

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 402**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2012** **E 18183987 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3415616**

54 Título: **Método de rejuvenecimiento celular**

30 Prioridad:

08.04.2011 EP 11161771

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

03.12.2024

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE -CNRS (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PRIEUR, ALEXANDRE;
MILHAVET, OLLIVIER;
LEMAITRE, JEAN-MARC y
LAPASSET, LAURE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

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

ES 2 991 402 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de rejuvenecimiento celular

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a células madre pluripotentes inducidas rejuvenecidas (iPSC) para su uso en terapia regenerativa autóloga en un paciente humano adulto como se define en el juego de reivindicaciones adjunto. La divulgación se refiere a un método para reprogramar células de donantes envejecidos o células senescentes a células pluripotentes que han perdido las marcas de senescencia. En particular, la divulgación se refiere a un método ex vivo para preparar células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de una población de células diana de donantes envejecidos o células senescentes, comprendiendo dicho método las etapas de cultivar dicha población de células diana en condiciones apropiadas para reprogramar dichas células en iPSC, en donde dichas condiciones apropiadas comprenden aumentar la expresión en dichas células diana de al menos la siguiente combinación de factores de reprogramación: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y, opcionalmente, Nanog.

Estado de la técnica

El descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) por S. Yamanaka^{1,2} y los rapidísimos avances de la tecnología de iPSC han abierto una nueva vía en la medicina regenerativa autóloga, según la cual podrían derivarse potencialmente células pluripotentes específicas del paciente de células somáticas adultas. Se han obtenido iPSC de forma reproducible en diferentes tipos celulares mediante la expresión forzada del cóctel de factores de transcripción OCT4, SOX2, c-MYC y KLF4 o mediante una combinación alternativa de factores, sustituyendo KLF4 y c-MYC por NANOG y LIN28³.

La senescencia celular está vinculada al envejecimiento fisiológico, y se caracteriza por una detención del ciclo celular estable en respuesta a diversas formas de estímulos de estrés, incluida la activación de oncogenes o telómeros extremadamente acortados, denominada senescencia replicativa^{9,10}. Una característica común es la activación de las rutas supresoras de tumores p53/p21^{CIP1} y pRb/p16^{INK4A} en estas células, asociadas a la alteración de la morfología, el aumento de la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), un secretoma de SA específico (SASP) y la formación de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF), que se cree que están implicados en la represión de genes que promueven la división celular¹¹.

El documento EP 2 096 169 divulga un proceso para generar células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas, que comprende la etapa de introducir los seis genes siguientes: gen de la familia Oct, gen de la familia Klf, gen de la familia Sox, gen de la familia Myc, Lin28 y Nanog en células somáticas.

Sin embargo, esta combinación específica de factores de reprogramación nunca se ha aplicado a células senescentes o células procedentes de donantes de edad avanzada.

Varios grupos han descrito recientemente que la senescencia celular es un obstáculo para la reprogramación, debido a la regulación al alza de p53, p16^{INK4A} y p21^{CIP1}, lo que sugiere que el envejecimiento celular podría ser una limitación importante de esta tecnología. En consecuencia, se ha propuesto la supresión de diferentes efectores de senescencia como una posible solución para mejorar la eficiencia de la generación de iPSC⁴⁻⁸.

El documento WO 2011/016588 sugiere el uso de inhibidores funcionales de p53 junto con un cóctel de factores de reprogramación compuesto por Oct3/4, Sox2, Klf4, L-myc y Lin28. Como inhibidores funcionales de p53, se usaron ARNhc de p53.

Los inventores han demostrado ahora que el uso de la combinación específica de los seis factores OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, c-MYC y LIN28 permite la reprogramación eficiente tanto de fibroblastos proliferativos centenarios como senescentes en iPSC humanas, sin necesidad de suprimir los efectores de senescencia, contrariamente a los prejuicios técnicos en la técnica relacionados con la reprogramación de células senescentes.

Además, los inventores demostraron que esta reprogramación restablece el tamaño de los telómeros, el perfil de expresión génica, el estrés oxidativo y el metabolismo mitocondrial observados en las células madre embrionarias humanas (hESC). Sorprendentemente, las iPSC derivadas de células envejecidas y senescentes no conservan marcas detectables del fenotipo de envejecimiento celular, y son indistinguibles de las hESC. Por último, las iPSC rediferenciadas en fibroblastos presentan un mayor potencial de proliferación y un perfil de expresión génica equivalente al de los fibroblastos proliferativos jóvenes, lo que demuestra que la estrategia de reprogramación según la presente divulgación borra las marcas del fenotipo de envejecimiento celular, definiendo un nuevo método para producir células rejuvenecidas.

Hasta donde sabe el solicitante, la divulgación es la primera descripción de un método para producir iPSC con células de donantes envejecidos o células senescentes, por tanto, la divulgación puede ser muy útil en particular en medicina regenerativa autóloga, por lo cual células pluripotentes específicas del paciente podrían derivarse

potencialmente de células somáticas adultas envejecidas o senescentes, y también encontrará numerosas aplicaciones en el campo de la investigación. Además, la divulgación es útil como método general para rejuvenecer células senescentes o células de donantes envejecidos, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

El documento WO2011/016588 divulga un método de producción de una célula iPS que comprende poner en contacto (a) Oct3/4 o un ácido nucleico que codifica el mismo, (b) Klf4 o un ácido nucleico que codifica el mismo y (c) Sox2 o un ácido nucleico que codifica el mismo, así como (d1) L-Myc o un ácido nucleico que codifica el mismo y/o (d2) un inhibidor funcional de p53, con una célula somática. El documento WO 2010/105311 divulga un método de producción de una célula reprogramada que comprende exponer células multipotenciales Stro-1+ y/o células de progenie de las mismas a uno o más factores determinantes de la potencia en condiciones suficientes para reprogramar las células.

Objeto de la invención

La invención se define en el juego de reivindicaciones adjunto.

Un primer aspecto de la divulgación se refiere a un método *ex vivo* para preparar células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de una población de células diana que comprende células de donantes envejecidos o células senescentes o células que sobreexpresan los efectores de senescencia p16^{INK4A} o p21^{CIP}, comprendiendo dicho método comprende las etapas de:

a) proporcionar dicha población de células diana que comprende células de donantes envejecidos o células senescentes o células que sobreexpresan los efectores de senescencia p16^{INK4A} o p21^{CIP}, y,

b) cultivar dicha población de células diana en condiciones apropiadas para reprogramar dicha población de células diana en iPSC, en donde dichas condiciones apropiadas comprenden el aumento de la expresión en dicha población de células diana de al menos la siguiente combinación de factores de reprogramación:

i. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Oct,

ii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Klf,

iii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Sox,

iv. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Myc, y

v. Lin28,

vi. y, opcionalmente, Nanog.

En una realización preferida, dichas condiciones apropiadas comprenden el aumento de la expresión en dicha población de células diana de los siguientes factores de reprogramación: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc (o L-myc), Lin28 y, opcionalmente, Nanog. En una realización relacionada, dichas condiciones apropiadas comprenden el aumento de la expresión en dicha población de células diana de los siguientes factores de reprogramación: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc (o L-myc), Lin28 y Nanog.

Los inventores han demostrado que las marcas de senescencia pueden borrarse completamente mediante el método de la divulgación. Así, ventajosamente, la población de células diana puede seleccionarse de una población de células que comprende células somáticas adultas de donantes envejecidos o células senescentes tales como fibroblastos senescentes, o de cualquier tipo de células que albergan fisiología asociada a envejecimiento o senescencia, como el síndrome de envejecimiento prematuro. En una realización específica, la población de células diana es una población de células humanas obtenidas de un sujeto adulto de al menos 50 años de edad, aparentemente sin límites de edad, ya que una población de células de un donante de 101 años de edad se reprogramó eficientemente con esta estrategia, por ejemplo al menos 60, 70, 80, 90 o 100 años de edad, por ejemplo que necesita terapia celular autóloga regenerativa.

El método no comprende ninguna etapa de silenciamiento directo de los efectores de senescencia, tales como p21^{CIP1} y/o p16^{INK4a} y/o p53. En particular, el método puede no comprender ningún uso de inhibidores funcionales de p53, tales como ARNhc de p53.

En una realización, las condiciones para aumentar la expresión de los factores de reprogramación enumerados anteriormente comprenden

(a) introducir uno o más vectores de expresión que comprenden las secuencias codificantes de dichos factores de reprogramación; o,

(b) administrar directamente una cantidad eficaz de cada factor de reprogramación o de su ARN precursor, en dicha población de células diana.

5 En una realización específica, el método de la divulgación comprende la etapa de transfectar dicha población de células diana con una combinación de vectores virales, comprendiendo cada vector viral la secuencia codificante de cada uno de los factores de reprogramación, Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc (o L-myc), Lin28 y, opcionalmente, Nanog.

10 La divulgación se refiere además a las células madre pluripotentes inducidas obtenibles mediante el método descrito anteriormente, en particular a células madre pluripotentes inducidas obtenibles por el método y obtenidas a partir de células envejecidas o senescentes.

15 La divulgación se refiere además a un método *in vitro* para rejuvenecer células de donantes envejecidos o células senescentes que comprende reprogramar dichas células de donantes envejecidos o células senescentes a células madre pluripotentes inducidas, mediante el aumento de la expresión en dichas células de donantes envejecidos o células senescentes de al menos una combinación de los siguientes factores de reprogramación:

- i. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Oct,
- 20 ii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Klf,
- iii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Sox,
- iv. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Myc, y,
- 25 v. Lin28,
- vi. y, opcionalmente, Nanog.

30 La divulgación se refiere además a una composición para su uso *in vivo* en el rejuvenecimiento de células de donantes envejecidos o células senescentes en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicha composición medios para aumentar la expresión de los siguientes factores de reprogramación Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y, opcionalmente, Nanog en dichas células envejecidas o senescentes.

35 En una realización, dichos medios para aumentar la expresión de dichos factores de reprogramación comprenden una combinación de proteína Oct4, proteína Klf4, proteína Sox2, proteína c-Myc, proteína Lin28 y, opcionalmente, proteína Nanog, en donde cada proteína está asociada a medios apropiados para la administración de dicha proteína en el núcleo de las células que van a rejuvenecerse.

40 Alternativamente, dichos medios para aumentar la expresión de dichos factores de reprogramación pueden comprender una combinación de ARN precursor de Oct4, ARN precursor de Klf4, ARN precursor de Sox2, ARN precursor de c-Myc, ARN precursor de Lin28 y, opcionalmente, ARN precursor de Nanog, en donde cada ARN precursor está asociado a medios apropiados para la administración de cada ARN precursor en el citoplasma de las células que van a rejuvenecerse.

45 Las composiciones de la divulgación tal como se han descrito anteriormente pueden ser ventajosamente adecuadas para aplicación tópica.

Descripción detallada de la invención

50 Un primer aspecto de la divulgación se refiere a un método *ex vivo* para preparar células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de una población de células diana que comprende células de donantes envejecidos o células senescentes o células que sobreexpresan los efectores de senescencia p16^{INK4A} o p21^{CIP}, comprendiendo dicho método las etapas de:

55 a) proporcionar dicha población de células diana que comprende células de donantes envejecidos o células senescentes o células que sobreexpresan los efectores de senescencia p16^{INK4A} o p21^{CIP}, y,

60 b) cultivar dicha población de células diana en condiciones apropiadas para reprogramar dicha población de células diana en iPSC, en donde dichas condiciones apropiadas comprenden el aumento de la expresión en dicha población de células diana de al menos la siguiente combinación de factores de reprogramación:

- i. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Oct,
- 65 ii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Klf,

- iii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Sox,
- iv. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Myc, y,
- 5 v. Lin28, y, opcionalmente,
- vi. Nanog.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “pluripotente” se refiere a células con la capacidad de dar lugar a progenie que puede experimentar diferenciación, en condiciones apropiadas, en tipos celulares que presentan colectivamente características asociadas con linajes celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre pluripotentes pueden contribuir a los tejidos de un organismo prenatal, postnatal o adulto. Para establecer la pluripotencia de una población celular, puede usarse una prueba estándar aceptada en la técnica, tal como la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad. Sin embargo, la identificación de diversas características de células madre pluripotentes también puede usarse para identificar células pluripotentes.

Más específicamente, las células madre pluripotentes humanas pueden expresar al menos algunos, y opcionalmente todos, los marcadores de la siguiente lista no limitativa: SSEA-3, SSEA-4, TRA-I-60, TRA-I-81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox2, E-cadherina, UTF-1, Oct4, Lin28, Rex1 y Nanog.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula madre pluripotente inducida” se refiere a una célula madre pluripotente derivada artificialmente de una célula no pluripotente. Una célula no pluripotente puede ser una célula de menor potencia para autorrenovarse y diferenciarse que una célula madre pluripotente. Las células de menor potencia pueden ser, pero no se limitan a, células madre somáticas, células progenitoras específicas de tejido, células primarias o secundarias. Una ventaja notable del presente método es que permite la producción de células madre pluripotentes inducidas a partir de cualquier célula somática, incluidas células envejecidas o senescentes, que anteriormente se creía que no eran inducibles a la pluripotencia debido a su fenotipo de envejecimiento.

30 El término “reprogramación” se refiere al proceso de cambiar el destino de una célula diana al de un tipo celular diferente, provocado por la expresión de un pequeño conjunto de factores (o factores de reprogramación) en las células diana. Por ejemplo, Takahashi y Yamanaka, 2006¹ han descrito métodos para reprogramar células de fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas mediante la expresión ectópica de Oct3/4, Sox2, c-myc y Klf4.

35 Por consiguiente, un “factor de reprogramación” es un factor, por ejemplo, puede ser un factor de transcripción, que puede usarse para reprogramar una célula diana. El término “factor de reprogramación” incluye además cualquier molécula análoga que imite la función del factor con respecto a la capacidad de reprogramación.

