículas están hechas de materiales biocompatibles y biodegradables. En algunas realizaciones, las nanopartículas incluyen, pero sin limitaciones, nanopartículas que incluyen poli(ácido láctico) o

poli(ácido glicólico) o tanto poli(ácido láctico) como poli(ácido glicólico). En algunas realizaciones, las nanopartículas son nanopartículas de poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA).

Se contemplan otros materiales poliméricos biodegradables para su uso con los métodos descritos en el presente documento, tales como poli(ácido láctico) (PLA) y poliglicólido (PGA). Nanopartículas útiles adicionales incluyen nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables (Vauthier *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. 55: 519-48, 2003).

Varios tipos de nanopartículas biodegradables y biocompatibles, métodos para fabricar tales nanopartículas, incluyendo nanopartículas de PLGA y métodos para encapsular diversos compuestos sintéticos, proteínas y ácidos nucleicos, se han descrito bien en la técnica (véase, por ejemplo, publicación de Estados Unidos n.º 2007/0148074; la publicación de Estados Unidos n.º 20070092575; la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2006/0246139; patente de Estados Unidos n.º 5.753.234; patente de Estados Unidos n.º 7.081.489; y la publicación PCT n.º WO 2006/052285).

Retinoides

En determinadas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 es un retinoide. Un retinoide puede hacer referencia a una clase de compuestos químicos que están relacionados químicamente con la vitamina A. Los retinoides se utilizan en medicina, principalmente debido a la forma en que regulan el crecimiento de las células epiteliales. Los retinoides tienen muchas funciones importantes y diversas en todo el cuerpo, incluidas funciones en la visión, regulación de la proliferación y diferenciación celular, crecimiento de tejido óseo, función inmunitaria y activación de genes supresores de tumores. Los ejemplos de retinoides incluyen, aunque sin limitación, ácido todo-*trans* retinoico (atRA), ácido 9-*cis* retinoico (9-*cis* RA), 13-*cis* RA y vitamina A (retinol).

Se conocen en la técnica varios retinoides y se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento. Los retinoides pueden incluir, sin limitación, ácido todo-*trans*-retinoico, ácido 9-*cis*-retinoico, ácido 13-*cis* retinoico o vitamina A.

Agentes que inducen estrés oxidativo

En determinadas realizaciones, un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 es un agente que induce estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede hacer referencia a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para detoxificar fácilmente los intermedios reactivos o reparar el daño resultante. Las alteraciones en el estado redox normal de los tejidos pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. En algunas realizaciones de los métodos desvelados, el agente que induce estrés oxidativo es peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Se conocen en la técnica varios agentes que inducen estrés oxidativo y se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento.

Aumento de la longitud de los telómeros y la estabilidad del genoma

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para aumentar la longitud de los telómeros y/o aumentar la estabilidad del genoma en una o más células humanas mediante, por ejemplo, poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión (por ejemplo, la expresión de proteínas) de Zscan4 en las una o más células humanas. Como se desvela en el presente documento, un aumento transitorio de la expresión y/o un aumento de la expresión durante un breve período de tiempo (por ejemplo, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 23 horas o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días) es suficiente para aumentar la longitud de los telómeros y/o aumentar la estabilidad del genoma en las células humanas. Además, en algunas realizaciones, la repetición del aumento transitorio de la expresión de Zscan4 en las células humanas potencia los efectos del aumento de la expresión de Zscan4. En determinadas realizaciones, el aumento transitorio de la expresión de Zscan4 se repite cada 4 horas, cada 8 horas, cada 12 horas, cada 16 horas, cada 24 horas, cada 32 horas, cada 40 horas, cada 48 horas, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada mes, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada siete meses, cada ocho meses, cada nueve meses, cada 10 meses, cada 11 meses, todos los años, cada dos años, cada tres años, cada cuatro años, cada cinco años, cada seis años, cada siete años, cada ocho años, cada nueve años, cada 10 años, cada 11 años, cada 12 años, cada 13 años, cada 14 años, cada 15 años, cada 16 años, cada 17 años, cada 18 años, cada 19 años, cada 20 años, cada 21 años, cada 22 años, cada 23 años, cada 24 años, cada 25 años, cada 26 años, cada 27 años, cada 28 años, cada 29 años, cada 30 años, cada 35 años, cada 40 años, cada 45 años o cada 50 años.

El contacto puede hacer referencia a la colocación en asociación física directa; incluyendo tanto en forma sólida como líquida. "Poner en contacto" puede usarse indistintamente con "expuesto". En algunos casos, "poner en contacto" incluye transfectar, tal como la transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula. Los métodos para medir la estabilidad del genoma y la longitud de los telómeros son rutinarios en la técnica y la divulgación no se limita a

métodos particulares. Los ejemplos particulares proporcionados en el presente documento son a modo de ejemplo.

En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros aumenta en las células humanas en contacto con un agente que aumenta la expresión de la proteína Zscan4 en las células humanas, por al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, al menos 2,0 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,15 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,35 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,45 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,55 veces, al menos 3,0 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4,0 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5,0 veces, al menos 5,5 veces, al menos 6,0 veces, al menos 6,5 veces, al menos 7,0 veces, al menos 7,5 veces, al menos 8,0 veces, al menos 8,5 veces, al menos 9,0 veces, al menos 9,5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 300 veces, al menos 400 veces, al menos 500 veces, al menos 600 veces, al menos 700 veces, al menos 800 veces, al menos 900 veces, al menos 1.000 veces, al menos 2.000 veces, al menos 3.000 veces, al menos 4.000 veces, al menos 5.000 veces, al menos 6.000 veces, al menos 7.000 veces, al menos 8.000 veces, al menos 9.000 veces, al menos 10.000 veces, al menos 25.000 veces, al menos 50.000 veces, al menos 75.000 veces, al menos 100.000 veces, al menos 125.000 veces, al menos 150.000 veces, al menos 175.000 veces, al menos 200.000 veces, al menos 225.000 veces, al menos 250.000 veces, al menos 275.000 veces, al menos 300.000 veces, al menos 325.000 veces, al menos 350.000 veces, al menos 375.000 veces, al menos 400.000 veces, al menos 425.000 veces, al menos 450.000 veces, al menos 475.000 veces, al menos 500.000 veces, al menos 525.000 veces, al menos 550.000 veces, al menos 575.000 veces, al menos 600.000 veces, al menos 625.000 veces, al menos 650.000 veces, al menos 675.000 veces, al menos 700.000 veces, al menos 725.000 veces, al menos 750.000 veces, al menos 775.000 veces, al menos 800.000 veces, al menos 825.000 veces, al menos 850.000 veces, al menos 875.000 veces, al menos 900.000 veces, al menos 925.000 veces, al menos 950.000 veces, al menos 975.000 veces o al menos 1.000.000 veces, por ejemplo, en relación con la expresión de la proteína Zscan4 en una célula humana correspondiente que no ha entrado en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica y desvelado en el presente documento para determinar la expresión de la proteína Zscan4 en una célula o para cuantificar el número de proteínas (es decir, la estequiometría proteica) por célula.

En otras realizaciones, los métodos para aumentar la longitud de los telómeros y/o la estabilidad del genoma en una o más células humanas incluyen poner en contacto una o más células humanas con una molécula de ácido nucleico o un vector que codifica una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como una proteína de fusión Zscan4-ERT2. En otras realizaciones, el método incluye poner en contacto la célula humana o la población de células humanas con una proteína Zscan4 modificada de la presente divulgación, tal como una proteína de fusión Zscan4-ERT2.

En otras realizaciones más, los métodos que aumentan la longitud de los telómeros y/o estabilidad del genoma en una o más células humanas incluyen poner en contacto la célula humana o la población de células humanas con una molécula de ácido nucleico o vector que codifica una proteína Zscan4- Δ C desvelada en el presente documento. En otras realizaciones, el método incluye poner en contacto la célula humana o la población de células humanas con una proteína Zscan4 desvelada en el presente documento.

Los métodos para administrar moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas Zscan4-ERT2 o Zscan4- Δ C y Zscan4-ERT2 o Zscan4- Δ C a células humanas son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros aumenta en las células humanas en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 115 %, al menos el 120 %, al menos el 125 %, al menos el 130 %, al menos el 135 %, al menos el 140 %, al menos el 145 %, al menos el 150 %, al menos el 155 % o al menos el 160 %, por ejemplo, en relación con una célula humana que no se ha puesto en contacto con una proteína Zscan4 modificada, tal como una proteína Zscan4-ERT2 o Zscan4- Δ C o un ácido nucleico que codifica una proteína Zscan4 modificada, tal como una proteína Zscan4-ERT2 o Zscan4- Δ C (o en comparación con un valor o intervalo de valores esperados en una célula humana que no ha experimentado una activación frecuente de Zscan4). En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros aumenta en las células humanas al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, al menos 2,0 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,15 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,25 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,35 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,45 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,55 veces, al menos 3,0 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4,0 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5,0 veces, al menos 5,5 veces, al menos 6,0 veces, al menos 6,5 veces, al menos 7,0 veces, al menos 7,5 veces, al menos 8,0 veces, al menos 8,5 veces, al menos 9,0 veces, al menos 9,5 veces o al menos 10 veces, por ejemplo, en relación con una célula humana que no se ha puesto en contacto con una proteína Zscan4 modificada, tal como una proteína Zscan4-ERT2 o Zscan4- Δ C o un ácido nucleico que codifica una proteína Zscan4 modificada, tal como una proteína Zscan4-ERT2 o Zscan4- Δ C (o en comparación con un valor o intervalo de valores esperados en una célula humana que no ha experimentado una activación frecuente de Zscan4).

En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros se mide en las una o más células humanas que se han puesto en contacto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células humanas. En algunos ejemplos, la longitud de los telómeros aumenta en una célula humana si la longitud de los telómeros es mayor, por ejemplo, en

relación con la longitud de los telómeros en una célula humana que no ha entrado en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. Por ejemplo, la longitud de los telómeros se puede detectar en una célula humana mediante hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), FISH cuantitativa (Q-FISH) o cPCR de telómeros.

5 Estabilidad del genoma

En algunas realizaciones, la estabilidad del genoma aumenta en una o más células humanas que se ponen en contacto con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en las células humanas en al menos el 20 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 %, por ejemplo, en relación con una célula humana correspondiente que no está en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4.

Los métodos para medir la estabilidad del genoma son rutinarios en la técnica y la divulgación no se limita a métodos en particular. Los ejemplos particulares proporcionados en el presente documento son a modo de ejemplo.

En algunos ejemplos, la estabilidad del genoma en una célula humana, tal como una célula humana en contacto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, un agente que aumenta la expresión de Zscan4, tal como un ácido nucleico de Zscan4, proteína Zscan4, Zscan4-ERT o Zscan4-ΔC), se mide realizando un análisis del cariotipo. La estabilidad del genoma aumenta si la presencia de anomalías en el cariotipo (tal como fusiones y fragmentaciones de cromosomas) disminuye o incluso no existe, por ejemplo, en relación con una célula que no ha estado en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. Por ejemplo, el análisis del cariotipo se puede realizar en células humanas induciendo detenciones en la metafase, a continuación, preparando extensiones cromosómicas en metafase.

En algunos ejemplos, la estabilidad del genoma en una célula humana, tal como una célula humana en contacto con una proteína Zscan4, Zscan4-ERT o Zscan4-ΔC o ácido nucleico, se mide midiendo el intercambio de cromátidas hermanas (ICH). La estabilidad del genoma aumenta si la presencia de ICH disminuye en relación con un control, tal como una célula madre que no ha sufrido una activación frecuente de Zscan4. Por ejemplo, El ICH se puede medir en una célula madre detectando ICH en una propagación en metafase.

Usos terapéuticos de Zscan4

En el presente documento se desvela que la expresión de Zscan4 aumenta la longitud de los telómeros, aumenta la estabilidad del genoma, corrige anomalías del genoma y/o cromosómicas, protege las células contra el daño del ADN y/o mejora la reparación del ADN. La reparación del ADN puede hacer referencia a un conjunto de procesos mediante los cuales una célula identifica y corrige el daño a las moléculas de ADN que codifican su genoma. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan métodos relacionados con el aumento de la expresión de Zscan4 en células humanas para aumentar la estabilidad del genoma, proteger las células contra el daño del ADN, mejorar la reparación del ADN y aumentar la longitud de los telómeros en las células humanas.

Se proporcionan métodos para tratar sujetos que necesitan terapia con células humanas, tal como un sujeto que tiene células humanas que necesitan el alargamiento de los telómeros o corregir las anomalías de los telómeros y/o cromosómicas. Estos métodos pueden incluir el uso de células humanas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir poner en contacto una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en la célula humana. La expresión aumentada de Zscan4 en las una o más células humanas induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que necesita alargamiento de telómeros. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir poner en contacto una o más células humanas en el sujeto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir aislar una o más células humanas, poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas y administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto. La expresión aumentada de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas.

También se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros y/o cromosomas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir administrar a un sujeto que lo necesite un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas en el sujeto, donde el aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros y/o la corrección de las anomalías de los telómeros y/o cromosomas en las una o más células humanas que se van a tratar para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros y/o cromosomas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir aislar una o más células humanas de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros y/o cromosomas, poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas y administrar al sujeto las una o más células humanas en

contacto para tratar la anomalía asociada con anomalías en los telómeros y/o cromosomas. El aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros y/o la corrección de anomalías de los telómeros y/o cromosomas en una o más células humanas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir aislar células de médula ósea humana de un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros y/o cromosomas, poner en contacto las células de médula ósea humana con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las células de médula ósea humana e injertar las células de médula ósea humana en contacto en el sujeto para tratar la enfermedad o afección asociada con una anomalía en los telómeros y/o cromosomas. El aumento de la expresión de Zscan4 induce el alargamiento de los telómeros y/o la corrección de anomalías en los telómeros y/o cromosomas en las células de médula ósea humana.

También se proporcionan métodos para aumentar la estabilidad del genoma de una o más células humanas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

También se proporcionan métodos para aumentar la capacidad de reparación del ADN de una o más células humanas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 aumenta la capacidad de reparación del ADN en las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

También se proporcionan métodos para rejuvenecer una o más células humanas y/o prolongar la vida de una o más células humanas. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde el aumento de expresión de Zscan4 rejuvenece y/o extiende la vida de las una o más células humanas en comparación con una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente.

Se desvelan métodos para rejuvenecer un tejido u órgano en un sujeto y/o prolongar la vida de un tejido u órgano en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir administrar a un sujeto que lo necesite un agente que aumente la expresión de Zscan4 en el tejido u órgano, en el que el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece y/o prolonga la vida del tejido u órgano.

Se desvelan métodos para tratar una enfermedad o afección asociada con una o más deficiencias en las células madre tisulares residentes (es decir, células madre tisulares residentes en el órgano y/o tejido del cuerpo humano), tal como distrofia muscular de Duchenne. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir administrar a las células madre tisulares residentes en un sujeto que lo necesite un agente que aumente la expresión de Zscan4 en las células madre tisulares residentes, en el que el aumento de la expresión de Zscan4 evita el deterioro de las células.

Se desvelan métodos para rejuvenecer a un sujeto que lo necesita y/o prolongar la vida de un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir administrar al sujeto un agente que aumenta la expresión de Zscan4, en los que el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece y/o prolonga la vida del sujeto. En determinadas realizaciones, los métodos pueden incluir aislar una o más células humanas del sujeto; poner en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas, donde la expresión aumentada de Zscan4 rejuvenece y/o prolonga la vida de las una o más células humanas y la administración al sujeto de una o más células humanas en contacto para rejuvenecer y/o prolongar la vida del sujeto. En algunas realizaciones, la administración del agente que aumenta la expresión de Zscan4 puede incluir, sin limitación, inyectar el agente en cada órgano y tejido del cuerpo, inyectar el agente en la sangre circulante del sujeto, inyectar el agente en los fluidos cerebrospinales del sujeto, inyectar el agente en el sistema linfático del sujeto, administrar el agente en el tejido pulmonar del sujeto, administrar el agente en los órganos y tejidos digestivos, incluidos esófago, estómago e intestinos del sujeto, inyectar el agente en las venas portales del sujeto y administrar tópicamente el agente en la piel y los anexos de la piel, tales como folículos pilosos y glándulas sudoríparas, para rejuvenecer las células madre tisulares, células progenitoras y/o células diferenciadas terminalmente que residen en el órgano y/o tejido tratado. Se cree que los efectos generales del rejuvenecimiento de las células madre tisulares, células progenitoras y/o células diferenciadas terminalmente en el sujeto tratado son el rejuvenecimiento del sujeto y/o la ralentización del proceso de envejecimiento del sujeto. También se cree que el rejuvenecimiento de las células madre tisulares, las células progenitoras y/o las células diferenciadas terminalmente en el sujeto tratado darán como resultado una prolongación de la vida del sujeto.

Por ejemplo, en el presente documento se desvela un método para tratar a un sujeto con cáncer mediante la administración al sujeto de un polipéptido o polinucleótido Zscan4. Un sujeto puede hacer referencia a organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos. En algunas realizaciones, el método incluye además seleccionar un paciente que necesite dicha terapia, tal como un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer. El cáncer puede hacer referencia a un tumor maligno caracterizado por un crecimiento celular anormal o descontrolado. Otras características asociadas a menudo con el cáncer incluyen metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretorios

a niveles anormales y supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como los ganglios linfáticos, etc. La enfermedad metastásica puede hacer referencia a células cancerosas que han abandonado el sitio del tumor original y migran a otras partes del cuerpo, por ejemplo, a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático.

En algunas realizaciones de los métodos desvelados en el presente documento, al sujeto se le administra un polinucleótido Zscan4. En algunos ejemplos, al sujeto se le administra un vector que incluye un polinucleótido Zscan4. Los métodos para generar y utilizar vectores que expresan Zscan4 se describen en otras secciones de la solicitud. En algunas realizaciones, el polinucleótido Zscan4 (o vector que incluye el polinucleótido Zscan4) se administra directamente a las células tumorales al tejido tumoral, tal como mediante inyección.

En algunas realizaciones, al sujeto se le administra un polipéptido Zscan4. En algunas realizaciones, un polinucleótido Zscan4 y/o polipéptido Zscan4 de la presente divulgación está encapsulado por una nanopartícula para ayudar a la administración del polinucleótido Zscan4, polipéptido Zscan4 y/o agente que induce la expresión de Zscan4 en células tumorales. Las nanopartículas adecuadas para su uso con los métodos desvelados se conocen en la técnica y se describen a continuación.

Las nanopartículas son vehículos de administración de fármacos de tamaño submicrónico (menos de aproximadamente 1.000 nm) que pueden transportar fármacos encapsulados, tales como agentes bioterapéuticos sintéticos basados en moléculas pequeñas, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos para liberación rápida o controlada. Diversas moléculas (por ejemplo, proteínas, péptidos y moléculas de ácido nucleico) pueden encapsularse eficazmente en nanopartículas usando procesos bien conocidos en la técnica.

Las nanopartículas para su uso con las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden ser cualquier tipo de nanopartícula biocompatible, tales como nanopartículas biodegradables, tales como nanopartículas poliméricas, incluyendo, pero sin limitaciones, nanopartículas de poliamida, policarbonato, polialqueno, éteres de polivinilo y éter de celulosa. En algunas realizaciones, las nanopartículas están hechas de materiales biocompatibles y biodegradables. En algunas realizaciones, las nanopartículas incluyen, pero sin limitaciones, nanopartículas que incluyen poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico) o tanto poli(ácido láctico) como poli(ácido glicólico). En algunas realizaciones, las nanopartículas son nanopartículas de poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA).

PLGA es un biomaterial aprobado por la FDA que se ha utilizado en suturas reabsorbibles e implantes biodegradables. Las nanopartículas de PLGA también se han utilizado en sistemas de administración de fármacos para diversos fármacos a través de numerosas vías de administración, que incluyen, pero sin limitación, subcutánea, intravenosa, ocular, oral e intramuscular. La administración puede hacer referencia a proporcionar o dar a un sujeto un agente por cualquier vía eficaz. Una vía de administración ejemplar incluye, pero sin limitación, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa o intraarterial). El PLGA se degrada en sus constituyentes monoméricos, ácido láctico y glicólico, que son subproductos naturales del metabolismo, haciendo que el material sea altamente biocompatible. Además, el PLGA está disponible comercialmente como material de calidad clínica para la síntesis de nanopartículas.

Se contemplan otros materiales poliméricos biodegradables para su uso con las composiciones y métodos descritos en el presente documento, tales como poli(ácido láctico) (PLA) y poliglicólido (PGA). Nanopartículas útiles adicionales incluyen nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables (Vauthier *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. 55: 519-48, 2003). La adsorción oral también se puede mejorar utilizando nanopartículas de poli(láctido-glicólido) recubiertas con quitosano, que es un polímero catiónico mucoadhesivo. La fabricación de tales nanopartículas se describe, por ejemplo, en Takeuchi *et al.* (Adv. Drug Del. Rev. 47: 39-54, 2001).

Entre los polímeros biodegradables que se utilizan actualmente para aplicaciones humanas, se sabe que PLA, PGA y PLGA son generalmente seguros porque se someten a hidrólisis *in vivo* a ácido láctico y ácido glicólico no dañinos. Estos polímeros se han usado para fabricar suturas cuando no se requiere la retirada posquirúrgica y en la formulación de acetato de leuprolida encapsulado, que está aprobada por la FDA para uso humano (Langer y Mose, Science 249:1527, 1990); Gilding y Reed, Polymer 20:1459, 1979; Morris, *et al.*, Vaccine 12:5, 1994). Las velocidades de degradación de estos polímeros varían con la proporción glicólido/láctido y el peso molecular de los mismos. Por tanto, la liberación de la molécula encapsulada (tal como una proteína o un péptido) se puede mantener durante varios meses ajustando el peso molecular y la proporción glicólido/láctido del polímero, así como el tamaño de partícula y el espesor de la cubierta de la formulación de la cápsula (Holland, *et al.*, J. Control. Rel. 4:155, 1986).

En algunas realizaciones, las nanopartículas para su uso con las composiciones y métodos descritos en el presente documento varían en tamaño desde aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 1.000 nm de diámetro. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen menos de aproximadamente 600 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 300 a aproximadamente 450 nm. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que el tamaño de la nanopartícula puede variar dependiendo del método de preparación, aplicación clínica y sustancia de imagen utilizada.

Varios tipos de nanopartículas biodegradables y biocompatibles, métodos para fabricar tales nanopartículas, incluyendo nanopartículas de PLGA y métodos para encapsular diversos compuestos sintéticos, proteínas y ácidos nucleicos, se han descrito bien en la técnica (véase, por ejemplo, publicación de Estados Unidos n.º 2007/0148074; la publicación de Estados Unidos n.º 20070092575; la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2006/0246139; la patente de Estados Unidos N.º 5.753.234; la patente de Estados Unidos N.º 7.081.489; y la publicación PCT n.º WO 2006/052285).

En algunas realizaciones, una o más células humanas se ponen en contacto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en las una o más células humanas. Como se usa en el presente documento, una célula humana que se ha puesto en contacto con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 se denomina "célula Zscan4+ humana". Como se desvela en el presente documento, Las "células Zscan4+" incluyen, sin limitación, células que expresan transitoriamente Zscan4. Es decir, las células Zscan4+ no continúan necesariamente en contacto con Zscan4 o expresan continuamente Zscan4. Como se desvela en algunas realizaciones de la presente divulgación, la acción de Zscan4 es rápida y generalmente solo requiere un contacto breve y transitorio (por ejemplo, del orden de horas a días). En el caso de los telómeros, una vez que los telómeros se prolongan por la acción transitoria de Zscan4, Zscan4 no es necesaria durante mucho tiempo, ya que los telómeros se acortan solo gradualmente. Por consiguiente, las "células Zscan4+ humanas" pueden incluir tanto células que se ponen en contacto con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 y las células que se ponen en contacto con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4, pero ya no están en contacto con el agente. Las células Zscan4+ humanas pueden administrarse a un sujeto que lo necesite para tratar un trastorno o enfermedad.

Los sujetos que pueden tratarse usando los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir sujetos mamíferos, tal como un sujeto veterinario o humano. Los sujetos pueden incluir un feto, recién nacidos, bebés, niños y/o adultos. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar se selecciona, tal como seleccionar un sujeto que se beneficiaría de la terapia con células humanas, particularmente terapia que incluye la administración de células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas.

Los ejemplos de trastornos o enfermedades que pueden beneficiarse de la administración de células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas incluyen aquellos trastornos o enfermedades que están asociados con el acortamiento de los telómeros. Otros ejemplos de trastornos o enfermedades que pueden beneficiarse de la administración de células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas incluyen cáncer, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades en las que la regeneración celular es beneficiosa, tales como lesiones neurológicas o trastornos neurodegenerativos, así como ceguera, sordera, pérdida de dientes, artritis, infartos de miocardio, trasplantes de médula ósea, calvicie, enfermedad de Crohn, diabetes, distrofia muscular y distrofia muscular de Duchenne. En ejemplos particulares, un sujeto que tiene uno o más de estos trastornos se selecciona para los tratamientos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, un sujeto de la presente divulgación que necesita tratamiento con Zscan4 tiene una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros. Una anomalía de los telómeros puede hacer referencia a cualquier cambio en un telómero, tal como acortamiento de los telómeros, interrupción de las repeticiones de ADN telomérico o mutación del ADN de los telómeros, que interrumpe la función de uno o más telómeros. Los ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con anomalías en los telómeros que pueden beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas pueden incluir, sin limitación, enfermedades de acortamiento de los telómeros, síndromes de insuficiencia de la médula ósea, enfermedades de acortamiento de los telómeros relacionadas con la edad y trastornos por envejecimiento prematuro.

Una enfermedad o afección del acortamiento de los telómeros que puede beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas puede incluir, sin limitación, disqueratosis congénita, síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, síndrome de Revesz, síndrome de Coats plus, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática y enfermedades degenerativas, tal como enfermedad de Alzheimer y artrosis.

Una enfermedad o afección de un síndrome de insuficiencia de médula ósea que puede beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas puede incluir, sin limitación, anemia de Fanconi, trombocitopenia amegacariocítica, anemia aplásica, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Pearson, síndrome de Shwachman Diamond, trombocitopenia y síndrome mielodisplásico.

Una enfermedad o afección que es una enfermedad de acortamiento de los telómeros relacionada con la edad o una enfermedad de envejecimiento prematuro que puede beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas puede incluir, sin limitación, síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de Cockayne, xerodermia pigmentosa, telangiectasia ataxia, síndrome de Rothmund Thomson, tricotiodistrofia, síndrome de Juberg-Marsidi y síndrome de Down.

En algunas realizaciones, un sujeto de la presente divulgación tiene una enfermedad o afección asociada con una anomalía cromosómica. Una anomalía cromosómica puede hacer referencia a cualquier anomalía, aberración o mutación en un cromosoma que da como resultado una porción faltante, extra o irregular del ADN cromosómico. En determinadas realizaciones, una anomalía cromosómica puede dar como resultado un número atípico de cromosomas o una anomalía estructural en uno o más cromosomas. En determinadas realizaciones, una anomalía cromosómica puede incluir una anomalía en el cariotipo, tal como aneuploidía. Como se usa en el presente documento, la aneuploidía puede hacer referencia a un número anormal de cromosomas completos o partes de cromosomas, incluyendo, sin limitación, nulisomía cromosómica, monosomía cromosómica, trisomía cromosómica, tetrasomía cromosómica y pentasomía cromosómica. Los ejemplos de aneuploidías humanas incluyen, sin limitación, trisomía 21, trisomía 16, trisomía 18 (síndrome de Edwards), trisomía 13 (síndrome de Patau), monosomía X (síndrome de Turner), aneuploidía XXX, aneuploidía XXY y aneuploidía XYY. Los ejemplos de aneuploidía segmentaria humana incluyen, sin limitación, duplicación 1p36, síndrome dup(17)(p11.2p11.2), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome dup (22) (q11.2q11.2) y síndrome del ojo de gato. En algunas realizaciones, una aneuploidía puede incluir una o más deleciones de cromosomas sexuales o autosómicos, que puede dar como resultado una afección tal como síndrome de Cri-du-chat, Wolf-Hirschhorn, síndrome de Williams-Beuren, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía hereditaria con tendencia a sufrir parálisis por presión, síndrome de Smith-Magenis, neurofibromatosis, síndrome de Alagille, síndrome de velocardiofacial, síndrome de DiGeorge, deficiencia de esteroides sulfatasa, síndrome de Kallmann, microftalmia con defectos cutáneos lineales, hipoplasia suprarrenal, deficiencia de glicerol quinasa, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, factor determinante de testículo en Y, azoospermia (factor a), azoospermia (factor b), azoospermia (factor c) o deleción de 1p36. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas se pueden usar para tratar la aneuploidía o una enfermedad, trastorno o afección asociada con una aneuploidía.

Varios tipos de enfermedades, trastornos y afecciones pueden beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas, incluyendo, sin limitación, deficiencias inmunológicas, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno autoinmunitario, úlceras crónicas, aterosclerosis, cáncer, una lesión neurológica, un trastorno degenerativo, un trastorno neurodegenerativo, cicatrización de heridas, reparación muscular, reparación del músculo cardíaco, reemplazo de cartilago, artritis, artrosis, regeneración dental, ceguera, ceguera relacionada con la edad debido a la disminución proliferativa de las células epiteliales pigmentadas de la retina, sordera, insuficiencia de la médula ósea, trasplante de médula ósea, diabetes, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad genética, una mutación genética y daño en el ADN.

Los cánceres incluyen tumores malignos que se caracterizan por un crecimiento celular anormal o descontrolado. Los cánceres se asocian con frecuencia con la inestabilidad del genoma, anomalías cromosómicas, mutaciones en el ADN y regulación aberrante de los telómeros. Basado en las actividades de Zscan4 descritas en el presente documento, tal como aumentar la estabilidad del genoma y corregir anomalías cromosómicas, Los agentes biológicos de Zscan4 de la presente divulgación (por ejemplo, agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 en células humanas) pueden administrarse para tratar pacientes con cáncer. Como se desvela en el presente documento en el Ejemplo 17, el solicitante ha demostrado que los agentes biológicos de Zscan4 pueden ralentizar la proliferación de células cancerosas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se puede administrar un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas para evitar que las células cancerosas se vuelvan más agresivas debido a la inestabilidad del genoma, anomalías cromosómicas, mutaciones del ADN y/o regulación aberrante de los telómeros. Adicionalmente, las células Zscan4+ humanas, tales como células inmunitarias, se pueden administrar a pacientes con cáncer para mejorar sus capacidades físicas para suprimir el crecimiento de células cancerosas. En otras realizaciones, las células Zscan4+ humanas pueden usarse en pacientes a los que se les ha extirpado un tumor, en los que se utilizan células específicas diferenciadas de las células Zscan4+ para reconstruir los tejidos y/u órganos extraídos. En otras realizaciones, se puede administrar un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas para reprimir el crecimiento (por ejemplo, la proliferación) de las células cancerosas.

Se sabe que los tejidos cancerosos humanos (por ejemplo, tumores) contienen células madre cancerosas, que no están proliferando activamente y son resistentes a la quimioterapia del cáncer (por ejemplo, tratamiento con agentes quimioterapéuticos como cisplatino). Se cree que las células madre cancerosas pueden sobrevivir al tratamiento con quimioterapia y, por lo tanto, provocan la recurrencia del cáncer después del tratamiento. También se cree en ciertas células madre cancerosas se produce expresión endógena de ZSCAN4, de modo que proporciona a las células protección frente a los agentes quimioterapéuticos. Como tal, se cree que los agentes que reducen la expresión endógena de ZSCAN4, tal como ARNip o ARNhc específicos de ZSCAN4, pueden administrarse a pacientes con cáncer que se someten o se someterán a quimioterapia para reducir o eliminar la resistencia a uno o más agentes quimioterapéuticos en las células madre cancerosas, mejorando así la capacidad de respuesta a uno o más agentes quimioterapéuticos en el paciente.

Los ejemplos de cánceres que pueden beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas proporcionado en el presente documento incluyen, pero sin limitaciones, cánceres del corazón (por ejemplo, sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma), de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico (escamocelular, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma

bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma); del tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago (carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, leiomioma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosos, hamartoma, leiomioma), del tracto genitourinario (por ejemplo, riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms, nefroblastoma, linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma), de hígado (por ejemplo, hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma), de huesos (por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes), del sistema nervioso (por ejemplo, cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma> pinealoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma)), cánceres ginecológicos (por ejemplo, útero (carcinoma de endometrio), cuello de útero (carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, tumores endometrioides, tumor de Brenner, carcinoma de células claras, carcinoma no clasificado, tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma escamocelular, sarcoma botrioides, rhabdomyosarcoma embrionario, trompas de Falopio (carcinoma)), cánceres hematológicos (por ejemplo, de sangre (leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma maligno)), de piel (por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma escamocelular, sarcoma de Kaposi, moles, nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis) y de glándulas suprarrenales (por ejemplo, neuroblastoma).

En algunas realizaciones, se selecciona un paciente con una enfermedad autoinmunitaria para el tratamiento. Una enfermedad autoinmunitaria puede hacer referencia a una enfermedad resultante de una respuesta inmunitaria aberrante, tal como la producción de anticuerpos o linfocitos T citotóxicos específicos para un autoantígeno o las propias células o tejidos de un sujeto. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser el resultado de una respuesta inmunitaria hiperactiva del cuerpo contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo. En algunos ejemplos, la enfermedad autoinmunitaria está restringida a ciertos órganos (por ejemplo, en la tiroiditis) o puede implicar un tejido particular en diferentes lugares (por ejemplo, enfermedad de Goodpasture, que puede afectar a la membrana basal tanto en el pulmón como en el riñón). Por consiguiente, en algunas realizaciones, las células Zscan4+ humanas, tales como células madre hematopoyéticas y/o células inmunitarias, y/o un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas, pueden usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, corrigiendo el sistema inmunológico de un paciente con una enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias de ejemplo que pueden beneficiarse de las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitaciones, artritis reumatoide, oligoartritis juvenil, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por adyuvantes, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), atrofia gástrica autoinmunitaria, pénfigo vulgar, psoriasis, vitiligo, diabetes tipo 1, diabetes no obesa, miastenia grave, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, colangitis esclerosante, sialadenitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, anemia hemolítica autoinmunitaria y anemia perniciosa.

En algunas realizaciones, el sujeto seleccionado es aquel que ha sufrido una lesión neurológica o padece un trastorno neurodegenerativo. Una lesión neurológica puede hacer referencia a un traumatismo en el sistema nervioso (tal como el cerebro o la médula espinal o neuronas concretas), que afecta negativamente al movimiento y/o la memoria del paciente que sufre la lesión. Por ejemplo, estos pacientes pueden sufrir disartria (un trastorno motor del habla), hemiparesia o hemiplejía. Las lesiones neurológicas pueden ser el resultado de un traumatismo en el sistema nervioso (tal como en el cerebro o la médula espinal o neuronas concretas), que afecta negativamente al movimiento y/o la memoria del paciente que sufre la lesión. Dichos traumatismos pueden estar causados por un agente infeccioso (por ejemplo, una bacteria o un virus), una toxina, una lesión debida a una caída u otro tipo de accidente, o un trastorno genético o por otras razones desconocidas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las células Zscan4+ humanas, tal como células madre hematopoyéticas, células madre neuronales, células madre mesenquimatosas y/o células inmunitarias y/o un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas, pueden usarse para tratar una lesión neurológica en un sujeto, rejuveneciendo las células madre tisulares en el sistema nervioso de un paciente que ha sufrido una lesión neurológica, donde el rejuvenecimiento de las células madre de tisulares en el sistema nervioso producen neuronas y células gliales, reparando así defectos en el sistema nervioso. En algunas realizaciones, el paciente puede haber sufrido una lesión neurológica, tal como una lesión cerebral o de la

médula espinal resultante de un accidente, tal como un accidente automovilístico o de buceo, o por un derrame cerebral.

Una enfermedad neurodegenerativa es una afección en la que se pierden células del cerebro y la médula espinal. Las enfermedades neurodegenerativas son el resultado del deterioro de las neuronas o de su vaina de mielina que, con el tiempo, provocan disfunción y discapacidades. Las afecciones resultantes pueden causar problemas con el movimiento (tal como ataxia) y con la memoria (tal como demencia). Por consiguiente, en algunas realizaciones, las células Zscan4+ humanas, tal como células madre hematopoyéticas, células madre neuronales, células madre mesenquimatosas y/o células inmunitarias y/o un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas, pueden usarse para tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, rejuveneciendo las células madre tisulares en el sistema nervioso de un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa, donde el rejuvenecimiento de las células madre de tisulares en el sistema nervioso producen neuronas y células gliales, reparando así defectos en el sistema nervioso. En algunas realizaciones, las células humanas y/o el agente Zscan4+ rejuvenecen el sistema nervioso del sujeto e invierten las condiciones degenerativas de la enfermedad. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas Las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitaciones: adrenoleucodistrofia (ALD), alcoholismo, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig), ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten (también conocida como enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, parálisis cerebral, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, insomnio letal familiar, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, neuroborreliosis, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar tipo 3), atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, narcolepsia, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, degeneración combinada subaguda de la médula espinal secundaria a anemia perniciosa, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten (también conocida como enfermedad de Batten), ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, tabes dorsal, encefalopatía tóxica.

Las células Zscan4+ humanas se pueden obtener o generar usando los métodos descritos en el presente documento. En la técnica se conocen métodos para administrar células Zscan4+ humanas a sujetos mamíferos. Por ejemplo, las células Zscan4+ humanas administradas a un sujeto que necesita dicha terapia mediante inyección, tal como administración subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa o intraarterial. En algunas realizaciones, las células Zscan4+ se administran directamente en el área que necesita tratamiento, tal como a un órgano o tejido canceroso, o en el cerebro o la médula espinal. En algunas realizaciones, las células Zscan4+ humanas se administran de forma independiente, en presencia de un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como encapsulado en un polímero adecuado) o en presencia de otros agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, a un sujeto se le administran al menos 20.000 células Zscan4+ humanas, tal como al menos 50.000, al menos 100.000, al menos 500.000, al menos 1.000.000, o al menos 2.000.000 de células Zscan4+ humanas.

En algunos aspectos, los métodos de la presente divulgación implican el uso de una cantidad terapéutica de un agente que aumenta la expresión de Zscan4. Una cantidad terapéutica de un agente puede hacer referencia a la cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el propósito pretendido. Por ejemplo, una cantidad terapéutica de células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una célula humana para tratar una enfermedad o afección asociada con una anomalía de los telómeros es una cantidad suficiente para reducir la enfermedad o afección o uno o más síntomas de la enfermedad o afección. En algún ejemplo, una cantidad terapéutica puede no tratar la enfermedad o afección o los síntomas de la enfermedad o afección al 100 %. Sin embargo, una disminución de cualquier característica o síntoma conocido de la enfermedad o afección, tal como una disminución de al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 % o más, puede ser terapéutica. La cantidad terapéutica de un agente terapéutico dado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y/o la edad del sujeto para recibir el agente terapéutico y la finalidad de la administración. La cantidad terapéutica en cada caso individual puede determinarla empíricamente un experto en la técnica sin experimentación indebida de acuerdo con métodos establecidos en la técnica.

En algunos aspectos, los métodos de la presente divulgación implican el uso de un agente farmacéutico. Un agente farmacéutico puede hacer referencia a un compuesto químico, molécula pequeña u otra composición, tal como una célula Zscan4+ humana, capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto o una célula. La "incubación" incluye una cantidad de tiempo suficiente para que un fármaco interactúe con una célula. "Poner en contacto" incluye incubar un fármaco en forma sólida o líquida con una célula.

Los vehículos de uso farmacéuticamente aceptables en la presente divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de las proteínas Zscan4, moléculas

de ácido nucleico de Zscan4, retinoides, agentes que inducen estrés oxidativo y células desveladas en el presente documento. En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales por lo general comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, polvo, pildora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

En un ejemplo, se encapsulan células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas en una membrana polimérica semipermeable y la membrana polimérica se trasplanta a un sitio de tejido de un sujeto hospedador. Tales métodos pueden lograr una administración local crónica a largo plazo de una sustancia terapéutica con la capacidad de regular la liberación de la sustancia. Véase la patente de Estados Unidos N.º 5.573.528 para la descripción de la encapsulación de compuestos y células. En una realización, las células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas se encapsulan dentro de una membrana polimérica. A continuación, la membrana polimérica encapsulada se trasplanta a un sitio de tejido de un sujeto hospedador. En una realización, el sitio del tejido es el sistema nervioso central, tal como el cerebro o la médula espinal.

