

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 897**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/02** (2006.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

**A01N 63/00** (2010.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008 E 16171245 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3078738**

54 Título: **Estimulación de la vía wnt en la reprogramación de células somáticas**

30 Prioridad:

**31.08.2007 US 967028 P**

**06.08.2008 US 188190 P**

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

**22.12.2020**

73 Titular/es:

**WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL  
RESEARCH (100.0%)  
455 Main Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CHEVALIER, BRETT;  
MARSON, ALEXANDER;  
YOUNG, RICHARD, A.;  
FOREMAN, RUTH y  
JAENISCH, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 799 897 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**

Estimulación de la vía wnt en la reprogramación de células somáticas

## 5 Financiación gubernamental

La invención descrita en la presente descripción fue respaldada, en todo o en parte, por las subvenciones 5-RO1-HDO45022, 5-R37-CA084198 y 5-RO1-CA087869 a RJ y por la subvención NIH HG002668 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

10

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 60/967,028, presentada el 31 de agosto de 2007, y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 61/188,190, presentada el 6 de agosto de 2008.

15

Antecedentes de la invención

Las células madre son células capaces de autorrenovarse y dar lugar a células más diferenciadas. Las células madre embrionarias (ES) pueden diferenciarse en los múltiples tipos de células especializadas que colectivamente comprenden el cuerpo. Además de ser de gran interés científico, la propiedad de la pluripotencia le da a las células ES humanas una gran promesa clínica para aplicaciones en medicina regenerativa, tales como terapias de reemplazo de células/tejidos para la enfermedad.

20

Actualmente se usan varios métodos diferentes para obtener células ES. En un método, una línea celular ES se deriva de la masa celular interna de un embrión normal en la etapa de blastocisto (Ver las patentes de EE.UU. núms. 5,843,780 y 6,200,806, Thompson, J.A. y otros Science, 282:1145-7, 1998). Un segundo método para crear células ES pluripotentes utiliza la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). En esta técnica, el núcleo se elimina de un huevo normal, y así se elimina el material genético. El núcleo de una célula somática diploide donante se introduce directamente en el ovocito enucleado, por ejemplo, por micromanipulación, o la célula somática diploide donante se coloca junto al óvulo enucleado y las dos células se fusionan. La célula resultante tiene el potencial de convertirse en un embrión temprano a partir del cual puede obtenerse la porción que contiene la célula madre que produce la masa celular interna. En un tercer método, el núcleo de una célula humana se trasplanta en un ovocito animal enucleado de una especie diferente de la célula donante. Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. Pub. núm. 20010012513. Las células quiméricas resultantes se usan para la producción de células ES pluripotentes, en particular células ES pluripotentes similares a las humanas. Las desventajas de esta técnica son que estas células quiméricas pueden contener virus desconocidos y retener las mitocondrias de las especies animales.

25

30

35

40

Los métodos tradicionales de aislamiento de células ES presentan varias limitaciones cuando se aplican a la generación de células ES humanas. Estos incluyen controversias éticas asociadas con la fuente de las células, así como desafíos técnicos. Una limitación significativa a la utilización productiva de las células ES para aplicaciones clínicas es la dificultad asociada con la generación de células ES que estén genéticamente adaptadas a pacientes individuales. Existe una necesidad significativa de métodos alternativos para generar células pluripotentes.

45

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para reprogramar células somáticas de mamíferos a un estado menos diferenciado. En ciertas modalidades, las composiciones y métodos permiten la reprogramación de células somáticas a células pluripotentes, embrionarias, similares a células madre ("células similares a ES").

50

La invención se define en las reivindicaciones. En un primer aspecto, la invención proporciona un método para reprogramar una célula somática de mamífero, que comprende:

- (a) poner en contacto la célula somática de mamífero con un activador de la vía Wnt seleccionado del grupo que consiste en: (i) una proteína Wnt que activa un receptor Wnt, y (ii) un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en 3-[(3-cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 415286), cloruro de litio, valproato de sodio, inhibidor de GSK3 II, un agente de ARNi que inhibe la expresión de GSK3, un derivado de 9-deazaguanina, un derivado de pirazolona, una bisindolilmaleimida, roterlina, KN62, quercetina, SP600125, KT5823, una indirubina, una paulona, una himenialdisina, una purina sustituida, CT 98016, una maleimida, una pirazolopiridazina, pirazolopiridina, una pirazolo[3,4-b] quinoxalina, un 1,3,4-oxadiazol, un 1,2,5-oxadiazol, una tiadiazolidinona, AF102B, AF150, una pirazolona, una pirazolamina, una amino pirimidina sustituida, una pirimidona, un acilaminoimidazol, un tiazol, un triarimidazol, una pirazina-2-carboxamina, una anilino pirimidina, una pirazolo[1,5-a]-1,3,4-triazina, CT 20026, una pirazina, una bencimidazol quinolinona, una pirazolopirimidina, un derivado de pirimidina, un derivado de piridina, una pirimidina 2,4,5-trisustituida y una 2-aminopirimidina bicíclica; y
- (b) poner en contacto la célula somática con factores de reprogramación que comprenden Oct4, Sox2 y Klf4;

65

reprogramar así la célula a un estado pluripotente.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición que comprende:

- 5 (a) un medio de cultivo celular que contiene un activador de la vía Wnt seleccionado del grupo que consiste en: (i) una proteína Wnt que activa un receptor Wnt, y (ii) un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en 3-[(3-Cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 415286), cloruro de litio, valproato de sodio, inhibidor de GSK3 II, un agente de ARNi que inhibe la expresión de GSK3, un derivado de 9-deazaguanina, un derivado de pirazolón, una bisindolilmaleimida, roterlina, KN62, quercetina, SP600125, KT5823, una indirubina, una paulona, una himenialdisina, una purina sustituida, CT 98016, una maleimida, una pirazolopiridazina, pirazolopiridina, una pirazolo[3,4-b]quinoxalina, un 1,3,4-oxadiazol, un 1,2,5-oxadiazol, una tiadiazolidinona, AF102B, AF150, una pirazolona, una pirazolamina, una amino pirimidina sustituida, una pirimidona, un acilaminoimidazol, un tiazol, un triarimidazol, una pirazina-2-carboxamina, una anilino pirimidina, una pirazolo[1,5-a]-1,3,4-triazina, CT 20026, una pirazina, una bencimidazol quinolinona, una pirazolopirimidina, un derivado de pirimidina, un derivado de piridina, una pirimidina 2,4,5-trisustituida y una 2-aminopirimidina bicíclica; y
- 10 (b) una célula somática de mamífero, en donde la célula se ha modificado para que exprese o contenga Oct4, Sox2 y Klf4.

20 En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende:

- (a) una célula madre pluripotente inducida (iPS); y
- (b) un activador de la vía Wnt seleccionado del grupo que consiste en: (i) una proteína Wnt que activa un receptor Wnt, y (ii) un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en 3-[(3-Cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 415286), cloruro de litio, valproato de sodio, inhibidor de GSK3 II, un agente de ARNi que inhibe la expresión de GSK3, un derivado de 9-deazaguanina, un derivado de pirazolón, una bisindolilmaleimida, roterlina, KN62, quercetina, SP600125, KT5823, una indirubina, una paulona, una himenialdisina, una purina sustituida, CT 98016, una maleimida, una pirazolopiridazina, una pirazolopiridina, una pirazolo[3,4-b]quinoxalina, un 1,3,4-oxadiazol, un 1,2,5-oxadiazol, una tiadiazolidinona, AF102B, AF150, una pirazolona, una pirazolamina, una amino pirimidina sustituida, una pirimidona, un acilaminoimidazol, un tiazol, un triarimidazol, una pirazina-2-carboxamina, una anilino pirimidina, una pirazolo[1,5-a]-1,3,4-triazina, CT 20026, una pirazina, una bencimidazol quinolinona, una pirazolopirimidina, un derivado de pirimidina, un derivado de piridina, una pirimidina 2,4,5-trisustituida y una 2-aminopirimidina bicíclica.

35 También se describe un método para reprogramar una célula somática de mamífero que comprende cultivar la célula en presencia de una molécula de señalización extracelular de manera que la célula se reprogramme.

El método puede comprender cultivar la célula en medio de cultivo celular acondicionado Wnt para que la célula se reprogramme. El método puede comprender cultivar la célula somática de manera que la célula sea inducida a volverse pluripotente. El medio de cultivo celular acondicionado Wnt puede comprender medio acondicionado Wnt3a (Wnt3a-CM).