40 La población de células diana para su uso en el método de la divulgación

La población de células diana para su uso en el método de la presente divulgación es ventajosamente una población celular que comprende células de donantes envejecidos o células senescentes o células que sobreexpresan los efectores de senescencia p16^{INK4A} o p21^{CIP1}. Estas células pueden obtenerse de tejidos vivos o congelados de animales.

50 El término “células senescentes” hace referencia a las células que presentan una detención del ciclo celular, generalmente durante la transición G1 del ciclo celular o, en pocos casos, en G2, provocada por agotamiento replicativo debido al desgaste de los telómeros o en respuesta a situaciones de estrés tales como daños en el ADN, fármacos quimioterápicos o expresión aberrante de oncogenes. Esta detención se implementa principalmente mediante la activación de p53 y la regulación al alza de los inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CDK) p16^{INK4A} y p21^{CIP1} (Collado *et al.* 2007, Cell, 130: 223-233).

Las “células senescentes” pueden caracterizarse por al menos una o más de las siguientes características:

- activación de las rutas supresoras de tumores p53/p21^{CIP1} y pRb/p16^{INK4A} (a continuación en el presente documento, efectores de senescencia),
- células detenidas irreversiblemente en G1,
- acortamiento del tamaño de los telómeros,
- expresión de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal),
- 65 - modificación específica de la cromatina como focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF),

- secretoma específico,

- reducción/alteración de la actividad mitocondrial global.

- 5 La detención celular irreversible en G1 puede evaluarse mediante FACS tal como se describe en Matsuura *et al*²⁵ y se resume brevemente a continuación:

Para analizar el ciclo celular, se fijan células tripsinizadas con EtOH al 70 % enfriado durante al menos 15 min a 4 °C. Las células fijadas se centrifugan y se resuspenden en PBS antes de tefirlas con yoduro de propidio (10 µg/ml) más ARNasa A (250 µg/ml) durante 30 min y analizarlas por citometría de flujo, usando por ejemplo un instrumento FacsCalibur II (BD Biosciences).

- 10 El acortamiento del tamaño de los telómeros puede caracterizarse evaluando la longitud media de fragmentos de restricción terminales (TRF), por ejemplo, mediante análisis de transferencia de tipo Southern, por ejemplo, como se describe en los ejemplos más adelante.

Un método para detectar la expresión de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal) se describe en Matsuura *et al*²⁵ y se resume brevemente a continuación:

- 20 Se tiñen cultivos celulares como se describe (Dimri *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de sep. de 1995; 92(20):9363-7). Brevemente, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijan con paraformaldehído al 1 % durante 3 minutos a temperatura ambiente, después se lavan tres veces con PBS durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente. La tinción se realiza durante la noche en una incubadora no enriquecida con CO2 a 37 °C usando una disolución de pH 6 que contiene fosfato sódico 40 mM (dibásico), ácido cítrico 40 mM, NaCl 150 mM, MgCl2 2 mM, ferrocianuro potásico 5 mM, ferricianuro potásico 5 mM, X-gal 1 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactósido, Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las sales de cianuro y el X-gal se añaden a partir de disoluciones madre de 100 X recién preparadas en PBS y dimetilformamida, respectivamente. A continuación, las células se lavan tres veces con PBS durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente, antes del examen microscópico y la fotografía.

- 30 En los ejemplos más adelante se describe un método para detectar la expresión de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF) mediante inmunofluorescencia indirecta.

- 35 La actividad mitocondrial global puede evaluarse midiendo el potencial transmembrana generado por el gradiente de protones. En los ejemplos más adelante se describe, por ejemplo, un método para medir este parámetro usando el colorante catiónico JC-1.

Las células de donantes envejecidos comprenden una serie de células proliferativas que presentan ciertas características de las células senescentes, en particular

- 40 - regulación al alza de los supresores de tumores p16^{INK4A} y p21^{CIP1} (a continuación en el presente documento, denominados efectores de senescencia)
- 45 - disminución de la capacidad de proliferación,
- hipometilación de CpG del genoma global,
- heterocromatinización no programada.

- 50 La regulación al alza de los supresores de tumores p16^{INK4A} y p21^{CIP1} puede observarse usando técnicas habituales en la técnica para medir la expresión de proteínas y/o la expresión de ARNm, por ejemplo, inmunotransferencia de tipo Western, transferencia de tipo Northern o PCR en tiempo real. Se observa regulación al alza cuando se observa una expresión significativamente mayor de p16^{INK4A} y p21^{CIP1} en las células de prueba en comparación con células controladas (no senescentes), por ejemplo células madre embrionarias.

- 55 Los inventores han demostrado que las células proliferativas y senescentes de donantes envejecidos (más de 70 años) tienen una firma diferente, por ejemplo en cuanto a expresión génica o metabolismo, de las células de donantes jóvenes. Las iPSC obtenidas según el método tienen una firma más cercana a las células madre embrionarias y se distinguen en ese aspecto de las iPSC obtenidas con el cóctel convencional de 4 factores de reprogramación OCT4, SOX2, c-MYC y KLF4.

- 60 Hasta donde sabe el solicitante, el método de la divulgación que comprende el uso de una combinación de al menos 5, preferiblemente 6 factores de reprogramación específicos es el único método descrito en la técnica para generar células madre pluripotentes inducidas a partir de células senescentes o células de donantes envejecidos. En consecuencia, el método de la divulgación es particularmente útil para poblaciones celulares susceptibles de
- 65 contener células senescentes en una alta proporción.

En una realización preferida del método de la divulgación, dicha población de células diana comprende al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o al menos el 50 % de las células que presentan al menos una o más (o todas) de las siguientes características del fenotipo de envejecimiento:

- regulación al alza de los supresores de tumores p16^{INK4A} y p21^{CIP1} (a continuación en el presente documento, denominados efectores de senescencia),
- células detenidas irreversiblemente en G1,
- expresión de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA β -Gal),
- expresión de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF),
- alteración de la actividad mitocondrial global.

En otra realización específica, dicha población de células diana son células, tales como células dérmicas o fibroblastos, obtenidas de un sujeto adulto de al menos 50 años de edad, por ejemplo al menos 60, 70, 80, 90 o al menos 100 años de edad.

Tal población de células diana puede obtenerse de especies de mamíferos, y preferiblemente de especies de roedores, primates o humanos, más preferiblemente de especies humanas.

La población de células diana puede obtenerse de diversos tejidos, preferiblemente de un paciente humano de edad avanzada que necesita un tratamiento regenerativo autólogo.

En la técnica se conocen bien métodos para obtener muestras de diversos tejidos y métodos para establecer células primarias (véase, por ejemplo, Jones y Wise, *Methods Mol Biol.* 1997).

En una realización específica, dicha población de células diana se obtiene a partir de células primarias de sangre, médula ósea, tejido adiposo, piel, pelo, apéndices cutáneos, órganos internos tales como corazón, intestino o hígado, tejidos mesenquimatosos, músculo, hueso, cartílago o tejidos esqueléticos.

La combinación de factores de reprogramación para su uso en el rejuvenecimiento o la generación de iPSC

Una característica esencial de la presente divulgación es el uso de la siguiente combinación de factores de reprogramación para su uso en el rejuvenecimiento o la inducción de células madre pluripotentes a partir de la población de células diana:

- i. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Oct, preferiblemente Oct4,
- ii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Klf, preferiblemente Klf4,
- iii. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Sox, preferiblemente Sox2,
- iv. un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Myc, preferiblemente c-Myc,
- v. Lin28, y, opcionalmente,
- vi. Nanog.

La combinación de factores de reprogramación para su uso en el rejuvenecimiento o la inducción de células madre pluripotentes a partir de la población de células diana, tales como células senescentes o células de donantes envejecidos, puede incluir, por ejemplo, la combinación de los 5 factores de reprogramación Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc (o L-myc) y Lin28, o los 6 factores de reprogramación Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc (o L-myc), Lin28 y Nanog. En una realización preferida, no se usan inhibidores funcionales de p53.

Tal como se usa en el presente documento, un inhibidor funcional de p53 es cualquier sustancia capaz de inhibir (a) la función de la proteína p53 o (b) la expresión del gen p53. Tales sustancias se describen, por ejemplo, en el documento WO 2011/016588. Lo más específicamente, el presente método no contiene el uso de ningún medio para expresar ARNip o ARNhc contra p53 en la población de células diana (por ejemplo, las células senescentes).

Tal como se usa en el presente documento, el término "familia Oct" se refiere a la familia de factores de transcripción de octámero ("Oct") que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia. POU5F1 (dominio POU, clase 5, factor de transcripción 1) también conocido como Oct3/4 es un representante de la familia Oct. La ausencia de Oct3/4 en células Oct-3/4+, como blastómeros y células madre embrionarias, conduce a la

diferenciación espontánea de trofoblastos, y la presencia de Oct-3/4 da lugar así a la pluripotencia y el potencial de diferenciación de células madre embrionarias. Proteínas Oct3/4 a modo de ejemplo son las proteínas codificadas por el gen *Oct3/4* murino (número de registro de Genbank NM_013633) y el gen *Oct3/4* humano (número de registro de Genbank NM_002701).

Los términos “Oct3/4”, “Oct4”, “OCT4”, “proteína Oct4”, “proteína OCT4” y similares se refieren, por tanto, a cualquiera de las formas de origen natural del factor de transcripción octómero 4, o variantes del mismo que mantienen la actividad del factor de transcripción Oct4 (por ejemplo, dentro de una actividad de al menos el 50 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con Oct4 de tipo silvestre, medida por métodos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con el polipéptido Oct4 de origen natural. En otras realizaciones, la proteína Oct4 es la proteína identificada por la referencia de Genbank ADW77327.1.

Tal como se usa en el presente documento, el término “familia Sox” se refiere a genes Sox asociados con el mantenimiento de la pluripotencia similares a Oct-3/4, aunque está asociado con células madre multipotentes y unipotentes en contraste con Oct-3/4, que se expresa exclusivamente en células madre pluripotentes. Aunque Sox2 fue el gen inicial usado para la inducción^{1,3}, se ha descubierto que otros genes de la familia Sox también funcionan en el proceso de inducción. Sox1 produce iPSC con una eficiencia similar a la de Sox2, y los genes Sox3, Sox15 y Sox18 también generan iPSC.

Proteínas Sox2 a modo de ejemplo son las proteínas codificadas por el gen *Sox2* murino (número de registro de Genbank NM_011443) y el gen *Sox2* humano (número de registro de Genbank NM_003106).

Los términos “Sox2”, “SOX2”, “proteína Sox2”, “proteína SOX2” y similares a los que se hace referencia en el presente documento incluyen por tanto cualquiera de las formas de origen natural del factor de transcripción Sox2, o variantes del mismo que mantienen la actividad del factor de transcripción Sox2 (por ejemplo, dentro de una actividad de al menos el 50 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con Sox2 de tipo silvestre, medida por métodos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con el polipéptido Sox2 de origen natural. En otras realizaciones, la proteína Sox2 es la proteína identificada por la referencia de NCBI NP_003097.1.

Tal como se usa en el presente documento, el término “familia Klf” se refiere a genes Klf identificados inicialmente como factor para la generación de iPSC de ratón y que también se ha demostrado que son un factor para la generación de iPSC humanas. Proteínas Klf4 a modo de ejemplo son las proteínas codificadas por el gen *klf4* murino (número de registro de Genbank NM_010637) y el gen *klf4* humano (número de registro de Genbank NM_004235).

Los términos “KLF4”, “proteína KLF4” y similares a los que se hace referencia en el presente documento incluyen por tanto cualquiera de las formas de origen natural del factor de transcripción KLF4, o variantes del mismo que mantienen la actividad del factor de transcripción KLF4 (por ejemplo, dentro de una actividad de al menos el 50 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con KLF4 de tipo silvestre, medida por métodos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con el polipéptido KLF4 de origen natural. En otras realizaciones, la proteína KLF4 es la proteína identificada por la referencia de NCBI NP_004226.3.

Tal como se usan en el presente documento, los factores de la familia Myc se refieren a factores codificados por protooncogenes myc implicados en el cáncer. Se demostró que c-Myc es un factor implicado en la generación de iPSC de ratón y de iPSC humanas. Proteínas c-Myc a modo de ejemplo son las proteínas codificadas por el gen *c-myc* murino (número de registro de Genbank NM_010849) y el gen *c-myc* humano (número de registro de Genbank NM_002467). También se usó N-Myc o L-myc como posible factor de reprogramación en sustitución de c-Myc.

Los términos “c-Myc”, “C-MYC”, “proteína c-Myc”, “proteína C-MYC” y similares a los que se hace referencia en el presente documento incluyen por tanto cualquiera de las formas de origen natural del factor de transcripción cMyc o variantes del mismo que mantienen la actividad del factor de transcripción cMyc (por ejemplo, dentro de una actividad de al menos el 50 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con cMyc de tipo silvestre, medida por métodos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con el polipéptido c-Myc de origen natural. En otras realizaciones, la proteína c-Myc es la proteína identificada por la referencia de NCBI NP_002458.2.

El término “Nanog” o “nanog” se refiere a un factor de transcripción implicado de forma crítica en la autorrenovación de células madre embrionarias indiferenciadas. En seres humanos, esta proteína está codificada por el gen *NANOG*. Un nanog a modo de ejemplo es la proteína codificada por el gen murino (número de registro de Genbank XM_132755) y el gen *Nanog* humano (número de registro de Genbank NM_024865).

El término “Nanog” o “nanog” y similares a los que se hace referencia en el presente documento incluyen por tanto cualquiera de las formas de origen del factor de transcripción Nanog, o variantes del mismo que mantienen la

actividad del factor de transcripción Nanog (por ejemplo, dentro de una actividad de al menos el 50 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con Nanog de tipo silvestre, medida por métodos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con el polipéptido Nanog de origen natural. En otras realizaciones, la proteína Nanog es la proteína identificada por la referencia de NCBI NP_079141.