La membrana polimérica semipermeable puede ser sintética o natural. Los ejemplos de polímero que se pueden usar incluyen poliétersulfona (PES), cloruro de poliácilonitrilo-co-vinilo (P[AN/VC], poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares. La administración de células Zscan4+ humanas encapsuladas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas dentro de una membrana polimérica puede evitar el rechazo del huésped y la respuesta inmunitaria a las células, y los problemas asociados con el rechazo y la inflamación. Además, las células contenidas dentro de la membrana polimérica están protegidas por la pared del polímero (es decir, las paredes de las fibras individuales, fibrillas, películas, pulverizaciones, gotículas, partículas, etc.) de la vigilancia inmunológica manteniendo la viabilidad celular y permitiendo el transporte de moléculas, nutrientes y productos metabólicos a través de las paredes del polímero. El injerto de células encapsuladas en polímero ha sido desarrollado por Aebischer *et al.*, 1991, Transplant, 111:269-275, y se ha utilizado con éxito tanto con primates no humanos como con humanos (Aebischer *et al.*, 1994, Transplant, 58:1275-1277). Véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.110.902.

En una realización, las células Zscan4+ humanas se encapsulan incluyéndolas primero en una matriz de colágeno, agarosa o PVA (alcohol polivinílico). Posteriormente, las células incluidas se inyectan en fibras huecas hechas de polipropileno de un copolímero 60:40 de poliácilonitrilo:cloruro de polivinilo. Las fibras se cortan en pedazos y se sellan en los extremos para su implantación. En una realización, las células encapsuladas tienen de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 2.000.000 células Zscan4+ humanas.

En algunos ejemplos, las células Zscan4+ humanas son de origen exógeno. Las células exógenas pueden referirse a células obtenidas de fuentes distintas del sujeto en el que se implantan para el tratamiento. Las células exógenas pueden ser de otros organismos de la misma especie (tales como células derivadas de ser humano para su uso en un paciente humano). Las células exógenas también pueden provenir de fuentes heterólogas, es decir, de una especie distinta del sujeto que se va a tratar terapéuticamente (tal como células de ratón para su uso en un ser humano). Las células Zscan4+ humanas también se pueden tomar de una fuente isogénica, es decir, del sujeto que va a recibir las células. Después de recolectar las células del sujeto, las células se pueden modificar genéticamente (por ejemplo, se introduce un ácido nucleico que codifica Zscan4) o seleccionar/enriquecer para células Zscan4+ humanas, después se reimplantan de nuevo en el sujeto. Dado que las células son isogénicas, no se espera una respuesta inmunitaria.

En un aspecto, las células Zscan4+ humanas se han inmortalizado. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células pueden inmortalizarse de forma condicional (de modo que las células crecen bien en cultivo de tejidos a temperaturas reducidas, al tiempo que se interrumpe la división una vez implantadas en un paciente y mantenidas a 37 °C) o inmortalizadas constitutivamente (por ejemplo, transfección con construcciones que expresan antígeno T grande, o inmortalización por virus de Epstein Barr) por métodos bien conocidos en la técnica. Otro método para administrar células Zscan4+ humanas en un sujeto hospedador es trasplantar directamente las células en el área objetivo de un sitio de tejido. Una vez trasplantadas, estas células sobreviven, migran y se integran sin problemas en el tejido hospedador. En una realización, las células Zscan4+ humanas se trasplantan directamente en el sistema nervioso del sujeto hospedador, tal como un sistema nervioso en desarrollo o un sistema nervioso que ha sufrido un traumatismo o en un sujeto que tiene un trastorno neurológico. Cuando se trasplantan a un sistema nervioso en desarrollo, las células Zscan4+ humanas participarán en procesos de desarrollo normal y responderán a las señales de desarrollo del hospedador. Las células precursoras neurales trasplantadas migrarán a lo largo de rutas migratorias establecidas, se propagarán ampliamente en áreas diseminadas del sistema nervioso y se diferenciarán de una manera temporal y regionalmente apropiada en la progenie de los linajes neuronal y glial en concierto con el programa de desarrollo del hospedador. La célula Zscan4+ humana trasplantada es capaz de entremezclarse de forma no disruptiva con las células precursoras neurales del hospedador y con las células diferenciadas. Las células trasplantadas pueden

reemplazar a poblaciones de células gliales o neuronales deficientes específicas, restaurar funciones defectuosas y pueden expresar genes extraños en una amplia distribución.

Las células Zscan4+ humanas también se pueden trasplantar a un sistema nervioso desarrollado. Las células precursoras neurales trasplantadas pueden formar un injerto estable, migrar dentro del sistema nervioso del hospedador, entremezclarse e interactuar con los progenitores neurales del hospedador y las células diferenciadas. Pueden reemplazar a poblaciones de células gliales o neuronales deficientes específicas, restaurar funciones deficientes y activar procesos regenerativos y curativos en el sistema nervioso del hospedador. En una realización, el injerto estable es un injerto establecido en el sistema nervioso central o el sistema nervioso periférico.

Pueden usarse métodos similares para trasplantar directamente células Zscan4+ humanas en cualquier región que necesite terapia con células humanas. Dichas células pueden ser indiferenciadas o diferenciadas en el tipo de célula deseado *in vitro* (a continuación, se administran a un sujeto que lo necesite). Por ejemplo, cuando se desea la regeneración de órganos, por ejemplo, para el reemplazo de órganos o tejidos extraídos para tratar el cáncer o perdidos por otras razones (por ejemplo, dientes, cabello, células del oído o de los ojos, piel o músculo). En una realización, las células Zscan4+ humanas se trasplantan directamente al corazón, por ejemplo, para regenerar tejido cardíaco o células perdidas por infarto de miocardio. En una realización, las células Zscan4+ humanas se trasplantan directamente al páncreas, por ejemplo para regenerar células en un sujeto con diabetes. En una realización, las células Zscan4+ humanas se trasplantan directamente al hueso o se administran sistémicamente, por ejemplo, para regenerar células de la médula ósea en un sujeto que tiene cáncer.

La dosis y el régimen terapéuticos más apropiados para el tratamiento del paciente variarán con las enfermedades o afecciones que se van a tratar y según el peso del paciente y otros parámetros. Un protocolo de dosificación y tratamiento eficaces puede determinarse por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y, a continuación, aumentando la dosis mientras se monitorizan los efectos, así como variando sistemáticamente el régimen de dosificación. A la hora de determinar una dosificación óptima para un sujeto dado, el clínico puede tener en cuenta numerosos factores. Los factores incluyen el tamaño del paciente, la edad del paciente, el estado general del paciente, la enfermedad en particular que se está tratando, la gravedad de la enfermedad, la presencia de otros fármacos en el paciente y similares. Las dosis de ensayo se elegirían después de considerar los resultados de los estudios en animales y la literatura clínica.

Por consiguiente, se administran a los sujetos células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas para reducir o mejorar los síntomas asociados con un trastorno en particular, particularmente aquellos asociados con anomalías de los telómeros. Los criterios de valoración terapéuticos para el tratamiento del cáncer pueden incluir una reducción del tamaño o el volumen de un tumor, reducción de la angiogénesis del tumor o reducción de la metástasis del tumor. Si se ha extirpado el tumor, otro criterio de valoración terapéutico puede ser la regeneración del tejido u órgano extraído. La eficacia del tratamiento del cáncer se puede medir usando métodos en la técnica, por ejemplo, obtener imágenes del tumor o detectar marcadores tumorales u otros indicadores de la presencia del cáncer. Los criterios de valoración terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias pueden incluir una reducción de la respuesta autoinmunitaria. La eficacia del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias se puede medir usando métodos en la técnica, por ejemplo, midiendo los anticuerpos autoinmunitarios, en los que una reducción de dichos anticuerpos en el sujeto tratado indica que la terapia tiene éxito. Los criterios de valoración terapéuticos para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos pueden incluir una reducción de las deficiencias relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, un aumento en las deficiencias motoras, de memoria o de comportamiento. La eficacia del tratamiento de trastornos neurodegenerativos se puede medir utilizando métodos en la técnica, por ejemplo, midiendo el deterioro cognitivo, en los que una reducción de dicho deterioro en el sujeto tratado indica que la terapia tiene éxito. Los criterios de valoración terapéuticos para el tratamiento de lesiones neurológicas pueden incluir una reducción de las deficiencias relacionadas con las lesiones, por ejemplo, un aumento en las deficiencias motoras, de memoria o de comportamiento. La eficacia del tratamiento de lesiones neurológicas se puede medir utilizando métodos en la técnica, por ejemplo, midiendo la movilidad y la flexibilidad, en los que un aumento de tales en el sujeto tratado indica que la terapia tiene éxito. El tratamiento no requiere una eficacia del 100 %. Una reducción de la enfermedad (o síntomas de la misma) de al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente un 50 % o mayor, por ejemplo, en relación con la ausencia de tratamiento con células Zscan4+ humanas y/o un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en células humanas, se considera eficaz.

En algunos ejemplos, las células Zscan4+ humanas se administran a una dosis de aproximadamente 1×10^4 células a aproximadamente 1×10^7 células en un ratón u otro mamífero pequeño, o una dosis de aproximadamente 1×10^4 células a aproximadamente 1×10^{10} células en un ser humano u otro mamífero grande. En una realización específica no limitante, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1×10^6 células. Otros agentes terapéuticos (por ejemplo, compuestos químicos, moléculas pequeñas o péptidos) se pueden administrar a una dosis terapéuticamente eficaz en combinación con las células Zscan4+ humanas (por ejemplo, poco antes o después, o simultáneamente) para lograr un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Puede administrarse una cantidad eficaz de células Zscan4+ humanas en una sola dosis o en varias dosis, por ejemplo diariamente, durante un ciclo de tratamiento. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la cantidad eficaz de células Zscan4+ humanas dependerá del agente aplicado, del sujeto que se está tratando, de la gravedad y el tipo de afección, y la

forma de administración del agente.

Los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también se pueden usar para rejuvenecer la piel, tratar la dermatitis atópica o lesiones cutáneas en un sujeto que lo necesite, mediante, por ejemplo, aplicación de un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en la piel del sujeto.

Los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también se pueden usar para tratar la caída del cabello estimulando el crecimiento del cabello en un sujeto que lo necesite, mediante, por ejemplo, aplicación de un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en el cuero cabelludo del sujeto. Los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también pueden usarse para prevenir o tratar el encanecimiento del cabello en un sujeto que lo necesita aplicando un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en el cuero cabelludo para aumentar la longitud de los telómeros y/o la estabilidad del genoma en las células madre de melanocitos en los folículos pilosos, cuya disfunción provoca canas.

Como se desvela en el presente documento, las células madre del limbo regeneran las córneas y, como tales, se cree que el aumento de la longitud de los telómeros y/o la estabilidad del genoma en las células madre del limbo a través del aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenecería las córneas en un sujeto que lo necesite. El aumento de la expresión de Zscan4 en las córneas también puede usarse para tratar los ojos secos en un sujeto que lo necesite. Por consiguiente, los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también se pueden usar para rejuvenecer las córneas y/o tratar el ojo seco en un sujeto que lo necesite, mediante, por ejemplo, la aplicación de un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 en una córnea del sujeto.

Como se desvela en el presente documento, se sabe que la fibrosis pulmonar idiopática está causada por el acortamiento de los telómeros. Por consiguiente, los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también se pueden usar para tratar la fibrosis pulmonar idiopática en un sujeto que lo necesite, mediante, por ejemplo, la formulación de un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, un polinucleótido Zscan4 de la presente divulgación) de manera que el sujeto pueda inhalarlo para tratar la fibrosis pulmonar idiopática.

Los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también se pueden usar para tratar la aterosclerosis y/o una cardiopatía coronaria en un sujeto que lo necesite, mediante, por ejemplo, la administración de un agente de la presente divulgación al torrente sanguíneo del sujeto de manera que el agente entre en contacto y aumente la longitud de los telómeros y/o la estabilidad del genoma de las células endoteliales vasculares, tratando de ese modo la aterosclerosis y/o una cardiopatía coronaria en el sujeto.

Los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también pueden usarse para proporcionar resistencia a uno o más agentes genotóxicos en una o más células humanas y/o un sujeto que lo necesite, mediante, por ejemplo, la puesta en contacto de una o más células humanas con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, un polinucleótido Zscan4 de la presente divulgación) o administrando tal agente a un sujeto que lo necesite, de manera que el aumento de la expresión de Zscan4 aumenta la resistencia a uno o más agentes genotóxicos en las una o más células humanas o en el sujeto. Ventajosamente, la expresión de Zscan4 se puede utilizar para proporcionar resistencia a cualquier fármaco o agente genotóxico conocido, incluyendo, sin limitación, mitomicina C y cisplatino.

Se sabe que hay regiones en el genoma de las células MPi donde los patrones de metilación del ADN difieren de los de las células madre embrionarias (ME) humanas, que se cree que causan problemas en las células MPi (por ejemplo, véase Ohi, Y *et al.*, Nat Cell Biol. 2011 May; 13(5):541-9). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 mejorarán las células MPi induciendo un patrón de metilación del ADN en células MPi humanas que es más similar al de las células ME humanas. Se cree además que inducir un patrón de metilación de ADN más similar al de una célula ME humana en las células MPi humanas puede hacer que tales células sean más seguras para uso terapéutico. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 pueden usarse para inducir un patrón de metilación de ADN similar al de una célula madre embrionaria humana en una o más células madre pluripotenciales inducidas (MPi) humanas, mediante, por ejemplo, la puesta en contacto de una o más células MPi humanas con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, un polinucleótido Zscan4 de la presente divulgación), de manera que el aumento de la expresión de Zscan4 induce un patrón de metilación del ADN similar al de una célula madre embrionaria humana en una o más células MPi humanas.

Los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 también pueden usarse para rejuvenecer los ovocitos envejecidos y corregir las anomalías en el cariotipo tanto en las células ovocitos como en los ovocitos fertilizados *in vitro*, tales como cigotos o embriones preimplantación entre el estadio unicelular y el estadio de blastocisto para aumentar la tasa de éxito de la fertilización *in vitro* (FIV); para aumentar la tasa de éxito de embarazos saludables a término en, por ejemplo, mujeres mayores; para corregir anomalías en el cariotipo, tal como aneuploidia; y para reducir el riesgo de trastornos del desarrollo, tal como el síndrome de Down. Dichos tratamientos pueden ser de especial utilidad para la fertilización *in vitro* (FIV) y en clínicas de FIV. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 pueden usarse para

rejuvenecer una o más células ovocitos humanos, aumentar la estabilidad del genoma en una o más células ovocitos humanos y/o corregir una o más anomalías en el cariotipo en una o más células ovocitos humanos mediante, por ejemplo, la puesta en contacto de una o más células ovocitos humanos con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, un polinucleótido Zscan4 de la presente divulgación), de forma tal que el aumento de la expresión de Zscan4 rejuvenece una o más células ovocitos humanos, aumenta la estabilidad del genoma en una o más células ovocitos humanos y/o corrige una o más anomalías en el cariotipo en una o más células ovocitos humanos. En algunas realizaciones, las una o más células ovocitos humanos se aíslan de un sujeto antes de ponerse en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. En otras realizaciones, una vez que las una o más células ovocitos humanos han sido tratadas con el agente que aumenta la expresión de Zscan4, las células son sometidas a fertilización *in vitro*.

En otras realizaciones, los agentes de la presente divulgación que aumentan la expresión de Zscan4 pueden usarse para aumentar la estabilidad del genoma y/o corregir una o más anomalías en el cariotipo en uno o más ovocitos humanos fertilizados mediante, por ejemplo, la puesta en contacto de uno o más ovocitos humanos fertilizados con un agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 (por ejemplo, un polinucleótido Zscan4 de la presente divulgación), de manera que el aumento de la expresión de Zscan4 aumenta la estabilidad del genoma y/o corrige las una o más anomalías en el cariotipo en uno o más ovocitos humanos fertilizados. En algunas realizaciones, los uno o más ovocitos humanos fertilizados se fertilizaron mediante fertilización *in vitro* antes de entrar en contacto con el agente que aumenta la expresión de Zscan4. En otras realizaciones, los uno o más ovocitos humanos se aíslan de un sujeto antes de ser fertilizados. En otras realizaciones más, los uno o más ovocitos fertilizados son embriones preimplantación entre el estadio unicelular y el estadio de blastocisto.

En determinadas realizaciones, el agente de la presente divulgación que aumenta la expresión de Zscan4 corrige una o más anomalías en el cariotipo que incluyen, sin limitación, una aneuploidía, tal como trisomía 21 (síndrome de Down), trisomía 16, trisomía 18 (síndrome de Edwards), trisomía 13 (síndrome de Patau), monosomía X (síndrome de Turner), aneuploidía XXX, aneuploidía XXY y aneuploidía XYY; una aneuploidía segmentaria, tal como la duplicación 1p36, síndrome dup(17)(p11.2p11.2), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome dup(22)(q11.2q11.2) y síndrome del ojo de gato; y una afección tal como el síndrome de Cri-du-chat, Wolf-Hirschhorn, síndrome de Williams-Beuren, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía hereditaria con tendencia a sufrir parálisis por presión, síndrome de Smith-Magenis, neurofibromatosis, síndrome de Alagille, síndrome de velocardiofacial, síndrome de DiGeorge, deficiencia de esteroides sulfatasa, síndrome de Kallmann, microftalmia con defectos cutáneos lineales, hipoplasia suprarrenal, deficiencia de glicerol quinasa, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, factor determinante de testículo en Y, azoospermia (factor a), azoospermia (factor b), azoospermia (factor c), delección de andlp36.

Como se desvela en el presente documento, los genes humanos SERPINB4, DNMT3L y DUX4 son genes marcadores, cuya expresión no está regulada por aumento cuando el gen Zscan4 se expresa en células humanas. Como tal, se cree que SERPINB4, DNMT3L y DUX4 se pueden utilizar como marcadores de los efectos de Zscan4 en células humanas. Por consiguiente, en algunas realizaciones se proporcionan métodos para determinar uno o más efectos inducidos por Zscan4 en una o más células humanas, por ejemplo, poniendo en contacto las una o más células humanas con un agente que aumenta la expresión de Zscan4 en una o más células humanas; midiendo los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas; y comparando los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas con los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en una o más células humanas correspondientes que no están en contacto con el agente, donde un aumento en los niveles de expresión de SERPINB4, DNMT3L y/o DUX4 en las una o más células humanas indica la presencia de uno o más efectos inducidos por Zscan4 en las una o más células humanas.

En algunas realizaciones, los sujetos de la presente divulgación son animales no humanos. Animales no humanos pueden hacer referencia a todos los animales que no sean humanos. Un animal no humano incluye, pero sin limitación, un primate no humano, un animal de granja, tal como cerdos, ganado vacuno y aves de corral, un animal de deporte o una mascota, tal como perros, gatos, caballos, hámsteres, roedores, tales como ratones, o un animal de zoológico, tal como leones, tigres u osos. En una realización, el animal no humano es un ratón.

A menos que se explique de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan con un fin descriptivo. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayos de la presente divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características o realizaciones

particulares descritas.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: La expresión de Zscan4 corrige anomalías cromosómicas en células madre embrionarias de ratón

Este ejemplo describe el hallazgo de que la expresión de Zscan4, ya sea por un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4, puede corregir anomalías cromosómicas en células madre embrionarias (ME) de ratón. Este ejemplo también demuestra que los ARNm sintéticos que codifican Zscan4 y el
10 vector de virus Sendai que expresa Zscan4 pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos.

Materiales y métodos

Cultivo celular

15 La línea de células ME de ratón MC1ZE se notificó anteriormente (Amano *et al.*, Nat Commun, 2013;4:1966.). Las células MC1ZE se usaron como células ME de ratón típicas que muestran cariotipos deficientes (es decir, solo aproximadamente el 20 % de las células portan euploidía) debido a cultivos a largo plazo (número de pase 33) y la integración de un gen exógeno. Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % en el medio completo para ME como
20 se ha descrito anteriormente (Amano *et al.*, Nat Commun, 2013;4:1966.): DMEM (Gibco), FBS al 15 % (Atlanta Biologicals), 1.000 U/ml de factor inhibidor de la leucemia (LIF) (ESGRO, Chemicon), piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 mM, GlutaMAX 2 mM, beta-mercaptoetanol 0,1 mM y penicilina/estreptomicina (50 U/50 µg/ml). El medio se cambió diariamente y las células se pasaron cada 2 a 3 días de forma rutinaria.

25 *ARNm sintético*

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifica ZSCAN4 humano o proteína verde
30 fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

Vectores de virus Sendai

35 Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón (SeV18+mZscan4/AF) o ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4" o "SeVhZSCAN4", respectivamente, en el presente documento. Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai, pero el vector expresó una variante de la proteína verde fluorescente, en lugar
40 de Zscan4. Estos vectores de Sendai carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón fusionado a un dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18+mZERT2/ΔF) o ZSCAN4 humano fusionado al dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18+hZERT2/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores
45 se denominan "SeVmZERT2" o "SeVhZERT2", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Además, los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón (SeV18+mZscan4/TS15ΔF) o ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/TS15ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4-TS15" o "SeVhZSCAN4-TS15", respectivamente,
50 en el presente documento. Estos vectores de Sendai son funcionales a 35 °C e inactivos a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34):14234-14239). Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai, pero el vector expresó una variante de la proteína verde fluorescente, en lugar de Zscan4. Este vector se denomina en el presente
55 documento "SeVAG-TS15". Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Análisis del cariotipo

60 El análisis del cariotipo se realizó mediante bandas G como se describe en Amano *et al.*, Nat Commun, 2013;4:1966.

Resultados

65 *Los ARNm sintéticos que codifican ZSCAN4 de ratón o humano corrigen las anomalías cromosómicas en las células madre embrionarias de ratón*

La figura 1A muestra el procedimiento experimental: se sembraron células ME de ratón MC1ZE (en el pase 33) en una placa de 6 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y se transfectaron con 1 μ g de ARNm de GFP sintéticos (control) o 1 μ g de ARNm de ZSCAN4 humano sintéticos usando 5 μ l de Lipofectamine (RNAiMAX: Life Technologies, California, EE. UU.). Además de las células transfectadas con ARNm de GFP, las células no transfectadas también se utilizaron como controles. Las células se pasaron cada 2-3 días, seguido de la transfección con ARNm sintéticos. El cariotipado de las células se llevó a cabo en el pase 33 (3 días después de una única transfección), en el pase 34 (3 días después de tres transfecciones), en el pase 36 (3 días después de 4 transfecciones) y en el pase 40 (3 días después de siete transfecciones).

Como se muestra en la figura 1B, la transfección de células ME de ratón con ARNm sintéticos de ZSCAN4 humano corrigió las anomalías cromosómicas y aumentó el número de células con un cariotipo normal (euploidía). Aunque la transfección única fue suficiente para ver un nivel significativo de corrección, las transfecciones repetidas (por ejemplo, siete veces) aumentaron aún más el número de células con euploidía de alrededor del 20 % al 40 %. Estos resultados indican que la introducción de ARNm de ZSCAN4 humanos en las células puede corregir anomalías en el número de cromosomas.

Los vectores de virus Sendai que expresan ZSCAN4 humano corrigen anomalías cromosómicas en células madre embrionarias de ratón

La figura 2A muestra un resumen del análisis del cariotipo después de tratar células ME de ratón con un vector de virus Sendai que expresa Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano. En una placa de 6 pocillos se sembraron células ME de ratón MC1ZE (en el pase 33 o 34) a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y se trataron con SeVAG (control), SeVmZscan4 o SeVhZSCAN4 a la MDI indicada en la figura 2A. Como control adicional, se utilizaron células MC1ZE sin ningún tratamiento. Después de 3 días, se analizó el cariotipo de las células. Como se muestra en la Figura 2A, el cariotipo de las células ME de ratón se puede mejorar drásticamente al ponerse en contacto con SeVmZscan4 o SeVhZSCAN4. Curiosamente, los resultados muestran que ZSCAN4 humano funcionaba mejor que el Zscan4c de ratón.

La figura 2B muestra un resumen del análisis del cariotipo después de tratar las células ME de ratón MC1ZE con un vector de virus Sendai que expresa una proteína de fusión Zscan4c-ERT2 de ratón o una proteína de fusión ZSCAN4-ERT2 humana. Se sabe que la proteína fusionada con el dominio ERT2 puede activarse por la presencia de tamoxifeno (Tmx) en el medio de cultivo celular. En una placa de 6 pocillos se sembraron células ME de ratón MC1ZE (en el pase 33 o 34) a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y se trataron con SeVmZERT2 o SeVhZERT2 en la MDI indicada en la figura 2B. Como control, se utilizaron células MC1ZE sin ningún tratamiento. Como se muestra en la figura 2B, el tratamiento con SeVmZERT2 o SeVhZERT2 puede corregir anomalías cromosómicas incluso sin Tmx. La adición de Tmx, sin embargo, mejoró aún más la capacidad de SeVmZERT2 y SeVhZERT2 para corregir anomalías cromosómicas. Los resultados también muestran que ZSCAN4 humano funciona mejor que el Zscan4c del ratón: la proteína de fusión, ZSCAN4-ERT2 humana, en presencia de Tmx, aumentó el número de células con euploidía del 15 % al 53 %.

La figura 3 muestra un resumen del análisis del cariotipo después de tratar células ME de ratón MC1ZE con un vector de virus Sendai sensible a la temperatura que expresa Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano. En una placa de 6 pocillos se sembraron células ME de ratón MC1ZE (en el pase 33 o 34) a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y se trataron con SeVAG-TS15 (control), SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15 al MDI indicado en la figura 3. Como control adicional, se utilizaron células MC1ZE sin ningún tratamiento. Después de poner en contacto las células con estos vectores, las células se cultivaron a 35 °C durante tres días (Figura 3A), a 35 °C durante seis días (Figura 3B) y a 35 °C durante tres días, seguido de cultivo a 37 °C durante tres días (Figura 3C). Se observó la corrección de anomalías cromosómicas poniendo en contacto las células con SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15 en las tres condiciones. Sorprendentemente, se descubrió que el ZSCAN4 humano funciona mejor que el Zscan4c de ratón en la corrección de anomalías cromosómicas. Por lo tanto, estos resultados demuestran que incluso en células de ratón, el ZSCAN4 humano produce resultados sorprendentemente superiores sobre Zscan4c de ratón. De hecho, el mejor resultado se obtuvo tratando células con ZSCAN4 humano (es decir, SeVhZSCAN4-TS15) y cultivando células a 35 °C durante tres días, seguido del cultivo a 37 °C durante tres días: el tratamiento aumentó el número de células con euploidía del 19 % al 53 %. En estos experimentos, el cultivo de células tratadas con los vectores de Sendai sensibles a la temperatura a la temperatura permitida de 35 °C durante tres días, seguido de un cultivo a la temperatura de inactivación de 37 °C durante tres días representa la expresión transitoria de Zscan4. Por el contrario, el cultivo de células tratadas con los vectores de Sendai sensibles a la temperatura a la temperatura permitida de 35 °C durante los seis días completos representa una expresión continua de Zscan4. Sobre la base de estas condiciones, los resultados indican que la expresión transitoria de Zscan4 funciona mejor que la expresión continua de Zscan4 para corregir anomalías cromosómicas.

Ejemplo 2: Efectos de los agentes biológicos de Zscan4 en células madre embrionarias de ratón

Se ha demostrado previamente que la expresión forzada de Zscan4c exógeno de ratón a partir de un vector plasmídico integrado en el genoma del ratón induce la expresión de un conjunto único de genes, incluyendo los genes de Tmem92, Stra8 y Zscan4 endógenos (Amano *et al.*, Nat Commun, 2013;4:1966.).

Este ejemplo demuestra que los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) ejercen la misma función en las células madre embrionarias (ME) de ratón.

5

Materiales y métodos

Cultivo celular

- 10 La línea de células madre embrionarias (ME) de ratón MC1 se utilizó previamente como células madre pluripotenciales de ratón típicas para demostrar la función del gen Zscan4c introducido de forma exógena, que se integró en el genoma de ratón (Amano *et al.*, Nat Commun, 2013;4:1966.). Las células MC1 se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % en medio para ME completo, como se ha descrito anteriormente (Amano *et al.*, Nat Commun, 2013;4:1966.): DMEM (Gibco), FBS al 15 % (Atlanta Biologicals), 1.000 U/ml de factor inhibidor de la leucemia (LIF) (ESGRO, Chemicon), piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 mM, GlutaMAX 2 mM, beta-mercaptoetanol 0,1 mM y penicilina/estreptomicina (50 U/50 µg/ml). El medio se cambió diariamente y las células se pasaron cada 2 a 3 días de forma rutinaria.

ARNm sintético

- 20 Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifica ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

Vectores de virus Sendai

- 30 Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón (SeV18+mZscan4/AF) o ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4" o "SeVhZSCAN4", respectivamente, en el presente documento. Como control, se utilizó el mismo Sendai, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Estos vectores de Sendai carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

- Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón fusionado a un dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18+mZERT2/ΔF) o ZSCAN4 humano fusionado al dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18+hZERT2/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZERT2" o "SeVhZERT2", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

- Además, los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón (SeV18+mZscan4/TS15ΔF) o ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/TS15ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4-TS15" o "SeVhZSCAN4-TS15", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai son funcionales a 35 °C e inactivos a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34): 14234-14239). Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai sensible a la temperatura, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Este vector se denomina en el presente documento "SeVAG-TS15". Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Resultados

- La figura 4A muestra los resultados del análisis cRT-PCR, monitorizando los niveles de expresión de los genes Tmem92, Stra8, Actb (control de beta-actina) y Zscan4 endógenos después de la transfección de las células ME de ratón MCI con ARNm sintéticos. En comparación con las células de control transfectadas con ARNm de GFP, los ARNm de ZSCAN4 humanos aumentaron la expresión del gen Zscan4 de ratón endógeno.

- La figura 4B muestra los resultados del análisis cRT-PCR, monitorizando los niveles de expresión de los genes Tmem92, Stra8, Actb (control de beta-actina) y Zscan4 endógenos después de poner en contacto las células ME de ratón MC1 con vectores de virus Sendai que expresan Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano. En comparación con las células de control en contacto con un vector de Sendai vacío (SeVAG), tanto SeVmZscan4 como SeVhZSCAN4 aumentaron la expresión de los genes Tmem92, Stra8 y Zscan4 endógeno. SeVmZERT2 y SeVhZERT2 también funcionan en presencia de Tmx. De manera similar, los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano también funcionaron en las células MC1 (FIG. 4C).

Estos resultados indican que los agentes biológicos de Zscan4, en forma de vectores de Sendai que expresan Zscan4 o ARNm sintéticos de Zscan4, pueden funcionar en células ME de una manera similar al transgén Zscan4 de ratón integrado en el genoma de ratón. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que los agentes biológicos de Zscan4 tienen una ventaja como reactivos para células de ratón y terapéuticos para células humanas, debido a la facilidad de uso y la eliminación de la integración de ADN no deseada en el genoma. Además, en lugar de gastar una gran cantidad de tiempo para diseñar genéticamente las células, los agentes biológicos de Zscan4 solo requieren un procedimiento simple de añadir un agente biológico de Zscan4 al medio de cultivo celular.

Ejemplo 3: Efectos de los agentes biológicos de Zscan4 sobre células madre pluripotenciales inducidas humanas

Los genes SERPINB4, DNMT3L y DUX4 se identifican como genes marcadores que se regulan por aumento cuando el gen Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano se sobreexpresa mediante un sistema de expresión génica basado en transgén.

Este ejemplo demuestra que los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) puede funcionar en células MPi humanas de una manera similar al sistema de sobreexpresión de Zscan4 basado en transgén utilizado en células madre pluripotenciales de ratón. Este ejemplo también demuestra que los ARNm sintéticos que codifican el ZSCAN4 humano y el vector de virus Sendai que expresa ZSCAN4 humano pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos para tratar células madre pluripotenciales humanas.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se cultivaron células madre pluripotenciales inducidas por fibroblastos del prepucio humano (MPih) (System Biosciences, CA, EE.UU.) en fibroblastos embrionarios de ratón (FER) inactivados mitóticamente y medios suplementados con un 20 % de reemplazo de suero de inactivación y 10 ng/ml de bFGF (Life Technologies, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El medio se cambió todos los días y las células se pasaron usando Accutase cada 7 días.

ARNm sintético

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* del ADN molde que codifica Zscan4c de ratón, ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN así como la eficiencia de la traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

Vectores de virus Sendai

Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón (SeV18+mZscan4/AF) o ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4" o "SeVhZSCAN4", respectivamente, en el presente documento. Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Estos vectores de Sendai carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón fusionado a un dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18+mZERT2/ΔF) o ZSCAN4 humano fusionado al dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18+hZERT2/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZERT2" o "SeVhZERT2", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Además, los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón (SeV18+mZscan4/TS15ΔF) o ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/TS15ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4-TS15" o "SeVhZSCAN4-TS15", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai son funcionales a 35 °C e inactivos a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34): 14234-14239). Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai sensible a la temperatura, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Este vector se denomina en el presente documento "SeVAG-TS15". Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Resultados

La figura 5A muestra que los ARNm sintéticos que codifican ZSCAN4 humano pueden inducir la expresión de SERPINB4. La figura 5B muestra que SeVmZscan4, SeVhZSCAN4, SeVmZERT2 (condición Tmx+) y SeVhZERT2 (condición Tmx+) pueden inducir la expresión SERPINB4 y, hasta cierto punto, DNMT3L y DUX4. De manera similar, los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4c de ratón o ZSCAN4 humano pueden inducir la expresión de DNMT3L (Figura 5C).

Estos resultados indican que los agentes biológicos de Zscan4, en forma de vectores de Sendai que expresan Zscan4 o ARNm sintéticos de Zscan4, pueden funcionar en células madre pluripotenciales humanas, por ejemplo, células MPi humanas, dado que Zscan4 induce marcadores (por ejemplo, SERPINB4, DNMT3L y DUX4) para los efectos de Zscan4 en células MPi humanas. Estos marcadores también pueden ser útiles para medir la calidad y la eficacia de los agentes biológicos de Zscan4 (Quality Control [QC]).

Ejemplo 4: Expresión de Zscan4 para mejorar la calidad de las células madre pluripotenciales humanas

Este ejemplo describe el hallazgo de que los agentes biológicos de Zscan4 pueden mejorar la calidad de las células madre pluripotenciales humanas, incluyendo, pero sin limitaciones, células madre embrionarias (ME) humanas y células madre pluripotenciales inducidas (MPi), mediante el uso de agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) para corregir una o más anomalías cromosómicas y corregir uno o más errores epigenéticos. En particular, se muestra que un agente biológico de Zscan4 puede corregir patrones de metilación de ADN erróneos en células MPi humanas mediante la desmetilación transitoria de varias regiones de ADN que son difíciles de desmetilar mediante otros procedimientos. Por ejemplo, hay regiones en el genoma donde los patrones de metilación del ADN son diferentes entre las células MPi humanas y las células ME humanas. Por tanto, es importante corregir estos patrones de metilación de ADN erróneos en células MPi humanas. Se cree que la capacidad de los agentes biológicos de Zscan4 para corregir los problemas de metilación del ADN simplemente exponiendo células MPi humanas a un agente biológico de Zscan4 puede ser una tecnología clave para mejorar la seguridad de las células MPi humanas para usos terapéuticos. La capacidad de los agentes biológicos de Zscan4 para corregir los problemas de metilación del ADN en células MPi humanas también permitirá la mejora de las células MPi humanas existentes.

Ejemplo 5: La expresión de Zscan4 prolonga la vida de las células fibroblastos de disqueratosis humana y prolonga la longitud de los telómeros en las células fibroblastos de disqueratosis congénita humana

Este ejemplo describe el hallazgo de que la expresión de ZSCAN4 humano, ya sea por un ARNm sintético que codifica ZSCAN4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4, induce la prolongación de la vida de las células fibroblastos de disqueratosis congénita humana y también induce el alargamiento de la longitud de los telómeros en las células fibroblastos de disqueratosis congénita humana. Este ejemplo también demuestra que los ARNm sintéticos que codifican el ZSCAN4 humano y el vector de virus Sendai que expresa el ZSCAN4 humano pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células fibroblastos aisladas de un paciente con disqueratosis congénita (DKC: ligada al cromosoma X) se adquirieron en el Depósito de células de Coriell (ID del catálogo AG04646). Según la información del catálogo de Coriell, el donante de células, un varón caucásico de 11 años, está afectado y acude con erupciones cutáneas, anemia, distrofia ungueal y anomalías esofágicas. Los antecedentes familiares son negativos. La biopsia se tomó *ante-mortem* de piel no afectada. El cultivo se inició el 21/2/81 utilizando explantes de tejido troceado. La morfología celular es similar a la de los fibroblastos. El nivel de duplicación de la población (NDP) fue de 5,41 en reposo y el número de pases fue de 5.

Después de recibir las células de DKC del Depósito de células de Coriell, las células se cultivaron durante algunos pases más. Las células se cultivaron en las condiciones recomendadas por el Depósito de células de Coriell: medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle y aminoácidos no esenciales, suplementado con suero bovino fetal al 15 % (no inactivado).

ARNm sintético

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifica ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

Vector de virus Sendai

Un vector de Sendai que expresa ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/ Δ F) fue fabricado a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). En el presente documento, el vector se denomina "SeVhZSCAN4". Este vector de Sendai carece de la proteína F y, por lo tanto, no es transmisible (Inoue *et al.*, J Virol. 77:3238 -3246, 2003). Se usó una MDI (multiplicidad de infección) de 10 para los experimentos.

Análisis de transferencia Southern de los telómeros

Las longitudes de los telómeros de las células se midieron mediante análisis de transferencia Southern utilizando el kit TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche Applied Sciences, Indiana, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Los ARNm sintéticos que codifican el ZSCAN4 humano prolongan la vida de las células fibroblastos de disqueratosis congénita humana

Las células de DKC se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y luego se transfectaron con 1 μ g de ARNm sintéticos usando 5 μ l de Lipofectamine (RNAiMAX: Life Technologies, California, EE. UU.). El medio se cambió al día siguiente. Todas las semanas, las células se pasaron a una proporción de 1:2 y se transfectaron con ARNm sintéticos en presencia de 50 ng/ml de B18R (inhibidor de tipo IIFN: eBiosciences, Inc., California, EE. UU.). Las muestras se prepararon por triplicado. El número de células se contó utilizando el contador de células automatizado Moxi Z (ORFLO Technologies, Idaho, Estados Unidos). Los números de células se convirtieron a NDP (nivel de duplicación de la población), comenzando en el NDP = 0 (normalizado a partir del pase 9, equivalente aproximadamente a un NDP = 9 según la información del Depósito de células de Coriell).

La figura 6 muestra los resultados de los ensayos de crecimiento celular durante 60 días. En experimentos de control, las transfecciones repetidas de ARNm de GFP no cambian los patrones de crecimiento de las células de DKC: después de aproximadamente 20 días en cultivo (aproximadamente un NDP = 2), las células dejan de proliferar y experimentan senescencia celular. Por el contrario, las transfecciones repetidas de los ARNm de ZSCAN4 humano prolongan la vida de las células de DKC y las células continuaron creciendo hasta ~ 40 días (~ NDP = 4). Es importante señalar que el tratamiento con hZSCAN4 no transformó las células en células de tipo tumoral con capacidad de proliferación ilimitada. Estos resultados indican que el tratamiento con hZSCAN4 puede prolongar la vida de las células de pacientes con DKC sin transformar las células en tumores.

Los vectores de virus Sendai que expresan ZSCAN4 humano prolongan la vida de las células fibroblastos de disqueratosis congénita humana

Se sembraron células de DKC en una placa de 6 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y 6 horas más tarde las células se pusieron en contacto con el vector SeVhZSCAN4 a una MDI de 10 durante 24 horas. Como control, se cultivó una segunda muestra de células de DKC de la misma manera, pero sin exposición al vector SeVhZSCAN4. Las células se pasaron cada una o dos semanas. El número de células se contó con el contador de células automatizado Moxi Z (ORFLO Technologies, Idaho, Estados Unidos). Los números de células se convirtieron a NDP (nivel de duplicación de la población), comenzando en el NDP = 0 (normalizado a partir del pase 9, equivalente aproximadamente a un NDP = 9 según la información del Depósito de células de Coriell).