Además, se describe un método para reprogramar una célula somática de mamífero que comprende poner en contacto la célula con un agente que aumenta la actividad de una vía Wnt de manera que la célula sea inducida a volverse pluripotente. El agente puede ser una proteína Wnt soluble, biológicamente activa, por ejemplo, una proteína Wnt3a. El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en: (i) moléculas pequeñas que imitan el efecto del medio acondicionado Wnt3a o proteínas Wnt biológicamente activas, solubles, por ejemplo, al interactuar con los receptores celulares para Wnt; (ii) agentes que modulan la interacción entre  $\beta$ -catenina y un miembro de la familia TCF/LEF y/o modulan la expresión o actividad de un miembro de la familia TCF/LEF; (iii) agentes que inhiben la expresión o actividad de un inhibidor endógeno de la vía Wnt.

Las células somáticas reprogramadas mediante el uso de los métodos de la invención se describen en la presente descripción.

55 Los medios de cultivo celular que contienen un activador Wnt3a y un agente de reprogramación adicional capaz de sustituir la expresión modificada por ingeniería genética de Oct4, Klf4 y/o Sox2 (o cualquier combinación de los mismos) se describen en el presente documento. Además, se describe (1) una composición que comprende: (i) una célula que se ha modificado para aumentar su expresión de Oct4, Klf4 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y (ii) un modulador de la vía Wnt, por ejemplo, un activador de la vía Wnt; (2) una composición que comprende: una célula que ha sido modificada para aumentar su expresión o nivel intracelular de uno o más factores de reprogramación, en donde el(los) factor(es) de reprogramación se seleccionan opcionalmente de Oct4, Klf4 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y medio acondicionado Wnt; (3) una composición que comprende: (i) una célula que ha sido modificada para aumentar su expresión o nivel intracelular de uno o más factores de reprogramación, en donde el(los) factor(es) de reprogramación se seleccionan opcionalmente de Oct4, Nanog, Lin28 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y (ii) un activador de la vía Wnt; y (4) una composición que comprende: (i) una célula que se ha modificado para aumentar su expresión o nivel intracelular de uno o más factores de reprogramación, en donde el(los)

factor(es) de reprogramación se seleccionan opcionalmente de Oct4, Nanog, Lin28 y/o Sox2, o cualquier subconjunto de estos; y (ii) medio acondicionado Wnt.

También se describen métodos para identificar un agente que reprograma las células somáticas a un estado menos diferenciado y/o contribuye a tal reprogramación en combinación con uno o más de otros agentes. En algunos de los métodos, las células somáticas se ponen en contacto con un agente que aumenta la actividad de la vía Wnt y un agente candidato. Las células se evalúan para las características de pluripotencia. La presencia de al menos un subconjunto de características de pluripotencia indica que el agente es capaz de reprogramar las células somáticas a un estado menos diferenciado. Los agentes identificados por los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para reprogramar células somáticas al poner en contacto las células somáticas con los agentes.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una afección en un individuo que necesita tratamiento para una afección. Las células somáticas pueden obtenerse del individuo y reprogramarse por los métodos de la invención. Las células reprogramadas pueden expandirse en cultivo. Las células reprogramadas pluripotentes (que se refieren a las células reprogramadas originales y/o su progenie que retienen la propiedad de la pluripotencia) se mantienen en condiciones adecuadas para que las células se desarrollen en células de un tipo celular o linaje celular deseado. Las células pueden diferenciarse in vitro mediante el uso de protocolos, tales como los conocidos en la técnica. Las células reprogramadas de un tipo de célula deseado se introducen en el individuo para tratar la afección. Las células somáticas obtenidas del individuo pueden contener una mutación en uno o más genes. En estos casos, las células somáticas obtenidas del individuo pueden tratarse primero para reparar o compensar el defecto, por ejemplo, mediante la introducción de una o más copias de los genes tipo salvaje en las células de manera que las células resultantes expresen la versión del gen tipo salvaje. Las células luego se introducen en el individuo.