El término "Lin28" u "homólogo A de Lin28" es una proteína codificada por el gen LIN28 en seres humanos. Es un marcador de células madre embrionarias humanas indiferenciadas y codifica una proteína de unión a ARNm del citoplasma que se une y potencia la traducción del ARNm de IGF-2 (factor de crecimiento similar a la insulina 2). También se ha demostrado que Lin28 se une al pre-miARN let-7 y bloquea la producción del microARN let-7 maduro en células madre embrionarias de ratón. Yu *et al.* demostraron que es un factor en la generación de iPSC, aunque no es obligatorio³. Lin28 a modo de ejemplo es la proteína codificada por el gen murino (número de registro de Genbank NM_145833) y el gen Lin28 humano (número de registro de Genbank NM_024674).

El término "Lin28" u "homólogo A de Lin28" y similares a los que se hace referencia en el presente documento incluyen por tanto cualquiera de las formas de origen natural del factor de transcripción Lin28, o variantes del mismo que mantienen la actividad del factor de transcripción Lin28 (por ejemplo, dentro de una actividad de al menos el 50 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con Lin28 de tipo silvestre, medida por métodos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, las variantes tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos en toda su secuencia en comparación con el polipéptido Lin28 de origen natural. En otras realizaciones, la proteína Lin28 es la proteína identificada por la referencia NP_078950 de NCBI.

Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n.º de posiciones idénticas/n.º total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse mediante un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

El experto puede seleccionar otros factores de reprogramación correspondientes procedentes de otros mamíferos, como ratones, ratas, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, camellos, antílopes y perros. Ventajosamente, el experto puede seleccionar el factor de reprogramación correspondiente de la misma especie que las células diana usadas como material de partida en el método de la divulgación.

El experto también puede seleccionar análogos de uno o más de los factores de reprogramación anteriores. Tal como se usa en el presente documento, el término "análogo" se refiere a un compuesto que tiene una estructura diferente pero que proporciona el mismo resultado que el factor de reprogramación para su uso en la generación de iPSC, y puede así sustituir a dicho factor de reprogramación en un método para generar células madre pluripotentes inducidas.

Por ejemplo, se han descrito análogos de tales factores de reprogramación en Wenlin Li y Sheng Ding. Trends in Pharmacological Sciences volumen 31, número 1, enero de 2010, páginas 36-45 o Feng *et al.* Cell Stem Cell. 3 de abril de 2009; 4(4):301-12 (véanse en particular los análogos divulgados en las tablas 1 y 2 de Feng *et al.*, 2009).

Condiciones para aumentar la expresión del factor de reprogramación

Cualquier condición disponible en la técnica para aumentar la expresión de un factor de reprogramación puede usarse en los métodos de la divulgación, siempre que tales condiciones den lugar a la presencia del factor de reprogramación en una cantidad adecuada para reprogramar dichas células diana a células madre pluripotentes inducidas.

Se han descrito diversos métodos para aumentar la expresión de factores de reprogramación. Para una revisión, véase Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Cell. 12 de noviembre de 2010; 143(4):508-25; o, Sheng Ding. Trends in Pharmacological Sciences volumen 31, número 1, enero de 2010, páginas 36-45; y, Feng *et al.* Cell Stem Cell. 3 de abril de 2009; 4(4):301-12.

En realizaciones preferidas, puede usarse la siguiente alternativa para aumentar la expresión de los factores de reprogramación:

(i) potenciar la expresión endógena del gen que codifica dicho factor de reprogramación,

(ii) permitir la expresión ectópica de dicho factor de reprogramación mediante la introducción en la población de células diana de un vector de expresión que comprende una secuencia codificante de dicho factor de reprogramación operativamente unida a secuencias de control, o

5 (iii) administrar a las células una cantidad apropiada de dicho factor de reprogramación o de su ARN precursor.

En otra realización, se usan uno o más vectores de expresión que comprenden la secuencia codificante de la combinación de factores de reprogramación, por ejemplo, la secuencia codificante de Oct4, la secuencia codificante de Sox2, la secuencia codificante de Klf4, la secuencia codificante de c-Myc, la secuencia codificante de Lin28 y,
10 opcionalmente, la secuencia codificante de Nanog y/o secuencias codificantes que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad con las correspondientes secuencias codificantes nativas de Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 y, opcionalmente, Nanog.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, al transcribirse, da lugar al producto codificado. La transcripción de la secuencia codificante de acuerdo con la presente divulgación puede efectuarse fácilmente en conexión con un promotor adecuado. Preferiblemente, la secuencia codificante corresponde a la secuencia de ADNc de un gen que da lugar, tras la transcripción, a un factor de reprogramación.

20 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando, por ejemplo, algoritmos tales como el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos, usando por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

25 Los vectores de expresión para la expresión ectópica de los factores de reprogramación pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos, vectores de cósmidos, vectores de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), vectores basados en transposones (como PiggyBac) o vectores virales.

En una realización específica, los vectores de expresión usados para aumentar la expresión de dichos factores de reprogramación son vectores virales. Los ejemplos de tales vectores virales incluyen vectores originados a partir de
30 retrovirus tales como VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), MLV (virus de la leucemia murina), ASLV (virus del sarcoma/leucosis aviar), SNV (virus de la necrosis del bazo), RSV (virus del sarcoma de Rous), MMTV (virus del tumor mamario del ratón), etc., lentivirus, virus adeno-asociados y virus del herpes simple, pero no se limitan a los mismos.

35 Se han descrito en la técnica métodos para generar células madre pluripotentes inducidas basándose en vectores de expresión que codifican factores de reprogramación; véanse, por ejemplo, los documentos WO2007/69666, EP2096169-A1 o WO2010/042490.

40 Normalmente, la secuencia codificante de cualquier factor de reprogramación usado en el método de la divulgación, por ejemplo, la secuencia codificante de Oct4, la secuencia codificante de Sox2, la secuencia codificante de Klf4, la secuencia codificante de c-Myc, la secuencia codificante de Nanog y/o la secuencia codificante de Lin28, puede estar operativamente unida a secuencias de control, por ejemplo un promotor, capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante en la población de células diana. Tal vector de expresión puede incluir además elementos reguladores que controlan su expresión, tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de parada, una
45 señal de poliadenilación y un potenciador. El promotor puede ser constitutivo o inducible. El vector puede ser autorreplicable o integrarse en el ADN de la célula huésped.

Alternativamente, el vector para la expresión ectópica es un vector viral y se producen partículas virales y se usan para introducir la secuencia codificante de dichos factores de reprogramación en dicha población de células diana que comprende células envejecidas o senescentes. El término "partículas virales" pretende referirse a las partículas
50 que contienen proteínas estructurales virales y una secuencia que codifica dichos factores de reprogramación.

Pueden prepararse partículas virales transformando o transfectando una célula de empaquetamiento con un vector viral que porta las secuencias codificantes de nucleótidos de dicha combinación de factores de reprogramación. En
55 los ejemplos más adelante, se preparan partículas virales a partir de lentivirus.

A continuación, la población de células diana puede transfectarse usando los vectores de expresión descritos anteriormente.

60 El término "transfección" o "transfectar" se refiere a un proceso de introducción de moléculas de ácido nucleico en una célula. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser secuencias de genes que codifican proteínas completas o porciones funcionales de las mismas. Cualquier método de transfección apropiado es útil en los métodos descritos en el presente documento.

65 La incorporación de la secuencia codificante y sus secuencias de control directamente en el genoma de las células diana puede provocar mutaciones activantes o inactivantes de oncogenes o genes supresores de tumores,

respectivamente. Para determinadas aplicaciones, en particular aplicaciones médicas, puede ser necesario evitar cualquier modificación genética de las células diana.

En una tercera realización, los factores de reprogramación, por ejemplo, Oct4, Sox2, Flk4, c-Myc, Nanog y Lin28, o el ADN o ARN codificante correspondiente, se introducen en las células diana sin integración de material genético exógeno en el ADN huésped, es decir, sin introducción de la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula.

Un vector de expresión, tal como un vector plasmídico, puede administrarse a dichas células para la expresión ectópica del factor de reprogramación, en forma de ADN desnudo. Alternativamente, pueden introducirse ARN que codifican dichos factores de reprogramación, modificados químicamente o no, en las células para reprogramarlas (véase, por ejemplo, Warren L, *et al*, 2010, Cell Stem Cell. 5 de nov.; 7(5):618-30).

Otros vectores de expresión se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 2009115295.

Estos ácidos nucleicos pueden administrarse a las células diana con la ayuda, por ejemplo, de un liposoma o un polímero catiónico, por ejemplo, usando protocolos de transfección convencionales en células de mamíferos.

En particular, en los métodos descritos en el presente documento, pueden usarse métodos de transfección apropiados que no usan ADN viral o partículas virales como sistema de administración para introducir las moléculas de ácido nucleico en la célula diana. Los métodos de transfección a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, transfección con fosfato de calcio, transfección liposomal, nucleofección, sonoporación, transfección por choque térmico, magnetofección y electroporación. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se introducen en las células diana mediante electroporación siguiendo procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, la proteína del factor de reprogramación o fragmentos de la misma que muestran propiedades similares a las proteínas intactas con respecto a la reprogramación de las células diana pueden administrarse a dichas células diana con la ayuda de portadores químicos tales como péptidos penetrantes de células incluidos, sin limitación, penetratina o péptidos derivados de TAT.

También se han descrito en la técnica métodos para mejorar la eficiencia de la generación de iPSC. En particular, en el método de la divulgación, puede realizarse la introducción y/o adición de diversos agentes de mejora de la eficiencia de generación. Los ejemplos de sustancias para mejorar la eficiencia de generación de iPSC incluyen, sin limitación, inhibidores de histona deacetilasa (tales como, por ejemplo, ácido valproico, trichostatina A, lactato de sodio, MC1293 y M344), e inhibidores de la expresión de ácidos nucleicos tales como ARNip y ARNhc para HDAC, e inhibidores de histona metiltransferasa G9a, e inhibidores del sistema de expresión de ácidos nucleicos tales como ARNip y ARNhc para G9a (véase también Feng *et al.*, 2009, citado anteriormente).

En una realización específica, los métodos según la divulgación no comprenden ninguna etapa de silenciamiento directo de los efectores de senescencia, y en particular silenciamiento directo de los efectores de p53.

Por "silenciamiento directo" quiere decirse usar una sustancia que actuará directamente sobre la expresión del gen de interés, por ejemplo, el gen de p53, y no una sustancia que actuará sobre un factor aguas arriba. Una forma de silenciar un gen es el uso de ARNip o ARNhc dirigido directamente sobre la secuencia del gen a inhibir.

Composiciones que comprenden iPSC obtenibles a partir de los métodos de la divulgación

La divulgación se refiere además a una composición basada en células que comprende iPSC obtenibles a partir del método descrito anteriormente (a continuación en el presente documento denominadas "las composiciones de iPSC"), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cabe destacar que las iPSC según la presente divulgación no tienen características del fenotipo de envejecimiento, aunque se deriven de células de donantes envejecidos o células senescentes.

Estas composiciones de iPSC pueden comprender normalmente iPSC obtenidas de un paciente que padece un trastorno relacionado con la edad, tal como trastornos provocados por helicasa defectuosa, incluidos síndrome de Werner, síndromes de Cockayne, Rothmund-Thomson y Bloom, y xerodermia pigmentosa y tricotiodistrofia, u otros trastornos incluidos, sin limitación, progeria de Hutchinson-Giford o síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.

Composición de células obtenidas por diferenciación de iPSC obtenibles a partir de los métodos de la divulgación y usos de las mismas

Las iPSC obtenidas a partir de los métodos de la divulgación, en particular a partir de células de donantes de edad avanzada, pueden cultivarse ventajosamente *in vitro* en condiciones de diferenciación, para generar células diferenciadas, tales como músculo, cartílago, hueso, tejido dérmico, tejido cardíaco o vascular, u otros tejidos de interés.

Así, la divulgación se refiere a los métodos para preparar composiciones que comprenden células diferenciadas, comprendiendo dicho método las etapas de

(a) proporcionar una composición que comprende células iPS obtenidas por los métodos de la divulgación a partir de células diana de donantes envejecidos; y,

(b) cultivar dicha composición que comprende células iPS, en condiciones apropiadas para su diferenciación en los linajes celulares deseados.

El experto puede usar protocolos conocidos para diferenciar células madre, tales como células madre pluripotentes inducidas, células ES o células madre mesenquimatosas en los linajes celulares deseados.

Otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de dicha composición que comprende dichos linajes celulares derivados de la diferenciación de iPSC, a continuación en el presente documento denominadas células diferenciadas de la invención.

Las células diferenciadas de la divulgación tienen la particularidad de tener un fenotipo rejuvenecido, por ejemplo, con respecto al tamaño de los telómeros, el perfil de expresión génica, el metabolismo y el número de ciclos celulares antes de la aparición del fenotipo de senescencia, al tiempo que se derivan de células de donantes envejecidos, por ejemplo, donantes de más de 70 años de edad. Las células diferenciadas de la divulgación pueden por tanto usarse en una variedad de aplicaciones, en particular, en el campo de investigación o terapéutico.

Uno de los principales campos de aplicación es la terapia celular o la medicina regenerativa. Esta composición de iPSC o células diferenciadas también puede ser útil para generar modelos celulares de trastornos relacionados con el envejecimiento, como se ha descrito anteriormente.

Por ejemplo, células primarias, tales como células de fibroblastos obtenidas de un paciente que padece un defecto genético, pueden cultivarse y corregirse genéticamente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y posteriormente reprogramarse y rejuvenecerse en iPSC de acuerdo con los métodos de la presente divulgación y diferenciarse en los linajes celulares adecuados para su readministración al paciente, por ejemplo el mismo paciente que el donante de células (tratamiento autólogo).

De manera similar, puede usarse medicina regenerativa para curar potencialmente cualquier enfermedad que resulte de un mal funcionamiento, un tejido dañado o defectuoso, ya sea regenerando los tejidos dañados *in vivo* mediante implantación directa *in vivo* de una composición que comprende iPSC o sus derivados que comprenden progenitores o linajes celulares apropiados o células diferenciadas de la divulgación. Preferiblemente, tales tejidos dañados son tejidos dañados por trastornos relacionados con la edad o pacientes envejecidos, de más de 50, 60, 70, 80, 90 o más de 100 años de edad.