La figura 7A muestra los resultados de los ensayos de crecimiento celular. En experimentos de control, las células de DKC muestran un patrón de crecimiento típico: después de aproximadamente 25 días en cultivo (aproximadamente un NDP = 2), las células dejan de proliferar y experimentan senescencia celular. Por el contrario, las células de DKC en contacto con el vector SeVhZSCAN4 muestran un aumento de la vida de las células. Es importante señalar que el tratamiento con SeVhZSCAN4 no transforma las células en células de tipo tumoral con capacidad de proliferación ilimitada.

La figura 7B muestra las morfologías celulares el día 28. Las células tratadas con SeVhZSCAN4 muestran una morfología mejor que las células de control no tratadas.

Estos resultados indican que el tratamiento con SeVhZSCAN4 puede prolongar la vida de las células de pacientes con DKC sin transformar las células en tumores.

Los ARNm sintéticos que codifican ZSCAN4 humano alargan la longitud de los telómeros en las células fibroblastos de disqueratosis congénita humana

La figura 8A muestra el procedimiento de los experimentos. Se sembraron células de DKC en placas de cultivo de 10 cm a una concentración de 1×10^5 células/placa de cultivo de 10 cm. Las células de cada placa de 10 cm se transfectaron luego con 5 μ g de ARNm sintéticos usando 25 μ l de Lipofectamine (RNAiMAX: Life Technologies,

California, EE. UU.). El medio se cambió al día siguiente. Las células de 1 placa se recolectaron el día 7 y se extrajo el ADN genómico. Las células de otra placa se pasaron en una proporción de 1:2 y, a continuación, se transfectaron con 5 µg de ARNm sintéticos usando 25 µl de Lipofectamine. Las células se recolectaron el día 15 y se extrajo el ADN genómico. A continuación, el ADN genómico se sometió a ensayos de longitud de los telómeros.

La figura 8B muestra los resultados de los ensayos de longitud de los telómeros. Como se ha informado anteriormente (Wong J.M., Collins K. Genes Dev. (2006), 20(20), 2848-2858), la longitud de los telómeros de las células fibroblastos de DKC es más corta que la de las células normales y rápidamente se acorta aún más cuando se cultivan las células de DKC. En experimentos de control, la transfección con ARNm de GFP no cambió los patrones de acortamiento de la longitud de los telómeros de las células de DKC. Por el contrario, la transfección con ARNm de ZSCAN4 humano alargó la longitud de los telómeros de las células de DKC y evitó que las longitudes de los telómeros se acortaran. Estos resultados indican que el acortamiento de la longitud de los telómeros de las células de DKC, una causa principal de los fenotipos de la enfermedad DKC, se puede rescatar tratando las células con ARNm de hZSCAN4.

Ejemplo 6: La expresión de Zscan4 prolonga la vida de las células de síndrome de Werner humano

Los pacientes con SW se caracterizan por la aparición de un envejecimiento prematuro. Las células de los pacientes con SW en cultivo exhiben una mayor tasa de roturas cromosómicas, translocaciones y deleciones. Por lo tanto, los pacientes con SW necesitan un tratamiento que pueda mejorar la estabilidad del genoma y/o cromosómica.

Este ejemplo demuestra que los ARNm sintéticos que codifican Zscan4 pueden prolongar la vida de las células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Werner (SW). Este ejemplo también demuestra que los ARNm sintéticos que codifican el ZSCAN4 humano pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Werner (SW) se adquirieron en el Depósito de células de Coriell (ID de catálogo AG03141). Según la información del catálogo de Coriell, "la donante era una mujer caucásica de 30 años y tenía características de envejecimiento prematuro, piel pigmentada y atrófica, cataratas e hiperlipidemia de tipo V. La biopsia se tomó *ante-mortem* el 20/9/78. El cultivo se inició utilizando explantes de tejido de piel troceado. La morfología celular es similar a la de los fibroblastos. El cariotipo es 46, XX y el 80 % de las células examinadas muestra anomalías cromosómicas aleatorias. Homocigoto para una transición de C a T en el nucleótido 2476 en el gen WRN (2476C> T), que da como resultado un codón de terminación en 748 {Gln748TER (Q748X)}. El nivel de duplicación de la población acumulada (NDP) fue de 17,97 en reposo y el número de pases fue de 11". Después de recibir las células de SW del Depósito de células de Coriell, las células se cultivaron durante algunos pases más. Las células se cultivaron en las condiciones recomendadas por el Depósito de células de Coriell: Medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle Sales de Earle: MEM modificado de Dulbecco, suplementado con suero bovino fetal al 15 % (no inactivado).

ARNm sintético

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifica ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

Resultados

Las células de SW se sembraron en una placas de 6 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y, después, se transfectaron con 1 µg de ARNm sintéticos utilizando 5 µl de Lipofectamine (RNAiMAX: Life Technologies, California, EE.UU.) el día 0. El medio se cambió al día siguiente. Se realizó una segunda transfección con los mismos ARNm el día 3. Dependiendo del crecimiento de las células, las células se pasaron en una proporción de 1:2 cada 1 o 2 semanas. Las muestras se prepararon por triplicado. Los números de células se convirtieron a NDP, comenzando a un NDP de 0 (aproximadamente equivalente a un NDP acumulativo de 19, que está cerca de la senescencia celular según la información del Depósito de células de Coriell).

La figura 9 muestra los resultados de los ensayos de crecimiento celular. Se usaron como control células de SW transfectadas con ARNm de GFP sintéticos. Como se muestra en la figura 9, las células de SW transfectadas con ARNm de GFP sintéticos experimentaron senescencia celular y dejaron de proliferar. Por el contrario, la transfección de células de SW con ARNm de hZSCAN4 sintéticos proporcionó a las células de SW dos NDP más y, por tanto, prolongó la vida de las células de SW (Figura 9). Notablemente, los resultados demuestran que los ARNm de hZSCAN4 sintéticos no proporcionaron un crecimiento celular ilimitado, ya que las células dejaron de proliferar

finalmente. Similar a los resultados con ARNm de hZSCAN4 sintéticos, también se observó una prolongación de la vida de las células de SW en las células que se pusieron en contacto con los vectores de virus Sendai SeVhZSCAN4 o SeVhZSCAN4-TS15 que expresan ZSCAN4 humano. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que el uso de ZSCAN4 como agente biológico terapéutico no parece causar transformación celular y/o cáncer en las células tratadas. Estos resultados indican que el tratamiento con hZSCAN4 puede prolongar la vida de las células en pacientes con SW sin transformar las células en tumores.

Ejemplo 7: Expresión de Zscan4 para tratar el acortamiento de los telómeros en pacientes

La figura 10 ilustra un modo de tratamiento con Zscan4. Este procedimiento es muy similar a los procedimientos de trasplante de médula ósea que se realizan de forma rutinaria en los hospitales para tratar a pacientes con insuficiencia de la médula ósea y leucemia. La médula ósea, que incluye células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimatosas, se aspirará de los pacientes y a continuación se expondrá inmediatamente a Zscan4 (por ejemplo, vector de Sendai portador de ZSCAN4 humano). Esta exposición a Zscan4 será transitoria y durante un corto tiempo. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la expresión de Zscan4 desaparecerá cuando las células de la médula ósea se vuelvan a administrar al paciente. Como alternativa, se pueden utilizar vectores de Sendai sensibles a la temperatura, ya que la expresión de Zscan4 se puede inactivar cambiando la temperatura. Como alternativa, se pueden usar vectores de Sendai portadores de la proteína de fusión hZSCAN4-ERT2, que puede activarse agregando tamoxifeno y desactivarse retirando el tamoxifeno. Como alternativa, se pueden usar ARNm sintéticos tales como hZSCAN4-ARNm, ya que la producción de la proteína ZSCAN4 es transitoria debido a la semivida limitada de los ARNm sintéticos. Las células de la médula ósea rejuvenecidas de este modo con Zscan4 repoblarán la médula ósea y el compartimento hematopoyético del paciente. Conforme a los efectos a largo plazo de este contacto transitorio con Zscan4, y sin desear quedar ligadas a teoría alguna, se cree que este procedimiento se requiere solo una vez o periódicamente después de largos intervalos de tiempo (por ejemplo, muchos años). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que las células de la médula ósea rejuvenecidas con Zscan4 competirán y así reemplazarán a las células de la médula ósea enfermas. Por consiguiente, se cree que la irradiación de la médula ósea para eliminar las células de la médula ósea enfermas, que se realiza durante el trasplante estándar de médula ósea, no sería necesaria.

Ejemplo 8: La expresión de Zscan4 prolonga los telómeros en los fibroblastos humanos

Este ejemplo describe el hallazgo de que la sobreexpresión de Zscan4 induce la prolongación de los telómeros en las células fibroblastos humanas.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Los fibroblastos dérmicos humanos adultos primarios (FDHa) aislados de piel de adulto (~ 30 años de edad) se adquirieron en Life Technologies (n.º de cat. C-013-5C). Los fibroblastos (GM01309) aislados de un paciente con anemia de Fanconi del grupo de complementación A (FANCA) se adquirieron en el Depósito de células de Coriell. Estas células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar: DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con suero bovino fetal al 10 %.

Cuantificación de los telómeros mediante cPCR

La cuantificación de los telómeros mediante cPCR se realizó utilizando los procedimientos descritos anteriormente (Cawthon, R.M. Nucleic Acids Res. 2002 May 15;30(10):e47; y Callicott, RJ *et al.* Comparative Medicine, 2006). Se extrajo ADN genómico de $> 5 \times 10^5$ células fibroblastos utilizando el kit de sangre y tejido DNeasy (Qiagen). La calidad de las muestras de ADN se evaluó utilizando Nanodrop. Para la cPCR se utilizaron muestras de ADN genómico con una proporción de absorbancia A260/280 superior a 1,8 y una proporción de absorbancia A260/230 de alrededor de 2 con objeto de determinar la longitud de los telómeros.

Los cebadores usados para la PCR de los telómeros fueron los siguientes:

tel1b: 5-CGGTTT(GTTTGG)₅GTT-3 (SEQ ID NO:41); y

tel2b: 5-GGCTTG(CCTTAC)₅CCT-3 (SEQ ID NO:42)

Cada cebador se usó a una concentración final de 300 nM.

Los cebadores utilizados para la PCR de genes de copia única fueron los siguientes:

36B4u: 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3' (SEQ ID NO:43); y

36B4d: 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' (SEQ ID NO:44)

El cebador 36B4u se usó a una concentración final de 300 nM y el cebador 36B4d se usó a una concentración final de 500 nM.

La reacción final de 20 µl de cPCR se realizó en un pocillo de una placa de 96 pocillos e incluyó 20 ng de ADN_g, cebadores y verde IX Power SYBR (Applied Biosystems). El programa de ciclos térmicos de PCR de los telómeros para ITel1b/2b PCR fue: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 56 °C durante 1 minuto. El programa de ciclos térmicos para la PCR de los telómeros para la 36B4 PCR fue: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 1 minuto. Se utilizó la máquina StepOne Plus qPCR (Applied Biosystems) para procesar las muestras. Se estableció un nivel de umbral para obtener valores de Ct de la muestra de aproximadamente 20-22. Se utilizó el método delta delta Ct para calcular la proporción relativa de telómero/gen de copia única (proporción relativa de T/S) para la evaluación de la longitud de los telómeros en cada muestra.

Vectores de virus Sendai

Los vectores de Sendai que expresan ZSCAN4 humano (SeV18 + hZSCAN4/ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Este vector de Sendai carece de la proteína F y, por lo tanto, no es transmisible (Inoue *et al.*, J Virol. 77:3238 -3246, 2003).

Resultados

La sobreexpresión de ZSCAN4 humano aumenta rápidamente la longitud de los telómeros en las células fibroblastos humanas adultas normales

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos adultos (FDHa) en condiciones de cultivo estándar. El día después de pasar las células, se recolectó una muestra de células para la extracción de ADN genómico (sin control de tratamiento). Se realizó transducción de una segunda muestra de células con el vector de virus Sendai SvHZSCAN4.

Las células transducidas se recolectaron 2 días (día 2 de tratamiento con SeVhZSCAN4) o 3 días (día 3 de tratamiento con SeVhZSCAN4) después de la transducción. A continuación, se midió la longitud de los telómeros de las células recolectadas mediante cRT-PCR y se calculó la longitud relativa de los telómeros (proporción T/S) respecto a las células de control sin tratamiento.

Como se muestra en la figura 11, la longitud promedio de los telómeros aumentó después del día 2 y después del día 3. En particular, 2 días después de la transducción con ZSCAN4, las células FDHa tenían una proporción T/S de aproximadamente 1,4, mientras que las células de control tenían una proporción T/S de 1,0 (Figura 11). De manera similar, 3 días después de la transducción con ZSCAN4, las células FDHa tenían una proporción T/S de aproximadamente 1,4 (Figura 11). Estos resultados indican que después de dos días de transducción con ZSCAN4, Las células FDHa tuvieron un aumento de aproximadamente un 40 % en la longitud relativa de los telómeros, en comparación con las células de control que no se habían transducido con ZSCAN4.

La sobreexpresión de ZSCAN4 humano aumenta rápidamente la longitud de los telómeros en fibroblastos aislados de un paciente con anemia de Fanconi, del grupo de complementación A

Se cultivaron fibroblastos GM01309 aislados de un paciente con FANCA en condiciones de cultivo estándar. El día después de pasar las células, se recolectó una muestra de células para la extracción de ADN genómico (sin control de tratamiento). Se realizó transducción de una segunda muestra de células con el vector de virus Sendai SvHZSCAN4.

Las células transducidas se recolectaron 2 días (día 2 de tratamiento con SeVhZSCAN4) o 3 días (día 3 de tratamiento con SeVhZSCAN4) después de la transducción. A continuación, se midió la longitud de los telómeros de las células recolectadas mediante cRT-PCR y se calculó la longitud relativa de los telómeros (proporción T/S) respecto a las células de control sin tratamiento.

Como se muestra en la figura 12, la longitud promedio de los telómeros aumentó ligeramente después del día 2 y drásticamente después del día 3. En particular, 2 días después de la transducción con ZSCAN4, las células GM01309 tenían una proporción T/S de aproximadamente 1,1, mientras que las células de control tenían una proporción T/S de 1,0 (Figura 12). Este resultado indica que después de dos días de transducción con ZSCAN4, las células GM01309 tuvieron un aumento de aproximadamente un 10 % en la longitud relativa de los telómeros, en comparación con las células de control que no se habían transducido con ZSCAN4.

Tres días después de la transducción con ZSCAN4, las células GM01309 tenían una proporción T/S de aproximadamente 2,6 (Figura 12). Este resultado indica que después de tres días de transducción con ZSCAN4, las células GM01309 tuvieron un aumento de aproximadamente un 160 % en la longitud relativa de los telómeros, en comparación con las células de control que no se habían transducido con ZSCAN4.

Ejemplo 9: La expresión de Zscan4 prolonga la vida de los fibroblastos humanos

Este ejemplo describe el hallazgo de que los ARNm sintéticos que codifican ZSCAN4 humano pueden prolongar la vida de las células fibroblastos dérmicos aisladas de un adulto sano. Este ejemplo también demuestra que los ARNm sintéticos que codifican el ZSCAN4 humano pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos.

5 Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células fibroblastos dérmicos humanos primarios (FDHa) aislados de piel de adulto se adquirieron de Life Technologies. De acuerdo con la información del fabricante, las células FDHa son capaces de al menos 12 duplicaciones de población (NDP). Las células FDHa se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de recibir las células FDHa, las células se cultivaron durante muchos pases de manera que las células no crecieran exponencialmente y se acercaran a la senescencia celular.

15 *ARNm sintético*

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifica ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitosina y trifosfato de pseudouridina.

Resultados

Las células FDHa en un estadio cercano a la senescencia celular se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 1×10^5 células/pocillo, y, después, se transfectaron con 1 μ g de ARNm sintéticos utilizando 5 μ l de Lipofectamine (RNAiMAX: Life Technologies, California, EE.UU) el día 0. El medio se cambió al día siguiente. Se realizó una segunda transfección con los mismos ARNm el día 3. Dependiendo del crecimiento de las células, las células se pasaron en una proporción de 1:2 cada 1 o 2 semanas. Las muestras se prepararon por triplicado. Los números de células se convirtieron a NDP, comenzando a un NDP de 0.

La figura 13 muestra los resultados de los ensayos de crecimiento celular. Se utilizaron como control células FDHa transfectadas con ARNm de GFP sintéticos. Después de 2 semanas, las células FDHa transfectadas con ARNm de GFP sintéticos experimentaron senescencia celular y proliferaron lentamente (Figura 13). Por el contrario, las células FDHa transfectadas con ARNm de hZSCAN4 sintéticos crecieron de 2 a 3 NDP más y, por lo tanto, prolongó la vida de las células FDHa cerca de la senescencia celular (Figuras 13A y 13B). Los ARNm de Zscan4 de ratón sintéticos no parecían prolongar la vida. Este resultado indica que el ZSCAN4 humano funciona mejor que el Zscan4c de ratón en la prolongación de la vida de las células FDHa (Figura 13C). Sin embargo, los ARNm de hZSCAN4 sintéticos no proporcionaron un crecimiento celular ilimitado, a medida que las células se ralentizaban o dejaban de proliferar con el tiempo. Similar a los resultados con ARNm de hZSCAN4 sintéticos, también se observó una prolongación de la vida de las células FDHa en las células en contacto con los vectores de virus Sendai SeVhZSCAN4 o SeVhZSCAN4-TS15 que expresan ZSCAN4 humano. Por lo tanto, no se observó que el uso de ZSCAN4 como agente biológico terapéutico causara transformación celular y/o cáncer en las células tratadas. Estos resultados indican que el tratamiento con hZSCAN4 puede prolongar la vida de las células FDHa sin transformar las células en tumores.

Ejemplo 10: Alargamiento de la longitud de los telómeros en células madre mesenquimatosas (MM) humanas (MS) mediante agentes biológicos de Zscan4

Este ejemplo describe el hallazgo de que un vector de virus Sendai sensible a la temperatura que expresa ZSCAN4 humano puede alargar la longitud de los telómeros en células madre mesenquimatosas (MM) humanas. Este ejemplo también demuestra que los vectores de virus Sendai que expresan ZSCAN4 humano pueden usarse como agentes biológicos para mejorar las terapias con células madre adultas, que incluyen, sin limitación, trasplantes de médula ósea.

55 Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células madre mesenquimatosas (CMM) derivadas de tejido adiposo humano se adquirieron de Life Technologies (CA, EE.UU.). De acuerdo con la información del fabricante, Las CMDA han demostrado características fenotípicas y funcionales muy similares a las células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea. Pueden expandirse a 4-5 pases antes de que pierdan su capacidad de crecer o diferenciarse en todos los fenotipos potenciales. Las células se cultivaron en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Vectores de virus Sendai

Los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón (SeV18 + mZscan4/TS15ΔF) o ZSCAN4 humano (SeV18 + hZSCAN4/TS15ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4-TS15" o "SeVhZSCAN4-TS15", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai son funcionales a 35 °C e inactivos a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34):14234-14239). Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai sensible a la temperatura, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Este vector se denomina en el presente documento "SeVAG-TS15". Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Análisis de transferencia Southern de los telómeros

Las longitudes de los telómeros de las células se midieron mediante análisis de transferencia Southern utilizando el kit TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche Applied Sciences, Indiana, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Las células madre mesenquimatosas (CMM) derivadas de tejido adiposo humano en el pase 2 se sembraron en placas de 10 cm a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células y se pusieron en contacto con vectores de Sendai sensibles a la temperatura a una MDI de 10 (el día 0). Las células se incubaron en un medio que contenía H_2O_2 10 μM y se mantuvieron a 35 °C durante 3 días, seguido de cultivo a 37 °C. Las células se pasaron en una proporción de 1:2 el día 7. Después de otro pase el día 10, las células se pusieron en contacto de nuevo con los vectores de Sendai sensibles a la temperatura a una MDI de 10 y se incubaron a 35 °C durante 3 días, seguido de cultivo a 37 °C. A continuación, las células se pasaron el día 14 (pase 3), el día 20, el día 27, el día 42 y el día 62 (pase 7). Las células se incubaron en un medio que contenía H_2O_2 10 μM de modo que la longitud de los telómeros se acortara más rápidamente que en las condiciones típicas de cultivo celular.

La figura 14 muestra los resultados de los ensayos de longitud de los telómeros. Las longitudes promedio de los telómeros (que se muestran en la leyenda de la figura) se estimaron basándose en el análisis de transferencia Southern de acuerdo con el protocolo del fabricante. Como se muestra en la figura 14, el ZSCAN4 humano (SeVhZSCAN4-TS15) aumentó la longitud de los telómeros de las CMM humanas, mientras que el Zscan4 de ratón (SeVmZscan4-TS) no pareció afectar a la longitud de los telómeros. Estos resultados indican que el acortamiento de la longitud de los telómeros en las CMM humanas se puede rescatar tratando las células con agentes biológicos ZSCAN4 humanos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que los efectos de ZSCAN4 humano descritos en el presente documento pueden aplicarse a otras células madre de tejido humano en cultivo. También se cree que los agentes biológicos ZSCAN4 humanos también pueden alargar la longitud de los telómeros (por ejemplo, rejuvenecimiento celular) en células madre de tejido humano residentes en tejido humano (es decir, *in vivo*).

Ejemplo 11: Expresión de Zscan4 para tratar pacientes con defectos en las células madre tisulares residentes

Hay muchas enfermedades causadas por una o más deficiencias en las células madre tisulares residentes (es decir, células madre tisulares residentes en el órgano y/o tejido del cuerpo humano). Por ejemplo, se sabe que la distrofia muscular de Duchenne está asociada con el envejecimiento prematuro de las células madre musculares (células satélite). Según los resultados descritos en el presente documento, los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) puede rejuvenecer las células madre tisulares, se cree que la expresión de Zscan4 en células madre tisulares residentes puede corregir las deficiencias de las células asociadas a la enfermedad. En el caso de la distrofia muscular de Duchenne, se cree que la expresión de Zscan4 se puede utilizar para tratar pacientes con distrofia muscular de Duchenne, mediante la administración de un agente biológico de Zscan4 a las células musculares, particularmente las células madre musculares, de un paciente con distrofia muscular de Duchenne, para prevenir el deterioro temprano de las células musculares.

Ejemplo 12: Expresión de Zscan4 para el tratamiento de pacientes con diabetes

Se ha demostrado que el ZSCAN4 humano se expresa de forma natural, aunque rara vez, en algunas células madre tisulares del páncreas humano. Según los resultados descritos en el presente documento, los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) puede rejuvenecer las células madre tisulares y las células diferenciadas terminalmente, se cree que la expresión de ZSCAN4 se puede utilizar para tratar pacientes con diabetes, mediante la administración de un agente biológico de Zscan4 a las células pancreáticas, particularmente a las células madre de tejido pancreático residentes, de un paciente con diabetes, para evitar que las células pancreáticas se deterioren aún más y, por lo tanto, facilitar la producción de células beta.

Ejemplo 13: Expresión de Zscan4 para el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica y otras lesiones cutáneas

Según los resultados descritos en el presente documento, los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) puede rejuvenecer las células madre tisulares y las células diferenciadas terminalmente, se cree que la expresión de Zscan4 puede usarse para tratar pacientes con dermatitis atópica u otras lesiones cutáneas, exponiendo un agente biológico de Zscan4 (por ejemplo, mediante administración tópica) a la piel, particularmente células madre de tejido cutáneo residentes, de un paciente con dermatitis atópica u otras lesiones cutáneas, para evitar que las células madre de tejido cutáneo y las células cutáneas se deterioren aún más, y de ese modo facilitar la producción de nuevas células madre del tejido cutáneo y células cutáneas.

Ejemplo 14: Expresión de Zscan4 para rejuvenecer a un individuo o ralentizar el proceso de envejecimiento de un individuo rejuveneciendo las células del cuerpo, incluidas células terminalmente diferenciadas, células progenitoras o células madre tisulares residentes

Se cree que casi todos los órganos y tejidos del cuerpo humano son mantenidos por células madre tisulares residentes que residen en los órganos y tejidos del cuerpo. Por ejemplo, los intestinos se mantienen mediante la producción continua de células maduras y diferenciadas a partir de células madre intestinales que residen en la cripta del intestino. De manera similar, la piel se mantiene mediante la producción continua de epitelio dérmico a partir de células madre de la piel, mientras que el cabello es mantenido por las células madre del folículo piloso. En comparación con las células completamente diferenciadas que envejecen y se deterioran a un ritmo relativamente rápido, las células madre tisulares tienden a mantener su calidad y juventud, por ejemplo, manteniendo la longitud de los telómeros (Figura 15). Sin embargo, incluso las células madre tisulares pierden gradualmente su juventud (Figura 15). Por tanto, el envejecimiento general y la pérdida gradual de un aspecto y función juveniles pueden considerarse el resultado del envejecimiento y deterioro de las células madre tisulares residentes.

Según los resultados descritos en el presente documento, los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) puede rejuvenecer las células madre embrionarias (ME) y las células madre mesenquimatosas (CMM), se cree que la expresión de Zscan4 en células madre tisulares residentes en cada órgano y/o tejido del cuerpo humano puede rejuvenecerse y así restaurar el órgano y/o tejido a un aspecto y función normales (es decir, joven). Esto se basa en las observaciones de que el ZSCAN4 humano se expresa de forma natural, aunque rara vez, en algunas células madre tisulares del páncreas humano. Adicionalmente, en función de los resultados descritos en el presente documento de que los agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) puede rejuvenecer las células diferenciadas terminalmente, tal como fibroblastos de la piel, se cree que la expresión de Zscan4 en células diferenciadas terminalmente y/o células progenitoras residentes en cada órgano y/o tejido del cuerpo humano puede ser rejuvenecedora y así restaurar el órgano y/o tejido a un aspecto y función normales (es decir, joven).

Este ejemplo describe un procedimiento para expresar agentes biológicos de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea mediante un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) en las células madre tisulares, células diferenciadas terminalmente y/o células progenitoras que residen en órganos y tejidos del cuerpo humano para rejuvenecer y así restaurar el cuerpo con un aspecto y función normales (es decir, joven). En particular, un agente biológico de Zscan4 como se describe en el presente documento se administra a un sujeto que lo necesita inyectando directamente un agente biológico de Zscan4 en cada órgano y tejido del cuerpo o inyectando un agente biológico de Zscan4 en la sangre circulante del sujeto, por lo tanto, administrando el agente biológico de Zscan4 a todos los órganos y tejidos del cuerpo. Como alternativa o adicionalmente, el agente biológico de Zscan4 puede inyectarse en el líquido cefalorraquídeo, por lo tanto, administrando el agente biológico de Zscan4 a todos los órganos y tejidos nerviosos del cuerpo. Como alternativa o adicionalmente, el agente biológico de Zscan4 puede inyectarse en el sistema linfático, por lo tanto, administrando el agente biológico de Zscan4 a todos los órganos y tejidos linfáticos del cuerpo. Como alternativa o adicionalmente, el agente biológico de Zscan4 se puede inhalar en el tejido pulmonar, administrando de este modo el agente biológico de Zscan4 al tejido pulmonar, administrando de este modo el agente biológico de Zscan4 al tejido pulmonar. Como alternativa o adicionalmente, el agente biológico de Zscan4 puede ser ingerido, administrando de este modo el agente biológico de Zscan4 a todos los órganos y tejidos digestivos, incluidos esófago, estómago e intestinos del cuerpo. Como alternativa o adicionalmente, el agente biológico de Zscan4 puede inyectarse en las venas portales, administrando de este modo el agente biológico de Zscan4 al hígado del cuerpo. Como alternativa o adicionalmente, el agente biológico de Zscan4 se puede aplicar tópicamente en la piel o el cuero cabelludo, administrando de este modo el agente biológico de Zscan4 a la piel y los anexos de la piel, tal como folículos pilosos y glándulas sudoríparas, del cuerpo. Estos procedimientos expondrán las células madre tisulares, las células progenitoras y las células diferenciadas terminalmente en cada órgano y/o tejido del sujeto a un agente biológico de Zscan4 y, por lo tanto, rejuvenecen las células madre tisulares, células progenitoras y/o células diferenciadas terminalmente que residen en el órgano y/o tejido tratado. Se cree que los efectos generales del rejuvenecimiento de las células madre tisulares, células progenitoras y/o células diferenciadas terminalmente en el sujeto tratado son el rejuvenecimiento del sujeto y/o la ralentización del proceso de envejecimiento del sujeto. También se cree que el rejuvenecimiento de las células madre tisulares, las células progenitoras y/o las células diferenciadas terminalmente en el sujeto tratado darán como resultado una prolongación de la vida del sujeto.

Ejemplo 15: La expresión de Zscan4 corrige la trisomía 21 en células fibroblastos humanos aisladas de un paciente con síndrome de Down

Este ejemplo describe el hallazgo de que la expresión de ZSCAN4 humano, ya sea por un ARNm sintético que codifica ZSCAN4 o un vector de virus Sendai que expresa ZSCAN4, puede corregir el cariotipo de la trisomía 21 de células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Down. Este ejemplo también demuestra que los ARNm sintéticos que codifican el ZSCAN4 humano y el vector de virus Sendai que expresa el ZSCAN4 humano pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Down (SD, trisomía 21) se adquirieron en el Depósito de células de Coriell (ID del catálogo AG06872). Según la información del catálogo de Coriell, la donante era una mujer caucásica de 1 año de edad. La donante tenía características típicas del síndrome de Down (trisomía 21). La biopsia de piel se tomó *post-mortem* el 19/05/83. El cultivo se inició utilizando explantes de tejido de piel troceado. El cariotipo es 47, XX, + 21. La morfología celular es similar a la de los fibroblastos. El nivel de duplicación de la población acumulada (NDP) fue de 10,5 en reposo y el número de pases fue de 5. Después de recibir las células de SD del Depósito de células de Coriell, las células se cultivaron durante algunos pases más. Las células se cultivaron en las condiciones recomendadas por el Depósito de células de Coriell: medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle y aminoácidos no esenciales, suplementado con suero bovino fetal al 10 % (no inactivado).

ARNm sintético

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realizó según lo indicado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Usando este protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifica ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN y la eficiencia de traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

Vectores de virus Sendai

Un vector de Sendai que expresa ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/ΔF) fue fabricado a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). En el presente documento, el vector se denomina "SeVhZSCAN4". Este vector de Sendai carece de la proteína F y, por lo tanto, no es transmisible (Inoue *et al.*, J Virol. 77:3238 -3246, 2003). Se usó una MDI (multiplicidad de infección) de 10 para los experimentos.

Además, un vector de Sendai sensible a la temperatura que expresa ZSCAN4 humano (SeV18+hZSCAN4/ TS15ΔF) fue fabricado a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Este vector se denomina en el presente documento "SeVhZSCAN4-TS15". Este vector de Sendai es funcional a 35 °C e inactivo a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34):14234-14239). Este vector de Sendai también carece de la proteína F y, por lo tanto, no es transmisible (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003). Se utilizó una MDI (multiplicidad de infección) de 25 para este experimento.

Análisis del cariotipo

Además del análisis de cariotipo regular mediante bandas G, las copias del cromosoma 21 presentes en cada célula cultivada se contaron mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) utilizando una sonda que hibrida específicamente con la región centromérica del cromosoma 21 (CHR21-10-GR: Empire Genomics, Nueva York, EE.UU.). En el núcleo en interfase, la detección de 3 puntos fluorescentes indica trisomía 21 (síndrome de Down), mientras que la detección de 2 puntos de fluorescencia indica un número normal de copias del cromosoma 21 (normal).

Resultados

Los ARNm sintéticos que codifican ZSCAN4 humano corrigen las anomalías cromosómicas en las células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Down (trisomía 21)

Las células fibroblastos del síndrome de Down (SD) en el pase 7 se sembraron en una placa de cultivo de 10 cm a una concentración de 5×10^5 células/pocillo y luego se transfectaron con 5 µg de ARNm sintéticos (hZSCAN4 o GFP) usando 25 µl de Lipofectamine (RNAiMAX: Life Technologies, California, EE. UU.). Además de las células transfectadas con ARNm de GFP, también se utilizaron células no transfectadas como control. En un experimento (1 transfección), todas las células se pasaron el día 5 y, a continuación, se analizaron los cariotipos el día 10 (pase 9). En otro experimento (2 transfecciones), después de pasar las células el día 5, se llevó a cabo una segunda transfección con ARNm de GFP o ARNm de hZSCAN4 y, a continuación, se analizó el cariotipo el día 10 (pase 9).

La figura 16A muestra imágenes representativas de núcleos celulares tras realizar una FISH con sondas del cromosoma 21. Cada punto indica el número de cromosoma 21 presente en el núcleo. Dos puntos indican una disomía normal del cromosoma 21, mientras que tres puntos indican una trisomía del cromosoma 21. La figura 16B muestra un resumen de los recuentos del cromosoma 21 en experimentos de 1 transfección: 10 días después de la transfección de ARNm de ZSCAN4 humano, el 14 % de las células ahora tiene un número normal del cromosoma 21. La figura 16C muestra un resumen de los recuentos del cromosoma 21 en experimentos de 2 transfecciones: la transfección de ARNm de ZSCAN4 humano dos veces hace que el 17 % de las células porten un número normal del cromosoma 21. Por el contrario, tanto las células no transfectadas como las transfectadas con ARNm de GFP muestran solo una pequeña fracción (<3 %) de células con el cromosoma 21 aparentemente normal. Estos están dentro del margen de error. Estos resultados indican que la introducción de ARNm de ZSCAN4 humanos en las células puede corregir anomalías en el número de cromosomas.

Los vectores de virus Sendai que expresan ZSCAN4 humano corrigen anomalías cromosómicas en células fibroblastos aisladas de un paciente con síndrome de Down (trisomía 21)

La figura 17A muestra los procedimientos experimentales. Se sembraron en una placa de 6 pocillos células fibroblastos de síndrome de Down (SD) a una concentración de 5×10^4 células/pocillo en el pase 8 (día 0). Un día después, las células se trataron con SeVhZSCAN4-TS15 a una MDI de 25 y se mantuvieron a 35 °C durante 3 días. A continuación, la placa se transfirió a 37 °C y se mantuvo a 37 °C durante el resto del experimento. Las células se pasaron el día 9, el día 12 y el día 15. Después de pasar el día 15, las células se trataron con SeVhZSCAN4 a un MO de 10. Posteriormente, las células se pasaron el día 18 y el día 21. Después de pasar el día 21, las células se trataron con SeVhZSCAN4 a un MDI de 10. El análisis del cariotipo se realizó el día 24 mediante FISH (Figura 17B). Después de pasar el día 30, las células se trataron con SeVhZSCAN4 a un MDI de 10. Después de pasar el día 39, las células se trataron con SeVhZSCAN4 a un MDI de 10. El análisis de cariotipo se realizó el día 42 mediante FISH (Figura 17C). Las células cultivadas en paralelo sin contactar con el vector de virus Sendai (sin tratamientos) o las células cultivadas en paralelo y puestas en contacto con el vector de control Sendai que expresa la variante de GFP se utilizaron como controles. Las imágenes FISH fueron puntuadas de forma independiente por dos investigadores experimentados: 2 puntos de fluorescencia (2x cromosoma 21: Normal); 3 puntos de fluorescencia (3x cromosoma 21: trisomía 21, síndrome de Down).

La figura 17B muestra un resumen de los recuentos del cromosoma 21 en las células de control y en las células tratadas una vez con SeVhZSCAN4-TS15 y dos veces con SeVhZSCAN4 (3 tratamientos). Los resultados demostraron que el tratamiento de las células fibroblastos del síndrome de Down con el vector del virus Sendai que expresa ZSCAN4 humano induce la corrección de la trisomía 21 en casi el 30 % de las células.

La figura 17C muestra un resumen de los recuentos del cromosoma 21 en las células de control no tratadas, en las células de control tratadas con el vector de Sendai de control y en las células tratadas una vez con SeVhZSCAN4-TS15 y cuatro veces con SeVhZSCAN4 (5 tratamientos). Los resultados indican que las células fibroblastos del síndrome de Down tratadas repetidamente con el vector del virus Sendai que expresa ZSCAN4 humano inducen la corrección de la trisomía 21 en casi el 55 % de las células.

Estos resultados indican que la introducción de ZSCAN4 humano en las células puede corregir anomalías en el número de cromosomas.

Ejemplo 16: Expresión de Zscan4 para rejuvenecer ovocitos y corregir anomalías cromosómicas en ovocitos y embriones preimplantación

Durante el envejecimiento materno, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados con éxito disminuye drásticamente y aumenta el riesgo de aborto espontáneo y defectos de nacimiento. Estudios recientes han revelado que el aborto espontáneo y los defectos de nacimiento maternos son causados principalmente por errores de segregación cromosómica en los ovocitos. En este punto, no ha habido ningún informe que revierta con éxito la capacidad de los ovocitos envejecidos mediante la prevención o corrección de errores de segregación cromosómica.

En el desarrollo normal de embriones de ratón preimplantación, Zscan4 endógeno se expresa de forma transitoria y elevada en embriones de 2 células (Falco *et al.*, Dev Biol. 2007; 307: 539-50). Asimismo, los inventores han demostrado que la expresión de Zscan4 es fundamental para el desarrollo normal (Falco *et al.*, Dev Biol. 2007; 307: 539-50). De manera similar, ZSCAN4 humano se expresa transitoriamente en embriones humanos en estadio de 6 a 8 células (Vassena *et al.*, Development. 2011; 138: 3699-709). Dado que la activación del genoma cigótico se produce en el estadio de 2 células en el ratón y en el estadio de 6 a 8 células en el ser humano, se considera que la expresión de Zscan4 es necesaria para el desarrollo del embrión preimplantación humano.

Este ejemplo describe el procedimiento con el que los agentes biológicos de Zscan4 pueden rejuvenecer los ovocitos y corregir las anomalías cromosómicas en los embriones de preimplantación de ratón. Basándose en la similitud funcional entre los genes Zscan4 de ratón y ZSCAN4 humanos mostrados en esta solicitud de patente, e incluso la superioridad del gen ZSCAN4 humano, se considera que los resultados del embrión de ratón se pueden aplicar

directamente a embriones humanos. Estos procedimientos se pueden implementar en la clínica de fertilización *in vitro* (FIV). Estos procedimientos pueden reducir el riesgo de síndrome de Down y otros problemas de cariotipo en mujeres de todas las edades, que pueden ser especialmente beneficiosos para aquellas mayores de 35 años de edad, de acuerdo con la pauta de riesgo de embarazo.

5

Materiales y métodos

Recolección de ovocitos

- 10 Los ratones envejecidos (es decir, ratones de más de 45 semanas de edad) y los ratones jóvenes (8 semanas de edad) se adquieren en Jackson Laboratory. Se recolectan ovocitos en un estado de vesícula germinal (ovocitos VG) de los ratones jóvenes y viejos. Los ovocitos de los ratones jóvenes se utilizan como control.

ARNm sintético

15

Para la síntesis de ARNm modificado, la síntesis de ARNm se realiza según lo informado previamente por Warren *et al.* (Warren *et al.*, Cell Stem Cell, 2010 Nov 5;7(5):618-30). Utilizando el protocolo de Warren *et al.*, los ARNm se sintetizan mediante la transcripción *in vitro* de ADN molde que codifican Zscan4c de ratón, ZSCAN4 humano o proteína verde fluorescente (GFP) con mezclas de dNTP modificados para aumentar la estabilidad del ARN así como la eficiencia de la traducción en células de mamíferos. Se utilizaron los siguientes dNTP modificados: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G ARCA análogo del capuchón,, trifosfato de 5-metilcitidina y trifosfato de pseudouridina.

20

Vectores de virus Sendai

- 25 Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón (SeV18 + mZscan4/AF) o ZSCAN4 humano (SeV18 + hZSCAN4/ΔF) están fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4" o "SeVhZSCAN4", respectivamente, en el presente documento. Como control, se utiliza el mismo vector de Sendai, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Estos vectores de Sendai carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

30

Los vectores de Sendai que expresan Zscan4c de ratón fusionado a un dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18 + mZERT2/ΔF), o ZSCAN4 humano fusionado a un dominio ERT2 controlable por tamoxifeno (SeV18 + hZERT2/ΔF) están fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZERT2" o "SeVhZERT2", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

35

Además, los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón (SeV18 + mZscan4/TS15ΔF) o ZSCAN4 humano (SeV18 + hZSCAN4/TS15ΔF) están fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4-TS15" o "SeVhZSCAN4-TS15", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai son funcionales a 35 °C e inactivos a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(34):14234-14239). Como control, se utiliza el mismo vector de Sendai, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Este vector se denomina en el presente documento "SeVAG-TS15". Estos vectores de Sendai también carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

40

45

Resultados

- 50 Los ovocitos en un estado de vesícula germinal (ovocitos VG) se recolectan y se someten a maduración *in vitro* (MIV) para la progresión posterior hacia la meiosis I y II. Durante la MIV, los ovocitos se ponen en contacto con un agente biológico de Zscan4 (por ejemplo, ARNm sintéticos que codifican Zscan4 o vectores del virus Sendai que expresan Zscan4) y posteriormente se fertilizan *in vitro* con esperma. Como alternativa, los ovocitos fertilizados/embriones de preimplantación entre el estadio unicelular (cigoto) y el estadio de blastocisto se ponen en contacto con un agente biológico de Zscan4 (por ejemplo, ARNm sintéticos que codifican Zscan4 o vectores del virus Sendai que expresan Zscan4). Los métodos de contacto pueden incluir la transfección estándar con Lipofectamine de ARNm sintéticos Zscan4 con, infección vírica de los vectores del virus Sendai que expresan Zscan4 e inyección intracitoplasmática de un agente biológico de Zscan4 mediante un micromanipulador.