Las células somáticas obtenidas del individuo pueden diseñarse por ingeniería genética para expresar uno o más genes después de su eliminación del individuo. Las células pueden diseñarse por ingeniería genética mediante la introducción de un gen o un casete de expresión que comprende un gen en las células. El gen introducido puede ser uno que sea útil para identificar, seleccionar y/o generar una célula reprogramada. Los genes introducidos pueden contribuir a iniciar y/o mantener el estado reprogramado. Los productos de expresión de los genes introducidos pueden contribuir a producir el estado reprogramado, pero son prescindibles para mantener el estado reprogramado.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar individuos que necesitan un órgano funcional. En los métodos, las células somáticas se obtienen de un individuo que necesita un órgano funcional y se reprograman mediante los métodos de la invención para producir células somáticas reprogramadas. Dichas células somáticas reprogramadas se cultivan luego en condiciones adecuadas para el desarrollo de las células somáticas reprogramadas en un órgano deseado, que luego se introduce en el individuo.

Además, se describe un método de reprogramación de una célula somática de mamífero que comprende poner en contacto la célula somática de mamífero con un agente que modula una vía Wnt de manera que la célula somática de mamífero se re programe. El método puede comprender reprogramar la célula somática de mamífero a un estado pluripotente. En la presente descripción se describen mejoras en los métodos de generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Por ejemplo, los métodos descritos en la presente descripción mejoran la reprogramación de las células somáticas a la pluripotencia que no han sido diseñadas por ingeniería genética para expresar c-Myc. Los métodos descritos en la presente descripción facilitan la generación de colonias homogéneas similares a ES. Los métodos descritos en la presente descripción pueden mejorar la formación de colonias homogéneas similares a ES, sin imponer una etapa de selección que requiera modificación genética de las células somáticas iniciales.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender cultivar la célula en medio acondicionado Wnt. El método puede comprender cultivar la célula en medio acondicionado Wnt3a. La célula puede ser una célula humana. La célula puede ser una célula de ratón. La célula puede ser una célula de primates no humana. La célula somática de mamífero puede ser una célula diferenciada terminalmente. La célula es un fibroblasto o una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, Células B o T). La célula somática de mamífero puede no ser una célula diferenciada terminalmente. Por ejemplo, la célula somática de mamífero puede ser una célula precursora, por ejemplo, una célula precursora neural o célula precursora hematopoyética. El método puede practicarse in vitro. La célula puede comprender cultivar la célula en medio de cultivo que contiene el agente. El contacto puede comprender cultivar la célula en medio de cultivo que comprende el agente durante al menos 10 días. El contacto puede comprender cultivar la célula en medio de cultivo que comprende el agente durante al menos 12 o al menos 15 días o al menos 20 días. La célula somática puede modificarse genéticamente para contener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable, unida operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógena, lo que permite de ese modo la selección de células que han sido reprogramadas para la pluripotencia, mientras que alternativamente la célula somática no está genéticamente modificada para contener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógena lo que permite de ese modo la selección de células que han sido reprogramadas para pluripotencia. La célula somática puede modificarse para expresar o contener al menos un factor de reprogramación a niveles superiores a los normalmente presentes en las células somáticas de ese tipo. El factor de reprogramación puede ser Oct4. El factor de reprogramación puede ser Sox2. El factor de reprogramación puede ser Klf4. El factor de

reprogramación puede ser Nanog. El factor de reprogramación puede ser Lin28. Los factores de reprogramación pueden ser Oct4 y Sox2. Los factores de reprogramación pueden ser Oct4, Sox2 y Klf4. La célula somática puede modificarse genéticamente para expresar c-Myc a niveles superiores a los normalmente presentes en las células somáticas de ese tipo celular. La célula puede ponerse en contacto con un segundo agente que modula la vía Wnt. La célula somática puede cultivarse en un medio que contiene proteína Wnt biológicamente activa, soluble y exógena. La proteína Wnt puede ser proteína Wnt3a. El método puede comprender, además, confirmar que la célula reprogramada es pluripotente. El método puede practicarse en una población de células y el método puede comprender, además, separar las células que se reprograman a un estado pluripotente de las células que no se reprograman a un estado pluripotente. El método puede comprender, además, administrar la célula reprogramada a un sujeto. El método puede comprender, además, diferenciar la célula a un tipo de célula deseado in vitro después de reprogramar la célula. El método puede comprender, además, administrar la célula diferenciada a un sujeto.