En un aspecto, las células iPS o las células diferenciadas de la divulgación pueden ser útiles para la terapia regenerativa autóloga de un paciente que padece trastornos relacionados con la edad o un paciente envejecido que necesita terapia regenerativa debido a trastornos específicos o tratamientos asociados a tales trastornos, incluidos, sin limitación, trastornos cancerosos, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, trastornos musculares y esqueléticos, trastornos neurológicos, diabetes y otros trastornos metabólicos.

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a las composiciones de iPSC o células diferenciadas de la divulgación para su uso como producto de terapia celular para implantar en un paciente humano de más de 50, 60, 70, 80, 90 o más de 100 años de edad como injerto autólogo (es decir, las células tienen el mismo genotipo que las células del paciente).

En otra realización específica, las composiciones de iPSC o células diferenciadas de la divulgación se usan para el tratamiento de daños articulares o cartilaginosos, musculares u óseos.

En otra realización específica, las composiciones de iPSC o células diferenciadas de la divulgación también pueden usarse ventajosamente para la producción de tejidos dérmicos, por ejemplo, tejidos cutáneos, para su uso en medicina regenerativa (terapia basada en células) o en investigación.

En otra realización específica, las composiciones de iPSC o células diferenciadas de la divulgación también pueden usarse ventajosamente para la producción de, pero sin limitarse a, células dérmicas, musculares o esqueléticas de pacientes sanos o enfermos para aplicaciones de cribado en la industria farmacéutica. Tales pruebas de cribado pueden usarse para buscar nuevos fármacos con aplicaciones clínicas o para pruebas toxicológicas.

En otra realización específica, las composiciones de iPSC o células diferenciadas de la divulgación también pueden usarse para regenerar tejido cardíaco o vascular.

En otra realización específica, las composiciones de iPSC o células diferenciadas de la divulgación también pueden usarse para regenerar tejido cerebral o neuronal, por ejemplo en pacientes que padecen trastornos neurodegenerativos.

5 Métodos para rejuvenecer las células diana

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para rejuvenecer células de donantes envejecidos o células senescentes.

10 En particular, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para rejuvenecer células de donantes envejecidos o células senescentes, comprendiendo dicho método reprogramar dichas células diana a células madre pluripotentes inducidas, mediante el aumento de la expresión en dichas células diana de al menos los siguientes factores de reprogramación:

15 (i) un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Oct, por ejemplo Oct4,

(ii) un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Klf, por ejemplo Klf4,

20 (iii) un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Sox, por ejemplo Sox2,

(iv) un factor de reprogramación codificado por un gen de la familia de genes Myc, por ejemplo, c-myc o L-myc, y,

(v) Lin28,

25 (vi) y, opcionalmente, Nanog.

El término “rejuvenecimiento” se refiere al proceso de borrar las modificaciones epigenéticas que participan en el fenotipo de envejecimiento celular. El fenotipo de envejecimiento celular puede caracterizarse, entre otros, por los siguientes marcadores:

30 - activación de las rutas supresoras de tumores p53/p21^{CIP1} y pRb/p16^{INK4A} (a continuación en el presente documento, denominados efectores de senescencia),

35 - células detenidas irreversiblemente en G1,

- acortamiento del tamaño de los telómeros,

- expresión de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal),

40 - modificación específica de la cromatina como focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF),

- secretoma específico,

45 - reducción/alteración de la actividad mitocondrial global.

Se observa un proceso de rejuvenecimiento cuando uno o todos de estos marcadores del fenotipo de envejecimiento se reducen o suprimen en un tipo de célula envejecida o senescente debido al proceso de rejuvenecimiento.

50 En una realización preferida, el método *in vitro* para rejuvenecer células de donantes envejecidos o células senescentes comprende cultivar dichas células de donantes envejecidos o células senescentes en condiciones apropiadas para aumentar la expresión de la siguiente combinación de factores de reprogramación que consiste en Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y, opcionalmente, Nanog.

55 La combinación de factores de reprogramación puede usarse *in vivo* para rejuvenecer el tejido de un sujeto que lo necesita. Así, la divulgación se refiere además a una composición para su uso *in vivo* en el rejuvenecimiento de células senescentes o envejecidas en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicha composición medios para aumentar la expresión de la siguiente combinación de factores de reprogramación que consiste en Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y, opcionalmente, Nanog.

60 En algunas realizaciones, dichos medios para aumentar la expresión de dichos factores de reprogramación comprenden una cantidad apropiada de proteína Oct4, proteína Klf4, proteína Sox2, proteína c-Myc, proteína Lin28 y, opcionalmente, proteína Nanog, estando cada proteína asociada a medios apropiados para la administración de dicha proteína al núcleo de las células senescentes que van a rejuvenecerse.

65

Los medios para la administración de una proteína a una célula incluyen, sin limitación, los portadores químicos tales como péptidos penetrantes de células tales como penetratina o péptidos derivados de TAT.

En otras realizaciones, dichos medios para aumentar la expresión de dichos factores de reprogramación comprenden una cantidad apropiada de ARN precursor de Oct4, ARN precursor de Klf4, ARN precursor de Sox2, ARN precursor de c-Myc, ARN precursor de Lin28 y, opcionalmente, ARN precursor de Nanog, asociados a medios apropiados para la administración de cada ARN precursor en el citoplasma de las células senescentes que van a rejuvenecerse.

Estas composiciones, tal como se han descrito anteriormente, son especialmente adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo para aplicación cutánea o dérmica, por ejemplo para tratar trastornos de la piel.

La divulgación se ilustrará además mediante los siguientes ejemplos. No obstante, estos ejemplos no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente divulgación.

Ejemplos:

MÉTODOS

Se obtuvieron células de donantes envejecidos del Coriell Institute for Medical Research (NJ, EE.UU.). Se obtuvieron células senescentes replicativas mediante cultivo celular extensivo hasta la detención del crecimiento del ciclo celular, se evaluaron mediante FACS y se detectó la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia, tal como se ha descrito previamente²⁵.

Se obtuvieron células madre embrionarias humanas H9 y H1 usadas como células de referencia del WiCell Research Institute (WI, EE.UU.). Las hESC e iPSC se mantuvieron usando procedimientos de hESC estándar sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) OF-1 tratados con mitomicina-C en medio de cultivo DMEM KO (medio de hESC) suplementado con un 20 % de sustitución de suero Knock-Out, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamina 2 mM (todos de Invitrogen), β -mercaptoetanol 0,1 mM y factor de crecimiento de fibroblastos básico 10 ng/ml (bFGF, Peprotech) o en cultivo sin alimentador sobre matrigel (BD Bio-sciences) con medio mTeSR químicamente definido (Stemcell Technologies) como se ha descrito previamente²⁶.

Para la generación de iPSC humanas, se obtuvieron de Addgene vectores lentivirales que contenían ADNc de los genes humanos OCT4, SOX2, NANOG y LIN28, y descritos previamente por Yu *et al.*³. Se subclonaron los ADNc de KLF4 y c-MYC en la misma estructura principal de vector a partir de los vectores descritos por Takahashi *et al.*^{2,3}. Se usó la línea celular 293T (Invitrogen) para producir lentivirus de expresión transgénica. Se sembraron fibroblastos primarios humanos a 2×10^5 células por placa de 35 mm un día antes de la transducción. Se mezclaron cantidades iguales de sobrenadantes que contenían cada uno de los seis lentivirus, se transfirieron a la placa de fibroblastos y se incubaron durante la noche. Veinticuatro horas después de la transducción, se substituyó el medio que contenía lentivirus por el segundo sobrenadante. Seis días después de la transducción, se recogieron los fibroblastos por tripsinización y volvieron a sembrarse en una placa de 100 mm sobre una capa alimentadora de MEF. Al día siguiente, el medio se substituyó por medio de hESC suplementado con bFGF 10 ng/ml.

El medio se cambió cada dos días. Treinta a cuarenta días después de la transducción, se recogieron las colonias y se transfirieron a una placa de 35 mm sobre una capa alimentadora con 2 ml de medio de hESC suplementado con bFGF 10 ng/ml.

RESULTADOS

Se indujo la senescencia replicativa de fibroblastos diploides humanos proliferativos de donantes de 74 años de edad (a continuación en el presente documento, 74P) mediante pases en serie (74S). Se evaluó la senescencia celular después de 18 pases (51 duplicaciones de la población) mediante análisis de FACS, aumento de la actividad SA- β -Gal, regulación al alza de los inhibidores de CDK p16^{INK4A} y p21^{CIP1} y la formación de SAHF. Estas células senescentes también se mantuvieron más de 2 meses en cultivo sin ningún aumento detectable en el número de células, lo que confirma la robustez de la detención del ciclo celular. Inicialmente, se intentó generar iPSC a partir de estos fibroblastos senescentes mediante la sobreexpresión del conjunto de genes que contiene LIN28 (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28) para comparar con los resultados experimentales previos publicados con el conjunto de 4 factores de reprogramación OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC y descritos originalmente como ineficaces para la derivación de la senescencia. Todos estos genes de factores de reprogramación se transdujeron por lentivirus individuales. Después de 40 días, no se observó ninguna nueva proliferación o formación de colonias de hESC parecidas a iPSC. Esto se confirmó por la ausencia de expresión detectable de genes de pluripotencia endógenos en la población de células infectadas, mientras que la RT-PCR cuantitativa demostró una transducción viral eficiente. Estos resultados demuestran que el conjunto de factores de reprogramación que contiene LIN28 no es capaz de revertir el estado de senescencia replicativa para generar iPSC, como se describió anteriormente con la combinación de OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC.

Curiosamente, se ha descrito que la sobreexpresión de NANOG acelera la reprogramación de una manera predominantemente independiente de la tasa de división celular, y la sobreexpresión de LIN28, similar a la inhibición de la ruta p53/p21^{CIP1}, aumenta la tasa de división celular, dando como resultado una cinética acelerada de producción de iPSC^{13,14}. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que la barrera de senescencia podría superarse usando un protocolo optimizado para una mayor eficiencia de reprogramación basándose en la combinación de los 6 factores de reprogramación OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC introducidos por partículas lentivirales individuales, sin inhibición transitoria o permanente adicional de los inductores de senescencia.

Para someter a prueba esta hipótesis, se infectaron células 74P y 74S dos veces con una mezcla de los lentivirus individuales que portaban de cada uno de los 6 genes. Una semana después de la infección, se observó la desaparición de los SAHF en fibroblastos senescentes infectados (74S inf), lo que reveló una primera etapa de la reprogramación. A continuación, se sembraron en placa las células sobre alimentadores de fibroblastos de ratón en medio de hESC y, después de 18-20 días, se recuperó la proliferación en células senescentes infectadas. Aparecieron colonias similares a hESC a los 35-40 días tras la invención. Se produjeron colonias similares a iPSC a partir de fibroblastos senescentes (74S), con una eficiencia media de reprogramación del 0,015-0,03 %, similar a la de los fibroblastos proliferativos (74P), infectados en las mismas condiciones. Se seleccionaron aleatoriamente 6 colonias de fibroblastos proliferativos (iPSC 74P) y senescentes (iPSC 74S) de donantes de 74 años de edad, y se caracterizaron adicionalmente 3 clones, que luego se expandieron con éxito en condiciones de cultivo regulares con o sin alimentador de hESC. El cultivo a largo plazo y la evaluación de la expresión de marcadores de células madre confirmaron el éxito del mantenimiento y la reprogramación de estas células, que se han cultivado ahora durante más de 35 pases. Los análisis inmunocitoquímicos demostraron la presencia continua de los marcadores de superficie celular SSEA-4 y TRA-1-60 que caracterizan a las células madre pluripotentes humanas. Los análisis de RT-PCR cuantitativa mostraron que las iPSC reexpresaban los genes de marcadores pluripotentes endógenos OCT4, SOX2, NANOG y REX1 al mismo nivel que las líneas de hESC H1 y H9 o la línea de iPSC IMR90 clon 4 generada en el laboratorio Thomson (iPSC IMR90 TH Cl 4³) y cultivada en paralelo, mientras que no se detectó transcripción alguna en los fibroblastos parentales. Para corroborar esta reactivación de genes endógenos, se investigó el estado de metilación del ADN de los dinucleótidos CpG en una región rica en CpG descrita en los promotores de *OCT4* y *NANOG*. El análisis de secuenciación genómica con bisulfito mostró que tanto los promotores de *OCT4* como de *NANOG* estaban desmetilados en iPSC de células senescentes (iPSC 74S Cl F) o proliferativas (iPSC 74P Cl H), tan eficientemente como en la iPSC IMR90 TH Cl 4³ publicada previamente, en comparación con el estado de metilación de hESC H9, mientras que las mismas regiones estaban altamente metiladas en fibroblastos parentales.

Para excluir cualquier efecto específico del tipo celular, se repitió el mismo protocolo usando fibroblastos embrionarios humanos IMR90 inducidos a senescencia replicativa mediante pases en serie. Al igual que con los fibroblastos de donantes de 74 años de edad, no se consiguió generar iPSC usando ambos conjuntos de 4 factores descritos anteriormente, mientras que se obtuvo una eficiencia de reprogramación similar a partir de fibroblastos IMR90 proliferativos o senescentes con la combinación de los 6 factores.

A continuación, se evaluó el estado pluripotente de las iPSC generadas mediante la evaluación de la capacidad de diferenciación de iPSC 74S en comparación con los clones de iPSC 74P. Todas las iPSC fueron capaces de diferenciarse en los tres linajes embrionarios tempranos, endodermo, ectodermo y mesodermo, como se demostró usando inmunotinción con anticuerpos específicos contra SMA, MAP2 y FOXA2 respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con fibroblastos IMR90 senescentes. En conjunto, estos resultados indican que la combinación de los 6 factores de transcripción, OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28 y c-MYC, es una estrategia de reprogramación exitosa para revertir el estado de senescencia celular que conduce a la generación de iPSC.