55

A continuación, los ovocitos fertilizados y tratados con Zscan4 se cultivan en medio de cultivo KSOM durante 96 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

60

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que el tratamiento con Zscan4 dará como resultado ovocitos de ratones envejecidos que son comparables a los ovocitos de ratones jóvenes en términos del número de cigotos que pueden desarrollarse con éxito hasta el estadio de blastocisto. Los blastocistos resultantes se transfieren a un ratón hembra receptor para comprobar la tasa de natalidad de crías sanas. Se cree que el tratamiento con agentes biológicos de Zscan4 mejora la tasa de éxito del desarrollo adecuado del embrión a partir de ovocitos envejecidos mejorando el

65

cariotipo y la calidad de los embriones.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, también se cree que el método anterior se puede aplicar a ovocitos humanos y ovocitos fertilizados/embriones preimplantación para mejorar la tasa de éxito del desarrollo embrionario adecuado a partir de ovocitos envejecidos y para mejorar el cariotipo y la calidad de los embriones (Figura 18).

Ejemplo 17: La expresión de Zscan4 reprime el crecimiento de células cancerosas humanas

Este ejemplo describe el hallazgo de que un vector de virus Sendai sensible a la temperatura que expresa Zscan4 de ratón o ZSCAN4 humano puede reprimir la proliferación de células cancerosas. Este ejemplo también demuestra que los vectores del virus Sendai que expresan Zscan4 pueden usarse como agentes biológicos terapéuticos.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células de carcinoma colorrectal humano HCT116 se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Las células HCT116 se obtienen del carcinoma colorrectal de un varón adulto humano. Según la ATCC, "el número de cromosomas de la línea madre está cerca de diploide con el número modal en 45 (62 %) y poliploides que ocurren en el 6,8 %. Esta línea tiene una mutación en el codón 13 del protooncogén *ras*". Las células HCT116 se cultivaron de acuerdo con la recomendación de la ATCC.

Vectores de virus Sendai

Los vectores de Sendai sensibles a la temperatura que expresan Zscan4 de ratón (SeV18 + mZscan4/TS15ΔF) o ZSCAN4 humano (SeV18 + hZSCAN4/TS15ΔF) fueron fabricados a medida por MBL (Medical & Biological Laboratories Co, LTD). Estos vectores se denominan "SeVmZscan4-TS15" o "SeVhZSCAN4-TS15", respectivamente, en el presente documento. Estos vectores de Sendai son funcionales a 35 °C e inactivos a 37 °C (Ban *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34):14234-14239). Como control, se utilizó el mismo vector de Sendai sensible a la temperatura, pero el vector expresó una variante de proteína verde fluorescente en lugar de Zscan4. Este vector se denomina en el presente documento "SeVAG-TS15". Estos vectores de Sendai carecen de la proteína F y, por lo tanto, no son transmisibles (Inoue *et al.*, J Virol. 77: 23238-3246, 2003).

Resultados

Se cultivaron muestras de células HCT116 (pase 9) a una concentración de 8×10^4 células/pocillo. Las muestras de células se trataron con uno de los siguientes vectores de Sendai: SeVAG-TS15 (control), SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15 a una MDI de 20 y se incubaron a 35 °C (día 0). Cada una de las tres muestras de tratamiento se preparó por triplicado. El día 3, cada muestra de tratamiento se pasó y se trató con el mismo vector de Sendai. El número de células se contó con el contador de células automatizado Moxi Z (ORFLO Technologies, Idaho, Estados Unidos). El día 7, cada muestra de tratamiento se pasó y se trató con el mismo vector de Sendai. Se contó el número de células (día 7). El día 10, cada muestra de tratamiento se pasó y se trató con el mismo vector de Sendai. Se contaron los números de células (día 10). El día 14, cada muestra de tratamiento se pasó y se trató con el mismo vector de Sendai. Se contaron los números de células (día 14). Las células se cultivaron a 35 °C a lo largo de los experimentos. Los números de células se convirtieron a NDP, comenzando a un NDP de 0 para el día 0.

La figura 19 muestra la curva de crecimiento de las muestras de células HTC116. En comparación con los grupos de control (es decir, grupo sin tratamiento y grupo tratado con SeVAG-TS15), los tratamientos con SeVmZscan4-TS15 o SeVhZSCAN4-TS15 reprimieron la proliferación de células HTC116. Como se muestra en la figura 19, el ZSCAN4 humano fue sorprendentemente mejor que el Zscan4 de ratón en la represión del crecimiento de células cancerosas. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el ZSCAN4 humano produce resultados sorprendentemente superiores sobre el Zscan4c de ratón. Estos resultados indican además que el tratamiento con hZSCAN4 puede reprimir el crecimiento de células cancerosas. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que los agentes que expresan Zscan4 pueden usarse para la terapia del cáncer.

Ejemplo 18: Expresión de Zscan4 para aumentar la capacidad de reparación del ADN de células o individuos humanos

Este ejemplo describe el hallazgo de que los agentes biológicos de Zscan4 pueden aumentar la capacidad de reparación del ADN de las células humanas. Se sabe que los agentes genotóxicos, tales como mitomicina C o cisplatino, mata las células humanas de una manera dependiente de la dosis. Las células expuestas a un agente genotóxico y que luego se tratan con un agente biológico de Zscan4 (por ejemplo, la expresión de Zscan4, ya sea por un ARNm sintético que codifica Zscan4 o un vector de virus Sendai que expresa Zscan4) se vuelven resistentes al agente genotóxico. Se ha descubierto que la resistencia a los agentes genotóxicos por parte del agente biológico de Zscan4 se debe a la mayor capacidad de reparación del ADN inducida por la expresión de Zscan4 en las células. Por lo tanto, los agentes biológicos de Zscan4 se pueden utilizar para: (1) mejorar la capacidad de reparación del ADN de

pacientes con enfermedades asociadas con una deficiencia de reparación del ADN; (2) proteger tejidos y/u órganos específicos, tal como las gónadas, frente a sufrir daños por agentes genotóxicos, tales como terapias contra el cáncer; y (3) proteger los tejidos, órganos y/o individuos frente a entornos peligrosos, tal como la presencia de productos químicos tóxicos o fallos nucleares.

5 **Ejemplo 19: Represión de Zscan4 en ciertas células madre cancerosas para tratar el cáncer**

Se sabe que los tejidos cancerosos (por ejemplo, tumores) contienen células madre cancerosas, que no están proliferando activamente y son resistentes a la quimioterapia contra el cáncer (por ejemplo, tratamiento con agentes genotóxicos como cisplatino). Se cree que las células madre cancerosas pueden sobrevivir al tratamiento con quimioterapia y, por lo tanto, provocan la recurrencia del cáncer después del tratamiento. Como la presencia de Zscan4 puede proporcionar a las células resistencia a los agentes genotóxicos, se cree que la expresión endógena de Zscan4 se produce en ciertas células madre cancerosas, proporcionando así a las células protección frente a los agentes genotóxicos. Como tal, se cree que los agentes que reducen la expresión endógena de Zscan4, tal como ARNip o ARNhc específicos de Zscan4, se pueden utilizar para tratar las células madre cancerosas en un paciente con cáncer para reducir o eliminar la resistencia a los agentes genotóxicos en las células madre cancerosas y así mejorar la respuesta del paciente a la terapia del cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> ELIXIRGEN, LLC Ko, Minoru S.H.

<120> MÉTODOS DE USO DE ZSCAN4 PARA REJUVENECER CÉLULAS HUMANAS

25 <130> 699442000840

<140> Todavía sin asignar

<141> Simultáneamente con el presente documento

30 <150> US 61/800,668

<151> 15/03/2013

<160> 44

35 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 2275

<212> ADN

40 <213> *Mus musculus*

<400> 1

cacagtgccct	ccctgggctt	cttggcatca	cccttgaagt	tactgggaga	aagagttgag	60
gtggaggaat	aggtaaactt	cccttcctag	tggtcttgaa	tgtcttttac	agtacatcca	120
tcaactgtta	gcattttcgt	aaagtcacaa	aacagatatt	aaactactat	agttgaatct	180
ttcacaccat	tgtcaccaca	atggcttcac	agcaggcacc	agcaaaagac	cttcagacca	240
acaatttaga	gtttactcca	actgatagtt	ctgggtgtgca	gtgggcagaa	gacatctcta	300
actcaccaag	tgctcagcta	aacttttccc	caagtaacaa	tggctgctgg	gcaactcagg	360
agctgcaaag	tctctggaag	atgttcaact	cctgggttgca	gccagaaaag	cagactaagg	420
agcagatgat	ttctcaactg	gtcttgaggc	agtttctcct	cactgggcac	tgcaaggaca	480
agtatgcttt	gacagagaag	tggaaagcca	gtggtagcga	tatgaggaga	ttcatggaga	540
gtctgactga	tgagtgcctg	aagcctcctg	tcatgggtcca	tgtctcaatg	caaggacaag	600
aagccctctt	ttctgaaaac	atgccattaa	aagaagtcac	caagcttttg	aaacaacagc	660
aatctgcaac	aaggccaaca	ccagataatg	cacagatgcc	agtagacacc	acacaagata	720
gattattggc	cacaggacaa	gaaaacagtg	aaaatgaatg	caacacctct	tgtaatgcta	780
ctgaaggaaa	tgttgggtgag	agctgtagtg	gaaatgaaat	ggactcctct	cttattatcc	840
agaaagaaca	gtaccctgag	catgaagagg	ggaatgttgt	ttgtcaattc	cctcttgatg	900
ccagaagagc	aagtcaaggc	acctccagtc	atcatgtaga	cttcctgagt	gctctgacta	960
ctgccgatgt	ccccatggag	gaacaaccaa	aggatttatc	cagagaaaac	atctctgagg	1020
acaagaacaa	ttgctataac	acttccagga	atgcagctac	taaagtatat	agtggtgata	1080
atattcccag	gaaaaagaca	gactcccttt	ccattaacaa	gaggatatat	catcctgagc	1140
ctgaggtggg	agatattcct	tatggagttc	ctcaggattc	tacaagagca	agtcaaggaa	1200
catctacatg	cctgcaagag	tacttggggg	gatgtttttc	cgaaaaagac	cctagggagg	1260
taccaggggt	gcagtctagg	taagagcagc	ctatctctga	tcctgtcctt	cttggtaaga	1320
atcatgaggc	aaactttacca	tgtgaaagtc	atcaaaagag	attctgtaga	gatgccaaac	1380
tatacaagtg	tgaagaatgt	tctaggatgt	tcaaaccatgc	caggagcctt	tcatcccacc	1440
agagaactca	cctgaataag	aagagtgaat	tgctttgtgt	cacctgtcag	aaaattttca	1500
aacgagtctc	tgaccgccga	acccatgaga	tcatacacat	gccagaaaag	cctttcaagt	1560
gcagcacatg	tgaaaagtcc	ttcagccaca	agaccaacct	gaagtctcat	gagatgattc	1620
acacaggaga	aatgccttat	gtctgttccc	tatgtagccg	tcgctttcgc	caatcatcca	1680
cttaccatcg	tcacctgagg	aattatcaca	gatctgactg	aagtatctaa	catcctcagc	1740
agagactggg	agggcttcag	cctcagtatg	tcatcttcaa	agagagaaga	atgttgcaag	1800
taaattgtac	tgtcccaata	atgatataac	atgcttgtgg	attgccactt	ttatgttttg	1860
ttttgttttg	ttttttatatt	tgtgtgtgtg	tatgtaattt	tttgtctgta	tttccatagt	1920
tccacagcat	aagttattag	aatactttgc	tgtttaattct	tgagttgctt	cttgcttttta	1980
gacagtgtct	ttctgggttg	cagctttata	cacctgtcct	tctggcacta	gagtttccaa	2040
acattttctg	atctccactt	ttattttcta	cagtggctcct	gacagaggcc	tgccattccc	2100
tctgacattt	ttctacatgt	tgggggtttca	tcccaagtct	taggggttgca	agttaaatgc	2160
attgcctctt	cagacatctc	atgtcatgtc	tactgcttac	agttcaagaa	tattttctcta	2220
cattactaga acgacgttca aagtggaata ataaataaat aaataatcaa caatt						2275

5 <210> 2
 <211> 1774
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 2

cacagtgcct	ccctgggctt	cttggcatca	cccttgaagt	tacttgagaga	aagaggtgat	60
gtggagaagt	aggtaaactt	ccctttcttg	tgttcttgaa	tgtcttttac	agtacatccg	120
tcaactgtta	gcattttcct	aaagtcacaa	aacagatact	aaactgctat	agttgaatct	180
ttcagaccat	tgtcaccaca	atggcttcac	agcaggcacc	agcaaaagac	cttcagacca	240
acaattttaga	gtttactcca	actgatagtt	ctggtgtgca	gtgggcagaa	gacatctcta	300
actaccaag	tgtcagcta	aacttttccc	caagtaacaa	tggctgctgg	gcaactcagg	360
agctgcaaag	tctctggaag	atgttcaact	cctgggtgca	gccagaaaag	cagactaagg	420
agcagatgat	ttctcaattg	gtcttgaggc	agtttctcct	cactgggcac	tgcaaggaca	480
agtatgcttt	gacagagaag	tggaaagcca	gtggtagcga	tatgaggaga	ttcatggaga	540
gtctgactga	tgagtgtctg	aagcctcctg	tcatgggtcca	tgtttcaatg	caaggacaag	600
aagccctctt	ttctgaaaac	atgccattaa	aagaagtcac	caagcttttg	aaacaacagc	660
aatctgcaac	aaggccaata	ccagataatg	cacagatgcc	agtagacacc	acacaagata	720
gattattggc	cacaggcaag	aaaacagtga	aaatgaatgc	aacacctctt	gcaatgctac	780
tgaagtaaat	gttgggtgaa	gctgtagtgg	aaatgaaaag	gactcccttc	ttattaccca	840
gaaagaacaa	aaccatgagc	atgaagaggg	gaatgttggt	tgtcaattcc	ctcgtggtgc	900
cagaagagca	agtcaagaca	cctccagtca	tcatgtagac	ttcccagagt	ctctgactcc	960
tgcagatgtc	cccatggagg	aacaaccaat	ggatttatcc	agagaaaaca	tctctgagga	1020
caagaacaat	tgtctataaca	cttccaggaa	tgcagctact	caagtatata	gtggtgataa	1080
tattcccagg	aacaagacag	actccctttt	cattaacaag	agaatatatc	atcctgagcc	1140
tgagggtgga	gatattcctt	atggagttcc	tcaggattct	acaagagcaa	gtcaagggaac	1200
atctacatgc	ctgcaagagt	cacttgggga	atgtttttct	gaaaaagacc	caagggaggt	1260
accagggttg	cagtctaggc	aagagcagcc	tatctctgat	cctgtccttg	gtaagaatca	1320
tgaggcaaac	ttaccatgtg	aaagtcatca	aaagagattc	catagagatg	ccaaactata	1380
caagtgtgaa	gaatgttcta	ggatgttcaa	acatgccagg	agcctttcat	cccaccagag	1440
aactcacctg	aataagaaga	gtgaattgct	ttgcatcacc	tgtcagaaaa	tattcaaacg	1500
agttttctgac	cttcgaaccc	atgagatcat	acacatgtca	gaaaagcctt	tcaagtgcag	1560
cacatgtgaa	aagtccttca	gccacaagac	caacctgaag	tatcatgaga	tgattcacac	1620
aggagaaatg	ccttatgtct	gttccctatg	tagccgtcgc	tttcgccaat	catccactta	1680
ccatcgtcac	ctgaggaatt	accacagatc	tgactgaagt	atctaaccatc	ctcagcagag	1740
actggtaggg	cttcagcctc	agtatgtcat	cttc			1774

<210> 3
 <211> 2275
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 3

cacagtgcct	ccctgggctt	cttggcatca	cccttgaagt	tcaccggaga	aagcagtgag	60
gtggaggaat	aggtaaactt	tccttcctag	tgttcttgaa	tgtcttttac	agtacatcca	120
tcaactgtta	gcattttcgt	aaagtcacaa	aacagatatt	aaactactat	agttgaatct	180
ttcacaccat	tgtcaccaca	atggcttcac	agcaggcacc	agcaaaagac	cttcagacca	240
acaattttaga	gtttactcca	actgatagtt	ctggtgtgca	gtgggcagaa	gacatctcta	300
actaccaag	tgtcagcta	aacttttccc	caagtaacaa	tggctgctgg	gcaactcagg	360
agctgcaaag	tctctggaag	atgttcaact	cctgggtgca	gccagaaaag	cagactaagg	420
agcagatgat	ttctcaactg	gtcttgaggc	agtttctcct	cactgggcac	tgcaaggaca	480
agtatgcttt	gacagagaag	tggaaagcca	gtggtagcga	tatgaggaga	ttcatggaga	540
gtctgactga	tgagtgtctg	aagcctcctg	tcatgggtcca	tgtttcaatg	caaggacaag	600
aagccctctt	ttctgaaaac	atgccattaa	aagaagtcac	caagcttttg	aaacaacagc	660
aatctgcaac	aaggccaaca	ccagataatg	agcagatgcc	agtagacacc	acacaagata	720
gattattggc	cacaggacaa	gaaaacagtg	aaaatgaatg	caacaactct	tgtaatgcta	780
ctgaagcaaa	tggtgggtgaa	agctgtagtg	gaaatgaaat	ggactccctt	cttattatcc	840
agaaagaaca	gcaccctgag	catgaagagg	ggaatgttgt	ttgtcaattc	cctcatgggtg	900
ccagaagagc	aagtcaaggc	acccccagtc	atcatgtaga	cttcccagag	gctccgacta	960
ctgccgatgt	ccccatggag	gaacaaccaa	aggatttatc	cagagaaaac	atctctgagg	1020
acaagaacaa	ttgtctataac	acttccagaa	atgcagctac	tcaagtatat	agtgggtgata	1080

atattcccag	gaacaagtca	gactcccttt	tcattaacaa	gagaatatat	catcctgagc	1140
ctgagggtggg	agatattcct	tatggagttc	ctcaggattc	tacaagagca	agtcaaggaa	1200
catctacatg	cctgcaagag	tcacttgagg	aatgtttttc	tgaaaacgac	ccaagggagg	1260
taccaggggt	gcagtctagg	caagagcagc	ctatctctga	tcctgtcctt	cttggttaaga	1320
atcatgaggc	aaacttacca	tgtgaaagtc	atcaaaagag	attctgtaga	gatgccaaac	1380
tatacaagtg	tgaagaatgt	tctaggatgt	tcaaaccatgc	caggagcctt	tcatcccacc	1440
agagaactca	cctgaataag	aagagtgaat	tgctttgtgt	cacctgtcag	aaaatgttca	1500
aacgagtctc	tgaccgccga	acccatgaga	tcatacacat	gccagaaaag	cctttcaagt	1560
gcagcacatg	tgaaaagtcc	ttcagccaca	agaccaacct	gaagtctcat	gagatgattc	1620
acacaggaga	aatgccttat	gtctgttccc	tatgtagccg	tcgctttcgc	caatcatcca	1680
cttaccatcg	tcacctgagg	aattaccaca	gatctgactg	aactatctaa	catcctcagc	1740
agagactggg	agggcttcag	cctcagtatg	tcactctcaa	agagagaaga	atgttgcaag	1800
taaattgtac	tgtcccaata	atgatataac	atgcttgtgg	attgccactt	ttatgttttg	1860
ttttgttttg	ttwtttatkt	tgtgtgtgtg	tatgtaattt	tttgtctgta	tttccatatt	1920
tccacagcat	aagttattag	aatactttgc	tgtaattctt	tgagttgctt	cttgcttttta	1980
gacagtgtct	ttctgggttg	cagctttata	cacctgtctt	tctggcacta	gagtttccaa	2040
acattttctg	atctccactt	ttattttcta	cagtgttctt	gacagaagcc	tggtattccc	2100
tctgacattt	tctacatgtt	ggggttttca	tccaagtctt	taggggtgca	agttaaatgc	2160
attgcctctt	cagacatctc	atgccatgtc	tactgcttac	agttcaagaa	tatttctcta	2220
cattactaga	acgacgttca	aagtggaata	ataaataaat	aaataatcaa	caatt	2275

<210> 4

<211> 2268

5

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 4

cacagtgcct	ccctgggctt	cttggcatca	cccttgaagt	tcactggaca	aagaggtagg	60
gtggaggagt	aggtaaactt	cccttcctag	tggtcgtgaa	tgtcttttac	agtacatcca	120
tcaactgtta	gcattttcat	aaagtcacaa	aacagatact	aaactgctat	agttgaatct	180
ttcacaccat	tgtcaccaca	atggcttcac	agcaggcacc	agcaaaaagac	cttcagacca	240
acaattttaga	gtttactcca	tctcatagtt	ctgggtgtgca	gtgggtagaa	gacatctcta	300
actcaccaag	tgctcagcta	aacttttctc	caagtaacaa	tggtcgtctg	gcaactcagg	360
agctgcaaag	tctctggaag	atgttcaact	cctgggtgca	gccagaaaag	cagactaagg	420
agcagatgat	ttctcaactg	gtcttgaggc	agtttctcct	cattggggcac	tgcaaggaca	480
agtatgcttt	gacagagaag	tggaaagcca	gtggtagcga	tatgaggaga	ttcatggaga	540
gtctgactga	tgagtgcctg	aagcctcctg	tcattgggtcca	tgtttcaatg	caaggacaag	600
aagctctctt	ttctgaaaac	atgccattat	aaagaagtcac	caagcttttg	aaacaacagc	660
aatctgcaac	aaggccaaca	ccagataatg	agcagatgcc	agtagacacc	acacaagata	720
gattattggc	cacaggacaa	gaaaacagtg	aaaatgaatg	caacaactct	tgtaatgcta	780
ctgaagcaaa	tggttggtgaa	agctgtagtg	gaaatgaaat	ggactccctt	cttattatcc	840
agaaagaaca	gcaccctgag	catgaagagg	ggaatgttgt	ttttcaattc	cctcttgatg	900
ccagaagagc	aagtcaaggc	aactccagtc	atcatgtaga	cttccggagt	gctccgactc	960
ctgcggtatg	ccccatggag	gaacaaccaa	aggatttatc	cagagaaaac	atctctgagg	1020
acaagaacaa	ttgctataac	acttccagga	atgcagctac	tcaagtatat	agaagtgata	1080
atattcccag	tgaaaagtc	gactcccttt	ccattcaaca	gagaatatat	cattctgagc	1140
ctgaggaggg	agatattcct	tatggagttc	ctcaggattc	tacaagagca	agtcaaggaa	1200
catctacatg	cttgcaagag	tcacttgagg	aatgtttttc	tgaaaaagac	cctagggagg	1260
taccaggggt	ggagtctagg	caagaggagc	ctatctctga	tcctgtcctt	cttggttaagg	1320
atcatgaggc	aaacttacca	tgtgaaagtc	atcaaaagag	attccgtaga	gatgccaaac	1380
tattcaagtg	tgaagaatgt	tctaggatgt	tcaaaccatgc	caggagcctt	tcgtcccacc	1440
agagaactca	cctgaataag	aagagtgaat	tgctttgtgt	cacctgtcag	aaaatgttca	1500
aacgagtctc	tgaccgccga	acccatgaga	tcatacacat	gccagaaaag	cctttcaagt	1560
gcagcacatg	tgaaaagtcc	ttcagccaca	agaccaacct	gaagtctcat	gagatgattc	1620
acacaggaga	aatgccttat	gtctgttccc	tatgtagccg	tcgctttcgc	caatcatcca	1680
cttaccatcg	tcacctgagg	aattaccaca	gatctgactg	aagtatctaa	catcctcagc	1740
agagactggg	agggcttcag	cctcagtatg	tcactctcaa	agagagaaga	atgttgcaag	1800
taaattgtac	tgtcccaata	atgatataac	atgcttgtgg	attgccactt	ttatgttttg	1860
ttttttattg	tgtgtgtgtg	tgtatgtaat	tttttgtctg	taatttccat	agttccacag	1920
cataagttat	tagaataact	tgtctgtaat	tcttgagttg	cttcttgctt	ttagacagtg	1980
tctttctggg	tggtcagctt	atacacctgt	ctttctggga	ctagagtttc	caacattttt	2040
ctgatctcca	cttttattct	ctacagtggg	cctgacagag	gcctgccatt	ccctctgaca	2100
ttttttaaca	tggtgggggt	tcattcccaag	tcttaggggt	gcaagttaaa	tgcatgtcct	2160

10

cttcagacat ctcatgtcat gtctactgct tacagttcaa gaatatttct ctacattact 2220
agaatgacgt tcaaagtgga ataataaata aaaaaataat caacaatt 2268

<210> 5
<211> 1774
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 5

cacagtgcct ccctgggctt cttggcatca ccattgaagt tcaactggaga aagaggtgag 60
gtggagaagt aggtaaaactt ccctttcttg tggctcttgaa tgtcttttac agtacatccg 120
tcaactgtta gcatttttctt aaagtcacaa aacagatact aaactgctat agttgaatct 180
ttcagaccat tgtcaccaca atggcttcac agcaggcacc agcaaaagac cttcagacca 240
acaatttaga gtttactcca actgatagtt ctgggtgtgca gtgggcagaa gacatctcta 300
actcaccaag tgctcagcta aacttttccc caagtaacaa tggctgctgg gcaactcagg 360
agctgcaaag tctctggaag atgttcaact cctgggtgca gccagaaaag cagactaagg 420
agcagatgat ttctcaactg gtcttgaggc agtttctcct cactgggcac tgcaaggaca 480
agtatgcttt gacagagaag tggaaagcca gtggtagcga tatgaggaga ttcatggaga 540
gtctgactga tgagtgttg aagcctcctg tcatggtcca tgtttcaatg caaggacaag 600
aagccctctt ttctgaaaac atgccattaa aagaagtcac caagcttttg aaacaacagc 660
aatctgcaac aaggccaata ccagataatg agcagatgcc agtagacacc acacaagata 720
gattattggc cacaggcaag aaaacagtga aaatgaatgc aacacctctt gcaatgctac 780
tgaagtaaat gttggtgaaa gctgtagtgg aaatgaaaag gactcccttc ttattaccca 840
gaaagaacaa aaccatgagc atgaagaggg gaatgttgtt tgtcaattcc ctctggtgac 900
cagaagagca agtcaagaca cctccagtca tcatgtagac ttcccgagtg ctctgactcc 960
tgcagatgtc cccatggagg aacaaccaat ggattttatcc agagaaaaca tctctgagga 1020
caagaacaat tgctataaca cttccaggaa tgcagctact caagtatata atggtgataa 1080
tattcccagg aacaagacag actccctttt cattaacaag agaatatatc atcctgagcc 1140
tgaggtggga gatattcctt atggagttcc tcaggattct acaagagcaa gtcaaggaac 1200
atctacatgc ctgcaagagt cacttgggga atgtttttct gaaaaagacc caagggaggt 1260
accagggttg cagtctaggc aagagcagcc tatctctgat cctgtccttg gtaagaatca 1320
tgaggcaaac ttaccatgtg aaagtcatca aaagagattc catagagatg ccaaactata 1380
caagtgtgaa gaatgttcta ggatgttcaa acatgccagg agcctttcat cccaccagag 1440
aactcacctg aataagaaga gtgaattgct ttgcatcacc tgtcagaaaa tattcaaacg 1500
agtttctgac cttcgaaccc atgagatcat acacatgtca gaaaagcctt tcaagtgcag 1560
cacatgtgaa aagtccttca gccacaagac caacctgaag tatcatgaga tgattcacac 1620
aggagaaatg ctttatgtct gttccctatg tagccgtcgc tttcgccaat catccactta 1680
ccatcgtcac ctgaggaatt accacagatc tgactgaagt atctaacatc ctcagcagag 1740
actggtaggg cttcagcctc agtatgtcat cttc 1774

<210> 6
<211> 2273
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 6

cacagtgcct	ccctgggctt	cttggcatca	cccttgaagt	tacttgagga	aagaggtgag	60
gtggagggaat	aggtaaactt	tccttcctag	tggtccttgaa	tgtctttttac	agtacatcca	120
tcaactgtta	gcattttcgt	aaagtacaaa	aacagatatt	aaactactat	agttgaatct	180
ttcacaccat	tgtcaccaca	atggcttcac	agcaggcacc	agcaaaagac	cttcagacca	240
acaattttaga	gtttactcca	actgatagtt	ctgggtgtgca	gtgggcagaa	gacatctcta	300
actcaccaag	tgctcagcta	aacttttccc	caagtaacaa	tggctgctgg	gcaactcagg	360
agctgcaaag	tctctggaag	atgttcaact	cctgggtgca	gccagaaaag	cagactaagg	420
agcagatgat	ttctcaactg	gtcttgagac	agtttctcct	cactgggcac	tgcaaggaca	480
agtatgcttt	gactgagaag	tggaaagcca	gtggtagcga	tatgaggaga	ttcatggaga	540
gtctgactga	tgagtgcttg	aagcctcctg	tcatgggtcca	tgtttcaatg	caaggacaag	600
aagccctctt	ttctgaaaac	atgccattaa	aagaagtcac	caagcttttg	aaacaacagc	660
aatctgcaac	aaggccaaca	ccagataatg	agcagatgcc	agtagacacc	acacaagata	720
gattattggc	cacaggacaa	gaaaacagtg	aaaatgaatg	caacaactct	tgtaatgcta	780
ctgaagcaaa	tgttggtgaa	agctgtagtg	gaaatgaaat	ggactccctt	cttattatgc	840
agaaagaaca	gcaccctgag	catgaagagg	ggaatgttgt	ttgtcaattc	cctcatgggtg	900
ccagaagagc	aagtcaaggc	acccccagtc	atcatgtaga	cttccccgagt	gctccgacta	960
ctgccgatgt	ccccatggag	gaacaaccaa	aggatttatc	cagagaaaac	atctctgagg	1020
acaagaacaa	ttgctataac	acttccagaa	atgcagctac	tcaagtatat	agtgggtgata	1080
atattcccag	gaacaagtca	gactcccttt	tcattaacaa	gagaatatat	catcctgagc	1140
ctgaggtggg	agatattcct	tatggagttc	ctcaggattc	tacaagagca	agtcaaggaa	1200
catctacatg	cctgcaagag	tcacttgggg	aatgtttttc	tgaaaaagac	cctagggagg	1260
taccaggggt	gcagtctagg	caagagcagc	ttatctctga	tcctgtcctt	cttggtaaga	1320
atcatgaggc	aaacttacca	tgtgaaagtc	atcaaaaagag	attctgtaga	gatgccaaac	1380
tatacaagtg	tgaagaatgt	tctaggatgt	tcaaacatgc	caggagcctt	tcatcccacc	1440
agagaactca	cctgaataag	aagagtgaat	tgctttgtgt	cacctgtcag	aaaatgttca	1500
aacgagtcct	tgaccgccga	acccatgaga	tcatacacat	gccagaaaag	cctttcaagt	1560
gcagcacatg	tgaaaagtcc	ttcagccaca	agaccaacct	gaagtctcat	gagatgattc	1620
acacaggaga	aatgccttat	gtctgttccc	tatgtagccg	tcgctttcgc	caatcatcca	1680
cttaccatcg	tcacctgagg	aattaccaca	gatctgactg	aactatctaa	catcctcagc	1740
agagactggg	agggcttcag	cctcagtatg	tcactttcaa	agagagaaga	atgttgcaag	1800
taaattgtac	tgtcccaata	atgatataac	atgcttgtgg	attgccactt	ttatgttttg	1860
ttttgttttt	tattttgtgt	gtgtgtgtat	gtaatttttt	gtctgtattt	ccatagtccc	1920
acagcataag	ttattagaat	actttgctgt	taattcttga	gttgcttctt	gcttttagac	1980
agtgtctttc	tggttgacag	ctttataaac	ctgtctttct	ggcactagag	tttccaaaca	2040
ttttctgata	tccactttta	ttctctacag	tgttcttgac	agaagcctgg	cattccctct	2100
gacatttttc	tacatgttgg	ggttttcatc	ccaagtctta	gggttgcaag	ttaaatgcat	2160
tgctcttca	gacatctcat	gccctgtcta	ctgcttacag	ttcaagaata	tttctctaca	2220
ttactagaac	gacattcaaa	gtggaataat	aaataaataa	ataatcaaca	att	2273

5 <210> 7
 <211> 2260
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 7

ccttgtaatt	cataaatctc	tgaaaactta	aaagtttgag	caaaagtttg	tcatgtttct	60
atgagtaatt	tataataaaa	cttgatcaga	atgtgtgaga	ctaacgtttg	tctttatatt	120
ttcctttttt	tttttttttt	ttttgagaca	cagtctcgct	ctgtcgtcca	ggctggagtg	180
ccgtggcgta	atctcggctc	actgcaacct	ctgcctcctg	gattcaaaca	attcttctgc	240
ctcagcctcc	tgagtagctg	ggattacagg	accagtgatg	gtatagaaca	ctgtattaga	300
gacatggagc	tggggctgga	tgaagattcc	atcagtaatt	caatcaacag	acaagtgtta	360
tccaatcacg	tctttaaatc	aatcactgac	atggagctgg	ggctggatga	agattccatc	420
agtaattcaa	tcaacagaca	agtgttatcc	aatcacgtct	ttaaatcaat	cactgatccc	480
agcccctata	aaagggagca	gccttaggag	gcacatcaga	taaacccagt	gtggaaaagct	540
agtacacat	cagctcagtg	ttcggcccg	gattacccag	tcaaccaagg	agcttgacgt	600
tttaaagaat	ccaccaactg	ttgaaacaaa	tccctagaga	cacaaggcaa	gagactgaat	660
catcaaagta	aagtctctct	gagaattatt	gctaagaatg	gcttttagatc	taagaaccat	720
atttcagtg	gaaccatccg	agaataatct	tggatcagaa	aattcagcgt	ttcaacaaag	780
ccaaggacct	gctgttcaga	gagaagaagg	gatttctgag	ttctcaagaa	tgggtgctcaa	840
ttcatttcaa	gacagcaata	attcatatgc	aaggcaggaa	ttgcaaagac	tttataggat	900
ctttcactca	tggctgcaac	cagaaaagca	cagcaaggat	gaaattattt	ctctattagt	960
cctggagcag	tttatgattg	gtggccactg	caatgacaaa	gccagtgtga	aagagaaatg	1020
gaaatcaagt	ggcaaaaact	tggagagatt	catagaagac	ctgactgatg	acagcataaa	1080
tccacctgcc	ttagtccacg	tccacatgca	gggacaggaa	gctctctttt	ctgaggatat	1140
gcccttaaga	gatgtcattg	ttcatctcac	aaaacaagtg	aatgccccaa	ccacaagaga	1200
agcaaacatg	gggacaccct	cccagacttc	ccaagatact	tccttagaaa	caggacaagg	1260
atatgaagat	gaacaagatg	gctggaacag	ttcttcgaaa	actactcgag	taaataaaaa	1320
tattactaat	caaggcaatc	aaatagtttc	cctaatactc	atccaggaag	agaacggtcc	1380
taggcctgaa	gagggagggtg	tttcttctga	caaccatac	aactcaaaaa	gagcagagct	1440
agtcactgct	agatctcagg	aagggtccat	aaatggaatc	actttccaag	gtgtccctat	1500
ggtgatggga	gcagggtgta	tctctcaacc	agagcagtc	tcccctgagt	ctgcccttac	1560
ccaccagagc	aatgagggaa	attccacatg	tgaggtagat	cagaaaggat	cccatggagt	1620
ccaaaaatca	tacaaatgtg	aagaatgccc	caagggtctt	aagtatctct	gtcacttatt	1680
agctcaccag	agaagacaca	ggaatgagag	gccatttggt	tgtcccagat	gtcaaaaagg	1740
cttcttccag	atatcagacc	tacgggtgca	tcagataatt	cacacaggaa	agaagccttt	1800
cacatgcagc	atgtgtaaaa	agtccttcag	ccacaaaacc	aacctgcggt	ctcatgagag	1860
aatccacaca	ggagaaaagc	cttatacatg	tcccttttgt	aagacaagct	accgccagtc	1920
atccacatac	caccgccata	tgaggactca	tgagaaaatt	accctgccaa	gtgttccctc	1980
cacaccagaa	gcttcctaag	ctgctggtct	gataatgtgt	ataaatatgt	atgcaagtat	2040
gtatattcct	atagtattta	tctacttagg	atataagata	taatctcctg	attatgcttt	2100
caatttattg	tcttgcttca	ttaaaatgta	aggctaagga	gagcatggaa	tttgtcagtt	2160
ttgttcacta	aagtattcca	agtgggtggg	aaagtggaac	atttccaaga	accaataaat	2220
ttctgttgaa	taaatgaatg	aatccaaaaa	aaaaaaaaaa			2260

5 <210> 8
 <211> 1302
 <212> ADN
 <213> Canis familiaris

10 <400> 8

atggcttcag	atatcagaat	atcatttcag	ggagaaccat	ctatgaatga	tcctgggtca	60
gaaaacctag	agcataaact	tagccaagga	ccagccattc	aggaggaaga	cgagatctat	120
gagttcccaa	gactcagct	cactttattg	caaaacagta	actcaagtgc	aaggcaggaa	180
ctgcaaaatc	tctataagtt	atttcactca	tggctgcaac	cagagaaaca	cagcaaggat	240
gagattatth	ctcatctggt	cttgggaacag	tttatgatca	atggccactg	cagtgcagg	300
tccatgttga	aaaagaaatg	gaatgcaagt	ggcaggaacc	tggagaaatt	catggaagat	360
ctgactgatg	atggcatgaa	gctacctgga	ttagtccacg	tccacatgaa	gggccaggac	420
gccctcttht	ctgagaatat	gcccttaaga	gaagtcacgc	ttcatttcat	gaaacaattg	480
tcagcaggaa	ccccaacaga	agagaacatg	gggacaccct	cctggacttc	ccaagatact	540
tccctggaaa	caggacaagg	tgagtgggat	aaagcaaattg	gctacaacat	ttatcacaat	600
gcggtacta	ctagtcaagg	caatgcagta	ccttcctgt	tcattgtcca	tgaggaggac	660
tgctctcacc	ctgaagagga	cagtgtttct	ttgaaggatc	tgctcagccc	tggaagaccg	720
ggtctaggta	cgtccaattc	ccaggaagg	tgcttgcagg	gacgcccata	tcaagatgtc	780
ctgatggagg	gggaccagg	gtttcactct	cggtcaaccg	cagtcacccc	tgaccctgtt	840
tctaccacc	aaaaaaccga	ggggaattcc	acatgtgggg	gacaccaaga	aagattccgt	900
gacgcccata	actcctacag	atgtgaaaaa	tgtcccagga	tcttttaggt	tttctctcag	960
ctaaaagccc	atcagagaag	acacaacaat	gagaggacat	tcatttgtgc	tgagtgtaac	1020
aaaggcttct	tccaagcgtc	agacctacac	gtgcatcaga	agattcacac	agaagagaag	1080
cctttcaggt	gcagcacatg	tgaaaaatcc	ttcagccaca	aaaccaacct	tctggcccat	1140
gagagaatcc	acacgggtga	gaagccctat	gtatgtgcgc	tttgccagag	aagctaccgc	1200
cagtcaccca	cctaccaccg	ccacctgagg	actcaccaga	aaattgccgt	caaaggtact	1260
ccttccacat	cagaagcttc	ctcagctgta	gcctcagtg	aa		1302