En la presente descripción se describe, además, un método para tratar a un individuo que lo necesita que comprende: (a) obtener células somáticas del individuo; (b) reprogramar al menos algunas de las células somáticas mediante un método que comprende poner en contacto las células somáticas de mamíferos con un agente que modula la vía Wnt (por ejemplo, un activador de la vía Wnt); y (c) administrar al menos algunas de las células reprogramadas al individuo, opcionalmente después de diferenciar las células en uno o más tipos de las células deseadas. El individuo puede ser un ser humano. El método puede practicarse en una población de células y comprende, además, separar las células que se reprograman a un estado pluripotente de las células que no se reprograman a un estado pluripotente. El método puede comprender, además, diferenciar la célula in vitro y, opcionalmente, administrar la célula diferenciada a un individuo que necesita tratamiento para una afección para la cual es útil la terapia celular. Por ejemplo, las células pueden diferenciarse a lo largo de un linaje celular deseado, tal como un linaje neural, un linaje muscular, etc.

En la presente descripción se describe, además, una composición que comprende (i) una célula somática de mamífero que ha sido modificada o tratada para que exprese o contenga al menos un factor de reprogramación a niveles mayores de lo que sería el caso sin dicha modificación o tratamiento; y (ii) un agente que aumenta la actividad de una vía Wnt y contribuye a reprogramar la célula somática a un estado pluripotente. El agente puede ser proteína Wnt3a. El agente puede ser una molécula pequeña.

En la presente descripción se describe, además, un método para identificar un agente útil para modular la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente que comprende: (a) cultivar una población de células somáticas de mamíferos en un medio que contiene un agente que modula la actividad de una vía Wnt y un agente candidato; y (b) determinar, después de un período de tiempo adecuado, si las células que tienen una o más características de células ES están presentes después de mantener las células y su progenie en cultivo durante un período de tiempo adecuado, en donde el agente candidato se identifica como útil para modular la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente si las células que tienen una o más características de células ES están presentes en niveles diferentes de lo que se esperaría si el medio no contuviera el agente candidato.

Las características pueden seleccionarse de: morfología de la colonia, expresión de un gen endógeno expresado selectivamente por las células ES, expresión de un marcador detectable unido operativamente a secuencias de control de expresión de un gen expresado selectivamente por las células ES, capacidad de diferenciarse en células que tienen características de endodermo, mesodermo y ectodermo cuando se inyectan en ratones inmunocomprometidos, y la capacidad de participar en la formación de quimeras que sobreviven a término. Las células pueden haber sido modificadas para expresar al menos un factor de reprogramación. El medio puede ser medio acondicionado Wnt.

El medio puede ser medio acondicionado Wnt3a. El agente que modula la actividad de una vía Wnt puede ser la proteína Wnt3a. El agente que modula la actividad de una vía Wnt puede ser una molécula pequeña. El agente candidato puede ser una molécula pequeña. El método puede comprender identificar un agente útil para mejorar la reprogramación de células somáticas de mamíferos, en donde el agente candidato se identifica como útil para mejorar la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente si las células que tienen una o más características de células ES están presentes a niveles mayores de lo esperado si el medio no contuviera al agente candidato. La etapa (b) puede comprender determinar si las colonias celulares que tienen una o más características de colonias de células ES están presentes después de mantener las células y sus progenies en cultivo durante un período de tiempo adecuado, en donde el agente candidato se identifica como útil para modular la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente si las colonias de células que tienen una o más características de colonias de células ES están presentes en niveles diferentes de lo esperado si el medio no contuviera el agente candidato. Las células pueden expresar al menos un factor de reprogramación.

En la presente descripción se describe, además, un método para identificar un agente útil para reprogramar células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente que comprende: (a) poner en contacto una población de células somáticas de mamíferos con un agente que aumenta la actividad de la vía Wnt y un agente candidato; (b) mantener las células en un sistema de cultivo celular durante un período de tiempo adecuado; y (c) determinar si las células que tienen una o más características de células ES están presentes en dicho sistema de cultivo, en donde el agente se identifica como útil para reprogramar células somáticas de mamíferos a un estado similar a ES si las células que tienen una o más características de ES están presentes en niveles mayores de lo esperado si las células no hubieran estado en contacto con el agente candidato.

Las características pueden seleccionarse de: morfología de la colonia, expresión de un gen endógeno expresado selectivamente por las células ES, expresión de un marcador detectable unido operativamente a secuencias de control de expresión de un gen expresado selectivamente por las células ES, capacidad de diferenciarse en células que tienen características de endodermo, mesodermo y ectodermo cuando se inyectan en ratones inmunocomprometidos, y la capacidad de participar en la formación de quimeras que sobreviven a término.