Durante el envejecimiento, el número de células senescentes aumenta en el cuerpo humano, y se cree que perjudica la homeostasis tisular. Sin embargo, se produce expresión aumentada de p16^{INK4A} y p21^{CIP1} en células proliferativas de donantes envejecidos, y se cree que disminuye progresivamente su capacidad proliferativa¹⁵. Queda por resolver si las células proliferativas de individuos centenarios pueden reprogramarse eficazmente hacia la pluripotencia, y si conservan algunos marcadores específicos del fenotipo de envejecimiento celular. Para investigar este punto específico, se usaron fibroblastos de donantes de 92, 94, 96 y 101 años de edad para experimentos de reprogramación, usando los 6 factores en combinación. Como sugirieron los experimentos previos de los presentes inventores con células senescentes, pudieron generarse iPSC a partir de todos los fibroblastos de donantes envejecidos, con una eficiencia similar a la obtenida con fibroblastos senescentes. Todos los clones de iPSC generados reexpresaron los genes de pluripotencia endógenos OCT4, SOX2, NANOG y REX1, como se presentó para dos clones por cada línea de fibroblastos parental, lo que también se confirmó mediante la desmetilación de CpG en las regiones promotoras de *OCT4* y *NANOG*. Curiosamente, también se observó una desmetilación parcial del promotor de *NANOG* en fibroblastos parentales de donantes envejecidos, lo que concuerda con la desmetilación global del genoma ya descrita en personas de edad avanzada¹⁶, lo que también podría tener efectos contribuyentes en la reprogramación. Además, se detectó la reexpresión de los marcadores de superficie de células de pluripotencia SSEA-4 y TRA-1-60 y, por último, se demostró su capacidad para diferenciarse en derivados de endodermo, ectodermo y mesodermo, a juzgar por la inmunotinción con anticuerpos frente a SMA, MAP2 y FOXA2 respectivamente.

Estos resultados demuestran la eficacia del presente procedimiento de reprogramación para restablecer con éxito el estado pluripotente y la autorrenovación a partir de fibroblastos centenarios; por tanto, el envejecimiento celular y el fenotipo senescente frecuentemente asociado no son un límite para la reprogramación hacia la pluripotencia.

Aunque se consiguió generar iPSC usando donantes envejecidos y fibroblastos senescentes, una cuestión esencial era dilucidar si la inducción de un estado pluripotente podría borrar los principales marcadores del fenotipo de envejecimiento celular. Anteriormente se demostró que la reprogramación inducía la desaparición de SAHF, demostrando la plasticidad de la organización del genoma de las células senescentes. A continuación, se analizaron otros rasgos distintivos del envejecimiento y la senescencia en las presentes iPSC y se descubrió que las iPSC generadas a partir de fibroblastos senescentes replicativos del donante de 74 años de edad no conservaban la expresión aumentada de p21^{CIP1} y p16^{INK4A} heredada de su estado senescente previo, como se demostró mediante análisis de inmunotransferencia. También se obtuvieron resultados similares con los fibroblastos senescentes replicativos embrionarios IMR90. Además, todas las iPSC generadas a partir de individuos centenarios también tienen una expresión regulada a la baja de las proteínas p21^{CIP1} y p16^{INK4A}, similar a las líneas de hESC. Estos resultados indican que pudo restablecerse la expresión de p21^{CIP1} y p16^{INK4A} al bajo nivel encontrado en las hESC.

Los fibroblastos proliferativos procedentes de donantes envejecidos se caracterizan habitualmente por telómeros de tamaño heterogéneo, cuya longitud media depende del tamaño heredado parental y del diverso número de divisiones que se producen a lo largo de la vida, pero que no se correlacionan necesariamente con la capacidad de proliferación. Sin embargo, la senescencia replicativa siempre está asociada a telómeros cortos. Los telómeros cortos se reconocen como ADN dañado, lo que conduce a la activación de la cascada de señalización de respuesta al daño del ADN y desencadena la detención del ciclo celular asociada a senescencia. Aunque, por lo general, las iPSC presentan un tamaño de los telómeros aumentado en comparación con las células diferenciadas parentales¹⁷, los inventores se preguntaron si las iPSC obtenidas a partir de células senescentes o de células centenarios presentaban telómeros de mayor longitud. Para abordar esta cuestión, se usó análisis de transferencia de tipo Southern para examinar la longitud media de fragmentos de restricción terminales (TRF) de las iPSC obtenidas a partir de células senescentes replicativas, en comparación con células proliferativas. Se encontró que la longitud de los telómeros de las iPSC del donante de 74 años de edad, tanto de células proliferativas como senescentes, aumentó hasta un tamaño equivalente al observado en las hESC H9. A diferencia de los fibroblastos parentales, que entraron en senescencia replicativa después de 50 duplicaciones de la población, y de 60-63 duplicaciones para fibroblastos embrionarios IMR90, pudieron cultivarse todas las líneas de iPSC de forma continua, que permanecieron estables después de más de 110 duplicaciones de la población. De forma similar, la longitud del ADN telomérico aumentó en las iPSC derivadas de fibroblastos embrionarios IMR90 senescentes o proliferativos, tras la reprogramación. Aunque el tamaño de los telómeros de individuos centenarios se acortó menos que en fibroblastos senescentes, pudo restablecerse su tamaño a la misma longitud que en las hESC. Curiosamente, en algunos clones de iPSC, se encontró un tamaño superior más largo que el encontrado en hESC H9, lo que sugiere que el tamaño de los telómeros en células pluripotentes no tiene un tamaño máximo heredado. También sugiere algunos posibles desarrollos adicionales en la generación de iPSC para aumentar la capacidad de proliferación de células diferenciadas, adecuadas para la terapia basada en células en medicina regenerativa.

En conjunto, estos datos ponen de manifiesto que el presente protocolo de reprogramación conduce al borrado de las marcas más comunes de senescencia y envejecimiento en las iPSC generadas.

Para evaluar adicionalmente la capacidad pluripotente de iPSC derivadas senescentes y envejecidas, se seleccionaron 3 clones de iPSC a partir de fibroblastos envejecidos proliferativos y senescentes, iPSC 74P CI H, iPSC 74S CI F e iPSC 96 CI 1. Se confirmó en primer lugar la plena capacidad de estos clones para progresar hacia la diferenciación terminal mediante la formación de teratomas en ratones, lo que condujo a la aparición de estructuras organizadas similares a órganos en los tres linajes embrionarios. También se realizaron análisis de huellas de ADN (repeticiones cortas en tándem, STR) para confirmar que los clones de iPSC se derivaban de sus correspondientes fibroblastos parentales. También se verificó que los 6 transgenes usados para la reprogramación estaban casi completamente regulados a la baja.

A continuación, se realizó un análisis del transcriptoma de los 3 clones seleccionados y de su homólogo parental, que se comparó con un conjunto de datos de hESC e iPSC, construido como un compendio (¹⁸). En primer lugar, se confirmó que los genes pluripotentes específicos se expresaban en las presentes iPSC a un nivel similar al de las hESC e iPSC del compendio (¹⁹). Después, se realizó una agrupación jerárquica de los 3 clones de iPSC y sus fibroblastos parentales, combinados con varias hESC, iPSC y fibroblastos postnatales. Sorprendentemente, se encontró que los fibroblastos proliferativos, senescentes y envejecidos se agrupaban juntos en comparación con los fibroblastos postnatales, lo que sugiere que comparten una firma de envejecimiento común general. Además, las iPSC derivadas de fibroblastos envejecidos proliferativos y senescentes obtenidas usando la infección de los 6 factores son significativamente más similares a las hESC que las iPSC previamente descritas derivadas de una infección de 4 factores.

Dado que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial están bien descritos en la senescencia y el envejecimiento^{20,21}, los inventores se preguntaron si estas funciones también se reprogramaban específicamente a partir de células senescentes y envejecidas. El análisis del transcriptoma permitió estudiar los genes implicados en

ambos procesos, tal como se ha descrito previamente²². Una vez más, la agrupación de los transcriptomas con este subconjunto de genes específicos indicó que las modificaciones globales en los perfiles de expresión asociadas con estas funciones alteradas eran específicas de fibroblastos envejecidos y senescentes, en comparación con fibroblastos proliferativos jóvenes embrionarios o postnatales, y que las presentes iPSC derivadas han restablecido estas funciones a un estado similar al embrionario. A continuación, se evaluó la actividad mitocondrial global en las iPSC derivadas en comparación con las hESC, midiendo el potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m$) generado por el gradiente de protones, que es un indicador de una función mitocondrial sana. Para ello, se usó el colorante catiónico JC-1 y se cuantificó la razón de intensidad de fluorescencia de sus dos formas mediante microscopía confocal y análisis de citometría de flujo. Como se ha demostrado anteriormente, la razón rojo/verde disminuye con la senescencia^{20,21} y también parece estar asociada al envejecimiento. Sorprendentemente, se encontró un aumento de la razón en iPSC hasta un nivel similar al encontrado en hESC, lo que confirma que la reprogramación restauró la actividad mitocondrial de iPSC derivadas de fibroblastos viejos y senescentes. Se obtuvieron resultados similares con iPSC procedentes de fibroblastos IMR90 proliferativos o senescentes. Además, no se observaron diferencias en la distribución y morfología de las mitocondrias en las iPSC mediante microscopía electrónica en comparación con hESC H1. El análisis de las propiedades mitocondriales ilustra cómo la reprogramación nuclear, al restablecer los programas de expresión génica, podría rejuvenecer a una fisiología celular sana mediante la restauración de la función alterada de los orgánulos celulares cuya disfunción está implicada en el envejecimiento celular. Por último, usando un ensayo de diferenciación de fibroblastos^{23,24}, se demostró que estas células no entraban prematuramente en senescencia. De hecho, los fibroblastos derivados de iPSC 74P, S y 96 no revelaron actividad SA- β -Gal después de 10 duplicaciones de la población, y presentaron una tasa de proliferación equivalente a la de fibroblastos proliferativos jóvenes. Para excluir la posibilidad de que la presente estrategia de reprogramación no estuviera asociada a ninguna mutación en las rutas de inducción de senescencia, se demostró la capacidad de los fibroblastos rediferenciados para volver a entrar en senescencia replicativa. Después de un cultivo extensivo, estas células se volvieron senescentes, como lo demuestra el aumento de la actividad SA- β -Gal asociada a la detención del ciclo celular, el nuevo aumento de la expresión de p16^{INK4A} y p21^{CIP1} y un tamaño de telómeros acortado de nuevo. Y lo que es más interesante, aumentó el número de duplicaciones de la población (PD) necesarias para desencadenar la senescencia replicativa. Mientras que los fibroblastos parentales de 74 años de edad entraron en senescencia replicativa después de 51 PD, los fibroblastos rediferenciados de iPSC 74S CI F entraron en senescencia replicativa sólo después de 58 PD. Este potencial de proliferación readquirido es similar al de las iPSC 74P CI H derivadas de los fibroblastos parentales proliferativos de 74 años de edad PD 60, que se infectaron en PD 12. Estas células mostraron un potencial de duplicación de la población de 39 PD antes de agotarse por senescencia replicativa. Se observó un restablecimiento similar de la capacidad de proliferación de los fibroblastos de 96 años de edad y se explicó por el alargamiento de los telómeros. Se concluye que la presente estrategia de reprogramación, que superó el estado senescente, también era capaz de aumentar la vida celular. El análisis del transcriptoma mediante agrupación jerárquica, comparando fibroblastos parentales con hESC H1 postnatales y diferenciadas en fibroblastos, demostró finalmente que el perfil de expresión génica global de los fibroblastos tempranos rediferenciados a partir de las presentes iPSC generadas a partir de donantes ancianos y fibroblastos senescentes es distinto de los fibroblastos parentales, y más cercano a fibroblastos embrionarios derivados de la línea de hESC H1. Este resultado también se confirmó mediante perfiles de expresión génica asociados con el estrés oxidativo y la actividad mitocondrial, confirmando la fisiología rejuvenecida de las presentes células envejecidas y senescentes.

En conjunto, los presentes resultados muestran que es posible reprogramar células senescentes replicativas y células derivadas de individuos centenarios a iPSC usando una combinación específica de genes, demostrando que el envejecimiento y la senescencia no son una barrera para la reprogramación hacia la pluripotencia. También mejora la presente comprensión de la reprogramación celular fundamental y subraya la importancia infravalorada de las modificaciones epigenéticas que participan en el proceso de envejecimiento celular, que evidentemente también son susceptibles de reprogramarse. Pero lo más importante es que también se demuestra que, usando una estrategia de reprogramación adecuada, es posible rejuvenecer la fisiología celular, lo que sugiere la reversibilidad potencial de aspectos importantes del fenotipo de envejecimiento. Estos resultados también promueven el desarrollo potencial de modelos de enfermedades relacionadas con la edad, y apoyan el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en células para borrar algunas patologías relacionadas con el envejecimiento.