<210> 9
 <211> 1251
 <212> ADN
 <213> Bos taurus

<400> 9

atggatttag	gtttcagagc	atcatttcag	catgaaccat	ccaatgagga	cccaaagtca	60
gcaaatacag	gctttatccc	cagtcgagga	cccactctgc	aaacagcaga	ggatatctct	120
cagttgcaaa	acactcagcc	cggcttattg	caaaatggta	ataactcacg	tgcaaggcag	180
gaactgcaaa	gactctataa	gtcatttcac	ttatggctgc	agccagaaaa	acacagcaag	240
catgaaatta	tttttcaact	tgccttgga	caatttatga	tcaataagca	ctgcagtga	300
aagtctactt	tgaagagaga	atggaaagca	agtgggtggag	acctggagaa	attcacagaa	360
gacctgcatg	atgactgcat	aaagctacct	gatttgggtcc	atgtccactt	gcagggggcag	420
gaagccctct	tttcagaaaa	tatgtcctta	aaagaaatca	tctttcatct	aaccaatcag	480
ttgtcaacag	gaggggtgaa	catgggaact	ccgtcctgga	ccatgcaaga	tacatccctg	540
gaaacaggac	aaagaaatga	aggtaaagaa	aatgatggca	acatttctgt	gaaaagtgc	600
agtattacta	gtccaagcaa	tcagataacct	tccctaataca	ttgtccaaga	agagaatcac	660
ctgaggctgg	agaaggagg	tgthttctctg	gagaatccac	ggaactccag	aagaggagca	720
ggcccaggcc	cctccaggcc	tcaggatgga	tccctgaaag	gaccctcctc	tcaagatgtc	780
ctcatggaag	tggaacgaga	ccaggtcacc	cctgggcctg	tttctaccct	ccagagctct	840
gaggggactt	ctgcacgtgg	gaaacaccag	gaaagatccc	tcagagcccc	agaagtatac	900
agatgtgaga	gatgtcccaa	gaccttcagg	tattcctctc	ggttcagagt	tcaccagaaa	960
agacacgata	atgagagaac	atatatttgt	gccgagtgtg	gcaaaggctt	ctttcaggcc	1020
tcagacctcc	atgtgcatca	gaggattcat	acaggagaga	agccctttgt	gtgcagcaca	1080
tgtgaaatgg	ccttcaccca	caaaaccaac	cttcgggctc	acgagagaac	ccacacggga	1140
gagaagccct	atgagtgttc	cctctgccag	agacgcttcc	gccagtcctc	cacctaccac	1200
cgccatctta	ggtttcacca	gaaaactacc	ctcaaaagtg	ctccacacta	a	1251

<210> 10
 <211> 1713
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

<400> 10

```

atggcttttag atctcagaat ctcattttcaa ggtgaaccat ccaggaatga tcctgggtca 60
gaaaatcatg agtttaaatcc ccgtcaagta cctgctgtcc aggatgggga gaggatctcc 120
aagttcccga gcaactcaaca cagcttattt caaaatggca agaattcatg tgcaaggcag 180
gaactgcaaa gactctataa gttattttcac tcctgggtac agccagaaaa acacagcaag 240
gatgaaatga tttctcgttt ggtcctggag caatttatga tcaatggcta ctgcagtgc 300
aggtccatgt tgaaagagaa atgggaatca agtggcagaa acctggagaa attcatggaa 360
gatctgactg atgatggcat gaagccacct ggcttagtcc acgtctgcat gcaggggcag 420
gaagctctct tttctgagaa tatgccctta agagaagtca tagttcacct caggaaacag 480
ttctcaacag gaacccaaac tggagagaac atgggggacc ctttccagac tcccaaagat 540
cattctcttg aaacagaaca aggagatgaa gacaaagaaa atggtggcaa catatctttg 600
aaaacttctg aagtaaatga cagtatgact agtcaaggca atcaaacacc ttccctactc 660
atcatccagg gagagaaccg tcctgggcct ggagaggag gtgttccttt ggagaatcca 720
ctcagctcca gaagagcagg tctaggcagc tgcaggtccc aggaagagtc cctgaaagga 780
cccccttacc aagatgtcct tatagagggt agaccagggt ttctctcccc gccaaaccag 840
gttacgcctg agcgtgttcc taccaccagg agcattgagg gaaactcagc atgtggggga 900
caccaagaaa gatcccaggg agcccccaaa tcatacaaat gtgagaagtg tcccaggatc 960
tttaggtatc tgtctcggtt aaaagcccac caaagaagac acaataatga gaggacattt 1020
atgtgtggcc agtgtgacaa aggttctctc caggcatcag acctacgcat gcatcagaag 1080
attcacacag gagagaaacc tttcaagtgc agcacatgtg aaatgtcctt cagccacaaa 1140
accaaccttc gggctcatga gagaatccac acaggggaga agccctatgt gtgttccttt 1200
tgccagagaa gctaccgcca gtcattccacc taccaccgcc acctgaggac tcaccagaaa 1260
attgccttca aaagtgttcc ctctaggggg ctgtggcagc ataccagttc atggatcccc 1320
acacagcaga ttcccacaac tgtaagagga ggtgaggaca gcatgaccgg aaaacacttt 1380
tgggctcttg cccatgggag ggcccaacat gccatagtgg ccttgccctg ggaaatgctc 1440
tacactgagt ggcgtgggt cccctccacc ctagcacagt gcaggcaaga aggtgccctg 1500
cccgctcaga aggtgcccct gtctgcagag cacagtagcc agaaggatcc acagagtggg 1560
ggctcagccc ccgcatgggt gccctacacc cttagtgtag cgcaggcaag aaggcaccct 1620
gccactcag aaggtacccc aaccacacaga gcatggcagc ccacaggaac catcaagtgg 1680
cggctcagcc tctacatagc ctgcagcagc taa 1713

```

<210> 11
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 11

```

Met Ala Ser Gln Gln Ala Pro Ala Lys Asp Leu Gln Thr Asn Asn Leu
1          5          10          15
Glu Phe Thr Pro Thr Asp Ser Ser Gly Val Gln Trp Ala Glu Asp Ile
          20          25          30
Ser Asn Ser Pro Ser Ala Gln Leu Asn Phe Ser Pro Ser Asn Asn Gly
          35          40          45
Cys Trp Ala Thr Gln Glu Leu Gln Ser Leu Trp Lys Met Phe Asn Ser
50          55          60
Trp Leu Gln Pro Glu Lys Gln Thr Lys Glu Gln Met Ile Ser Gln Leu
65          70          75          80
Val Leu Glu Gln Phe Leu Leu Thr Gly His Cys Lys Asp Lys Tyr Ala
          85          90          95
Leu Thr Glu Lys Trp Lys Ala Ser Gly Ser Asp Met Arg Arg Phe Met
100          105          110
Glu Ser Leu Thr Asp Glu Cys Leu Lys Pro Pro Val Met Val His Val
115          120          125
Ser Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe Ser Glu Asn Met Pro Leu Lys
130          135          140
Glu Val Ile Lys Leu Leu Lys Gln Gln Gln Ser Ala Thr Arg Pro Thr
145          150          155          160
Pro Asp Asn Ala Gln Met Pro Val Asp Thr Thr Gln Asp Arg Leu Leu
          165          170          175
Ala Thr Gly Gln Glu Asn Ser Glu Asn Glu Cys Asn Thr Ser Cys Asn

```

			180					185					190			
Ala	Thr	Glu	Gly	Asn	Val	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Gly	Asn	Glu	Met	Asp	
		195					200					205				
Ser	Ser	Leu	Ile	Ile	Gln	Lys	Glu	Gln	Tyr	Pro	Glu	His	Glu	Glu	Gly	
	210					215					220					
Asn	Val	Val	Cys	Gln	Phe	Pro	Leu	Asp	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	
225					230				235						240	
Thr	Ser	Ser	His	His	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Asp	
				245					250					255		
Val	Pro	Met	Glu	Glu	Gln	Pro	Lys	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser	
		260						265					270			
Glu	Asp	Lys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Asn	Thr	Ser	Arg	Asn	Ala	Ala	Thr	Lys	
		275					280					285				
Val	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Pro	Arg	Lys	Lys	Thr	Asp	Ser	Leu	Ser	
	290					295					300					
Ile	Asn	Lys	Arg	Ile	Tyr	His	Pro	Glu	Pro	Glu	Val	Gly	Asp	Ile	Pro	
305					310					315					320	
Tyr	Gly	Val	Pro	Gln	Asp	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Thr	Ser	Thr	
				325					330					335		
Cys	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Cys	Phe	Ser	Glu	Lys	Asp	Pro	Arg	
			340					345					350			
Glu	Val	Pro	Gly	Leu	Gln	Ser	Arg									
		355					360									

<210> 12
<211> 195
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

[illegible]

<210> 13
<211> 506
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 13

Met	Ala	Ser	Gln	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Asp	Leu	Gln	Thr	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	
Glu	Phe	Thr	Pro	Thr	Asp	Ser	Ser	Gly	Val	Gln	Trp	Ala	Glu	Asp	Ile
			20					25					30		
Ser	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Pro	Ser	Asn	Asn	Gly
		35					40					45			
Cys	Trp	Ala	Thr	Gln	Glu	Leu	Gln	Ser	Leu	Trp	Lys	Met	Phe	Asn	Ser
	50					55					60				
Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Lys	Glu	Gln	Met	Ile	Ser	Gln	Leu
65					70					75					80
Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	His	Cys	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ala
				85					90					95	
Leu	Thr	Glu	Lys	Trp	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Asp	Met	Arg	Arg	Phe	Met
			100					105					110		
Glu	Ser	Leu	Thr	Asp	Glu	Cys	Leu	Lys	Pro	Pro	Val	Met	Val	His	Val
		115					120					125			
Ser	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Lys
	130					135					140				
Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Gln	Gln	Ser	Ala	Thr	Arg	Pro	Thr
145					150					155					160
Pro	Asp	Asn	Glu	Gln	Met	Pro	Val	Asp	Thr	Thr	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu
				165					170					175	
Ala	Thr	Gly	Gln	Glu	Asn	Ser	Glu	Asn	Glu	Cys	Asn	Asn	Ser	Cys	Asn
			180					185					190		
Ala	Thr	Glu	Ala	Asn	Val	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Gly	Asn	Glu	Met	Asp
		195				200						205			
Ser	Leu	Leu	Ile	Ile	Gln	Lys	Glu	Gln	His	Pro	Glu	His	Glu	Glu	Gly
	210					215					220				
Asn	Val	Val	Cys	Gln	Phe	Pro	His	Gly	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly
225					230					235					240
Thr	Pro	Ser	His	His	Val	Asp	Phe	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ala	Asp
			245						250					255	
Val	Pro	Met	Glu	Gln	Pro	Lys	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser	
			260				265					270			
Glu	Asp	Lys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Asn	Thr	Ser	Arg	Asn	Ala	Ala	Thr	Gln
		275					280					285			
Val	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Pro	Arg	Asn	Lys	Ser	Asp	Ser	Leu	Phe
	290					295				300					
Ile	Asn	Lys	Arg	Ile	Tyr	His	Pro	Glu	Pro	Glu	Val	Gly	Asp	Ile	Pro
305					310					315					320
Tyr	Gly	Val	Pro	Gln	Asp	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Thr	Ser	Thr
			325						330					335	
Cys	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Gly	Glu	Cys	Phe	Ser	Glu	Asn	Asp	Pro	Arg
			340					345					350		
Glu	Val	Pro	Gly	Leu	Gln	Ser	Arg	Gln	Glu	Gln	Pro	Ile	Ser	Asp	Pro
		355					360					365			
Val	Leu	Leu	Gly	Lys	Asn	His	Glu	Ala	Asn	Leu	Pro	Cys	Glu	Ser	His
	370					375					380				
Gln	Lys	Arg	Phe	Cys	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Tyr	Lys	Cys	Glu	Glu	Cys
385					390					395					400
Ser	Arg	Met	Phe	Lys	His	Ala	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser	His	Gln	Arg	Thr
				405					410					415	
His	Leu	Asn	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Cys	Val	Thr	Cys	Gln	Lys	Met
			420					425					430		
Phe	Lys	Arg	Val	Ser	Asp	Arg	Arg	Thr	His	Glu	Ile	Ile	His	Met	Pro
		435					440					445			
Glu	Lys	Pro	Phe	Lys	Cys	Ser	Thr	Cys	Glu	Lys	Ser	Phe	Ser	His	Lys
	450					455					460				
Thr	Asn	Leu	Lys	Ser	His	Glu	Met	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Met	Pro	Tyr
465					470					475					480
Val	Cys	Ser	Leu	Cys	Ser	Arg	Arg	Phe	Arg	Gln	Ser	Ser	Thr	Tyr	His

Arg His Leu Arg Asn Tyr His Arg Ser Asp
500 505

<210> 14
<211> 506
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

10

Met	Ala	Ser	Gln	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Asp	Leu	Gln	Thr	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	
Glu	Phe	Thr	Pro	Ser	His	Ser	Ser	Gly	Val	Gln	Trp	Val	Glu	Asp	Ile
			20					25					30		
Ser	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Pro	Ser	Asn	Asn	Gly
		35					40					45			
Cys	Trp	Ala	Thr	Gln	Glu	Leu	Gln	Ser	Leu	Trp	Lys	Met	Phe	Asn	Ser
	50					55					60				
Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Lys	Glu	Gln	Met	Ile	Ser	Gln	Leu
65					70					75					80
Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	His	Cys	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ala
				85					90					95	
Leu	Thr	Glu	Lys	Trp	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Asp	Met	Arg	Arg	Phe	Met
			100					105					110		
Glu	Ser	Leu	Thr	Asp	Glu	Cys	Leu	Lys	Pro	Pro	Val	Met	Val	His	Val
		115					120					125			
Ser	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Lys
	130					135					140				
Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Gln	Gln	Ser	Ala	Thr	Arg	Pro	Thr
145					150					155					160
Pro	Asp	Asn	Glu	Gln	Met	Pro	Val	Asp	Thr	Thr	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu
				165					170					175	
Ala	Thr	Gly	Gln	Glu	Asn	Ser	Glu	Asn	Glu	Cys	Asn	Asn	Ser	Cys	Asn
			180					185					190		
Ala	Thr	Glu	Ala	Asn	Val	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Gly	Asn	Glu	Met	Asp
	195					200						205			
Ser	Leu	Leu	Ile	Ile	Gln	Lys	Glu	Gln	His	Pro	Glu	His	Glu	Glu	Gly
	210					215					220				
Asn	Val	Val	Phe	Gln	Phe	Pro	Leu	Asp	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly
225					230				235						240
Asn	Ser	Ser	His	His	Val	Asp	Phe	Arg	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Asp
			245					250						255	
Val	Pro	Met	Glu	Glu	Gln	Pro	Lys	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser
			260					265					270		
Glu	Asp	Lys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Asn	Thr	Ser	Arg	Asn	Ala	Ala	Thr	Gln
		275					280				285				
Val	Tyr	Arg	Ser	Asp	Asn	Ile	Pro	Arg	Lys	Lys	Thr	Asp	Ser	Leu	Ser
	290					295					300				
Ile	Asn	Lys	Arg	Ile	Tyr	His	Ser	Glu	Pro	Glu	Glu	Gly	Asp	Ile	Pro
305					310					315					320
Tyr	Gly	Val	Pro	Gln	Asp	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Thr	Ser	Thr
				325					330					335	
Cys	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Gly	Glu	Cys	Phe	Ser	Glu	Lys	Asp	Pro	Arg
			340					345					350		
Glu	Leu	Pro	Gly	Leu	Glu	Ser	Arg	Gln	Glu	Glu	Pro	Ile	Ser	Asp	Pro
		355					360					365			
Val	Phe	Leu	Gly	Lys	Asp	His	Glu	Ala	Asn	Leu	Pro	Cys	Glu	Ser	His
	370					375					380				
Gln	Lys	Arg	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Phe	Lys	Cys	Glu	Glu	Cys
385					390					395					400
Ser	Arg	Met	Phe	Lys	His	Ala	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser	His	Gln	Arg	Thr
				405					410					415	

```

His Leu Asn Lys Lys Ser Glu Leu Leu Cys Val Thr Cys Gln Lys Met
      420      425      430
Phe Lys Arg Val Ser Asp Arg Arg Thr His Glu Ile Ile His Met Pro
      435      440      445
Glu Lys Pro Phe Lys Cys Ser Thr Cys Glu Lys Ser Phe Ser His Lys
      450      455      460
Thr Asn Leu Lys Ser His Glu Met Ile His Thr Gly Glu Met Pro Tyr
465      470      475      480
Val Cys Ser Leu Cys Ser Arg Arg Phe Arg Gln Ser Ser Thr Tyr His
      485      490      495
Arg His Leu Arg Asn Tyr His Arg Ser Asp
      500      505

```

<210> 15
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 15

```

Met Ala Ser Gln Gln Ala Pro Ala Lys Asp Leu Gln Thr Asn Asn Leu
 1      5      10      15
Glu Phe Thr Pro Thr Asp Ser Ser Gly Val Gln Trp Ala Glu Asp Ile
      20      25      30
Ser Asn Ser Pro Ser Ala Gln Leu Asn Phe Ser Pro Ser Asn Asn Gly
      35      40      45
Cys Trp Ala Thr Gln Glu Leu Gln Ser Leu Trp Lys Met Phe Asn Ser
      50      55      60
Trp Leu Gln Pro Glu Lys Gln Thr Lys Glu Gln Met Ile Ser Gln Leu
      65      70      75      80
Val Leu Glu Gln Phe Leu Leu Thr Gly His Cys Lys Asp Lys Tyr Ala
      85      90      95
Leu Thr Glu Lys Trp Lys Ala Ser Gly Ser Asp Met Arg Arg Phe Met
      100      105      110
Glu Ser Leu Thr Asp Glu Cys Leu Lys Pro Pro Val Met Val His Val
      115      120      125
Ser Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe Ser Glu Asn Met Pro Leu Lys
      130      135      140
Glu Val Ile Lys Leu Leu Lys Gln Gln Gln Ser Ala Thr Arg Pro Ile
      145      150      155      160
Pro Asp Asn Glu Gln Met Pro Val Asp Thr Thr Gln Asp Arg Leu Leu
      165      170      175
Ala Thr Gly Lys Lys Thr Val Lys Met Asn Ala Thr Pro Leu Ala Met
      180      185      190
Leu Leu Lys
      195

```

<210> 16
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 16

```

Met Ala Ser Gln Gln Ala Pro Ala Lys Asp Leu Gln Thr Asn Asn Leu
 1      5      10      15
Glu Phe Thr Pro Thr Asp Ser Ser Gly Val Gln Trp Ala Glu Asp Ile
      20      25      30
Ser Asn Ser Pro Ser Ala Gln Leu Asn Phe Ser Pro Ser Asn Asn Gly
      35      40      45
Cys Trp Ala Thr Gln Glu Leu Gln Ser Leu Trp Lys Met Phe Asn Ser
      50      55      60
Trp Leu Gln Pro Glu Lys Gln Thr Lys Glu Gln Met Ile Ser Gln Leu

```

65					70					75					80
Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	His	Cys	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ala
				85					90					95	
Leu	Thr	Glu	Lys	Trp	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Asp	Met	Arg	Arg	Phe	Met
			100					105					110		
Glu	Ser	Leu	Thr	Asp	Glu	Cys	Leu	Lys	Pro	Pro	Val	Met	Val	His	Val
		115					120					125			
Ser	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Lys
	130					135					140				
Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Gln	Gln	Ser	Ala	Thr	Arg	Pro	Thr
145					150					155					160
Pro	Asp	Asn	Glu	Gln	Met	Pro	Val	Asp	Thr	Thr	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu
			165						170					175	
Ala	Thr	Gly	Gln	Glu	Asn	Ser	Glu	Asn	Glu	Cys	Asn	Asn	Ser	Cys	Asn
		180						185					190		
Ala	Thr	Glu	Ala	Asn	Val	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Gly	Asn	Glu	Met	Asp
	195					200						205			
Ser	Leu	Leu	Ile	Met	Gln	Lys	Glu	Gln	His	Pro	Glu	His	Glu	Glu	Gly
	210					215					220				
Asn	Val	Val	Cys	Gln	Phe	Pro	His	Gly	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly
225					230					235					240
Thr	Pro	Ser	His	His	Val	Asp	Phe	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ala	Asp
			245						250					255	
Val	Pro	Met	Glu	Gln	Pro	Lys	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser	
		260					265					270			
Glu	Asp	Lys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Asn	Thr	Ser	Arg	Asn	Ala	Ala	Thr	Gln
	275						280					285			
Val	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Pro	Arg	Asn	Lys	Ser	Asp	Ser	Leu	Phe
	290					295				300					
Ile	Asn	Lys	Arg	Ile	Tyr	His	Pro	Glu	Pro	Glu	Val	Gly	Asp	Ile	Pro
305					310					315					320
Tyr	Gly	Val	Pro	Gln	Asp	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Thr	Ser	Thr
			325						330					335	
Cys	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Gly	Glu	Cys	Phe	Ser	Glu	Lys	Asp	Pro	Arg
		340						345					350		
Glu	Val	Pro	Gly	Leu	Gln	Ser	Arg	Gln	Glu	Gln	Leu	Ile	Ser	Asp	Pro
	355						360					365			
Val	Leu	Leu	Gly	Lys	Asn	His	Glu	Ala	Asn	Leu	Pro	Cys	Glu	Ser	His
	370					375					380				
Gln	Lys	Arg	Phe	Cys	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Tyr	Lys	Cys	Glu	Glu	Cys
385					390					395					400
Ser	Arg	Met	Phe	Lys	His	Ala	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser	His	Gln	Arg	Thr
			405						410					415	
His	Leu	Asn	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Cys	Val	Thr	Cys	Gln	Lys	Met
		420						425					430		
Phe	Lys	Arg	Val	Ser	Asp	Arg	Arg	Thr	His	Glu	Ile	Ile	His	Met	Pro
	435						440					445			
Glu	Lys	Pro	Phe	Lys	Cys	Ser	Thr	Cys	Glu	Lys	Ser	Phe	Ser	His	Lys
	450					455					460				
Thr	Asn	Leu	Lys	Ser	His	Glu	Met	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Met	Pro	Tyr
465					470					475					480
Val	Cys	Ser	Leu	Cys	Ser	Arg	Arg	Phe	Arg	Gln	Ser	Ser	Thr	Tyr	His
			485						490					495	
Arg	His	Leu	Arg	Asn	Tyr	His	Arg	Ser	Asp						
			500					505							

<210> 17
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

Met Ala Leu Asp Leu Arg Thr Ile Phe Gln Cys Glu Pro Ser Glu Asn
 1           5           10           15
Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ser Ala Phe Gln Gln Ser Gln Gly Pro Ala
      20           25           30
Val Gln Arg Glu Glu Gly Ile Ser Glu Phe Ser Arg Met Val Leu Asn
      35           40           45
Ser Phe Gln Asp Ser Asn Asn Ser Tyr Ala Arg Gln Glu Leu Gln Arg
 50           55           60
Leu Tyr Arg Ile Phe His Ser Trp Leu Gln Pro Glu Lys His Ser Lys
 65           70           75           80
Asp Glu Ile Ile Ser Leu Leu Val Leu Glu Gln Phe Met Ile Gly Gly
      85           90           95
His Cys Asn Asp Lys Ala Ser Val Lys Glu Lys Trp Lys Ser Ser Gly
      100           105           110
Lys Asn Leu Glu Arg Phe Ile Glu Asp Leu Thr Asp Asp Ser Ile Asn
      115           120           125
Pro Pro Ala Leu Val His Val His Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe
      130           135           140
Ser Glu Asp Met Pro Leu Arg Asp Val Ile Val His Leu Thr Lys Gln
 145           150           155           160
Val Asn Ala Gln Thr Thr Arg Glu Ala Asn Met Gly Thr Pro Ser Gln
      165           170           175
Thr Ser Gln Asp Thr Ser Leu Glu Thr Gly Gln Gly Tyr Glu Asp Glu
      180           185           190
Gln Asp Gly Trp Asn Ser Ser Ser Lys Thr Thr Arg Val Asn Glu Asn
      195           200           205
Ile Thr Asn Gln Gly Asn Gln Ile Val Ser Leu Ile Ile Ile Gln Glu
      210           215           220
Glu Asn Gly Pro Arg Pro Glu Glu Gly Gly Val Ser Ser Asp Asn Pro
 225           230           235           240
Tyr Asn Ser Lys Arg Ala Glu Leu Val Thr Ala Arg Ser Gln Glu Gly
      245           250           255
Ser Ile Asn Gly Ile Thr Phe Gln Gly Val Pro Met Val Met Gly Ala
      260           265           270
Gly Cys Ile Ser Gln Pro Glu Gln Ser Ser Pro Glu Ser Ala Leu Thr
      275           280           285
His Gln Ser Asn Glu Gly Asn Ser Thr Cys Glu Val His Gln Lys Gly
      290           295           300
Ser His Gly Val Gln Lys Ser Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Pro Lys Val
 305           310           315           320
Phe Lys Tyr Leu Cys His Leu Leu Ala His Gln Arg Arg His Arg Asn
      325           330           335
Glu Arg Pro Phe Val Cys Pro Glu Cys Gln Lys Gly Phe Phe Gln Ile
      340           345           350
Ser Asp Leu Arg Val His Gln Ile His Thr Gly Lys Lys Pro Phe
      355           360           365
Thr Cys Ser Met Cys Lys Lys Ser Phe Ser His Lys Thr Asn Leu Arg
      370           375           380
Ser His Glu Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Pro Phe
 385           390           395           400
Cys Lys Thr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Thr Tyr His Arg His Met Arg
      405           410           415
Thr His Glu Lys Ile Thr Leu Pro Ser Val Pro Ser Thr Pro Glu Ala
      420           425           430
Ser

```

5 <210> 18
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 18

Met	Ala	Ser	Asp	Ile	Arg	Ile	Ser	Phe	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Met	Asn
1				5					10					15	
Asp	Pro	Gly	Ser	Glu	Asn	Leu	Glu	His	Lys	Leu	Ser	Gln	Gly	Pro	Ala
			20					25					30		
Ile	Gln	Glu	Glu	Asp	Glu	Ile	Tyr	Glu	Phe	Pro	Ser	Thr	Gln	Leu	Thr
		35					40					45			
Leu	Leu	Gln	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser	Ala	Arg	Gln	Glu	Leu	Gln	Asn	Leu
	50					55					60				
Tyr	Lys	Leu	Phe	His	Ser	Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Lys	Asp
65					70					75					80
Glu	Ile	Ile	Ser	His	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Met	Ile	Asn	Gly	His
				85					90					95	
Cys	Ser	Asp	Arg	Ser	Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Trp	Asn	Ala	Ser	Gly	Arg
			100					105					110		
Asn	Leu	Glu	Lys	Phe	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Gly	Met	Lys	Leu
		115					120					125			
Pro	Gly	Leu	Val	His	Val	His	Met	Lys	Gly	Gln	Asp	Ala	Leu	Phe	Ser
	130					135					140				
Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Arg	Glu	Val	Ile	Val	His	Phe	Met	Lys	Gln	Leu
145					150					155					160
Ser	Ala	Gly	Thr	Pro	Thr	Glu	Glu	Asn	Met	Gly	Thr	Pro	Ser	Trp	Thr
				165					170					175	
Ser	Gln	Asp	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Gln	Gly	Glu	Trp	Asp	Lys	Ala
			180					185					190		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Ile	Tyr	His	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Ser	Gln	Gly	Asn
	195						200					205			
Ala	Val	Pro	Ser	Leu	Phe	Ile	Val	His	Glu	Glu	Asp	Cys	Pro	His	Pro
	210				215						220				
Glu	Glu	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Ser	Pro	Gly	Arg	Pro
225					230					235					240
Gly	Leu	Gly	Thr	Ser	Asn	Ser	Gln	Glu	Gly	Cys	Leu	Gln	Gly	Arg	Pro
				245					250					255	
Tyr	Gln	Asp	Val	Leu	Met	Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Phe	His	Ser	Arg	Ser
			260					265					270		
Thr	Ala	Val	Thr	Pro	Asp	Pro	Val	Ser	Thr	His	Gln	Lys	Thr	Glu	Gly
	275						280					285			
Asn	Ser	Thr	Cys	Gly	Gly	His	Gln	Glu	Arg	Phe	Arg	Asp	Ala	Gln	Asn
	290					295					300				
Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Pro	Arg	Ile	Phe	Arg	Tyr	Phe	Ser	Gln
305					310					315					320
Leu	Lys	Ala	His	Gln	Arg	Arg	His	Asn	Asn	Glu	Arg	Thr	Phe	Ile	Cys
				325					330					335	
Ala	Glu	Cys	Asn	Lys	Gly	Phe	Phe	Gln	Ala	Ser	Asp	Leu	His	Val	His
			340					345					350		
Gln	Lys	Ile	His	Thr	Glu	Glu	Lys	Pro	Phe	Arg	Cys	Ser	Thr	Cys	Glu
	355						360					365			
Lys	Ser	Phe	Ser	His	Lys	Thr	Asn	Leu	Leu	Ala	His	Glu	Arg	Ile	His
	370					375					380				
Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Val	Cys	Ala	Leu	Cys	Gln	Arg	Ser	Tyr	Arg
385					390					395					400
Gln	Ser	Ser	Thr	Tyr	His	Arg	His	Leu	Arg	Thr	His	Gln	Lys	Ile	Ala
				405					410					415	
Val	Lys	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ala	Ser
			420					425					430		
Val															

5

<210> 19
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 19

```

Met Asp Leu Gly Phe Arg Ala Ser Phe Gln His Glu Pro Ser Asn Glu
 1      5      10      15
Asp Pro Lys Ser Ala Asn Thr Gly Phe Ile Pro Ser Arg Gly Pro Thr
      20      25      30
Leu Gln Thr Ala Glu Asp Ile Ser Gln Leu Gln Asn Thr Gln Pro Gly
      35      40      45
Leu Leu Gln Asn Gly Asn Asn Ser Arg Ala Arg Gln Glu Leu Gln Arg
 50      55      60
Leu Tyr Lys Ser Phe His Leu Trp Leu Gln Pro Glu Lys His Ser Lys
 65      70      75      80
His Glu Ile Ile Phe Gln Leu Ala Leu Glu Gln Phe Met Ile Asn Lys
      85      90      95
His Cys Ser Glu Lys Ser Thr Leu Lys Glu Lys Trp Lys Ala Ser Gly
      100      105      110
Gly Asp Leu Glu Lys Phe Thr Glu Asp Leu His Asp Asp Cys Ile Lys
      115      120      125
Leu Pro Asp Leu Val His Val His Leu Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe
 130      135      140
Ser Glu Asn Met Ser Leu Lys Glu Ile Ile Phe His Leu Thr Asn Gln
 145      150      155      160
Leu Ser Thr Gly Gly Val Asn Met Gly Thr Pro Ser Trp Thr Met Gln
      165      170      175
Asp Thr Ser Leu Glu Thr Gly Gln Arg Asn Glu Gly Lys Glu Asn Asp
      180      185      190
Gly Asn Ile Ser Val Lys Ser Asp Ser Ile Thr Ser Pro Ser Asn Gln
      195      200      205
Ile Pro Ser Leu Ile Ile Val Gln Glu Glu Asn His Leu Arg Leu Glu
 210      215      220
Glu Gly Gly Val Ser Leu Glu Asn Pro Arg Asn Ser Arg Arg Gly Ala
 225      230      235      240
Gly Pro Gly Pro Ser Arg Pro Gln Asp Gly Ser Leu Lys Gly Pro Ser
      245      250      255
Ser Gln Asp Val Leu Met Glu Val Glu Arg Asp Gln Val Thr Pro Gly
      260      265      270
Pro Val Ser Thr Leu Gln Ser Ser Glu Gly Thr Ser Ala Arg Gly Lys
      275      280      285
His Gln Glu Arg Ser Leu Arg Ala Pro Glu Val Tyr Arg Cys Glu Arg
 290      295      300
Cys Pro Lys Thr Phe Arg Tyr Ser Ser Arg Phe Arg Val His Gln Lys
 305      310      315      320
Arg His Asp Asn Glu Arg Thr Tyr Ile Cys Ala Glu Cys Gly Lys Gly
      325      330      335
Phe Phe Gln Ala Ser Asp Leu His Val His Gln Arg Ile His Thr Gly
      340      345      350
Glu Lys Pro Phe Val Cys Ser Thr Cys Glu Met Ala Phe Thr His Lys
      355      360      365
Thr Asn Leu Arg Ala His Glu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
 370      375      380
Glu Cys Ser Leu Cys Gln Arg Arg Phe Arg Gln Ser Ser Thr Tyr His
 385      390      395      400
Arg His Leu Arg Phe His Gln Lys Thr Thr Leu Lys Ser Ala Pro His
      405      410      415

```

5

<210> 20
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

10

<400> 20

Met Ala Leu Asp Leu Arg Ile Ser Phe Gln Gly Glu Pro Ser Arg Asn

1	5	10	15
Asp	Pro	Gly	Ser
20	Glu	Asn	His
Val	Gln	Asp	Gly
35	Glu	Arg	Ile
Leu	Phe	Gln	Asn
50	Gly	Lys	Asn
65	Tyr	Lys	Leu
80	Phe	His	Ser
95	Met	Ile	Asn
110	Ser	Ser	Gly
125	Met	Lys	Arg
140	Val	His	Val
155	Arg	Lys	Gln
170	Thr	Pro	Phe
185	Glu	Thr	Asp
200	Gly	Gln	Glu
215	Val	Ile	Val
230	Leu	Arg	Glu
245	Ala	Gly	Leu
260	Pro	Tyr	Gln
275	Asn	Gln	Thr
290	Ser	Thr	Gly
305	Lys	Met	His
320	Arg	Val	Leu
335	Gln	Thr	Arg
350	Pro	Val	Glu
365	His	Gln	Arg
380	Val	Leu	Val
395	Arg	Thr	Pro
410	His	Arg	Gly
425	Leu	Thr	Val
440	Pro	Thr	Gln
455	Val	Ala	Leu
470	Thr	Pro	Ser
485	Leu	Pro	Thr
500	Val	Pro	Leu

ES 2 827 248 T3

Ser	Gln	Lys	Asp	Pro	Gln	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Trp	Val	Pro
		515					520					525			
Tyr	Thr	Leu	Ser	Val	Ala	Gln	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Ala	His	Ser	Glu
	530					535					540				
Gly	Thr	Pro	Thr	His	Arg	Ala	Trp	Gln	Pro	Thr	Gly	Thr	Ile	Lys	Trp
545					550					555					560
Arg	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ala	Cys	Ser	Ser						
				565					570						

<210> 21
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Gorilla gorilla

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 18, 19, 80, 211, 212, 519, 520, 521, 522
 <223> n = A, T, C o G

<400> 21

aatggaatca	ctttccanng	tgtccctatg	gtgatgggag	caggggtgtat	ctctcaacca	60
gagcagtcct	cccctgagtn	tgcccttacc	caccagagca	atgagggaaa	ctccacatgt	120
gaggtacatc	agaaaggatc	ccatggagtc	cgaaaatcat	acaaatgtga	agaatgcccc	180
aaggtcttta	agtatcactg	tcacttatta	nntcaccaga	gaagacacag	gaatgagagg	240
ccatttgttt	gtcccgagtg	tcaaaaaggc	ttcttccaga	tatcagacct	acgggtgcat	300
cagataaattc	acacaggaaa	gaagcctttc	acatgcagca	tgtgtaaaaa	gtccttcagc	360
cacaaaacca	acctgcggtc	tcatgagaga	atccacacag	gagaaaagcc	ttatacatgt	420
cccttttgta	agacaagcta	ccgccagtc	tccacatacc	accgccatat	gaggactcat	480
gagaaaatta	ccctgccaag	tgttccctcc	acaccagann	nntcctaa		528

<210> 22
 <211> 1302
 <212> ADN
 <213> Pan paniscus

<400> 22

atggcttttag	atctaagaac	catatttcag	tgtgaaccat	ccgagaataa	tcttggtatca	60
gaaaattcag	cgtttcaaca	aagccaagga	cctgctgttc	agagagaaga	agggatttct	120
gagttctcaa	gaatggtgct	caattcattt	caagacagca	ataattcata	tgcaaggcag	180
gaattgcaaa	gactttatag	gatctttcac	tcatggctgc	aaccagaaaa	gcacagcaag	240
gatgaaatta	tttctctatt	agtcctggag	cagtttatga	ttggtggcca	ctgcaatgac	300
aaagccgggtg	tgaaagagaa	atggaaatca	agtggcaaaa	acttggagag	attcatagaa	360
gacctgactg	atgacagcat	aaatccacct	gccttagtcc	acgtccacat	gcagggacag	420
gaagctctct	tttctgagga	tatgccctta	agagatgtca	ttgttcatct	cacaaaacaa	480
gtgaatgccc	aaaccacaag	agaagcaaac	atggggacac	cctcccagac	ttcccaagat	540
acttccttag	aaacaggaca	aggatatgaa	gatgaacaag	atggctggaa	cagttctttg	600
aaaactactc	aagtaaatga	aaatattact	aatcaaggcg	atcaaatagt	ttccctaata	660
atcatccagg	aagagaacag	tcctaggcct	gaagagggag	gtgtttcttc	tgacaaccca	720
tacaactcaa	aaagagcaga	gctagtcact	gctagatctc	aggaagggtc	cataaatgga	780
atcactttcc	aaggtgtccc	tatggtgatg	ggagcagggg	gtatctctca	accagagcag	840
tcctcccctg	agtctgccct	taccaccag	agcaatgagg	gaaactccac	atgtgaggta	900
catcagaaag	gatcccattg	agtcggaaaa	tcatacaaat	gtgaagaatg	ccccaaagtc	960
tttaagtatc	tctgtcactt	attagctcac	cagagaagac	acaggaatga	gaggccattt	1020
gtttgtcccg	agtgtaaaaa	aggcttcttc	cagatatcag	acctacgggt	gactcagata	1080
attcacacag	gaaagaagcc	tttcacatgc	agcatatgta	aaaagtcctt	cagccacaaa	1140
accaacctgc	ggtctcatga	gagaatccac	acaggagaaa	agccttatac	atgtcccttt	1200
tgtaagacaa	gctaccgcca	gtcatccaca	taccaccgcc	atatgaggac	tcatgagaaa	1260
attaccgtgc	caagtgttcc	ctccacacca	gaagcttcct	aa		1302

<210> 23
 <211> 1302
 <212> ADN

<213> Orangután de Borneo

<400> 23

```

atggccttag atctaagaac catatctcag tgtgaaccat ccgagaataa tcttgatca 60
gaaaattcag agtttcgaca aagccaagga cctgctgttc agagagaaga agggatttct 120
gagttctcaa gaatggtgct caattcattt caagacagca ataattcata tgcaaggcag 180
gaattgcaga gactttatag gatctttcac tcatggctgc aaccagaaaa gcacagcaag 240
gatgaaatta tttctctatt agtcctggag cagtttatga ttggtggcca ctgcaatgac 300
aaagccagtg tgaagagaaa atggaaatca agtggcaaaa acttgagag attcatggaa 360
gacctgactg atgacagcat aaatccacct gccttagtcc atgtccacat gcagggacag 420
gaagctctct tttctgagga tatgccctta aaagatgtca ttgttcatct caaaaacaa 480
gtgtctgccc aaaccccaag agaagcaaat atggggacac cctcccagac ttcccaagat 540
acttccttag aaacaggaga aggatgtgaa gatgaacaag atggctgcaa cagttctttg 600
aaaactactc aagtaaatga aaatattact aatcaaggca atcaaatagt ttccctaata 660
atcatccagg aagagaacgg tcctaggtct gaagagggag gtgtttcttc tgacaatcca 720
aacaactcaa aaagagcaga gctagtcact gctagatctc aggaagggtc cataaacgga 780
atcacttttc aaggtgtccc tatggagatg ggagcagggt gtatctctca gccagagcag 840
tcctcccctg agtctgccct taccaccagg agcaatgagg gaaactccac atgtgaggtg 900
catcagaaag gatcccatgg agtccgaaaa tcctacaaat gtgaagaatg ccctaagggtc 960
ttaagtatc tctgtcactt attagctcac cagagaagac acagggaatga gaggccattt 1020
gtttgtcccg agtgtcaaaa aggttctctc cagatatcag acctacgcgt gcatcagata 1080
attcacacag gaaagaagcc ttccacatgc agcatgtgtg aaaagtccct cagccacaaa 1140
accaacctgc ggtctcatga gagaatccac acaggagaaa agccttatac atgtcccttt 1200
tgtaagacaa gctaccgcca gtcacccaca taccaccgcc atatgaggac tcatgagaaa 1260
attaccccg ccaagtgttc ctccacacca gaagcttctt aa 1302

```

5

<210> 24

<211> 1640

<212> ADN

10

<213> Pongo abelii

<400> 24