El agente que aumenta la actividad de la vía Wnt puede ser la proteína Wnt3a. El agente candidato puede ser una molécula pequeña. Las células pueden expresar al menos un factor de reprogramación. La etapa (b) puede comprender determinar si las colonias celulares que tienen una o más características de colonias de células ES están presentes después de mantener las células y sus progenies en cultivo durante un período de tiempo adecuado, en donde el agente candidato se identifica como útil para modular la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente si las colonias de células que tienen una o más características de colonias de células ES están presentes en niveles diferentes de lo esperado si el medio no contuviera el agente candidato.

También se describe un método para reprogramar una célula somática de mamífero que comprende cultivar la célula en presencia de una molécula de señalización extracelular de manera que la célula se re programe. Dicha molécula de señalización extracelular puede ser una molécula cuya unión a un dominio extracelular de un receptor celular inicia o modifica una vía de transducción de señal dentro de la célula. La vía de transducción de señales puede ser la vía Wnt.

En la presente descripción se describe un método para identificar un modulador de la vía Wnt útil para modular la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente que comprende: (a) cultivar una población de células somáticas de mamíferos en medio que contiene el modulador de la vía Wnt; (b) determinar, después de un período de tiempo adecuado, si las células que tienen una o más características de células ES están presentes después de mantener las células y sus progenies en cultivo durante un período de tiempo adecuado, en donde el modulador de la vía Wnt se identifica como útil para modular la reprogramación de células somáticas de mamíferos a un estado pluripotente si las células que tienen una o más características de células ES están presentes en niveles diferentes de lo que se esperaría si el medio no contuviera el modulador de la vía Wnt.

El método puede comprender (i) probar al menos 10 moduladores de vía Wnt; y (ii) identificar uno o más de los moduladores de la vía Wnt que tienen un efecto significativamente mayor sobre la velocidad o eficiencia de reprogramación que al menos el 50 % de los otros moduladores de la vía Wnt probados. El método puede comprender probar al menos 20, al menos 50 o al menos 100 moduladores de vía Wnt. El método puede comprender identificar uno o más de los moduladores de la vía Wnt que tienen un efecto significativamente mayor sobre la velocidad o eficiencia de reprogramación que al menos el 75 %, o al menos el 90 % de los otros moduladores de la vía Wnt probados. Los moduladores de la vía Wnt probados pueden ser moléculas pequeñas. Los moduladores de vía Wnt probados pueden estar estructuralmente relacionados. Por ejemplo, ellos pueden ser miembros de un conjunto de compuestos, por ejemplo, una biblioteca de compuestos combinatorios, sintetizados en base a una estructura central común o ellos pueden ser derivados obtenidos al modificar una estructura central o compuesto principal, tal como mediante sustituciones o adiciones en una o más posiciones. El modulador de la vía Wnt puede identificarse como útil para aumentar la velocidad o la eficiencia de la reprogramación de las células a un estado similar a ES si, después de un período de tiempo adecuado, las células que tienen una o más características de las células ES están presentes en números mayores que si el medio no contuviera el modulador de la vía Wnt. El modulador de la vía Wnt puede identificarse como útil para aumentar la velocidad o la eficiencia de la reprogramación de las células a un estado pluripotente si, después de un período de tiempo adecuado, las colonias celulares que tienen una o más características de colonias de células ES, están presentes en números mayores que si el medio no contuviera el modulador de la vía Wnt. Por ejemplo, los métodos pueden dar como resultado un aumento en el porcentaje de colonias que tienen características de colonias de células ES y/o las colonias pueden ser más homogéneas de lo que serían en ausencia del modulador de la vía Wnt.

También se describe una composición de cultivo celular que comprende: (a) medio de cultivo celular que contiene un modulador de la vía Wnt; y (b) una pluralidad de células somáticas de mamíferos, en donde (i) las células están genéticamente modificadas o transfectadas transitoriamente para expresar uno o más factores de reprogramación; (ii) las células están genéticamente modificadas para contener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable, unido operativamente a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno, lo que permite, así, la selección de células que se han reprogramado para pluripotencia; o (iii) el medio de cultivo celular contiene una o más moléculas pequeñas, ácidos nucleicos o polipéptidos que sustituyen a un factor de reprogramación distinto de c-Myc.