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos útiles para poner en práctica los métodos de la divulgación

N.º	Descripción	Secuencia
1	Secuencia del gen Oct3/4 humano (NM_002701)	CCTTCGCAAGCCCTCATTTACACAGGCCCCCGCTTGGGGCGCCTT CCTTCCCCATGGCGGGACACCTGGCTTCGGATTTGCGCTTCTCGCC CCCTCCAGGTGGTGGAGGTGATGGGCCAGGGGGGCGGAGCCGGGC TGGGTTGATCCTCGGACCTGGCTAAGCTTCCAAGGCCCTCCTGGAG GGCCAGGAATCGGGCCGGGGGTGGGCCAGGCTCTGAGGTGTGGGG GATTCCCCCATGCCCCCGCCGTATGAGTTCTGTGGGGGGATGGCG TACTGTGGGCCCCAGGTTGGAGTGGGGCTAGTGCCCCAAGGCGGCT TGGAGACCTCTCAGCCTGAGGGCGAAGCAGGAGTCGGGGTGGAGAG CAACTCCGATGGGGCCTCCCCGGAGCCCTGCACCGTCACCCCTGGT GCCGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAACCCGGAGGAGT CCCAGGACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAACTCGAGCAATTTGCCAA GCTCCTGAAGCAGAAGAGGATCACCCCTGGGATATACACAGGCCGAT GTGGGGCTCACCCCTGGGGGTTCTATTTGGGAAGGTATTCAGCCAAA CGACCATCTGCCGCTTTGAGGCTCTGCAGCTTAGCTTCAAGAACAT GTGTAAGCTGCGGCCCTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAAGCTGAC AACAATGAAAATCTTCAGGAGATATGCAAAGCAGAAACCCCTCGTGC AGGCCCCGAAAGAGAAAGCGAACCAGTATCGAGAACCGAGTGAGAGG CAACCTGGAGAATTTGTTCTGTCAGTGCCCCGAAACCCACACTGCAG CAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAGGATGTGG TCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCAGAAGGGCAAGCGATCAAG CAGCGACTATGCACAACGAGAGGATTTTGAGGCTGCTGGGTCTCCT TTCTCAGGGGGACCAGTGTCTTTCTCTGGCCCCAGGGCCCCATT TTGGTACCCCAGGCTATGGGAGCCCTCACTTCACTGCACTGTACTC CTCGGTCCCTTTCCCTGAGGGGGAAGCCTTTCCCCCTGTCTCCGTC ACCACTCTGGGCTCTCCCATGCATTCAAACCTGAGGTGCCTGCCCTT CTAGGAATGGGGGACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGGGAAAGAAAAC CTGGAGTTTGTGCCAGGGTTTTTTGGGATTAAGTTCTTCATTCATA AGGAAGGAATTGGGAACACAAAGGGTGGGGGCAGGGGAGTTTGGGG CAACTGGTTGGAGGGAAGGTGAAGTTCAATGATGCTCTTGAT TTTAATCCCACATCATGTATCACTTTTTTCTTAAATAAAGAAGCCT GGGACACAGTAGATAGACACACTTAAAAAAAAAAAA

ES 2 991 402 T3

N.º	Descripción	Secuencia
2	Secuencia de aminoácidos de Oct4 humana (ADW77327.1)	MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGPGGPEPGWVDPRTWLSFQGPFGGPG IGPGVGPGSEVWGIPPCPPPYEFCGGMAYCGPQVGVLVPQGGLET SQPEGEAGVGVESNSDGASPEPCTVTPGAVKLEKEKLEQNPEESQD IKALQKELEQFAKLLKQKRITLGYTQADVGLTLGVLF GKVFSQTTI CRFEALQLSFKNMCKLRPLLQKWVEEADNNENLQEICKAETLVQAR KRKRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPTLQQISHIAQQLGLEKDVVVRV WFCNRRQKGKRSSSDYAQREDFEAAGSPFSGGPVSFPLAPGPHFGT PGYGSPHFTALYSSVPFPEGEAFPPVSVTTLGSPMHSN
3	Secuencia del gen Sox2 humano (NM_003106)	CTATTAAC TTGTTCAAAAAAGTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAA GAGAGTGT TTGCAAAAAGGAAAAGTACTTTGCTGCCTCTTTAAGA CTAGGGCTGGGAGAAAGAAGAGGAGAGAGAAAGAAAGGAGAGAAGT TTGGAGCCCGAGGCTTAAGCCTTTCCAAAACTAATCACAACAATC GCGGCGGCCCGAGGAGGAGAGCGCCTGTTTTTTCATCCCAATTGCA CTTCGCCCCGTCTCGAGCTCCGCTTCCCCCACTATTCTCCGCCAG ATCTCCGCGCAGGGCCGTGCACGCCGAGGCCCCCGCCGCGGCCCC TGCATCCCGGCCCCCGAGCGCGGCCCCCACAGTCCCGGCGGGGCGG AGGGTTGGCGGCCCGCGGCGGGCGCGCCCCAGCGCCCGCATG TATAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCGGGCCCCGAGCAAG CTTCGGGGGGCGGCGGCGGAGGAGGCAACGCCACGGCGGCGGCGAC CGGCGGCAACCAGAAGAAGAGCCCGGACCGCGTCAAGAGGCCCATG AACGCCTTCATGGTATGGTCCCGGGGGCAGCGGCGTAAGATGGCCC

N.º	Descripción	Secuencia
		AGGAGAACCCCAAGATGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGCGCCTGGG CGCGGAGTGGAAACTTTTGTCCGAGACCGAGAAGCGGCCGTTCATC GACGAGGCCAAGCGGCTGCGCGCTCTGCACATGAAGGAGCACCCGG ATTATAAATACCGGCCGCGCCGAAAAACCAACACGCTCATGAAGAA GGATAAGTACACGCTTCCCGGAGGCTTGCTGGCCCCCGGCGGGAAC AGCATGGCGAGCGGGTTGGGGTGGGCGCCGGCCTGGGTGCGGGCG TGAACCAGCGCATGGACAGCTACGCGCACATGAACGGCTGGAGCAA CGGCAGCTACAGCATGATGCAGGAGCAGCTGGGCTACCCGCAGCAC CCGGGCCCTCAACGCTCACGGCGGGCACAGATGCAACCGATGCACC GCTACGACGTCAGCGCCCTGCAGTACAACTCCATGACCAGCTCGCA GACCTACATGAACGGCTCGCCACCTACAGCATGTCTACTCGCAG CAGGGCACCCCCGGTATGGCGCTGGGCTCCATGGGCTCTGTGGTCA AGTCCGAGGCCAGCTCCAGCCCCCGTGTTACCTCTTCTCCCA CTCCAGGGCGCCCTGCCAGGCCGGGGACCTCCGGGACATGATCAGC ATGTACCTCCCCGGCGCCGAGGTGCCGGAGCCCGCTGCGCCAGTA GACTGCACATGGCCCAGCACTACCAGAGCGGCCCCGGTGCCCGGCAC GGCCATTAACGGCACACTGCCCTGTGCGACATGTGAGGGCTGGAC TGCGAACTGGAGAAGGGGAGAGATTTTCAAAGAGATACAAGGGAAT TGGGAGGGGTGCAAAAAGAGGAGAGTAGGAAAAATCTGATAATGCT CAAAAGGAAAAAAATCTCCGCAGCGAAACGACAGCTGCGGAAAAA AACCACCAATCCCATCCAAATTAACGCAAAAACCGTGATGCCGACT AGAAAACTTTTATGAGAGATCTTGGGACTTCTTTTGGGGGACTAT TTTTGTACAGAGAAAACCTGAGGGCGGCGGGGAGGGCGGGGGAATC GGACCATGTATAGATCTGGAGGAAAAAACTACGCAAAACTTTTTT TTAAAGTTCTAGTGGTACGTTAGGCGCTTCGCAGGGAGTTCGCAAA AGTCTTTACCAGTAATATTTAGAGCTAGACTCCGGGCGATGAAAAA AAAGTTTTAATATTTGCAAGCAACTTTTGTACAGTATTTATCGAGA TAAACATGGCAATCAAATGTCCATTGTTTATAAGCTGAGAAATTGCG CAATATTTTTCGAGGAAAGGGTTCTTGCTGGGTTTTGATTCTGCAG CTTAAATTTAGGACCGTTACAAACAAGGAAGGAGTTTATTCCGATT TGAACATTTTAGTTTTAAATTTGTACAAAAGGAAAACATGAGAGCA

N.º	Descripción	Secuencia
		AGTACTGGCAAGACCGTTTTTCGTGGTCTTGTTTAAGGCAAACGTTCTAGATTGTACTAAATTTTTAACTTACTGTTAAAGGCAAAAAAAAAATGTCCATGCAGGTTGATATCGTTGGTAATTTATAATAGCTTTTGTTCAATCCTACCCTTTCATTTTGTTACATAAAAAATATGGAATTACTGTGTTTGAAATATTTTCTTATGGTTTGTAATATTTCTGTAAATTGTGATATTTTAAGGTTTTTCCCCCTTTTATTTTCCGTAGTTGTATTTTAAAAGATTTCGGCTCTGTTATTGGAATCAGGCTGCCGAGAATCCATGTATATATTTGAACTAATACCATCCTTATAACAGCTACATTTTCAACTTAAGTTTTTACTCCATTATGCACAGTTTGAGATAAATAAATTTT TGAAATATGGACACTGAAA
4	Secuencia de aminoácidos de Sox2 humana (ref. de NCBI NP_003097.1)	MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGGNSTAAAAGGNQKNSPDRVKRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYKYRPRRKTTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNGSYSMQDQLGYPQHPGLNAHGAAQMOPMHRVDVSALQYNSMTSSQTYMNGSPTYSMSYSQQGTPGMALGSMGSVVKSEASSPPVVTSSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAEVPEPAAPSR LHMSQHYQSGPVPGTAINGTLP LSHM

N.º	Descripción	Secuencia
5	Secuencia del gen Klf4 humano (NM_004235)	AGTTTCCCGACCAGAGAGAACGAACGTGTCTGCGGGCGCGGGGA GCAGAGGCGGTGGCGGGCGGCGGGCACCGGGAGCCGCCGAGTGA CCCTCCCCCGCCCTCTGGCCCCCACCCTCCACCCGCCCGTGGC CCGCGCCCATGGCCGCGCGCTCCACACAACTCACCGGAGTCCGC GCCTTGCGCCCGACAGTTTCGCAGCTCCGCGCCACGGCAGCCAG TCTCACCTGGCGGCACCGCCCGCCACCGCCCCGGCCACAGCCCCCT GCGCCACGGCAGCACTCGAGGCGACCGCGACAGTGGTGGGGGACG CTGCTGAGTGGAAGAGAGCGCAGCCCGGCCACCGGACCTACTTACT CGCCTTGCTGATTGTCTATTTTTGCGTTTACAACTTTCTAAGAAC TTTTGTATACAAAGGAACTTTTTAAAAAAGACGCTTCCAAGTTATA TTTAATCCAAAGAAGAAGGATCTCGGCCAATTGGGGTTTTGGGTT TTGGCTTCGTTTCTTCTCTTCGTTGACTTTGGGGTTCAGGTGCCCC AGCTGCTTCGGGCTGCCGAGGACCTTCTGGGCCCCACATTAATGA GGCAGCCACCTGGCGAGTCTGACATGGCTGTCAGCGACGCGCTGCT

N.º	Descripción	Secuencia
		CCCATCTTTTCTCCACGTTTCGCGTCTGGCCCGGCGGGAAGGGAGAAG ACAC TGCGTCAAGCAGGTGCCCCGAATAACCGCTGGCGGGAGGAGC TCTCCACATGAAGCGACTTCCCCCAGTGCTTCCCGGCCGCCCTA TGACCTGGCGCGGGCGACCCCTGGCCACAGACCTCGAGAGCGGCGGA GCCGGTGCGGCTTGCGGCGGTAGCAACCTGGCGCCCTACCTCGGA GAGAGACCGAGGAGTTCAACGATCTCCTGGACCTGG ACTTTATTCTCTCCAATTCGCTGACCCATCCTCCGGAGTCAGTGGC CGCCACCGTGTCTCGTCAGCGTCAGCCTCCTCTTCGTCTGCGCG TCGAGCAGCGGCCCTGCCAGCGCGCCCTCCACCTGCAGCTTCACCT ATCCGATCCGGGCGGGGAACGACCCGGGCGTGGCGCCGGGCGGCAC GGGCGGAGGCCTCCTCTATGGCAGGGAGTCCGCTCCCCCTCCGACG GCTCCCTTCAACCTGGCGGACATCAACGACGTGAGCCCTCGGGCG GCTTCGTGGCCGAGCTCCTGCGGCCAGAATTGGACCCGGTGTACAT TCCGCCGCAGCAGCCGCAGCCGCCAGGTGGCGGGCTGATGGGCAAG TTCGTGCTGAAGGCGTCGCTGAGCGCCCTGGCAGCGAGTACGGCA GCCCGTCGGTCATCAGCGTCAGCAAAGGCAGCCCTGACGGCAGCCA CCCGGTGGTGGTGGCGCCCTACAACGGCGGGCGCGCGCACGTGC CCCAAGATCAAGCAGGAGGCGGTCTCTTCGTGCACCCACTTGGGCG CTGGACCCCTCTCAGCAATGGCCACCGGCCGGCTGCACACGACTT CCCCCTGGGGCGGCAGTCCCCAGCAGGACTACCCGACCCCTGGGT CTTGAGGAAGTCTGAGCACCAGGACTGTCACCCTGCCCTGCCGC TTCCTCCCGGCTTCCATCCCCACCCGGGGCCCAATTACCCA TCCTT CCTGCCCCGATCAGATGCAGCCGCAAGTCCCGCCGCTCCATTACCAA GAGCTCATGCCACCCGGTTCTGTCATGCCAGAGGAGCCCAAGCCAA AGAGGGGAAGACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACCGCCACCCACAC TTGTGATTACGCGGGCTGCGGCAAAACCTACACAAAGAGTTCCCAT CTC AAGGCACACCTGCGAACCACACAGGTGAGAAACCTTACCACT GTGACTGGGACGGCTGTGGATGGAAATTGCCCCGCTCAGATGAACT GACCAGGCACTACCGTAAACACACGGGGCACCGCCCGTTCCAGTGC CAAAAATGCGACCGAGCATTTTCCAGGTCCGACCACCTCGCCTTAC ACATGAAGAGGCATTTTAAATCCCAGACAGTGGATATGACCCACA