```

tccaccaact gttgaaacaa atccctagag acacaaggca agagactgaa tcatcaaagt 60
aaagtctctc tgagaattat tgctaagaat ggcttttagat ctaagaacca tatttcagt 120
tgaaccatcc gagaataatc ttggatcaga aaattcagag tttcgacaaa gccaggacc 180
tgctgttcag agagaagaag ggatttctga gttctcaaga atggtgctca attcatttca 240
agacagcaat aattcatatg caaggcagga attgcagaga ctttatagga tctttcactc 300
atggctgcaa ccagaaaagc acagcaagga tgaaattatt tctctattag tcttgagca 360
gtttatgatt ggtggccact gcaatgacaa agccagtgtg aaagagaaat ggaaatcaag 420
tggcaaaaac ttggagagat tcatggaaga cctgactgat gacagcataa atccacctgc 480
cttagtccat gtccacatgc agggacagga agctctcttt tctgaggata tgcccttaaa 540
agatgtcatt gttcatctca caaaacaagt gtctgcccac accccaagag aagcaaatat 600
ggggacaccc tcccagactt cccaagatac ttcccttagaa acaggagaag gatgtgaaga 660
tgaacaagat ggctgcaaca gttctttgaa aactactcaa gtaaatgaaa atattactaa 720
tcaaggcaat caaatagttt ccctaatacat catccaggaa gagaacgggtc ctaggtctga 780
agagggaggt gtttcttctg acaatccaaa caactcaaaa agagcagagc tagtactgc 840
tagatctcag gaagggtcca taaacggaat cacttttcaa ggtgtcccta tggagatggg 900
agcagggtgt atctctcagc cagagcagtc ctcccctgag tctgccctta cccaccagag 960
caatgaggga aactccacat gtgaggtaca tcagaaagga tcccatggag tccgaaaatc 1020
ctacaaatgt gaagaatgcc ctaagggtct taagtatctc tgtcacttat tagctacca 1080
gagaagacac aggaatgaga ggccatttgt ttgtcccgag tgtcaaaaag gcttcttcca 1140
gatatcagac ctacgcgtgc atcagataat tcacacagga aagaagcctt tcacatgcag 1200
catgtgtgaa aagtccttca gccacaaaac caacctgcgg tctcatgaga gaatccacac 1260
aggagaaaag ccttatacat gtcccttttg taagacaagc taccgccagt catccacata 1320
ccaccgccat atgaggactc atgagaaaat taccgcccca agtgttccct ccacaccaga 1380
agcttcctaa gctgtggtc tgataatgtg tataaatatg tatgcaagta tgtatattcc 1440
catagtattt atcgacttag gatataagat ataatttctt gattatgctt tcaattttat 1500
gtcttgcttc attaaaatgt aaggctaagg agagcatgga atttgtcagt tttgttact 1560
aaagtattcc aagtgttgg gaaagtggaa catttccaag aaccaataaa tttctgttga 1620
ataaatgaat gaatccaaaa 1640

```

15

<210> 25
<211> 1002
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Traducción inversa de la SEQ ID NO:35

<400> 25

10

```

ctgaaaattg atagctttct gtgcgaactg agcatggatg atccgggcag caaaaacaaa 60
gatttttaac cgagccaggg cccggcgctg cagaaagcgg aagaaattag cgaatttcag 120
gatagccagc atagcctgtt tcaggatggc aacaacagcc atgcgaaaca ggaactgcag 180
cgcctgtata aaagctttta tagctggctg cagccggaaa aacatagcaa agatgaaatt 240
attttttcagg tgggtgctgga acagtttatg attaacccgc attgcagcgg ccgcagcacc 300
ctgaaaaaaaa aatgggaaaag cagcggccgc aacctgaaa aatttatgga aagcctgagc 360
gaaagcagcc tgaaccgcc ggatctggtg catgtgcata tgcagggccca ggaagcgtg 420
tttagcgaaa acatgccgct gaaagaagtg attgtgcatc tgaccaaaca gctgagcgtg 480
ggcagcccca ccggcaccga tatggaaaacc ccgagctgga ccccgagga taccagcctg 540
gaaaccggcc agggcgaaat gggcaaaaaa gaaaacggcg ataacattta tcatattaac 600
gatagcatta ccagccaggg caacgaaatt ccgagcctgc tgattattcg cgaagaagat 660
tatccgcgcc cggaagaaga tagcgtgagc ctgaaaaacc cgctgagcag ccgcaaagcg 720
ggcctgggca tgagcggcag ccaggaaggc agcctgaaag gcccgagcta tcaggatgtg 780
ctgatggaag gcggcccggg ctttctgagc cagagcattc aggtgagccc ggaaccggtg 840
ccgacccatc agcgcaccga aggcaacagc acccgcgccg gccatcagga acgctgccgc 900
gaagcgcaga acagctatcg ctgcgaaaaa tgcccgaaaa tttttcgcta ttttagccag 960
ctgaaagcgc atcagcgccg ccataacaac gaacgcacct tt 1002

```

<210> 26
<211> 1317
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Traducción inversa de la SEQ ID NO:36

<400> 26

20

```

atggatctgg atctgcgcct gagctttcag ggcgaaccga gccgcaacga tccgggcagc 60
gaaaacctgg cgctgaaagc gagccagggc tatgtgattc gcgatggcga aggcatagc 120
gaatttccga acaccgcct gagcctgttt cagaacagca gcaacagctt tgcgcgccgc 180
gaactgcagc gcctgtataa cctgtttcat agctggctgc agccggaaaa acgcagcaaa 240
gatgaaatga ttagctgcct ggtgctggaa cagtttgtga ttaacggcca ttgcagcgat 300
cgcagcacc tgcaggaaaa atggaacgcg agcggccgca acctggaaaa atttatggaa 360
gatctgaccg atgatggcat gaaacagccg ggctttgtgc atgtgcatat gcagggccag 420
gaagcgtctg ttagcgaaaa catgccgctg cgcgaagtgc tgggtgcat tgcgaaacat 480
ctggcgaccg cgaccccgcg cggcgaaaa accaaagcgc cgctgtggac cccgcgcgat 540
gcgagcctgg aaaccggcca ggaaagcgaa ggcaaaagaa gcggcggcaa caccagccgc 600
aaaacctgcc cggtgaccga aagcctgacc tggcagggca gccagacccc gtttctgctg 660
attattccgg aagaaacctg cccgggcctg gaagaagcgg gcgtgagccc ggaaaacctg 720
ctgggcagcc gcaccgcgga accgggcctg gcggtgagcc aggaaggcag cccggaaggc 780
ccgtttggcg gcgatgtgca tctggaagcg gaaccgggct ttctgagccg cccggatcag 840
gtgaccctgg aaccgggtgag cgcgcaccc agcctggaag gcaaccggc gcgcggcaaa 900
agcccggaag gcctgccggg cgcgcagaaa gtgtttccgt gcgaaaaatg cagccaggtg 960
tttcgctatc tgagccgcct gaaagtgcac cagcgcgcc ataacgatga acgcccgtt 1020
gtgtgcgcga aatgcaaaaa aggtttttt cagaccagcg atctgcgcgt gcatcagcgc 1080
attcatacca aagaaaaacc gtttcgctgc agcacctgca aacgcccgtt tagccataaa 1140
accaacctgc gcgcgcagta acgcattcat accggcgaaa aaccgtatct gtgcagcctg 1200
tgccagcgcc gctatcgcca gagcagcacc tataaccgcc atctgaaaag ccatcagaaa 1260
ctggcgctga aaggcgatct gagcggcgctg ccggtggtgg cgcagcgcaa acgcatt 1317

```

<210> 27
<211> 1656

25

<212> ADN

<213> Nomascus leucogenys

<400> 27

5

```

agattgcagt tttaaagaat ccaccaactg ttgaaacaaa tccctagaga cacaaggcaa 60
gagactgaat catcaaagtt aagtctctct gagaattatt gctaagaatg gcttttagagc 120
taagaaccat atttcagtgt gaaccatccg agaataatct tggatcagaa aattcagagt 180
ttcgacaaag ccaaggacct gctgttcaga gagaagaagg gattttctgag ttctcaagaa 240
tgggtgctcaa ttcatittcaa gacagcaata aatcatatgc aaggcaggaa ttgcaaagac 300
tttataggat ctttcactca tggctgcaac cagaaaagca cagcaaggat gaaattattt 360
ctctattagt cctggagcag tttatgattg gtggccactg caatgacaaa accagtgtga 420
aagagaaatg gaaatcaagt ggcaaaaact tggagagatt catggaagac ctgactgatg 480
acagcataaa tccacctgcc ttagtccacg tccacatgca gggacaggaa gctctctttt 540
ctgaggatat gcccttaaaa gatgtcattg ttcatctcac aaaacaagtg tctgccc aaa 600
tcccaagaga agcaaacatg gggacaccct tccagacttc ccaagatact tccttagaaa 660
caggacaagg acgtgaagat gaacaagatg gctgcaacag ttctttgaaa actactcaag 720
taaataaaaa tattactaat caaggcaatc aaatagtttc cctaatactc atccaggaag 780
agaatggtcc taggcctgaa gagggaggtg tttcttctga caacccatgc aactcaaaaa 840
gagcagagct agtcactgct agatcccagg aagggtccat aaacggaatc acttttcaag 900
gtgtccctat ggagatggga gcagggtgta tctctcagcc agagcagtcc tcccctgagt 960
ctgcccctac ccaccagagc aatgagggaa actccacatg tgaggtacat cagaaaggat 1020
cccatggagt ccgaaaatca taaaaatgtg aagaatgccc caaggtcttt aagtatctct 1080
gtcacttatt agctcaccag aggagacaca ggaatgagag gccatttggt tgtcccagat 1140
gtcagaaagg cttcttccag acatcagacc tacgcgtgca tcaggtgatt cacacaggaa 1200
agaagccttt cacatgcagc atgtgtgaaa agtccttcag ccacaaaacc aacctgcggt 1260
cccatgagag aatccacaca ggagaaaagc cttatacatg tccctattgt aagacaagct 1320
accgccagtc atccacatac caccgccata tgaggactca tgagaaaatt acctcaccaa 1380
gtgttccctc cagccagaa gcttcctaag ctgctggtct gataatgtgt ataaatgtgt 1440
atgcaagtat gtatattccc atagtattta tctacttagg atataagata taatttcctg 1500
attatgcttt caattttattg tctgcttcat taaaatgtaa ggctaaggag agcatggaat 1560
ttgtcagttt tgcactactaa agtattccaa gtggttgga aagtgggaac atttccaaga 1620
accaataaat ttctgttgaa taaatgaatg aatcca 1656

```

<210> 28

<211> 1299

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 28

10

```

atggccttag atctaagaac catatttcag catgaaccat ccgagaataa tcttggtatca 60
gaaaattcag agtttcgacg aagtcaggga cctgctgttc agacagaaga agggatttct 120
gagttctcaa gaatgatgct caattcattt caagacagca ataattcata tgcaaggcag 180
gaattgcaaa gactttatag gatctttcac tcatggctgc aaccagaaaa gcacagcaag 240
gatgaaatta tttctctatt agtcctggag cagtttatga ttggtggcca ctgcaatgac 300
aaagccactg tgaaagagaa atggaaatca agtggcaaaa acctggagag attcatggaa 360
gacctgactg atgacatcat aaatccacct gccttagtcc atgtccacat gcagggacag 420
gaagctctct tttctgacaa tatgccctta aaagatgtca ttgttcatct cacaaaaaaa 480
gtgtctgcca aaactccaag agaagcaaac atggggacac cttccagac ttcccaagac 540
acttcctcag aaacaggaca aggacgtgaa gatgaacaag atggctgcaa cagttctttg 600
aaaactactc aagtaaatga aagtaatact aatcaagaca atccaatagt ttctctaata 660
atccaggaag agaatggccc taggcctaaa gagggagggtg tttcttctga caaccatac 720
aattcaagaa gaacagagct agacactgct agatcccagg aagggtccac gaacggaatt 780
atTTTTcaag gtgtccctat ggagatggga gcagggttta tctctcagcc agagcagtca 840
tcccctgagt ctgcccctac ccaccagagc aataagggga actccacatg tgaggtagat 900
cagaaaggat cccatggagt ccgaaaatca tacaatgtg aagaatgcc caaggtcttt 960
aagtatctct gtcacttatt agctcaccag agaagacaca ggaatgagag gccatttgtt 1020
tgtcccaagt gtcaaaaagg cttcttccag atatcagacc tacgtgtgca tcagataatt 1080
cacacaggag agaaaccttt tacatgcagc atgtgtgaaa agtccttcag ccacaaaacc 1140
aacctgcggt ctcatgagag aatccacaca ggagaaaagc cttatacatg tccctattgt 1200
aagagaagct accgccagtc atccacatac caccgccata tgaggactca taagaaaatt 1260
actctgccaa ctgttccctc cacaccagaa gcttcctaa 1299

```

<210> 29
 <211> 1008
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Traducción inversa de la SEQ ID NO:39
 <400> 29

```

atggcgctgg atctgcgcaa aagcttttgc caggaaactga gcagcaacaa cctggaaagc 60
gaagatctgg aatttagcag caccagggc tttgcggtgc cgaaacgcga aattagcgcg 120
tttagcagca tttagctgaa cagcctgcag tatagcgata acagcgaagc gcgcaaagaa 180
ctgcagcgcc tgtatgaatt ttttcatagc tggctgcagc cggaiaacca tagcaaagat 240
cagattattg cgcagctggc gatggaacag tttatgctga gcggccgctg ccgcgataaa 300
agcattctga aaaaaaatg ggaaagcagc ggcaiaaacc tggiaiaaact gctggaagat 360
ctgaccgatg attgcatgaa accgccggtg ctggtgcatg tgtgcatgca gggccaggaa 420
gcgctgttta gcgaagatat gccgctgaaa gaagtgattg cgcatctgac caaacagagc 480
agcgcgaaaa cctttaccgc gggcatgggc accgcgcac aggtgagcca gaacgcgccg 540
ctgggcaccc gccagggcaa cgaacatgaa gaagatggct gcaccagcag ctgggaagtg 600
accaggtga acgattatat taccacccg ggcaiaagaa ttgtgagcct gctgattatt 660
ccggaagcga acgatccgac cccggtggaa gaaagcgcg gctgggaaaa caccatagc 720
agccgcaaa cgcgcccgtg gatgtgcggc ctgcaggaag aaagccagaa aggcccgagc 780
tatcaggatg tgccgatgga tgtgggccc ggagcagcgc gcctgccgca tcagagcagc 840
agcgaaccgg tgagcaacca tcattgcagc gaaggcaaca gcgcgtgcga agaaagccag 900
gaacgctttc atgaaagccc gaaaagctat aaatgcgaag aatgcccgaa aacctttaaa 960
tatctgagcc attttctggc gcatcagcgc tgccatcgca gctttcgc 1008

```

<210> 30
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Traducción inversa de la SEQ ID NO:40
 <400> 30

```

atgccgagca acctgaccaa cagctgccag tgcaaaaacca gccagaacga ttttgaactg 60
ggcaacaccg aatttcgccg caccagggc agcgcggtgc agaacggcga aatttttagc 120
gaatttagca gcagccagct gaacagcctg ccggataacg gcaacagcaa cgcgcgcaaa 180
gaactgcagc gcctgcatgg catttttcat agctggctgc agccggaaaa acatagcaaa 240
gatgaaatta ttagccgcct ggtgctggaa cagtttatga ttaacggcaa ctgccgcgat 300
cgcagcattc tgaaagaaaa atgggaaagc agcgggccgca acctggaaaa actgatggaa 360
gatctgaccg atgattgcat ggaaccgccc gtgctggtgc gcgtgcatat gcagggccag 420
gaagcgctgt ttagcgaaaa catgccgctg aaagaagtga ttgtgcatct gaaaaaacag 480
ctgagcgcgg aaaacaccac cggcgaaaaa aaaggcatga gcctgcaggc gccgcaggat 540
accccgctgg aaaccgcgca gggcaacgaa gataaagaaa acgcgtgcaa caacttttgg 600
aaaaacacc aggtggatga tagcattacc tgccagggca cccagacccc gagcctgctg 660
attattcagg aagatcattg cctgcgcctg gaagatggcg gcgcgagctg cgaaaacccg 720
cataacagcc gccgcggcgt gaccagccat agcgaaaaag gcccgctgga aggcccgagc 780
tatcagaaca ttccggtggg cgaacagccg gaatttctgc cgaccagcga tcagagcagc 840
agcgaatttg tgccggcgca tcagagcaac aaaggcgata gcacctgcgg cggccatcat 900
gaaaaatatc gcggcgcgca gaaaagctat aaatgcaaag aatgcccgaa aatttttcgc 960
tatctgtgcc attttctggc gcatcagcgc                                     990

```

<210> 31

<211> 175

5 <212> PRT

<213> Gorilla gorilla

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 6, 7, 27, 71, 173, 174

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 31

```

      Asn Gly Ile Thr Phe Xaa Xaa Val Pro Met Val Met Gly Ala Gly Cys
      1              5              10              15
15  Ile Ser Gln Pro Glu Gln Ser Ser Pro Glu Xaa Ala Leu Thr His Gln

              20              25              30
      Ser Asn Glu Gly Asn Ser Thr Cys Glu Val His Gln Lys Gly Ser His
              35              40              45
      Gly Val Arg Lys Ser Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Pro Lys Val Phe Lys
              50              55              60
      Tyr His Cys His Leu Leu Xaa His Gln Arg Arg His Arg Asn Glu Arg
      65              70              75              80
      Pro Phe Val Cys Pro Glu Cys Gln Lys Gly Phe Phe Gln Ile Ser Asp
              85              90              95
      Leu Arg Val His Gln Ile Ile His Thr Gly Lys Lys Pro Phe Thr Cys
              100              105              110
      Ser Met Cys Lys Lys Ser Phe Ser His Lys Thr Asn Leu Arg Ser His
              115              120              125
      Glu Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Pro Phe Cys Lys
              130              135              140
      Thr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Thr Tyr His Arg His Met Arg Thr His
      145              150              155              160
      Glu Lys Ile Thr Leu Pro Ser Val Pro Ser Thr Pro Xaa Xaa Ser
              165              170              175

```

<210> 32

20 <211> 433

<212> PRT

<213> Pan paniscus

<400> 32

25

Met	Ala	Leu	Asp	Leu	Arg	Thr	Ile	Phe	Gln	Cys	Glu	Pro	Ser	Glu	Asn
1				5					10					15	
Asn	Leu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser	Ala	Phe	Gln	Gln	Ser	Gln	Gly	Pro	Ala
			20					25					30		
Val	Gln	Arg	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Glu	Phe	Ser	Arg	Met	Val	Leu	Asn
			35					40				45			
Ser	Phe	Gln	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Tyr	Ala	Arg	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg
			50			55					60				
Leu	Tyr	Arg	Ile	Phe	His	Ser	Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Lys
65					70					75					80
Asp	Glu	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Met	Ile	Gly	Gly
				85					90					95	
His	Cys	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	Val	Lys	Glu	Lys	Trp	Lys	Ser	Ser	Gly
			100					105					110		
Lys	Asn	Leu	Glu	Arg	Phe	Ile	Glu	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Asn
			115				120					125			
Pro	Pro	Ala	Leu	Val	His	Val	His	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe
			130			135						140			
Ser	Glu	Asp	Met	Pro	Leu	Arg	Asp	Val	Ile	Val	His	Leu	Thr	Lys	Gln
145					150					155					160
Val	Asn	Ala	Gln	Thr	Thr	Arg	Glu	Ala	Asn	Met	Gly	Thr	Pro	Ser	Gln
				165					170					175	
Thr	Ser	Gln	Asp	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Gln	Gly	Tyr	Glu	Asp	Glu
			180					185					190		
Gln	Asp	Gly	Trp	Asn	Ser	Ser	Leu	Lys	Thr	Thr	Gln	Val	Asn	Glu	Asn
			195				200					205			
Ile	Thr	Asn	Gln	Gly	Asp	Gln	Ile	Val	Ser	Leu	Ile	Ile	Ile	Gln	Glu
			210			215					220				
Glu	Asn	Ser	Pro	Arg	Pro	Glu	Glu	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro
225					230					235					240
Tyr	Asn	Ser	Lys	Arg	Ala	Glu	Leu	Val	Thr	Ala	Arg	Ser	Gln	Glu	Gly
				245					250					255	
Ser	Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Phe	Gln	Gly	Val	Pro	Met	Val	Met	Gly	Ala
			260					265				270			
Gly	Cys	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu	Gln	Ser	Ser	Pro	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr
			275				280					285			
His	Gln	Ser	Asn	Glu	Gly	Asn	Ser	Thr	Cys	Glu	Val	His	Gln	Lys	Gly
	290					295					300				
Ser	His	Gly	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Glu	Cys	Pro	Lys	Val
305					310					315					320
Phe	Lys	Tyr	Leu	Cys	His	Leu	Leu	Ala	His	Gln	Arg	Arg	His	Arg	Asn
				325					330					335	
Glu	Arg	Pro	Phe	Val	Cys	Pro	Glu	Cys	Gln	Lys	Gly	Phe	Phe	Gln	Ile
			340					345					350		
Ser	Asp	Leu	Arg	Val	His	Gln	Ile	Ile	His	Thr	Gly	Lys	Lys	Pro	Phe
			355				360					365			
Thr	Cys	Ser	Ile	Cys	Lys	Lys	Ser	Phe	Ser	His	Lys	Thr	Asn	Leu	Arg
			370			375					380				
Ser	His	Glu	Arg	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Thr	Cys	Pro	Phe
385					390					395					400
Cys	Lys	Thr	Ser	Tyr	Arg	Gln	Ser	Ser	Thr	Tyr	His	Arg	His	Met	Arg
				405					410					415	
Thr	His	Glu	Lys	Ile	Thr	Val	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala
			420					425					430		
Ser															

5 <210> 33
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Pongo pygmaeus

<400> 33

Met	Ala	Leu	Asp	Leu	Arg	Thr	Ile	Phe	Gln	Cys	Glu	Pro	Ser	Glu	Asn
1				5					10					15	
Asn	Leu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser	Glu	Phe	Arg	Gln	Ser	Gln	Gly	Pro	Ala
			20					25					30		
Val	Gln	Arg	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Glu	Phe	Ser	Arg	Met	Val	Leu	Asn
		35					40					45			
Ser	Phe	Gln	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Tyr	Ala	Arg	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg
	50					55					60				
Leu	Tyr	Arg	Ile	Phe	His	Ser	Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Lys
65					70					75					80
Asp	Glu	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Met	Ile	Gly	Gly
				85					90					95	
His	Cys	Asn	Asp	Lys	Ala	Ser	Val	Lys	Glu	Lys	Trp	Lys	Ser	Ser	Gly
			100					105					110		
Lys	Asn	Leu	Glu	Arg	Phe	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Asn
		115					120					125			
Pro	Pro	Ala	Leu	Val	His	Val	His	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe
	130					135					140				
Ser	Glu	Asp	Met	Pro	Leu	Lys	Asp	Val	Ile	Val	His	Leu	Thr	Lys	Gln
145					150					155					160
Val	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	Arg	Glu	Ala	Asn	Met	Gly	Thr	Pro	Ser	Gln
				165					170					175	
Thr	Ser	Gln	Asp	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Glu	Gly	Cys	Glu	Asp	Glu
			180					185					190		
Gln	Asp	Gly	Cys	Asn	Ser	Ser	Leu	Lys	Thr	Thr	Gln	Val	Asn	Glu	Asn
		195					200					205			
Ile	Thr	Asn	Gln	Gly	Asn	Gln	Ile	Val	Ser	Leu	Ile	Ile	Ile	Gln	Glu
	210					215					220				
Glu	Asn	Gly	Pro	Arg	Ser	Glu	Glu	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro
225					230					235					240
Asn	Asn	Ser	Lys	Arg	Ala	Glu	Leu	Val	Thr	Ala	Arg	Ser	Gln	Glu	Gly
				245					250					255	
Ser	Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Phe	Gln	Gly	Val	Pro	Met	Glu	Met	Gly	Ala
			260					265					270		
Gly	Cys	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu	Gln	Ser	Ser	Pro	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr

5

			275				280					285			
His	Gln	Ser	Asn	Glu	Gly	Asn	Ser	Thr	Cys	Glu	Val	His	Gln	Lys	Gly
	290					295					300				
Ser	His	Gly	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Glu	Cys	Pro	Lys	Val
305					310					315					320
Phe	Lys	Tyr	Leu	Cys	His	Leu	Leu	Ala	His	Gln	Arg	Arg	His	Arg	Asn
				325					330					335	
Glu	Arg	Pro	Phe	Val	Cys	Pro	Glu	Cys	Gln	Lys	Gly	Phe	Phe	Gln	Ile
			340					345					350		
Ser	Asp	Leu	Arg	Val	His	Gln	Ile	Ile	His	Thr	Gly	Lys	Lys	Pro	Phe
		355					360					365			
Thr	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Lys	Ser	Phe	Ser	His	Lys	Thr	Asn	Leu	Arg
	370					375					380				
Ser	His	Glu	Arg	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Thr	Cys	Pro	Phe
385					390					395					400
Cys	Lys	Thr	Ser	Tyr	Arg	Gln	Ser	Ser	Thr	Tyr	His	Arg	His	Met	Arg
				405					410					415	
Thr	His	Glu	Lys	Ile	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala
			420					425					430		
Ser															

<210> 34

<211> 433

<212> PRT
 <213> Pongo abelii

<400> 34

5

```

Met Ala Leu Asp Leu Arg Thr Ile Phe Gln Cys Glu Pro Ser Glu Asn
 1      5      10      15
Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ser Glu Phe Arg Gln Ser Gln Gly Pro Ala
 20      25      30
Val Gln Arg Glu Glu Gly Ile Ser Glu Phe Ser Arg Met Val Leu Asn
 35      40      45
Ser Phe Gln Asp Ser Asn Asn Ser Tyr Ala Arg Gln Glu Leu Gln Arg
 50      55      60
Leu Tyr Arg Ile Phe His Ser Trp Leu Gln Pro Glu Lys His Ser Lys
 65      70      75      80
Asp Glu Ile Ile Ser Leu Leu Val Leu Glu Gln Phe Met Ile Gly Gly
 85      90      95
His Cys Asn Asp Lys Ala Ser Val Lys Glu Lys Trp Lys Ser Ser Gly
100      105      110
Lys Asn Leu Glu Arg Phe Met Glu Asp Leu Thr Asp Asp Ser Ile Asn
115      120      125
Pro Pro Ala Leu Val His Val His Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe
130      135      140
Ser Glu Asp Met Pro Leu Lys Asp Val Ile Val His Leu Thr Lys Gln
145      150      155      160
Val Ser Ala Gln Thr Pro Arg Glu Ala Asn Met Gly Thr Pro Ser Gln
165      170      175
Thr Ser Gln Asp Thr Ser Leu Glu Thr Gly Glu Gly Cys Glu Asp Glu
180      185      190
Gln Asp Gly Cys Asn Ser Ser Leu Lys Thr Thr Gln Val Asn Glu Asn
195      200      205
Ile Thr Asn Gln Gly Asn Gln Ile Val Ser Leu Ile Ile Ile Gln Glu
210      215      220
Glu Asn Gly Pro Arg Ser Glu Glu Gly Gly Val Ser Ser Asp Asn Pro
225      230      235      240
Asn Asn Ser Lys Arg Ala Glu Leu Val Thr Ala Arg Ser Gln Glu Gly
245      250      255
Ser Ile Asn Gly Ile Thr Phe Gln Gly Val Pro Met Glu Met Gly Ala
260      265      270

Gly Cys Ile Ser Gln Pro Glu Gln Ser Ser Pro Glu Ser Ala Leu Thr
275      280      285
His Gln Ser Asn Glu Gly Asn Ser Thr Cys Glu Val His Gln Lys Gly
290      295      300
Ser His Gly Val Arg Lys Ser Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Pro Lys Val
305      310      315      320
Phe Lys Tyr Leu Cys His Leu Leu Ala His Gln Arg Arg His Arg Asn
325      330      335
Glu Arg Pro Phe Val Cys Pro Glu Cys Gln Lys Gly Phe Phe Gln Ile
340      345      350
Ser Asp Leu Arg Val His Gln Ile Ile His Thr Gly Lys Lys Pro Phe
355      360      365
Thr Cys Ser Met Cys Glu Lys Ser Phe Ser His Lys Thr Asn Leu Arg
370      375      380
Ser His Glu Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Pro Phe
385      390      395      400
Cys Lys Thr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Thr Tyr His Arg His Met Arg
405      410      415
Thr His Glu Lys Ile Thr Pro Pro Ser Val Pro Ser Thr Pro Glu Ala
420      425      430
Ser

```

<210> 35
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Ailuropoda melanoleuca

5

<400> 35

```

Leu Lys Ile Asp Ser Phe Leu Cys Glu Leu Ser Met Asp Asp Pro Gly
 1      5      10      15
Ser Lys Asn Lys Asp Phe Lys Pro Ser Gln Gly Pro Ala Leu Gln Lys
      20      25      30
Ala Glu Glu Ile Ser Glu Phe Gln Asp Ser Gln His Ser Leu Phe Gln
      35      40      45
Asp Gly Asn Asn Ser His Ala Lys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Tyr Lys
      50      55      60
Ser Phe Tyr Ser Trp Leu Gln Pro Glu Lys His Ser Lys Asp Glu Ile
      65      70      75      80
Ile Phe Gln Val Val Leu Glu Gln Phe Met Ile Asn Arg His Cys Ser
      85      90      95
Gly Arg Ser Thr Leu Lys Lys Lys Trp Glu Ser Ser Gly Arg Asn Leu
      100      105      110
Glu Lys Phe Met Glu Ser Leu Ser Glu Ser Ser Leu Lys Pro Pro Asp
      115      120      125
Leu Val His Val His Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe Ser Glu Asn
      130      135      140
Met Pro Leu Lys Glu Val Ile Val His Leu Thr Lys Gln Leu Ser Val
      145      150      155      160
Gly Ser Pro Thr Gly Thr Asp Met Glu Thr Pro Ser Trp Thr Pro Gln
      165      170      175
Asp Thr Ser Leu Glu Thr Gly Gln Gly Glu Trp Gly Lys Lys Glu Asn
      180      185      190
Gly Asp Asn Ile Tyr His Ile Asn Asp Ser Ile Thr Ser Gln Gly Asn
      195      200      205
Glu Ile Pro Ser Leu Leu Ile Ile Arg Glu Glu Asp Tyr Pro Arg Pro
      210      215      220
Glu Glu Asp Ser Val Ser Leu Lys Asn Pro Leu Ser Ser Arg Lys Ala
      225      230      235      240
Gly Leu Gly Met Ser Gly Ser Gln Glu Gly Ser Leu Lys Gly Pro Ser
      245      250      255
Tyr Gln Asp Val Leu Met Glu Gly Gly Pro Gly Phe Leu Ser Gln Ser

```

10

```

      260      265      270
Ile Gln Val Ser Pro Glu Pro Val Pro Thr His Gln Arg Thr Glu Gly
      275      280      285
Asn Ser Thr Arg Gly Gly His Gln Glu Arg Cys Arg Glu Ala Gln Asn
      290      295      300
Ser Tyr Arg Cys Glu Lys Cys Pro Lys Ile Phe Arg Tyr Phe Ser Gln
      305      310      315      320
Leu Lys Ala His Gln Arg Arg His Asn Asn Glu Arg Thr Phe
      325      330

```

<210> 36
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

15

<400> 36

Met	Asp	Leu	Asp	Leu	Arg	Leu	Ser	Phe	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Arg	Asn	1	5	10	15
Asp	Pro	Gly	Ser	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ser	Gln	Gly	Tyr	Val	20	25	30	
Ile	Arg	Asp	Gly	Glu	Gly	Ile	Ser	Glu	Phe	Pro	Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	35	40	45	
Leu	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser	Asn	Ser	Phe	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Gln	Arg	50	55	60	
Leu	Tyr	Asn	Leu	Phe	His	Ser	Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Arg	Ser	Lys	65	70	75	80
Asp	Glu	Met	Ile	Ser	Cys	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Val	Ile	Asn	Gly	85	90	95	
His	Cys	Ser	Asp	Arg	Ser	Thr	Leu	Gln	Glu	Lys	Trp	Asn	Ala	Ser	Gly	100	105	110	
Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Phe	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Gly	Met	Lys	115	120	125	
Gln	Pro	Gly	Phe	Val	His	Val	His	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe	130	135	140	
Ser	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Val	His	Phe	Arg	Lys	His	145	150	155	160
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	Asn	Thr	Lys	Ala	Pro	Leu	Trp	165	170	175	
Thr	Pro	Arg	Asp	Ala	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Ser	Glu	Gly	Lys	180	185	190	
Glu	Cys	Gly	Gly	Asn	Thr	Ser	Arg	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Thr	Glu	Ser	195	200	205	
Leu	Thr	Trp	Gln	Gly	Ser	Gln	Thr	Pro	Phe	Leu	Leu	Ile	Ile	Pro	Glu	210	215	220	
Glu	Thr	Cys	Pro	Gly	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Val	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	225	230	235	240
Leu	Gly	Ser	Arg	Thr	Ala	Glu	Pro	Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Gln	Glu	Gly	245	250	255	
Ser	Pro	Glu	Gly	Pro	Phe	Gly	Gly	Asp	Val	His	Leu	Glu	Ala	Glu	Pro	260	265	270	
Gly	Phe	Leu	Ser	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Ser	Ala	275	280	285	
His	Pro	Ser	Leu	Glu	Gly	Asn	Pro	Ala	Arg	Gly	Lys	Ser	Pro	Glu	Gly	290	295	300	
Leu	Pro	Gly	Ala	Gln	Lys	Val	Phe	Pro	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Gln	Val	305	310	315	320
Phe	Arg	Tyr	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Val	His	Gln	Arg	Arg	His	Asn	Asp	325	330	335	
Glu	Arg	Pro	Phe	Val	Cys	Ala	Lys	Cys	Lys	Lys	Gly	Phe	Phe	Gln	Thr	340	345	350	
Ser	Asp	Leu	Arg	Val	His	Gln	Arg	Ile	His	Thr	Lys	Glu	Lys	Pro	Phe	355	360	365	
Arg	Cys	Ser	Thr	Cys	Lys	Arg	Pro	Phe	Ser	His	Lys	Thr	Asn	Leu	Arg	370	375	380	
Ala	His	Glu	Arg	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Leu	Cys	Ser	Leu	385	390	395	400
Cys	Gln	Arg	Arg	Tyr	Arg	Gln	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Arg	His	Leu	Lys	405	410	415	
Ser	His	Gln	Lys	Leu	Ala	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Gly	Val	Pro	Val	420	425	430	
Val	Ala	Gln	Arg	Lys	Arg	Ile										435			

5 <210> 37
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Nomascus leucogenys

<400> 37

```

Met Ala Leu Glu Leu Arg Thr Ile Phe Gln Cys Glu Pro Ser Glu Asn
 1      5      10      15
Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ser Glu Phe Arg Gln Ser Gln Gly Pro Ala
 20      25      30
Val Gln Arg Glu Glu Gly Ile Ser Glu Phe Ser Arg Met Val Leu Asn
 35      40      45
Ser Phe Gln Asp Ser Asn Lys Ser Tyr Ala Arg Gln Glu Leu Gln Arg
 50      55      60
Leu Tyr Arg Ile Phe His Ser Trp Leu Gln Pro Glu Lys His Ser Lys
 65      70      75      80
Asp Glu Ile Ile Ser Leu Leu Val Leu Glu Gln Phe Met Ile Gly Gly
 85      90      95
His Cys Asn Asp Lys Thr Ser Val Lys Glu Lys Trp Lys Ser Ser Gly
 100     105     110
Lys Asn Leu Glu Arg Phe Met Glu Asp Leu Thr Asp Asp Ser Ile Asn
 115     120     125
Pro Pro Ala Leu Val His Val His Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe
 130     135     140
Ser Glu Asp Met Pro Leu Lys Asp Val Ile Val His Leu Thr Lys Gln
 145     150     155     160
Val Ser Ala Gln Ile Pro Arg Glu Ala Asn Met Gly Thr Pro Phe Gln
 165     170     175
Thr Ser Gln Asp Thr Ser Leu Glu Thr Gly Gln Gly Arg Glu Asp Glu
 180     185     190
Gln Asp Gly Cys Asn Ser Ser Leu Lys Thr Thr Gln Val Asn Glu Asn
 195     200     205
Ile Thr Asn Gln Gly Asn Gln Ile Val Ser Leu Ile Ile Ile Gln Glu
 210     215     220
Glu Asn Gly Pro Arg Pro Glu Glu Gly Gly Val Ser Ser Asp Asn Pro
 225     230     235     240
Cys Asn Ser Lys Arg Ala Glu Leu Val Thr Ala Arg Ser Gln Glu Gly
 245     250     255
Ser Ile Asn Gly Ile Thr Phe Gln Gly Val Pro Met Glu Met Gly Ala
 260     265     270
Gly Cys Ile Ser Gln Pro Glu Gln Ser Ser Pro Glu Ser Ala Pro Thr
 275     280     285
His Gln Ser Asn Glu Gly Asn Ser Thr Cys Glu Val His Gln Lys Gly
 290     295     300
Ser His Gly Val Arg Lys Ser Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Pro Lys Val
 305     310     315     320
Phe Lys Tyr Leu Cys His Leu Leu Ala His Gln Arg Arg His Arg Asn
 325     330     335
Glu Arg Pro Phe Val Cys Pro Glu Cys Gln Lys Gly Phe Phe Gln Thr
 340     345     350
Ser Asp Leu Arg Val His Gln Val Ile His Thr Gly Lys Lys Pro Phe

```

5

```

          355          360          365
Thr Cys Ser Met Cys Glu Lys Ser Phe Ser His Lys Thr Asn Leu Arg
 370          375          380
Ser His Glu Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Pro Tyr
 385          390          395     400
Cys Lys Thr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Thr Tyr His Arg His Met Arg
 405          410          415
Thr His Glu Lys Ile Thr Ser Pro Ser Val Pro Ser Thr Pro Glu Ala
 420          425          430
Ser

```

<210> 38

<211> 432

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 38

5

```

Met  Ala  Leu  Asp  Leu  Arg  Thr  Ile  Phe  Gln  His  Glu  Pro  Ser  Glu  Asn
 1      5      10      15
Asn  Leu  Gly  Ser  Glu  Asn  Ser  Glu  Phe  Arg  Arg  Ser  Gln  Gly  Pro  Ala
      20      25      30
Val  Gln  Thr  Glu  Glu  Gly  Ile  Ser  Glu  Phe  Ser  Arg  Met  Met  Leu  Asn
      35      40      45
Ser  Phe  Gln  Asp  Ser  Asn  Asn  Ser  Tyr  Ala  Arg  Gln  Glu  Leu  Gln  Arg
 50      55      60
Leu  Tyr  Arg  Ile  Phe  His  Ser  Trp  Leu  Gln  Pro  Glu  Lys  His  Ser  Lys
65      70      75      80
Asp  Glu  Ile  Ile  Ser  Leu  Leu  Val  Leu  Glu  Gln  Phe  Met  Ile  Gly  Gly
      85      90      95
His  Cys  Asn  Asp  Lys  Ala  Thr  Val  Lys  Glu  Lys  Trp  Lys  Ser  Ser  Gly
      100     105
Lys  Asn  Leu  Glu  Arg  Phe  Met  Glu  Asp  Leu  Thr  Asp  Asp  Ile  Ile  Asn
      115     120     125
Pro  Pro  Ala  Leu  Val  His  Val  His  Met  Gln  Gly  Gln  Glu  Ala  Leu  Phe
      130     135     140
Ser  Asp  Asn  Met  Pro  Leu  Lys  Asp  Val  Ile  Val  His  Leu  Thr  Lys  Gln
145      150     155     160
Val  Ser  Ala  Lys  Thr  Pro  Arg  Glu  Ala  Asn  Met  Gly  Thr  Pro  Phe  Gln
      165     170     175
Thr  Ser  Gln  Asp  Thr  Ser  Ser  Glu  Thr  Gly  Gln  Gly  Arg  Glu  Asp  Glu
      180     185     190
Gln  Asp  Gly  Cys  Asn  Ser  Ser  Leu  Lys  Thr  Thr  Gln  Val  Asn  Glu  Ser
      195     200     205
Asn  Thr  Asn  Gln  Asp  Asn  Pro  Ile  Val  Ser  Leu  Ile  Ile  Gln  Glu  Glu
      210     215     220
Asn  Gly  Pro  Arg  Pro  Lys  Glu  Gly  Gly  Val  Ser  Ser  Asp  Asn  Pro  Tyr
225      230     235     240
Asn  Ser  Arg  Arg  Thr  Glu  Leu  Asp  Thr  Ala  Arg  Ser  Gln  Glu  Gly  Ser
      245     250     255
Thr  Asn  Gly  Ile  Ile  Phe  Gln  Gly  Val  Pro  Met  Glu  Met  Gly  Ala  Gly
      260     265     270
Phe  Ile  Ser  Gln  Pro  Glu  Gln  Ser  Ser  Pro  Glu  Ser  Ala  Pro  Thr  His
      275     280     285
Gln  Ser  Asn  Lys  Gly  Asn  Ser  Thr  Cys  Glu  Val  His  Gln  Lys  Gly  Ser
      290     295     300
His  Gly  Val  Arg  Lys  Ser  Tyr  Lys  Cys  Glu  Glu  Cys  Pro  Lys  Val  Phe
305      310     315     320
Lys  Tyr  Leu  Cys  His  Leu  Leu  Ala  His  Gln  Arg  Arg  His  Arg  Asn  Glu
      325     330     335
Arg  Pro  Phe  Val  Cys  Pro  Lys  Cys  Gln  Lys  Gly  Phe  Phe  Gln  Ile  Ser
      340     345     350