El medio de cultivo celular puede comprender Wnt-3a CM. El medio puede contener una molécula pequeña que modula la vía Wnt.

El uno o más factores de reprogramación pueden seleccionarse de: Oct4, Nanog, Sox2, Lin28 y Klf4. También se describe una composición que comprende: una célula iPS y un agente que modula, por ejemplo, activa, la vía Wnt. El

agente que activa la vía Wnt puede ser la proteína Wnt3a. El agente que activa la vía Wnt puede ser una molécula pequeña.

5 Aquí se describe el uso de un agente que modula una vía Wnt en la fabricación de un medicamento para reprogramar una célula somática de mamífero.

Se contempla que todas las modalidades descritas en la presente descripción sean aplicables a los diversos aspectos de la invención. También se contempla que las diversas modalidades de la invención y sus elementos puedan combinarse con una o más de tales modalidades y/o elementos cuando sea apropiado.

10 Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1. Wnt3a promueve la reprogramación epigenética. a. Representación esquemática de la línea de tiempo experimental. Se infectaron MEF con lentivirus inducible por DOX, se dividieron en cultivos con y sin tratamiento con Wnt3-CM y luego se indujeron con DOX (día 0). La selección de G418 se inició en puntos de tiempo fijos después de la inducción y el tratamiento con Wnt3a-CM se mantuvo durante 7 días de selección. DOX y G418 se mantuvieron hasta que se evaluaron las colonias resistentes. b. Recuentos de colonias resistentes a G418 de MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc en medios de células ES estándar o con tratamiento con Wnt3a-CM. c. Imágenes de fase de colonias resistentes a G418 formadas con y sin tratamiento con Wnt3a-CM. d. Recuentos de colonias resistentes a G418 de MEF infectados con diferentes combinaciones de factores de reprogramación en presencia y ausencia de Wnt3a-CM. Las colonias resistentes a G418 emergieron sin transducción de c-Myc en presencia de Wnt3a-CM. e. Imagen de fase de colonia resistente a Myc[-] G418 formada con tratamiento con Wnt3a-CM. En este experimento, no se observaron colonias para las células Myc[-] en ausencia de Wnt3a-CM. f. Los recuentos de colonias resistentes a G418 de MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4 (Myc[-]) o Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc (Myc[+]) en presencia (barras rojas) y ausencia (barras grises) de Wnt3a-CM. La selección de G418 se inició el día 5 o el día 10 después de la inducción, como se indica, y las colonias (en un área de 32 cm<sup>2</sup>) se evaluaron el día 20. g. Los gráficos de dispersión que comparan la intensidad de GFP con la autofluorescencia, mediante el uso de citometría de flujo, en células Oct4-GFP en el día 20 posterior a la inducción de Oct4/Sox2/Klf4, revelan una población de células que expresan GFP (indicada con una flecha) solo con tratamiento con Wnt3a-CM. h. Imagen de fase de GFP que expresa células Myc[-] derivadas del tratamiento con Wnt3a-CM y sin ninguna selección genética.

Figura 2. Inducción de pluripotencia en células estimuladas con Wnt. a-d. La inmunotinción revela la inducción de marcadores de pluripotencia, Nanog (a-b) y SSEA-1(c-d) en células Myc[-] tratadas con Wnt3a-CM. e-g. Las líneas Myc[-] tratadas con Wnt3a-CM formaron teratomas cuando se inyectaron en ratones SCID por vía subcutánea. Los teratomas de las líneas Oct4/Sox2/Klf4/Wnt3aCM iPS mostraron evidencia de células diferenciadas de tres capas germinales similares a los teratomas formados a partir de inyecciones de V6.5 mES. Las flechas indicaron tejido neural en (e), cartílago en (f) y células endodérmicas en (g), h. Las líneas Oct4/Sox2/Klf4/Wnt3aCM iPS derivadas sin selección dieron lugar a ratones quiméricos (como se muestra a la izquierda) con color de pelaje agutí y ojos pigmentados (en contraste con el ratón Balb/c de tipo salvaje, derecha) que proporcionan evidencia de la contribución a las células somáticas. El color del pelaje de la descendencia confirmó que la línea Oct4/Sox2/Klf4/Wnt3aCM iPS generada aquí es competente para línea germinal (datos no mostrados).