N.º	Descripción	Secuencia
		CTGCCAGAAGAGAATTCAGTATTTTTTACTTTTCACACTGTCTTCC CGATGAGGGAAGGAGCCCAGCCAGAAAGCACTACAATCATGGTCAA GTTCCCAACTGAGTCATCTTGTGAGTGGATAATCAGGAAAAATGAG GAATCCAAAAGACAAAAATCAAAGAACAGATGGGGTCTGTGACTGG ATCTTCTATCATTCCAATTCTAAATCCGACTTGAATATTCTCTGGAC TTACAAAATGCCAAGGGGGTGACTGGAAGTTGTGGATATCAGGGTA TAAATTATATCCGTGAGTTGGGGGAGGGAAGACCAGAATTCCT TGAATTGTGTATTGATGCAATATAAGCATAAAAGATCACCTTGAT TCTCTTTACCTTCTAAAAGCCATTATTATGATGTTAGAAGAAGAGG AAGAAATTCAGGTACAGAAAACATGTTTAAATAGCCTAAATGATGG TGCTTGGTGAGTCTTGGTTCTAAAGGTACCAAACAAGGAAGCCAAA GTTTTCAAACCTGCTGCATACTTTGACAAGGAAAATCTATATTTGTC TTCCGATCAACATTTATGACCTAAGTCAGGTAATATACCTGGTTTA CTTCTTTAGCATTTTTTATGCAGACAGTCTGTTATGCACTGTGGTTT CAGATGTGCAATAATTTGTACAATGGTTTATTCCCAAGTATGCCTT AAGCAGAACAAATGTGTTTTTCTATATAGTTTCTTGCCTTAATAAA TATGTAATATAAATTTAAGCAAACGTCTATTTTGTATATTTGTAAA CTACAAAGTAAAATGAACATTTTGTGGAGTTTGTATTTTGCATACT CAAGGTGAGAATTAAGTTTTAAATAAACCTATAATATTTTATCTGA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
6	Secuencia de aminoácidos de Klf4 humana (NP_004226.3)	MRQPPGESDMAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRQAGAPNNRWRE ELSHMKRLPPVLPGRPYDLAAATVATDLESGGAGAACGGSNLAPLP RRETEEFNDLLDLDFILSNLTHPPESVAATVSSASASSSSSPSS SGPASAPSTCSFTYPIRAGNDPGVAPGGTGGGLLYGRESAPPPTAP FNLADINDVSPSGGFVAELLRLPELDPVYIPPQQPQPPGGGLMGKFV LKASLSAPGSEYGPSVISVSKGSPDGSHPVVVAPYNGGPPRTCPK IKQEAVSSCTHLGAGPPLSNGHRPAAHDFPLGRQLPSRTTPTLGLE EVLSSRDCHPALPLPPGFHHPGPNYPSFLPDQMOPQVPPLHYQEL MPPGSCMPEEPKPKRGRRSWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLK AHLRHTTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDDELTRHYRKHTGHRPFQCQK CDRAFSRSDHLALHMKRHF

N.º	Descripción	Secuencia
7	Secuencia del gen c-Myc humano (ref. de NCBI NM_002467)	GACCCCCGAGCTGTGCTGCTCGCGGCCGCCACCGCCGGGCCCCGGC CGTCCCTGGCTCCCCCTCCTGCCTCGAGAAGGGCAGGGCTTCTCAGA GGCTTGGCGGGAAAAAGAACGGAGGGAGGGATCGCGCTGAGTATAA AAGCCGCTTTTCGGGGCTTTATCTAACTCGCTGTAGTAATTCCAGC GAGAGGCAGAGGGAGCGAGCGGGCGGCCGGCTAGGGTGGGAAGAGCC GGGCGAGCAGAGCTGCGCTGCGGGCGTCTCTGGGAAGGGAGATCCGG AGCGAATAGGGGGCTTCGCCTCTGGCCCAGCCCTCCCCTGATCCC CCAGCCAGCGGTCCGCAACCCTTGCCGCATCCACGAAACTTTGCC ATAGCAGCGGGCGGGCACTTTGCACTGGAACCTACAACACCCGAGC AAGGACGCGACTCTCCCGACGCGGGGAGGCTATTCTGCCCATTTGG GGACACTTCCCCGCCGCTGCCAGGACCCGCTTCTCTGAAAGGCTCT CCTTGCAGCTGCTTAGACGCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTGGAAAAC CAGCAGCCTCCCGCGACGATGCCCCCTAACGTTAGCTTACCAACA GGAACATATGACCTCGACTACGACTCGGTGCAGCCGTATTTCTACTG CGACGAGGAGGAGAACTTCTACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGAGCTG CAGCCCCCGGCGCCAGCGAGGATATCTGGAAGAAATTCGAGCTGC TGCCACACCCGCCCTGTCCCTAGCCGCCGCTCCGGGCTCTGCTC GCCCTCCTACGTTGCGGTACACACCTTCTCCCTTCGGGGAGACAAC GACGGCGGTGGCGGGAGCTTCTCCACGGCCGACCAGCTGGAGATGG TGACCGAGCTGCTGGGAGGAGACATGGTGAACCAGAGTTTCATCTG CGACCCCGACGACGAGACCTTCATCAAAAACATCATCATCCAGCAC TGTAATGTGGAGCGGCTTCTCGGCCGCCGCAAGCTCGTCTCAGAGA AGCTGGCCTCCTACCAGGCTGCGCGCAAAGACAGCGGCAGCCCGAA CCCCGCCCGCGGCCACAGCGTCTGCTCCACCTCCAGCTTGTACCTG CAGGATCTGAGCGCCGCCCTCAGAGTGCATCGACCCCTCGGTGG TCTTCCCCTACCTCTCAACGACAGCAGCTCGCCCCAAGTCTCTGCGC CTCGCAAGACTCCAGCGCCTTCTCTCCGTCTCTGGATTCTCTGCTC TCCTCGACGGAGTCTCCCCGAGGGCAGCCCCGAGCCCTGGTGC TCCATGAGGAGACACCGCCACCACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGA ACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTTGTTTCTGTGAAAAGAGG CAGGCTCCTGGCAAAAGGTCAGAGTCTGGATCACCTTCTGCTGGAG

N.º	Descripción	Secuencia
		GCCACAGCAAACCTCCTCACAGCCCCTGGTCTCAAGAGGTGCCA CGTCTCCACACATCAGCACAACTACGCAGCGCCTCCCTCCACTCGG AAGGACTATCCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGTCAAG TCCTGAGACAGATCAGCAACAACCGAAAAATGCACCAGCCCCAGGTC CTCGGACACCGAGGAGAATGTCAAGAGGCGAACACACAACGTCTTG GAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTTGGCCTGC GTGACCAGATCCCGGAGTTGGAAAACAATGAAAAGGCCCCCAAGGT AGTTATCCTTAAAAAGCCACAGCATAACATCCTGTCCGTCCAAGCA GAGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGTTCGGAAACGAC GAGAACAGTTGAAACACAACTTGAACAGCTACGGAACCTTGTGTC GTAAGGAAAAGTAAGGAAAACGATTCTTCTAACAGAAATGTCTTG AGCAATCACCTATGAACTTGTTTCAAATGCATGATCAAATGCAACC TCACAACCTTGGCTGAGTCTTGAGACTGAAAGATTTAGCCATAATG TAAACTGCCTCAAATTGGACTTTGGGCATAAAAGAACTTTTTTATG CTTACCATCTTTTTTTTTCTTTAACAGATTTGTATTTAAGAATTG TTTTTAAAAAATTTTAAGATTTACACAATGTTTCTCTGTAAATATT GCCATTAAATGTAAATAACTTTAATAAAACGTTTATAGCAGTTACA CAGAATTTCAATCCTAGTATATAGTACCTAGTATTATAGGTACTAT AAACCCTAATTTTTTTTTTATTTAAGTACATTTTGCTTTTTTAAAGTTG ATTTTTTTCTATTGTTTTTAGAAAAAATAAAATAACTGGCAAATAT ATCATTGAGCCAAATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAA
8	Secuencia de aminoácidos de c-Myc humana (ref. de NCBI NP_002458.2)	MDFFRVVENQPPATMPLNVSFTRNRYDLDYDSVQPYFYCDEEENF YQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPPLSPSRRLCSYVAV TPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDET FIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHS VCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVPYPLNDSSSPKSCASQDSSA FSPSSDLLSSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEE IDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHKPPHSPLVLKRCHVSTHQH NYAAPSTRKDYPAARVKLDSVRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEEN VKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKA TAYILSVQAEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA

N.º	Descripción	Secuencia
9	Secuencia del gen Nanog humano (NM_024865.2)	ATTATAAATCTAGAGACTCCAGGATTTTAACGTTCTGCTGGACTGA GCTGGTTGCCTCATGTTATTATGCAGGCAACTCACTTTATCCCAAT TTCTTGATACTTTTCCTTCTGGAGGTCCTATTTCTCTAACAATCTTC CAGAAAAGTCTTAAAGCTGCCTTAACCTTTTTTCCAGTCCACCTCT TAAATTTTTTCTCCTCTTCTCTATACTAACATGAGTGTGGATCC AGCTTGTCCTCCAAAGCTTGCCTTGCTTTGAAGCATCCGACTGTAAA GAATCTTCACCTATGCCTGTGATTTGTGGGCCTGAAGAAAACATC CATCCTTGCAAATGTCTTCTGCTGAGATGCCTCACACGGAGACTGT CTCTCCTCTTCCCTTCCATGGATCTGCTTATTAGGACAGCCCT GATTCTTCCACCAGTCCCAAAGGCAACAACCCACTTCTGCAGAGA AGAGTGTCGCAAAAAAGGAAGACAAGGTCCCGGTCAAGAAACAGAA GACCAGAACTGTGTTCTTCTCCACCCAGCTGTGTGTACTCAATGAT AGATTCAGAGACAGAAATACCTCAGCCTCCAGCAGATGCAAGAAC TCTCCAACATCCTGAACCTCAGCTACAAACAGGTGAAGACCTGGTT CCAGAACCAGAGAATGAAATCTAAGAGGTGGCAGAAAAACAACCTGG CCGAAGAATAGCAATGGTGTGACGCAGAAGGCCTCAGCACCTACCT ACCCAGCCTTTACTCTTCTACCACCAGGGATGCCTGGTGAACCC GACTGGGAACCTTCCAATGTGGAGCAACCAGACCTGGAACAATTCA ACCTGGAGCAACCAGACCCAGAACATCCAGTCTGGAGCAACCACT CCTGGAACACTCAGACCTGGTGCACCCAATCCTGGAACAATCAGGC CTGGAACAGTCCCTTCTATAACTGTGGAGAGCAATCTCTGCAGTCC TGCAATGCAGTTCCAGCCAAATTCTCCTGCCAGTGACTTGGAGGCTG CCTTGGAAGCTGCTGGGGAAGGCCTTAATGTAATACAGCAGACCAC TAGGTATTTTAGTACTCCACAAACCATGGATTTATTCCTAAACTAC TCCATGAACATGCAACCTGAAGACGTGTGAAGATGAGTGAACTGA TATTACTCAATTTAGTCTGGACACTGGCTGAATCCTTCTCTCCC CTCCTCCCATCCCTCATAGGATTTTTCTTGTGTTGGAAACACGTGT TCTGGTTTCCATGATGCCCATCCAGTCAATCTCATGGAGGGTGGAG TATGGTTGGAGCCTAATCAGCGAGGTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTCC TATTGGATCTTCTGGAGAAAATACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGA AACGGAGTCTTGCTCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGGT

N.º	Descripción	Secuencia
		CTTGGCTCACTGCAAGCTCCGTCTCCCGGGTTCACGCCATTCTCCT GCCTCAGCCTCCCGAGCAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCTCG CCCGGCTAATATTTTGTATTTTGTAGTAGAGACGGGGTTTCACTGTG TTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGTGATCCACCCGCCT CGGCCTCCCTAACAGCTGGGATTTACAGGCGTGAGCCACCGCGCCC TGCCTAGAAAAGACATTTTAATAACCTTGGCTGCCGTCTCTGGCTA TAGATAAGTAGATCTAATACTAGTTTGGATATCTTTAGGGTTTAGA ATCTAACCTCAAGAATAAGAAATACAAGTACAAATTGGTGATGAAG ATGTATTCGTATTGTTTGGGATTGGGAGGCTTTGCTTATTTTTTAA AAACTATTGAGGTAAAGGGTTAAGCTGTAACATACTTAATTGATTT CTTACCGTTTTTGGCTCTGTTTTGCTATATCCCTAATTTGTTGGT TGTGCTAATCTTTGTAGAAAGAGGTCTCGTATTTGCTGCATCGTAA TGACATGAGTACTGCTTTAGTTGGTTTAAGTTCAAATGAATGAAAC AACTATTTTTCTTTAGTTGATTTTACCCTGATTTACCGAGTGTT TCAATGAGTAAATATACAGCTTAAACAT
10	Secuencia de aminoácidos de Nanog humano (NP_079141)	MSVDPACPQSLPCFEASDCKESSMPVICGPEENYPQLQSSAEMP HTETVSPLPSSMDLLIQDSPDSSTSPKKGQPTSAEKSVAKKEDKVP VKKQKTRTVFSSTQLCVLNDRFQRQKYLQLQMQELSNILNLSYKQ VKTWFQNQRMKSKRWQKNNWPKNSNGVTQKASAPTYPSLYSSYHQG CLVNPTGNLPMWSNQTNWNNSTWSNQTNIQSWSNHSWNTQTWCTQS WNNQAWNPFYNCGEESLQSCMQFQPNSPASDLEAALEAAGEGLNV IQQTTRYFSTPQTMDLFLNYSNMMPEDV

N.º	Descripción	Secuencia
11	Secuencia del gen Lin28 humano (NM_024674)	GTGCGGGGGAAGATGTAGCAGCTTCTTCTCCGAACCAACCCTTTGC CTTTCGGACTTCTCCGGGGCCAGCAGCCGCCCGACCAGGGGGCCCGGG GCCACGGGCTCAGCCGACGACCATGGGCTCCGTGTCCAACCAGCAG TTTGCAGGTGGCTGCGCCAAGGCGGCAGAAGAGGCGCCCGAGGAGG CGCCGGAGGACGCGGCCCCGGGCGGCGGACGAGCCTCAGCTGCTGCA CGGTGCGGGCATCTGTAAGTGGTTCAACGTGCGCATGGGGTTCGGC TTCCTGTCCATGACCGCCCGCGCCGGGGTCGCGCTCGACCCCCCAG TGGATGTCTTTGTGCACCAGAGTAAGCTGCACATGGAAGGGTTCCG GAGCTTGAAGGAGGGTGAGGCAGTGGAGTTCACCTTTAAGAAGTCA