Asp  Leu  Arg  Val  His  Gln  Ile  Ile  His  Thr  Gly  Glu  Lys  Pro  Phe  Thr
      355     360     365
Cys  Ser  Met  Cys  Glu  Lys  Ser  Phe  Ser  His  Lys  Thr  Asn  Leu  Arg  Ser
      370     375     380
His  Glu  Arg  Ile  His  Thr  Gly  Glu  Lys  Pro  Tyr  Thr  Cys  Pro  Tyr  Cys
385      390     395     400
Lys  Arg  Ser  Tyr  Arg  Gln  Ser  Ser  Thr  Tyr  His  Arg  His  Met  Arg  Thr
      405     410     415
His  Lys  Lys  Ile  Thr  Leu  Pro  Thr  Val  Pro  Ser  Thr  Pro  Glu  Ala  Ser
      420     425     430

```

10

<210> 39

<211> 336
 <212> PRT
 <213> *Cavia porcellus*

5 <400> 39

```

Met Ala Leu Asp Leu Arg Lys Ser Phe Cys Gln Glu Leu Ser Ser Asn
 1          5          10          15
Asn Leu Glu Ser Glu Asp Leu Glu Phe Ser Ser Thr Gln Gly Phe Ala
          20          25          30
Val Pro Lys Arg Glu Ile Ser Ala Phe Ser Ser Ile Gln Leu Asn Ser
          35          40          45
Leu Gln Tyr Ser Asp Asn Ser Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Arg Leu
 50          55          60
Tyr Glu Phe Phe His Ser Trp Leu Gln Pro Glu Asn His Ser Lys Asp
 65          70          75          80
Gln Ile Ile Ala Gln Leu Ala Met Glu Gln Phe Met Leu Ser Gly Arg
          85          90          95
Cys Arg Asp Lys Ser Ile Leu Lys Lys Lys Trp Glu Ser Ser Gly Lys
          100          105          110
Asn Leu Glu Lys Leu Leu Glu Asp Leu Thr Asp Asp Cys Met Lys Pro
          115          120          125
Pro Val Leu Val His Val Cys Met Gln Gly Gln Glu Ala Leu Phe Ser
          130          135          140
Glu Asp Met Pro Leu Lys Glu Val Ile Ala His Leu Thr Lys Gln Ser
 145          150          155          160
Ser Ala Lys Thr Phe Thr Ala Gly Met Gly Thr Ala His Gln Val Ser
          165          170          175
Gln Asn Ala Pro Leu Gly Thr Arg Gln Gly Asn Glu His Glu Glu Asp
          180          185          190
Gly Cys Thr Ser Ser Trp Glu Val Thr Gln Val Asn Asp Tyr Ile Thr
          195          200          205
Asn Pro Gly Lys Glu Ile Val Ser Leu Leu Ile Ile Pro Glu Ala Asn
 210          215          220
Asp Pro Thr Pro Val Glu Glu Ser Ala Ser Trp Glu Asn Thr His Ser
 225          230          235          240
Ser Arg Lys Ala Arg Pro Val Ile Cys Gly Leu Gln Glu Glu Ser Gln
          245          250          255
Lys Gly Pro Ser Tyr Gln Asp Val Pro Met Asp Val Gly Pro Gly Ser
          260          265          270
Ser Ser Leu Pro His Gln Ser Ser Ser Glu Pro Val Ser Asn His His
          275          280          285
Cys Ser Glu Gly Asn Ser Ala Cys Glu Glu Ser Gln Glu Arg Phe His
 290          295          300
Glu Ser Pro Lys Ser Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Pro Lys Thr Phe Lys
 305          310          315          320
Tyr Leu Ser His Phe Leu Ala His Gln Arg Cys His Arg Ser Phe Arg
          325          330          335
    
```

<210> 40
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Spermophilus tridecemlineatus*

10

<400> 40

15

Met	Pro	Ser	Asn	Leu	Thr	Asn	Ser	Cys	Gln	Cys	Lys	Thr	Ser	Gln	Asn
1				5					10					15	
Asp	Phe	Glu	Leu	Gly	Asn	Thr	Glu	Phe	Arg	Arg	Thr	Gln	Gly	Ser	Ala
			20					25					30		
Val	Gln	Asn	Gly	Glu	Ile	Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Ser	Ser	Gln	Leu	Asn
		35					40					45			
Ser	Leu	Pro	Asp	Asn	Gly	Asn	Ser	Asn	Ala	Arg	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg
	50					55					60				
Leu	His	Gly	Ile	Phe	His	Ser	Trp	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	His	Ser	Lys
65					70					75					80
Asp	Glu	Ile	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Met	Ile	Asn	Gly
				85					90					95	
Asn	Cys	Arg	Asp	Arg	Ser	Ile	Leu	Lys	Glu	Lys	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly
			100					105					110		
Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Leu	Met	Glu	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Cys	Met	Glu
		115					120					125			
Pro	Pro	Val	Leu	Val	Arg	Val	His	Met	Gln	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Phe
	130					135					140				
Ser	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Lys	Glu	Val	Ile	Val	His	Leu	Lys	Lys	Gln
145					150					155					160
Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Thr	Thr	Gly	Glu	Asn	Lys	Gly	Met	Ser	Leu	Gln
				165					170					175	
Ala	Pro	Gln	Asp	Thr	Pro	Leu	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Asn	Glu	Asp	Lys
			180					185					190		
Glu	Asn	Ala	Cys	Asn	Asn	Phe	Trp	Lys	Asn	Thr	Gln	Val	Asp	Asp	Ser
		195					200					205			
Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Ile	Gln	Glu
	210					215					220				
Asp	His	Cys	Leu	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly	Ala	Ser	Cys	Glu	Asn	Pro
225					230					235					240
His	Asn	Ser	Arg	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	His	Ser	Glu	Lys	Gly	Pro	Leu
				245					250					255	
Glu	Gly	Pro	Ser	Tyr	Gln	Asn	Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Gln	Pro	Glu	Phe
			260					265					270		
Leu	Pro	Thr	Ser	Asp	Gln	Ser	Ser	Ser	Glu	Phe	Val	Pro	Ala	His	Gln
		275					280					285			
Ser	Asn	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Cys	Gly	Gly	His	His	Glu	Lys	Tyr	Arg
	290					295					300				
Gly	Ala	Gln	Lys	Ser	Tyr	Lys	Cys	Lys	Glu	Cys	Pro	Lys	Ile	Phe	Arg
305					310					315					320
Tyr	Leu	Cys	His	Phe	Leu	Ala	His	Gln	Arg						
				325					330						

<210> 41
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 41
 cggtttggtt gggtttgggt ttgggttgg gtttgggt 39

<210> 42
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 42

ggcttgctt acccttacc ttacccttac ccttaccct 39

<210> 43

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 43

cagcaagtgg gaaggtgtaa tcc 23

<210> 44

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<400> 44

cccattctat catcaacggg taca 25

REIVINDICACIONES

1. Una proteína Zscan4 o una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o una afección asociadas a una anomalía de los telómeros, en donde dicha proteína Zscan4 o
5 dicha molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 inducen el alargamiento de los telómeros en una o más células humanas para tratar la enfermedad o la afección asociadas a una anomalía de los telómeros, en donde la enfermedad o la afección asociadas a la anomalía de los telómeros es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea, con la condición de que dicho tratamiento no modifique la identidad genética de la línea germinal de dicho sujeto humano.
- 10 2. Una o más células humanas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o una afección asociadas a una anomalía de los telómeros, en donde la enfermedad o la afección asociadas a la anomalía de los telómeros es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea y en donde dichas una o más células humanas han sido preparadas mediante
15 puesta en contacto de una o más células humanas aisladas de un sujeto que padece la enfermedad o la afección asociadas a la anomalía de los telómeros con una proteína Zscan4 o una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4,
en donde dicha proteína Zscan4 o dicha molécula de ácido nucleico aisladas que codifica Zscan4 inducen el
20 alargamiento de los telómeros en las una o más células humanas;
y en donde el uso en el tratamiento de la enfermedad o la afección asociadas a una anomalía de los telómeros comprende administrar al sujeto las una o más células humanas en contacto para tratar la enfermedad o la afección asociadas a la anomalía de los telómeros,
- 25 con la condición de que las una o más células humanas no sean células germinales ni células embrionarias.
3. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el síndrome de insuficiencia de la médula ósea se selecciona de entre el grupo que consiste en anemia de Fanconi, trombocitopenia amegacariocítica, anemia aplásica, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita,
30 hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Pearson, síndrome de Shwachman Diamond, trombocitopenia y síndrome mielodisplásico.
4. Las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las una o más células
35 humanas son células de médula ósea humana, en donde el uso en el tratamiento de la enfermedad o la afección asociadas a una anomalía de los telómeros comprende injertar en el sujeto las células de la médula ósea humana en contacto y en donde el síndrome de insuficiencia de la médula ósea asociado a una anomalía de los telómeros se selecciona de entre anemia de Fanconi y disqueratosis congénita.
- 40 5. Las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las una o más células humanas son células madre adultas, células madre tisulares, células progenitoras, células madre pluripotenciales inducidas, células somáticas, células de la médula ósea, células maduras o células diferenciadas.
- 45 6. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una expresión aumentada de Zscan4 es transitoria.
7. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula
50 de ácido nucleico aislada es un ARNm sintético.
8. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende un vector.
- 55 9. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el vector es un vector de virus Sendai.
10. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la proteína
60 Zscan4 se fusiona con un péptido que penetra en las células.
11. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Zscan4
65 es Zscan4 de ratón, ZSCAN4 humana o un homólogo de la misma.

12. La proteína Zscan4 o la molécula de ácido nucleico aislada que codifica Zscan4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o las una o más células humanas para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Zscan4 es una proteína de fusión Zscan4-ERT2 o una proteína Zscan4- Δ C, en donde la proteína Zscan4- Δ C tiene una delección de uno, dos, tres o cuatro dominios de dedo de cinc.

5

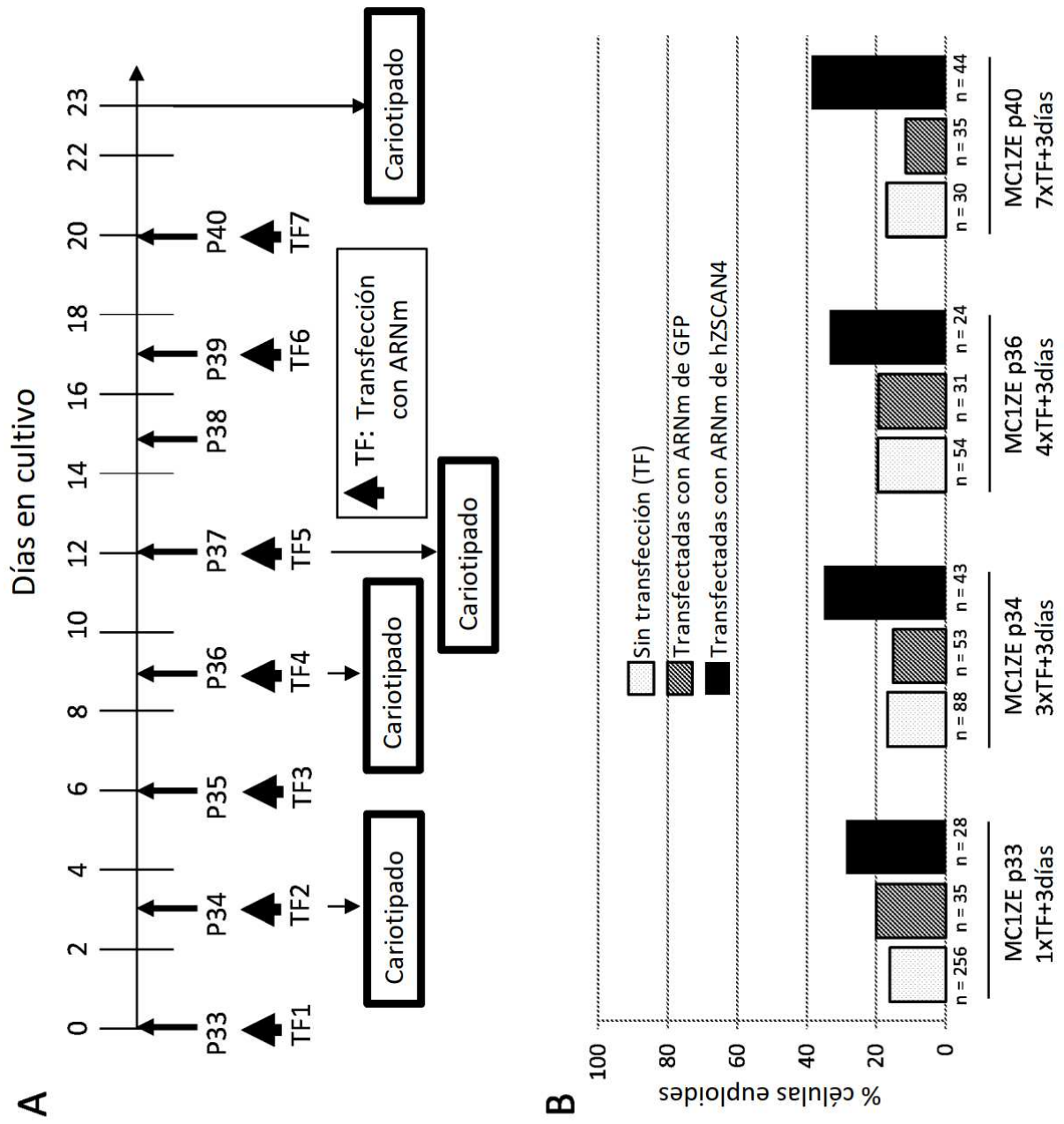


FIG. 1

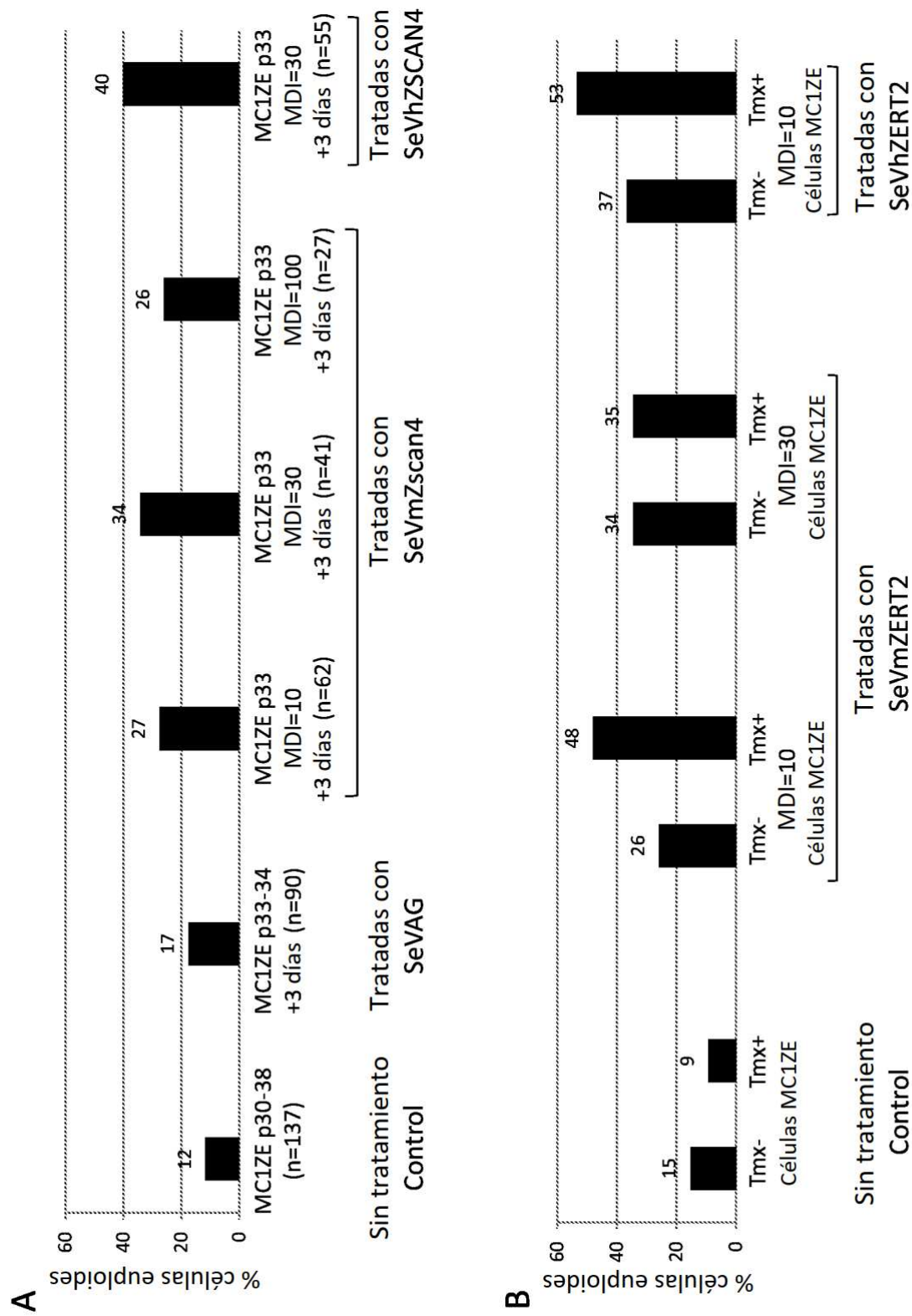


FIG. 2

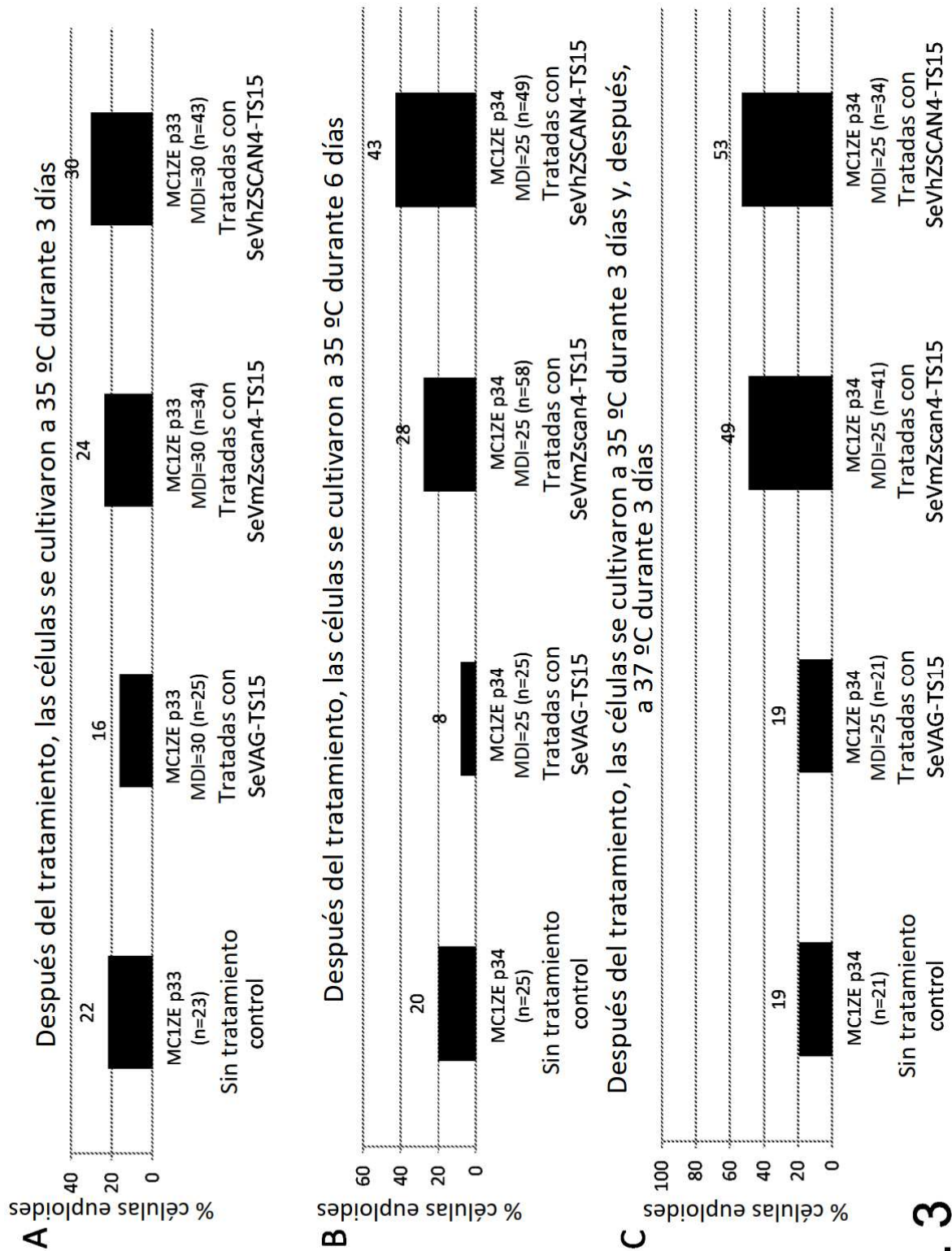


FIG. 3

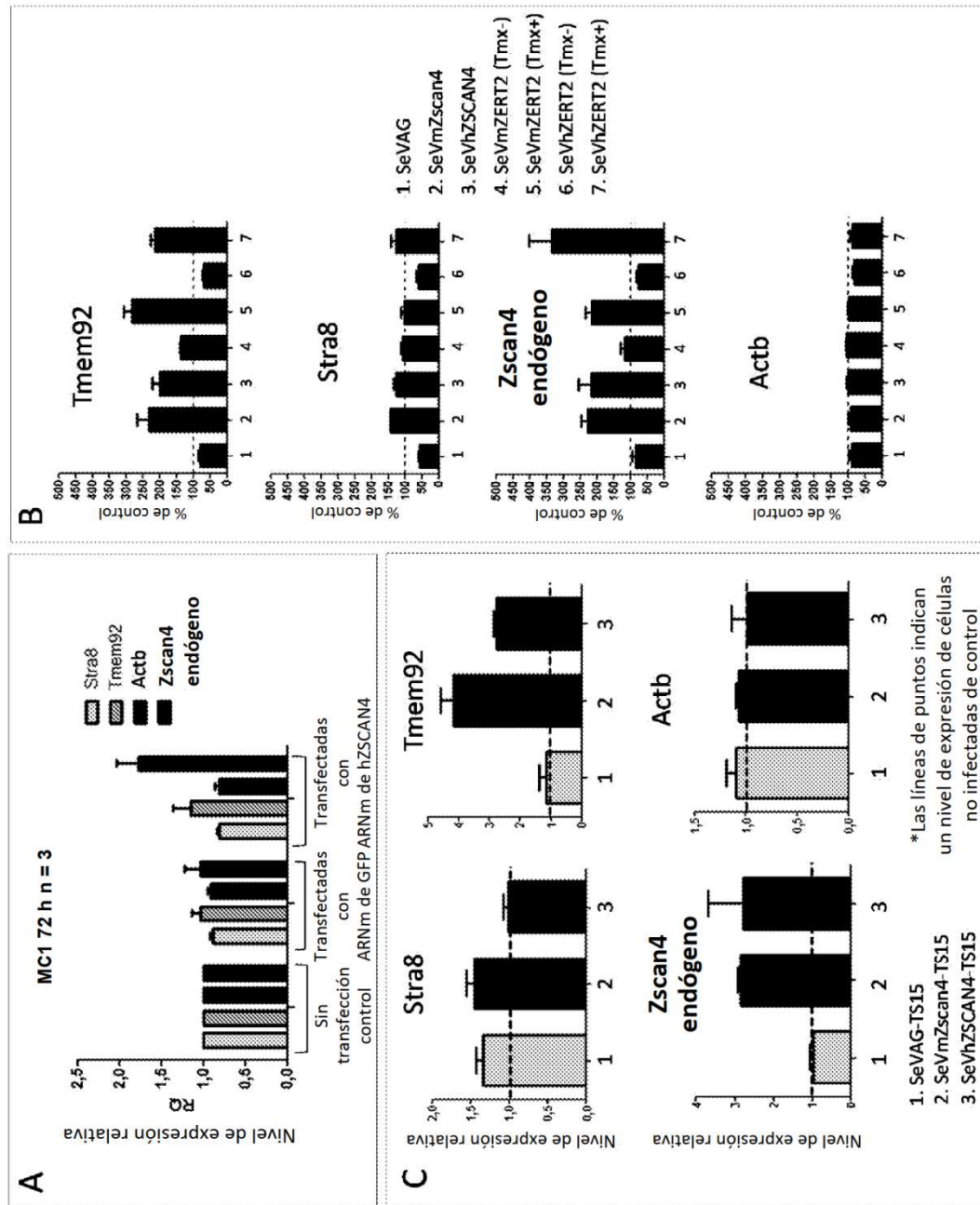


FIG. 4

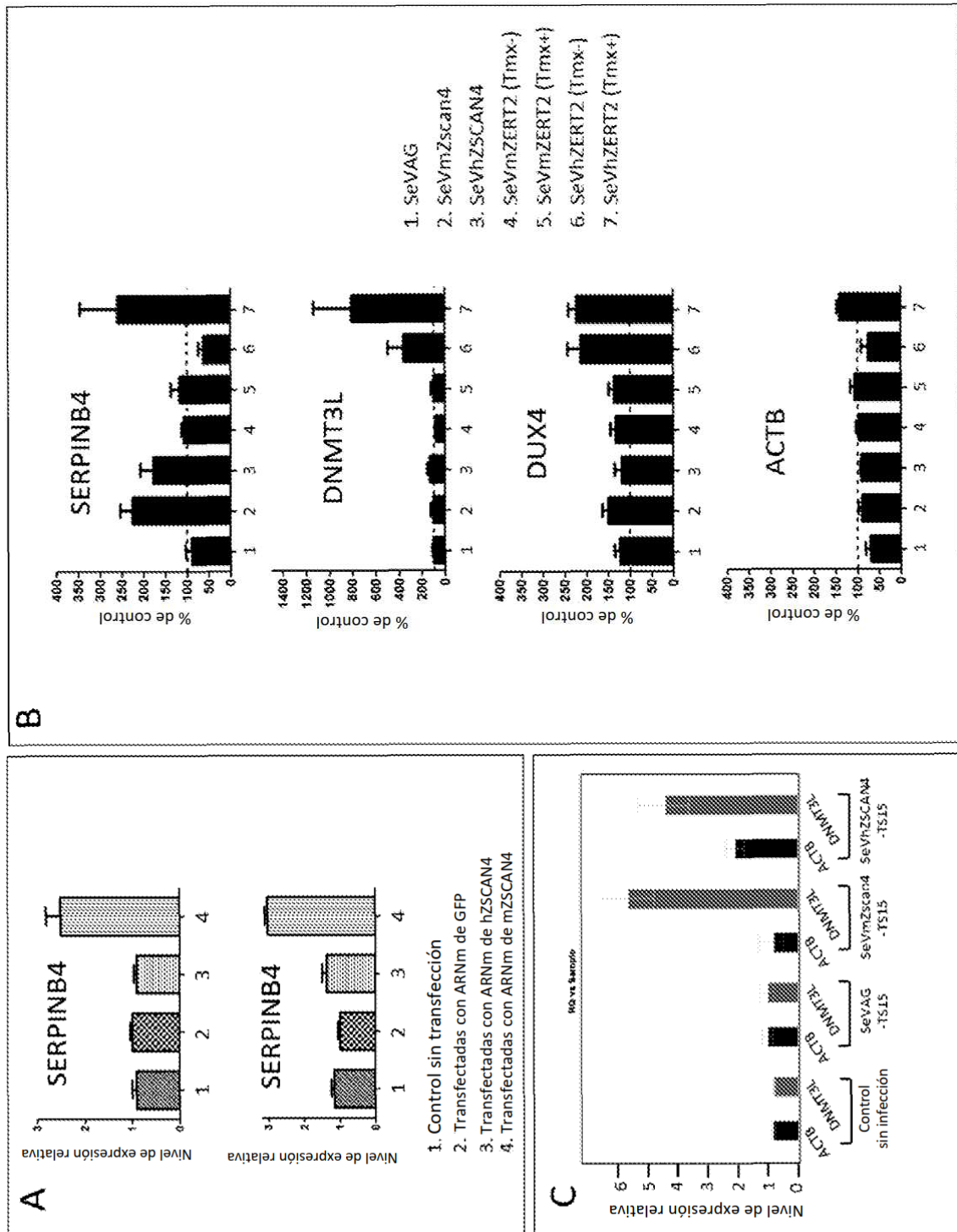


FIG. 5

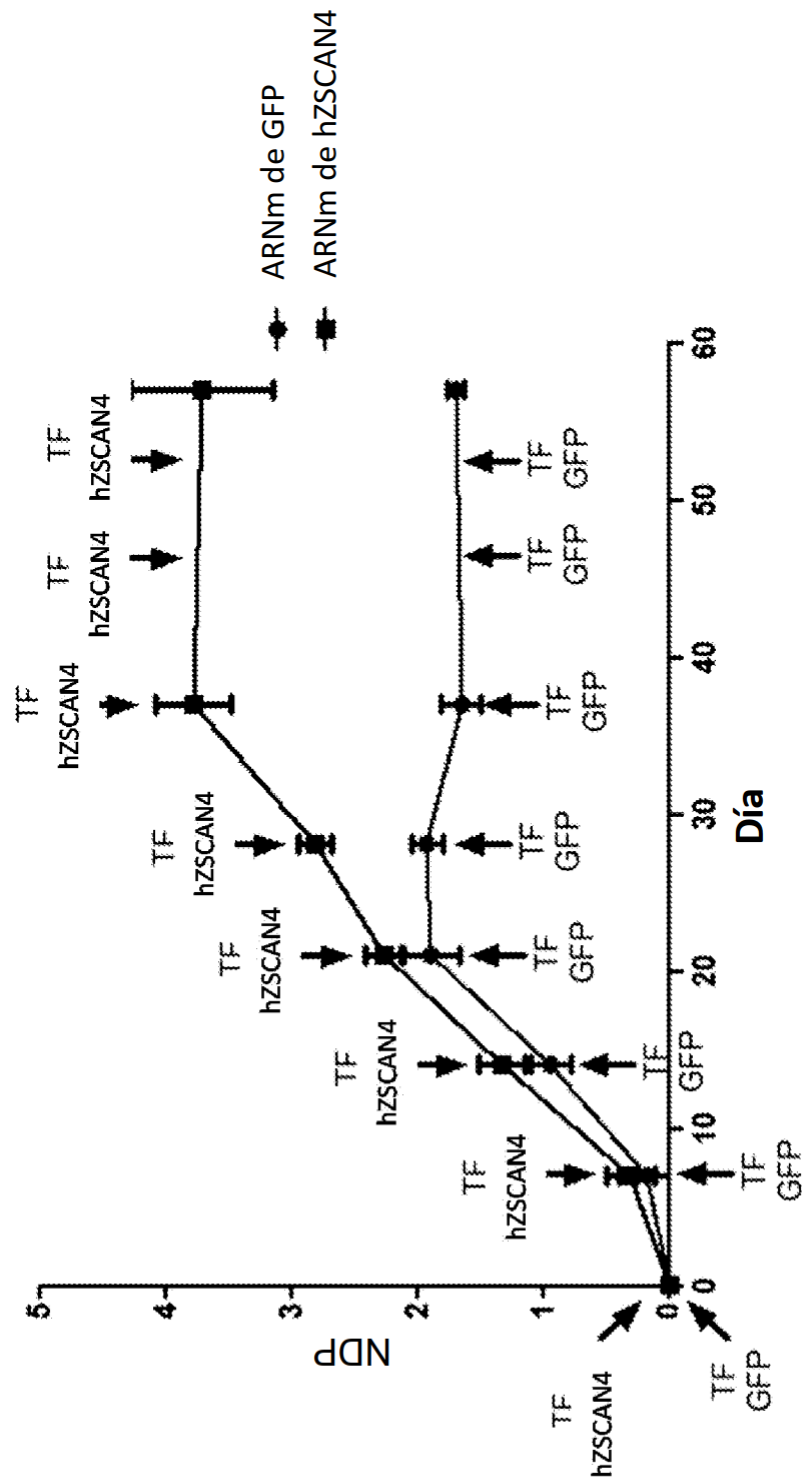


FIG. 6

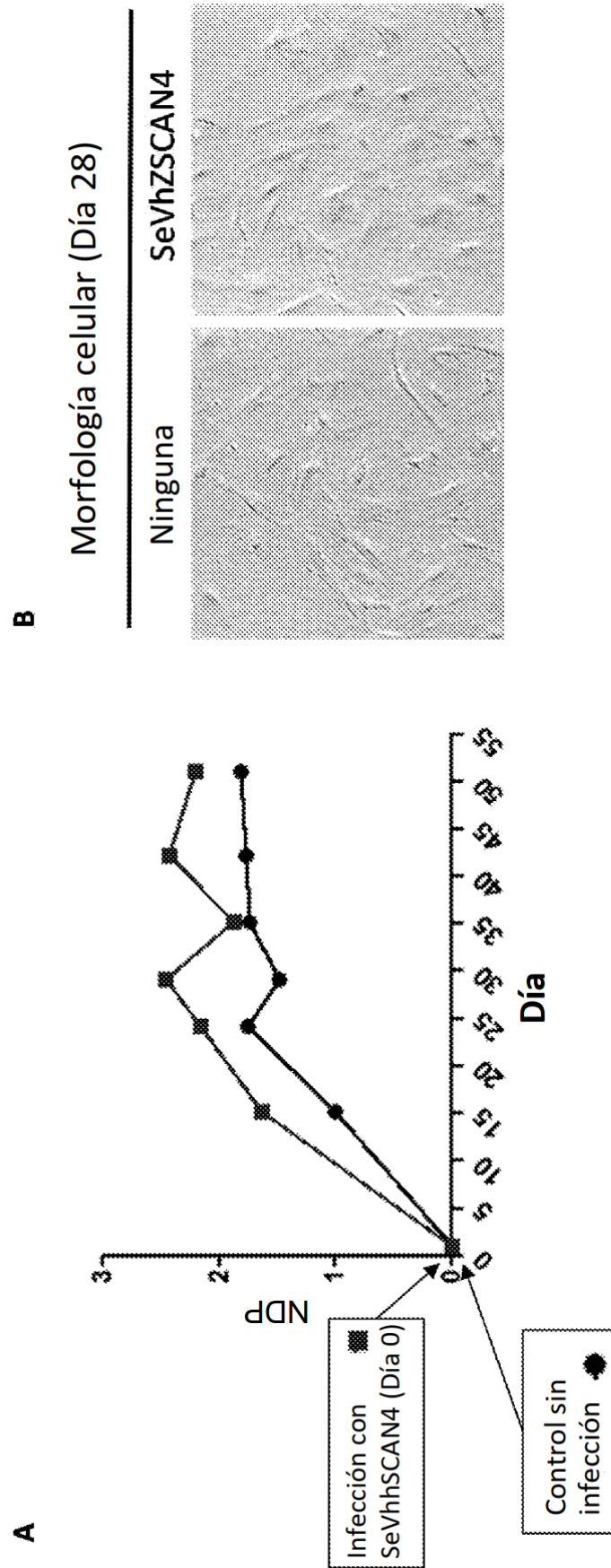


FIG. 7

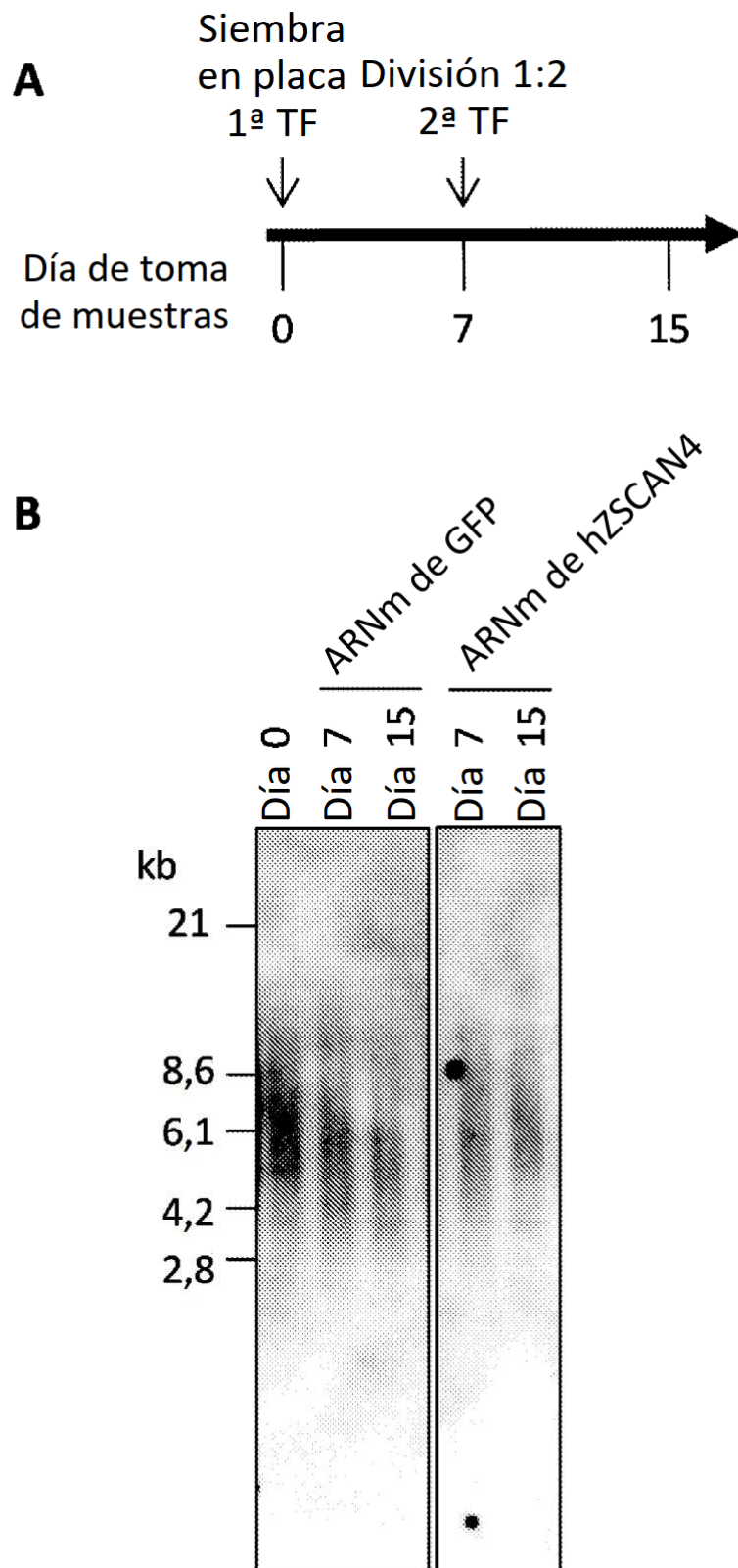


FIG. 8

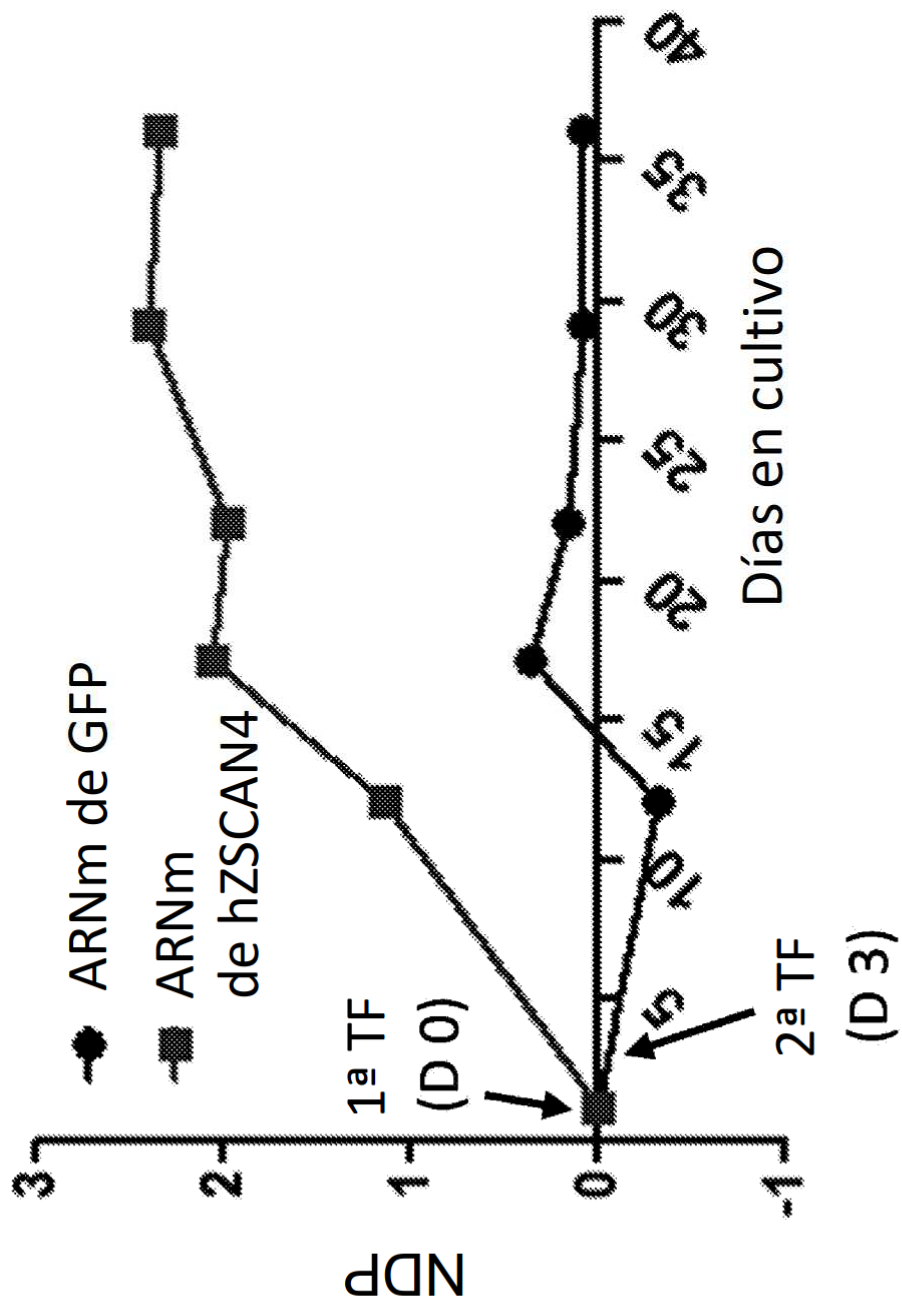


FIG. 9

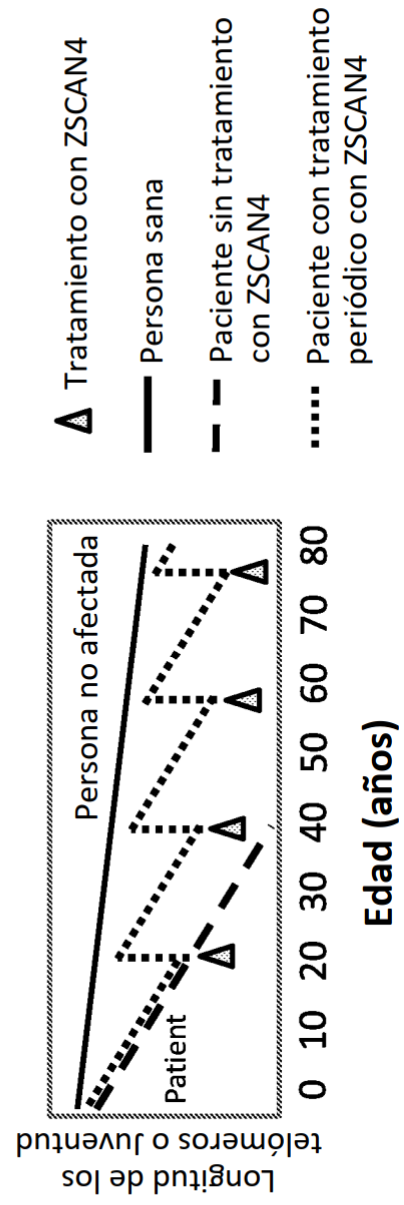
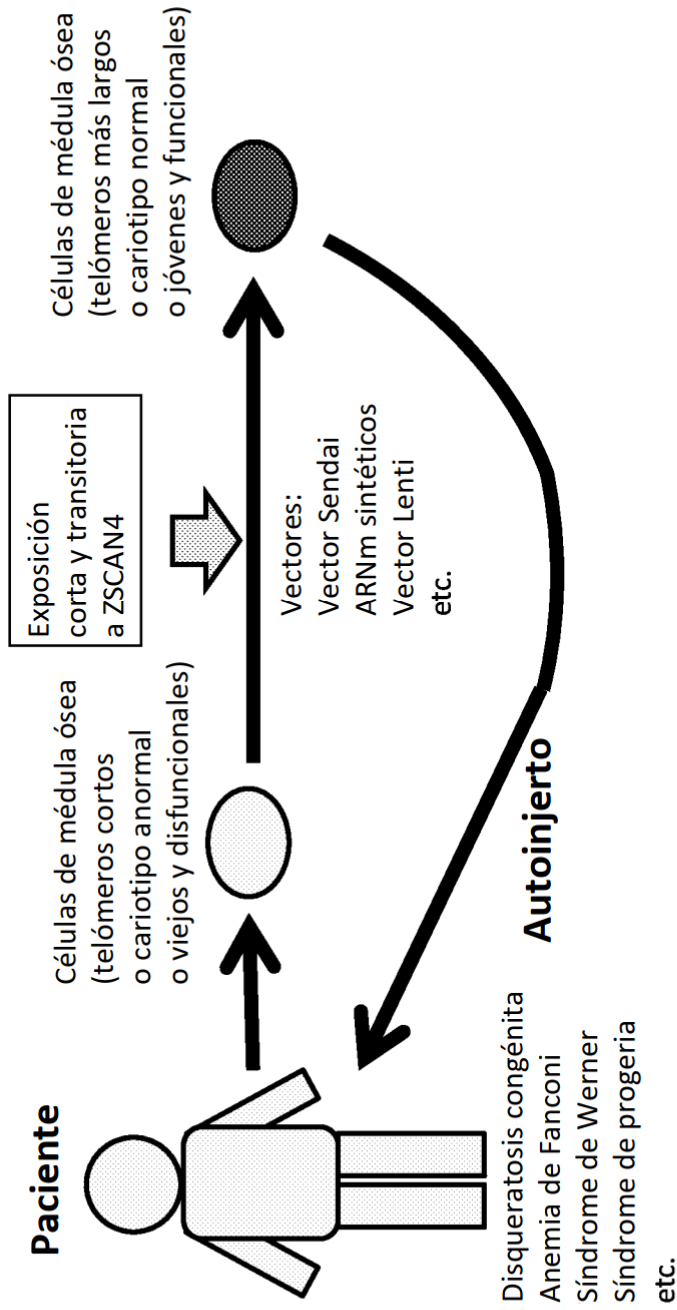


FIG. 10

Fibroblastos dérmicos humanos primarios
aislados de piel de adulto

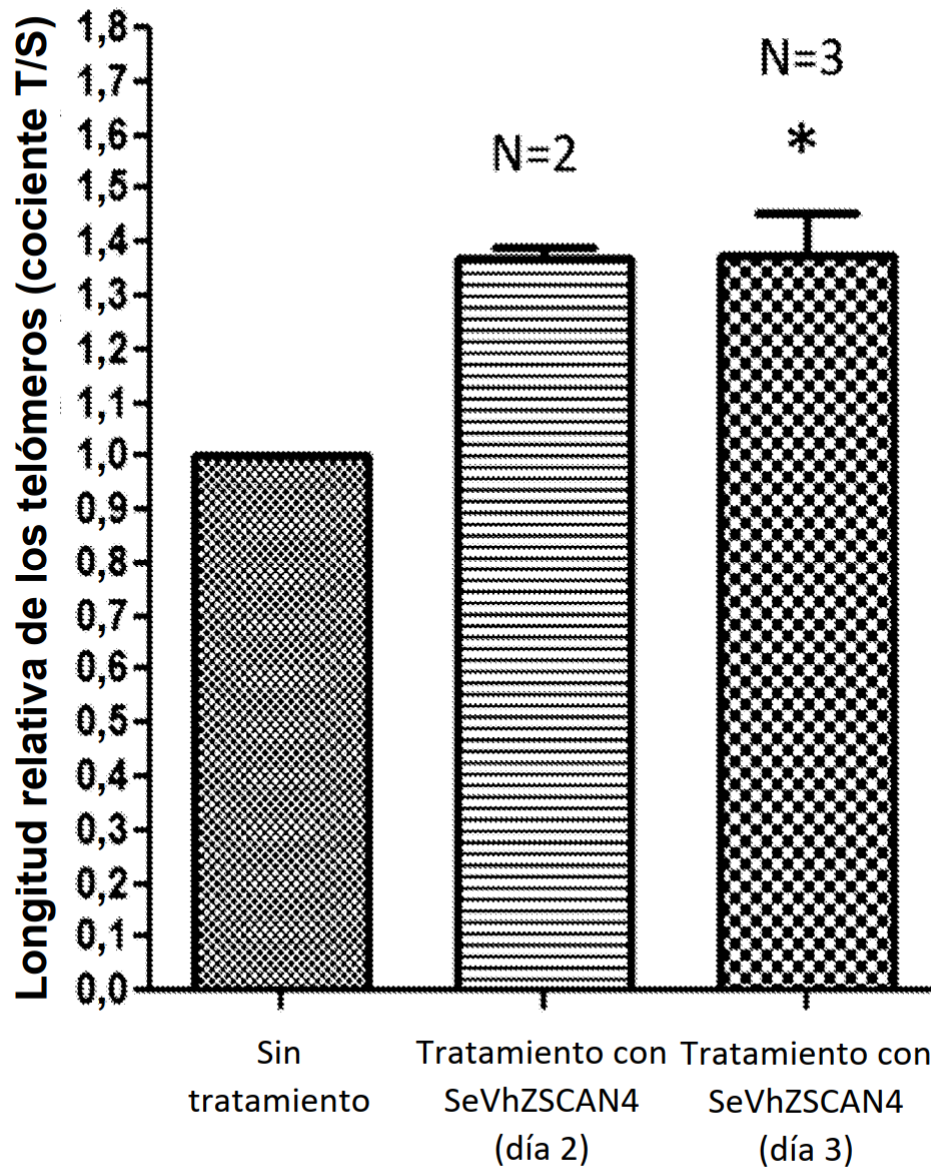


FIG. 11

Fibroblastos de pacientes de FANCA

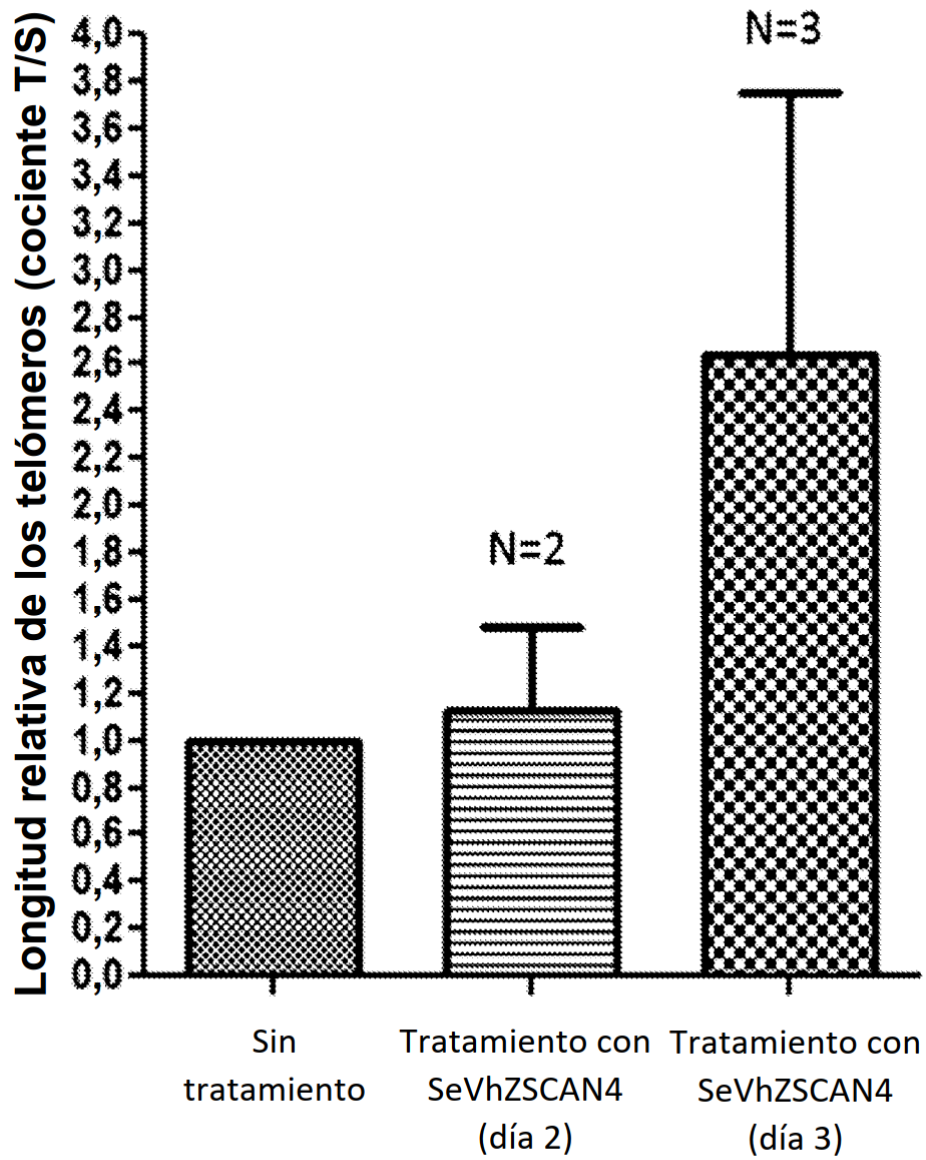
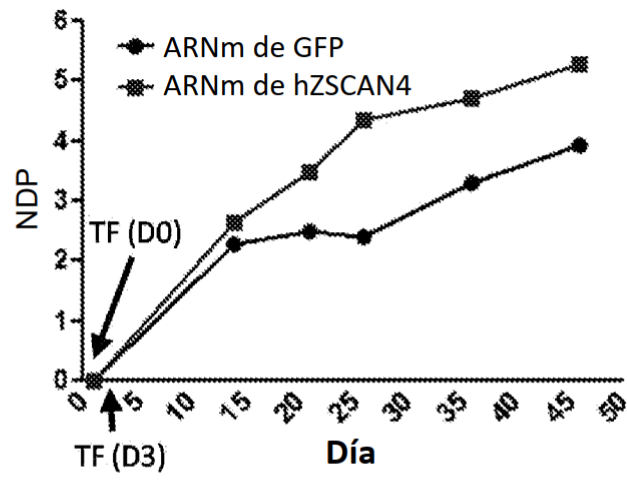
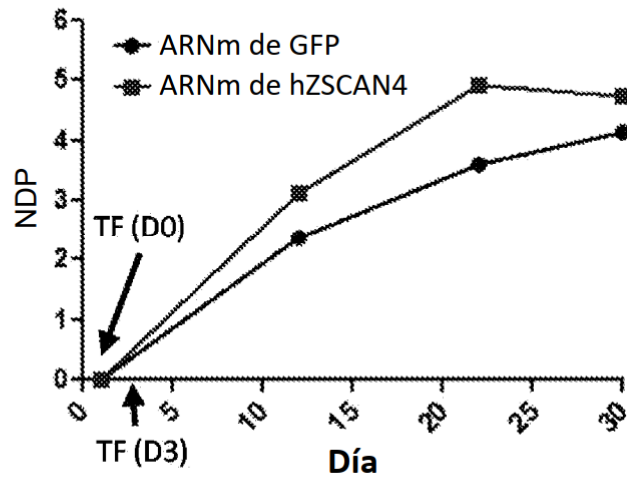


FIG. 12

A



B



C

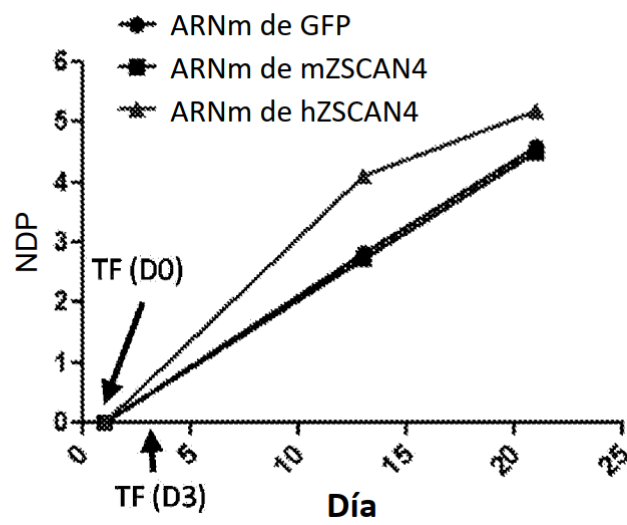
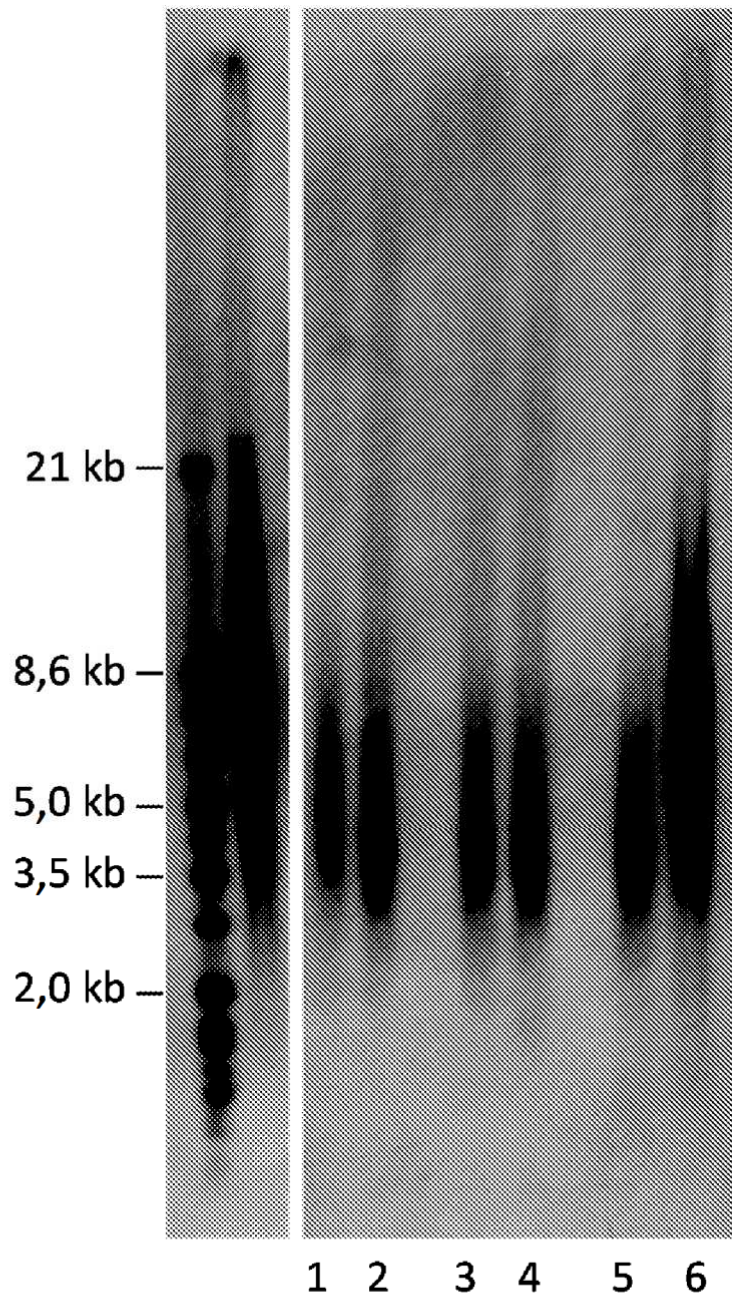


FIG. 13



1. SeVAG-TS15 (P3, D14) -> 6,9 kb
2. SeVAG-TS15 (P7, D62) -> 6,7 kb
3. SeVmZscan4-TS15 (P3, D14) -> 6,8 kb
4. SeVmZscan4-TS15 (P7, D62) -> 6,7 kb
5. SeVhZSCAN4-TS15 (P3, D62) -> 6,7 kb
6. SeVhZSCAN4-TS15 (P7, D62) -> 7,8 kb

FIG. 14

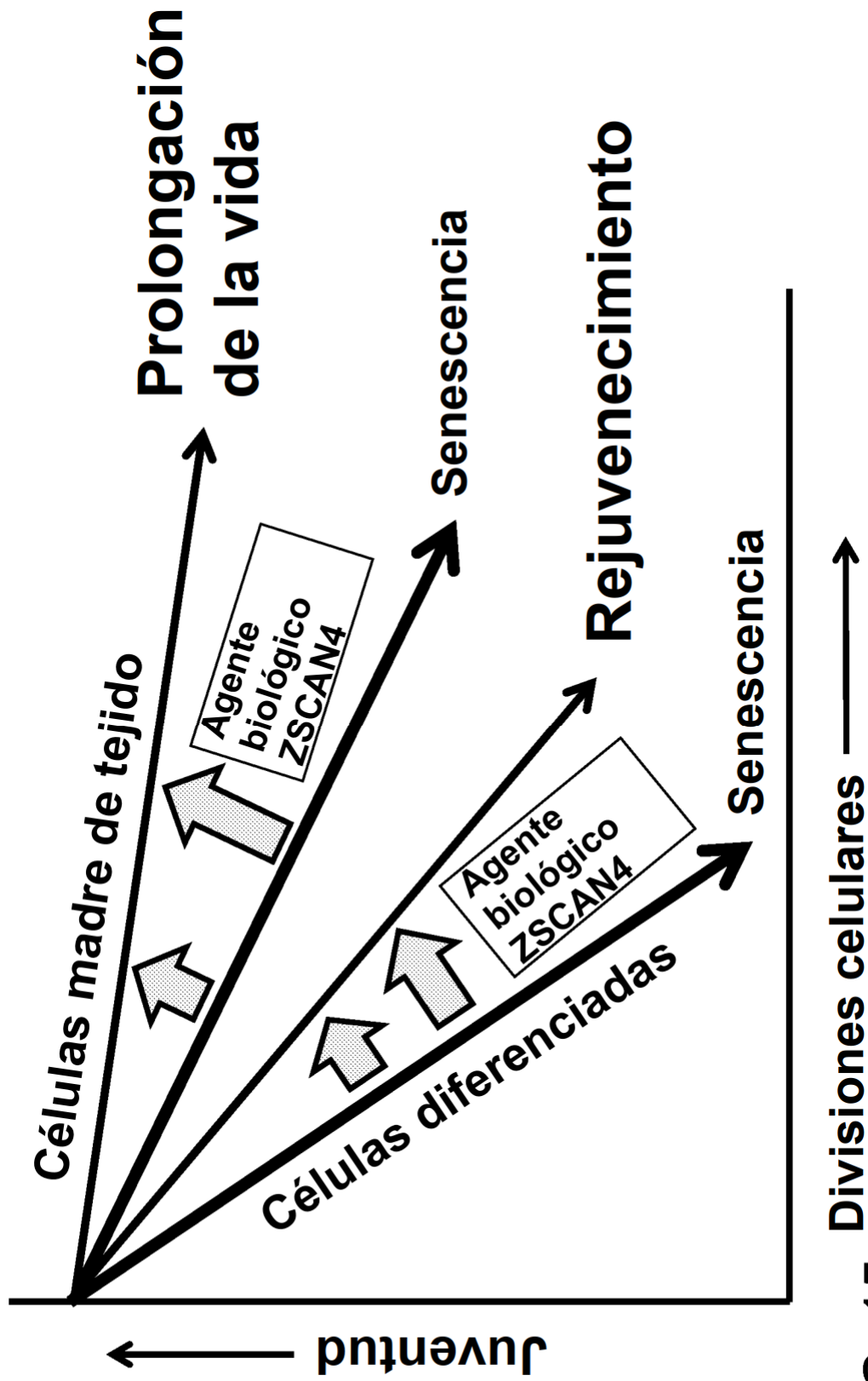


FIG. 15

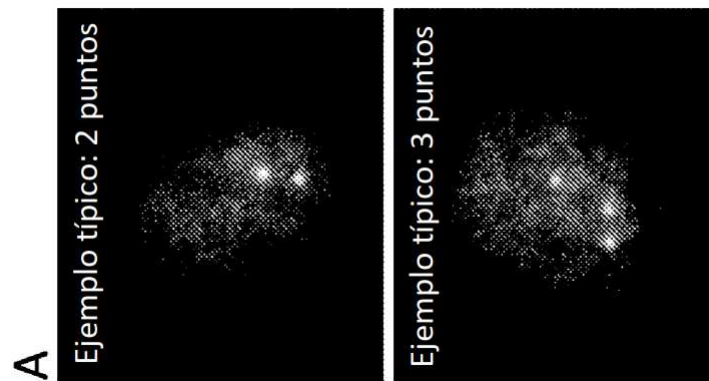
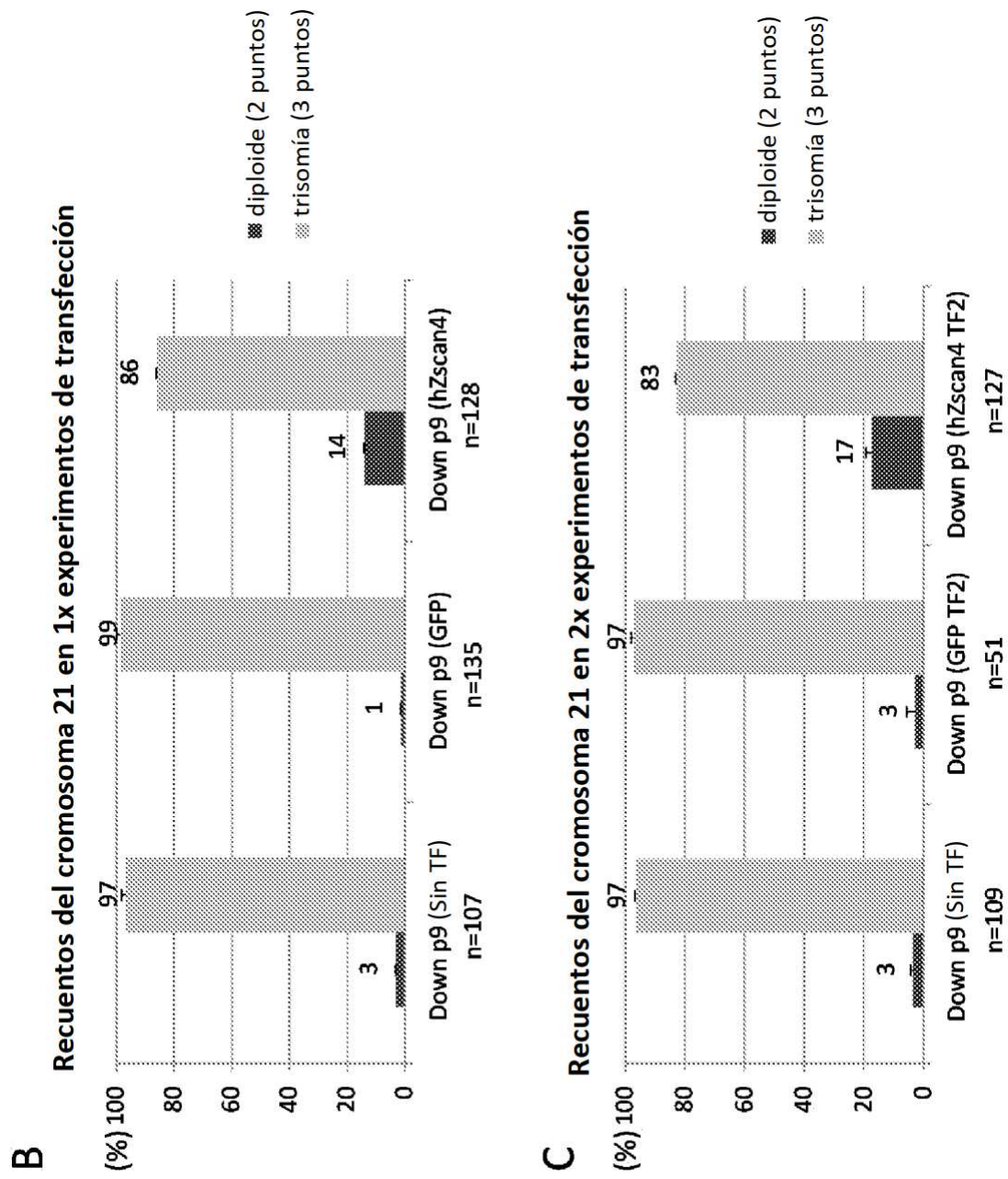
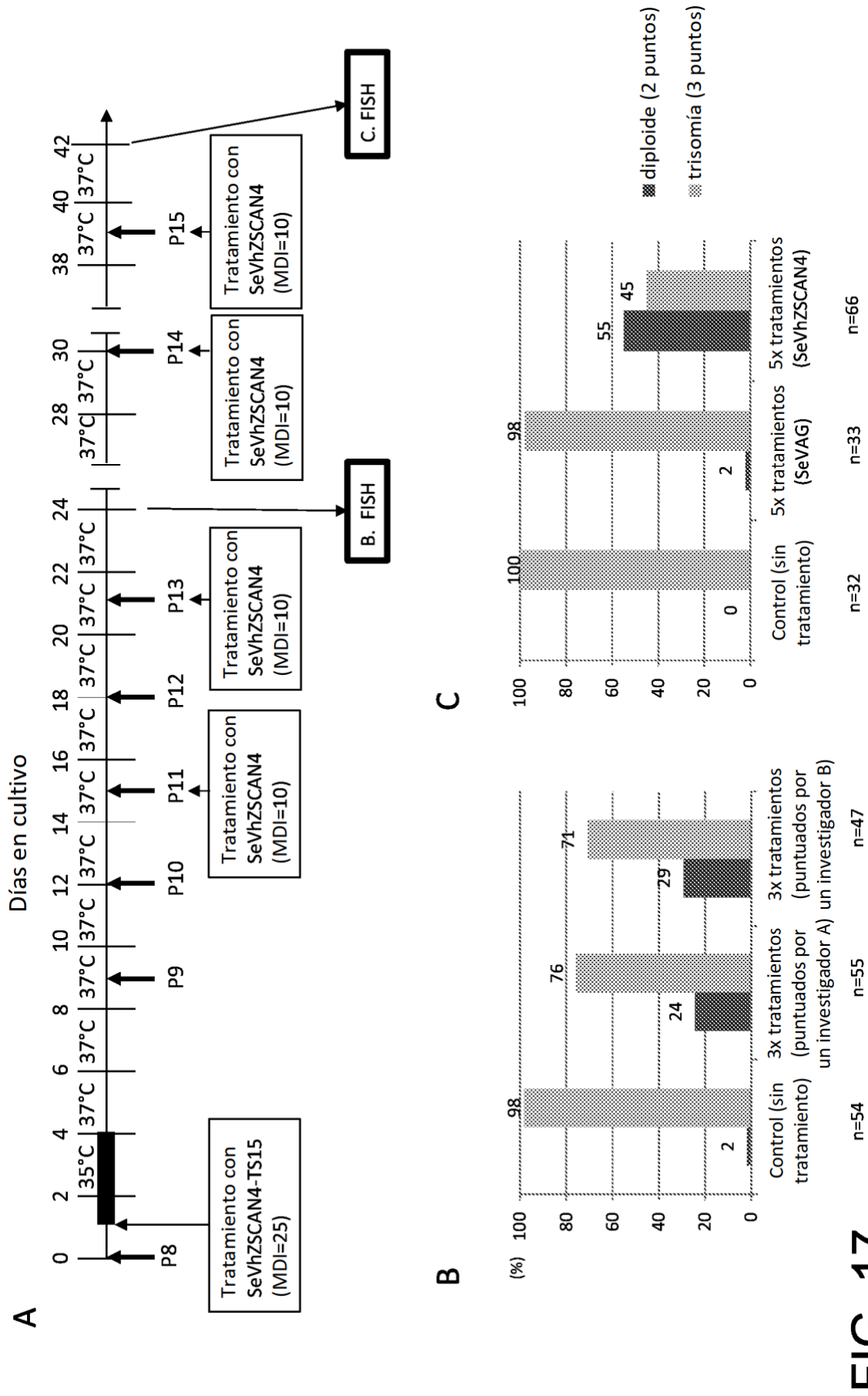


FIG. 16



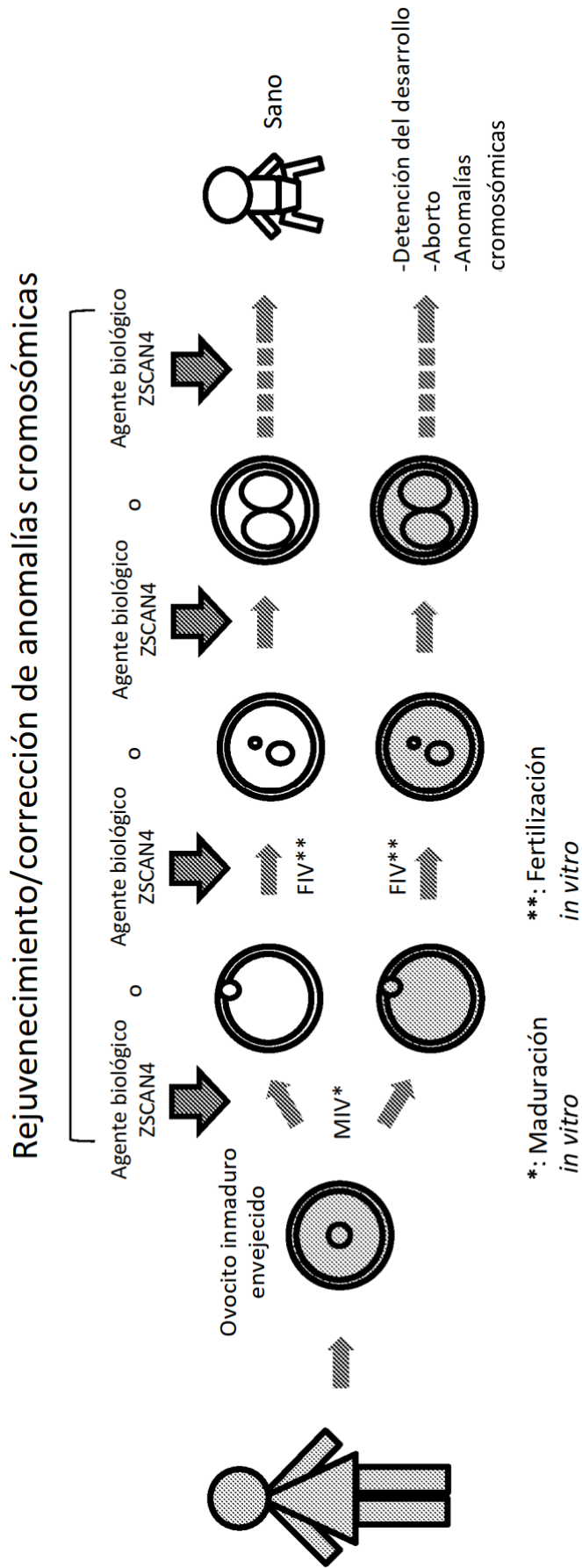


FIG. 18

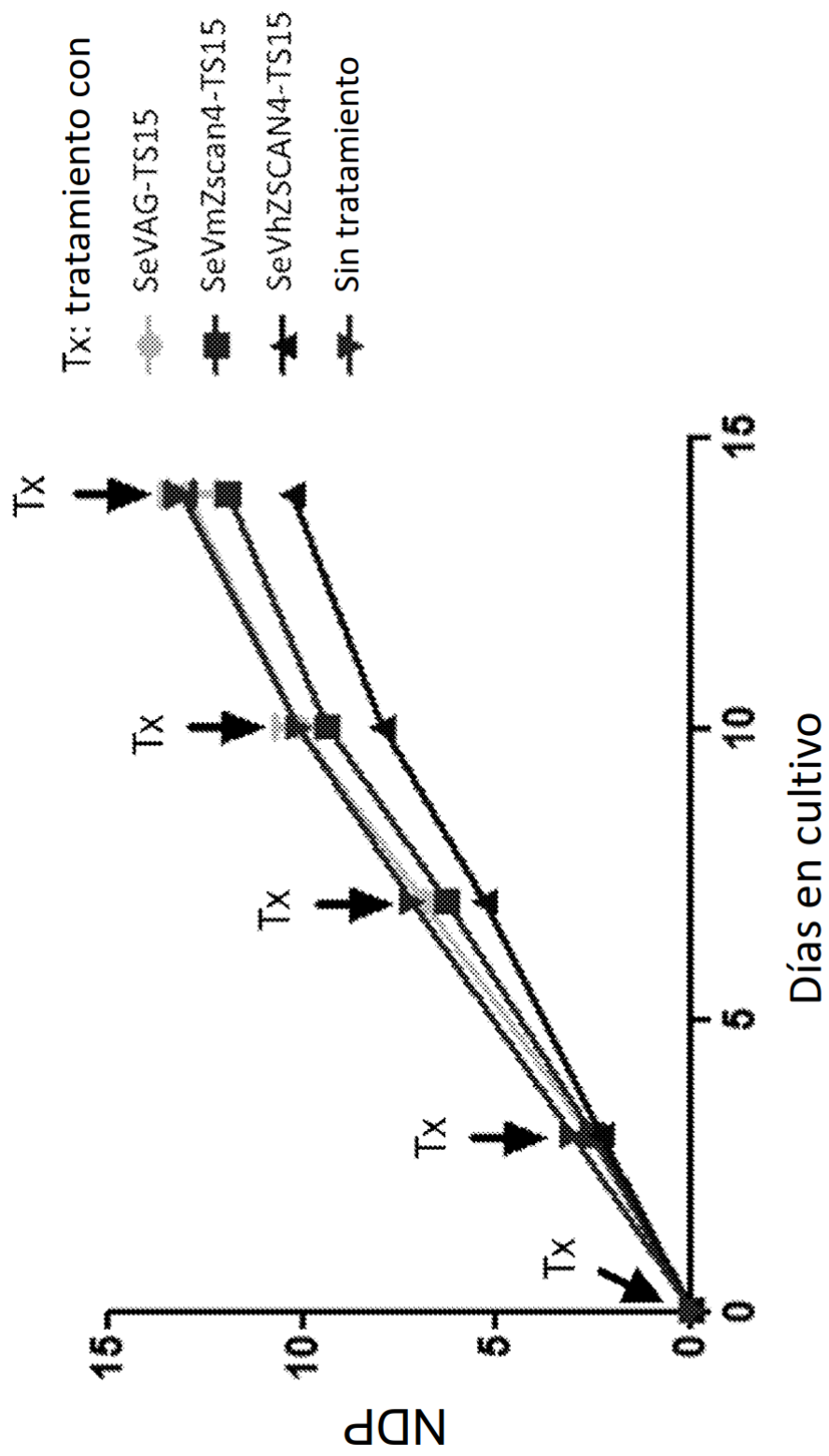


FIG. 19