N.º	Descripción	Secuencia
		GCCAAGGGTCTGGAATCCATCCGTGTCACCGGACCTGGTGGAGTAT TCTGTATTGGGAGTGAGAGGCGGCCAAAAGGAAAGAGCATGCAGAA GCGCAGATCAAAAGGAGACAGGTGCTACAACCTGTGGAGGTCTAGAT CATCATGCCAAGGAATGCAAGCTGCCACCCCAGCCCAAGAAGTGCC ACTTCTGCCAGAGCATCAGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGCTGAA GGCCCAGCAGGGCCCTAGTGCACAGGGAAAGCCAACCTACTTTCGA GAGGAAGAAGAAGAAATCCACAGCCCTACCCTGCTCCCGGAGGCAC AGAAATTGAGCCACAATGGGTGGGGGCTATTCTTTTGTATCAGGAA GTTTTGAGGAGCAGGCAGAGTGGAGAAAGTGGGAATAGGGTGCATT GGGGCTAGTTGGCACTGCCATGTATCTCAGGCTTGGGTTCACACCA TCACCCTTTCTCCCTCTAGGTGGGGGAAAGGGTGAGTCAAAGGA ACTCCAACCATGCTCTGTCCAAATGCAAGTGAGGGTTCTGGGGGCA ACCAGGAGGGGGGAATCACCTACAACCTGCATACTTTGAGTCTCC ATCCCCAGAATTTCCAGCTTTTGAAAGTGGCCTGGATAGGGAAGTT GTTTTCTTTTAAAGAAGGATATATAATAATTCCTATGCCAGAGTG AAATGATTAAGTATAAGACCAGATTCATGGAGCCAAGCCACTACAT TCTGTGGAAGGAGATCTCTCAGGAGTAAGCATTGTTTTTTTTCTAC ATCTTGTATCCTCATACCCACTTTTGGGATAGGGTGCTGGCAGCTG TCCCAAGCAATGGGTAATGATGATGGCAAAAAGGGTGTTTGGGGGA ACAGCTGCAGACCTGCTGCTCTATGCTCACCCCGCCCCATTCTGG GCCAATGTGATTTTATTTATTTGCTCCCTTGCATACTGCACCTTGG GTCCCACTTTCTCCAGGATGCCAACTGCACTAGCTGTGTGCGAATG ACGTATCTTGTGCATTTTAACTTTTTTCTTAATATAAATATTCT GGTTTGTATTTTGTATATTTTAATCTAAGGCCCTCATTTCTCTG ACTGTGTTCTCAGGTACATGAGCAATCTCAGGGATAGCCAGCAGCA GCTCCAGGTCTGCGCAGCAGGAATTACTTTTTGTTGTTTTTGCCAC CGTGGAGAGCAACTATTTGGAGTGACAGCCATTGAACTACCTCA TTTTTGCCAATAAGAGCTGGCTTTTCTGCCATAGTGCTCTTGAA ACCCCTCTGCCTTGAAAATGTTTTATGGGAGACTAGGTTTTAACT GGGTGGCCCCATGACTTGATTGCCTTCTACTGGAAGATTGGGAATT AGTCTAAACAGGAAATGGTGGTACACAGAGGCTAGGAGAGGCTGGG

N.º	Descripción	Secuencia
		CCCCGGTGAAAAGGCCAGAGAGCAAGCCAAGATTAGGTGAGGGTTGT CTAATCCTATGGCACAGGACGTGCTTTACATCTCCAGATCTGTTCT TCACCAGATTAGGTTAGGCCTACCATGTGCCACAGGGTGTGTGTGT GTTTGTAAACTAGAGTTGCTAAGCATAACTTTAAAGACCAATACC CCTGTACTTAATCCTGTGCTGTCGAGGGATGGATATATGAAGTAAG GTGAGATCCTTAACCTTTCAAAAATTTTCGGGTTCAGGGAGACACA CAAGCGAGGGTTTTGTGGTGCCTGGAGCCTGTGTCCTGCCCTGCTA CAGTAGTGATTAATAGTGTGTCATGGTAGCTAAAGGAGAAAAAGGGGG TTTCGTTTACACGCTGTGAGATCACCGCAAACCTACCTTACTGTGT TGAAACGGGACAAATGCAATAGAACGCATTGGGTGGTGTGTGTCTG ATCCTGGGTTCCTGTCTCCCTAAATGCTGCCCCCAAGTTACTGT ATTTGTCTGGGCTTTGTAGGACTTCACTACGTTGATTGCTAGGTGG CCTAGTTTGTGTAAATATAATGTATTGGTCTTTCTCCGTGTCTTT GGGGGTTTTGTTTACAACTTCTTTTTGTATTGAGAGAAAAATAGC CAAAGCATCTTTGACAGAAGGTTCTGCACCAGGCAAAAAGATCTGA AACATTAGTTTGGGGGGCCCTCTTCTTAAAGTGGGGATCTTGAACC ATCCTTTCTTTTGTATTCCCTTCCCTATTACCTATTAGACCAGA TCTTCTGTCTAAAAACTTGTCTTCTACCCTGCCCTCTTTTCTGTT CACCCCCAAAAGAAAACCTACACACCCACACACATACACATTCAT GCTTGGAGTGTCTCCACAACCTCTAAATGATGTATGCAAAAATACT GAAGCTAGGAAAACCCTCCATCCCTTCTTCCCAACCTCCTAAGTCA AGACCATTACCATTCTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTAAAATG GAGTCTCACTGTGTCAACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCGGC TCACTGCAGCCTCTGCCTCTTGGGTCAAGTGATTCTCCTGCCTCA GCCTCCTGAGTAGCTGGGATTTTCAGGCACCCGCCACACTCAGCTAA TTTTTGTATTTTGTAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGTCCAGGC TGGTCTGGAACCTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCACCTTGGCTTCC CAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCATGCTGGGCCAACCA TTTCTTGGTGTATTGATGCCAAACACTTAAGACACTGCTGTAGCCC AGGCGCGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGAAGGCTGA GGCGGGCGGATCACAAGGTCACGAGTTCAAACTATCCTGGCCAAC

N.º	Descripción	Secuencia
		ACAGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAATACAAAAAAATTAGCCGGGT GTGGTGGTGCATGCCTTTAGTCCTAGCTATTCAGGAGGCTGAGGCA GGGGAATCGCTTGAACCCGAGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCTGAGA TCGCACCACTGCACTCCAGCCTGGTTACAGAGCAAGACTCTGTCTC AAACAAAACAAAACAAAACAAAACACACTACTGTATTTTGGATGG ATCAAACCTCCTTAATTTTAAATTTCTAATCCTAAAGTAAAGAGATG CAATTGGGGGCCTTCCATGTAGAAAGTGGGGTCAGGAGGCCAAGAA AGGGAATATGAATGTATATCCAAGTCACTCAGGAACTTTTATGCAG GTGCTAGAACTTTATGTCAAAGTGGCCACAAGATTGTTTAATAGG AGACGAACGAATGTAAGTCCATGTTTACTGCTAAAAACCAAAGCTT TGTGTAAAATCTTGAATTTATGGGGCGGGAGGGTAGGAAAGCCTGT ACCTGTCTGTTTTTTTCTGATCCTTTTCCCTCATTCTGAACTGC AGGAGACTGAGCCCCTTTGGGCTTTGGTGACCCCATCACTGGGGTG TGTTTATTTGATGGTTGATTTTGCTGTACTGGGTACTTCCTTTCCC ATTTTCTAATCATTTTTTTAACACAAGCTGACTCTTCCCTTCCCTTC TCCTTTCCCTGGGAAAATACAATGAATAAATAAGACTTATTGGTA CGCAAACGTGCA
12	Secuencia de aminoácidos de Lin28 humana (NP_078950)	MGSVSNQQFAGGCAKAAEEAPEEAPEDAARAADPEQLLHGAGICKW FNVRMGFGFLSMTARAGVALDPPVDVVFVHQSKLHMEGFRSLKEGEA VEFTFKKSAKGLESIRVTGPGGVFCIGSERRPKGKSMQKRRSKGDR CYNCGGLDHHAKECKLPPQPKKCHFCQSI SHMVASCPLKAQQGPSA QGKPTYFREEEEEIHSP TLLPEAQN

Bibliografía

- 1 Takahashi, K. & Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4), 663-676 (2006).
- 2 Takahashi, K. *et al.*, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861-872 (2007).
- 3 Yu, J. *et al.*, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 (5858), 1917-1920 (2007).
- 4 Marion, R.M. *et al.*, A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460 (7259), 1149-1153 (2009).
- 5 Li, H. *et al.*, The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460 (7259), 1136-1139 (2009).
- 6 Banito, A. *et al.*, Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23 (18), 2134-2139 (2009).

- 7 Utikal, J. *et al.*, Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460 (7259), 1145-1148 (2009).
- 5 8 Kawamura, T. *et al.*, Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460 (7259), 1140-1144 (2009).
- 9 Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F., Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9), 729-740 (2007).
- 10 10 Collado, M., Blasco, M.A., & Serrano, M., Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130 (2), 223-233 (2007).
- 11 Zhang, R., Chen, W., & Adams, P.D., Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27 (6), 2343-2358 (2007).
- 15 12 Liao, J. *et al.*, Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 18 (5), 600-603 (2008).
- 13 Hanna, J. *et al.*, Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462 (7273), 595-601 (2009).
- 20 14 Yu, J. *et al.*, Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* (2009).
- 15 Krishnamurthy, J. *et al.*, Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114 (9), 1299-1307 (2004).
- 25 16 Zhang, W. *et al.*, Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence. *Life Sci* 83 (13-14), 475-480 (2008).
- 17 Marion, R.M. *et al.*, Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4 (2), 141-154 (2009).
- 30 18 Assou, S. *et al.*, A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells* 25 (4), 961-973 (2007).
- 19 Guenther, M.G. *et al.*, Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7 (2), 249-257.
- 35 20 Passos, J.F. *et al.*, Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 5 (5), e110 (2007).
- 40 21 Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X., & Ferbeyre, G., Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* 29 (16), 4495-4507 (2009).
- 22 Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H., & Adjaye, J., The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28 (4), 721-733 (2010).
- 45 23 Park, I.H. *et al.*, Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451 (7175), 141-146 (2008).
- 24 Assou, S. *et al.*, A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells. *BMC Genomics* 10, 10 (2009).
- 50 25 Matsuura, F. *et al.*, Senescent phenotypes of skin fibroblasts from patients with Tangier disease. *Biochemical and biophysical research communications* 357 (2), 493-498 (2007).
- 55 26 Ludwig, T.E. *et al.*, Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods* 3 (8), 637-646 (2006).
- 27 Freberg, C.T., Dahl, J.A., Timoskainen, S., & Collas, P., Epigenetic Reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Molecular biology of the cell* 18 (5), 1543-1553 (2007).
- 60

REIVINDICACIONES

1. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC) rejuvenecidas para su uso en terapia regenerativa autóloga en un sujeto humano adulto de más de 50 años de edad,

en donde dichas iPSC rejuvenecidas se obtienen mediante un método que comprende las etapas de:

a) proporcionar una composición celular obtenida de dicho sujeto humano adulto de al menos 50 años de edad, y,

b) cultivar dicha composición celular en condiciones apropiadas para reprogramar dicha composición celular en iPSC humanas rejuvenecidas, en donde dichas condiciones apropiadas comprenden el aumento de la expresión en dicha composición celular de al menos la siguiente combinación de factores de reprogramación:

i. Oct4,

ii. Klf4,

iii. Sox2,

iv. C-Myc,

v. Lin28,

vi. y Nanog,

obteniendo de ese modo dichas células iPSC humanas rejuvenecidas,

en donde dicho método no comprende una etapa de silenciamiento de efectores de senescencia en dicha composición celular, tales como p21^{CIP} y/o p16^{INK4A} y/o p53,

en donde uno o todos los fenotipos siguientes se suprimen en las células madre pluripotentes inducidas rejuvenecidas:

- activación de los efectores de senescencia p16^{INK4A} o p21^{CIP},

- células detenidas irreversiblemente en G1,

- acortamiento del tamaño de la telomerasa,

- expresión de actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia,

- modificación específica de la cromatina como focos heterocromáticos asociados a senescencia.

2. Las iPSC humanas rejuvenecidas para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha composición celular proporcionada en la etapa a) comprende al menos un 40 % de las células que presentan al menos una o más de las siguientes características del fenotipo de envejecimiento:

• regulación al alza de los supresores de tumores p16^{INK4A} o p21^{CIP1},

• células detenidas irreversiblemente en G1,

• expresión de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal),

• expresión de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF),

• alteración de la actividad mitocondrial global.

3. Las iPSC humanas rejuvenecidas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha composición celular proporcionada en la etapa a) comprende o consiste en células senescentes.

4. Las iPSC humanas rejuvenecidas para su uso según la reivindicación 3, en donde dichas células senescentes se obtienen de un sujeto que padece trastornos relacionados con la edad que conducen a una alta proporción de células envejecidas o senescentes.

5. Las iPSC humanas rejuvenecidas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dichas condiciones para aumentar la expresión de los factores de reprogramación comprenden
- 5 a) introducir uno o más vectores de expresión que comprendan secuencias codificantes de dicha combinación de factores de reprogramación en dicha composición celular; o,
- b) administrar directamente una cantidad eficaz de cada ARN precursor de los factores de reprogramación en dicha composición celular.
- 10 6. Las iPSC humanas rejuvenecidas para su uso según la reivindicación 5, en donde dicha etapa de introducción se realiza transfectando dicha composición celular con una combinación de vectores virales, comprendiendo cada vector viral la secuencia codificante de cada uno de los factores de reprogramación, respectivamente: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 y Nanog.
- 15 7. Las iPSC humanas rejuvenecidas para uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto necesita terapia regenerativa debido a trastornos específicos seleccionados de trastornos cancerosos, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, trastornos musculares y esqueléticos, trastornos neurológicos, diabetes y otros trastornos metabólicos.