Figura 3. La estimulación de Wnt/ $\beta$ -catenina mejora la formación de colonias iPS en ausencia de retrovirus c-Myc. a. Se muestran los recuentos para las colonias resistentes a G418 en MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4 cultivadas en medios de células ES, medios condicionados MEF, medios condicionados que sobreexpresan Wnt3a y medios condicionados que sobreexpresan Wnt3a con ICG001 (4  $\mu$ M). La selección se inició el día 15 después de la inducción, y las colonias se evaluaron el día 28. El tratamiento con Wnt3a-CM se mantuvo hasta el día 22. El número medio de recuentos de experimentos por triplicado se muestra con barras de error que indican S.D. b. Se muestran los recuentos de colonias resistentes a G418 (en un área de 32 cm<sup>2</sup>) en MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc cultivadas en medios de células ES, medios condicionados que sobreexpresan Wnt3a y medios condicionados que sobreexpresan Wnt3a con ICG -001 (4 mM). La selección se inició el día 10 después de la inducción, Wnt3a-CM se mantuvo hasta el día 17 y las colonias se evaluaron el día 20. c. La estimulación de Wnt promueve la formación de células iPS en ausencia de transducción de c-Myc. Esto podría deberse a: i) la regulación directa por la vía Wnt de factores de pluripotencia endógenos clave, tales como Oct4, Sox2 y Nanog, como lo sugieren los estudios genómicos en células ES (Cole y otros, 2008), ii) la activación de Myc endógeno inducida por la vía Wnt (He y otros, 1998; Cole y otros, 2008) u otros genes de proliferación celular, aceleran el proceso secuencial de formación de colonias iPS.

Figura 4. (a) Línea cronológica de los experimentos iniciales que muestran la capacidad del medio acondicionado Wnt3a para promover la generación de células iPS. La expresión de los factores inductores de pluripotencia se indujo el día 2. La expresión de GFP y la formación de colonias se evaluaron como se indica (b). Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc; Fig. 4C. Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 sin expresión modificada por ingeniería genética de c-Myc; (c) Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 sin expresión modificada por ingeniería genética de c-Myc.

Figura 5. Estructura de ICG-001.

## Descripción detallada de la invención

## Introducción y definiciones

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para reprogramar células somáticas de mamíferos, por ejemplo, para reprogramar células somáticas a pluripotencia in vitro. La invención proporciona métodos para reprogramar células somáticas a un estado menos diferenciado. Las células resultantes se denominan en la presente descripción como "células somáticas reprogramadas" ("RSC") en la presente descripción, o en algunas modalidades como células madre pluripotentes inducidas (iPS) si se reprograman a un estado pluripotente. El término "célula somática" se refiere a cualquier célula que no sea una célula germinal, una célula presente en un embrión u obtenida de un embrión previo a la implantación, o una célula resultante de la proliferación de dicha célula in vitro. En algunas modalidades, la célula somática es una "célula somática no embrionaria", que se entiende como una célula somática que no está presente en un embrión o que no se ha obtenido de un embrión y no resulta de la proliferación de tal célula in vitro. En algunas modalidades, la célula somática es una "célula somática adulta", que se entiende como una célula que está presente o se ha obtenido de un organismo distinto de un embrión o un feto o que resulta de la proliferación de tal célula in vitro. A menos que se indique de otra manera, los métodos para reprogramar las células a un estado menos diferenciado se realizan in vitro, es decir, se practican mediante el uso de células somáticas aisladas mantenidas en cultivo.

20 La invención abarca el reconocimiento de que las moléculas de señalización naturales que modulan la expresión de factores endógenos de transcripción de células ES son candidatos prometedores para agentes solubles que mejoran la reprogramación. La invención también abarca el reconocimiento de que la modulación de las vías biológicas con las que interactúan tales moléculas de señalización de origen natural es útil para mejorar (por ejemplo, aumentar la velocidad y/o la eficiencia de) la reprogramación. La invención también abarca el reconocimiento de que los agentes (ya sean naturales o sintéticos, por ejemplo, moléculas pequeñas) que modulan las vías biológicas con las cuales interactúan tales moléculas naturales de señalización, son candidatos prometedores para agentes solubles que mejoran la reprogramación.

30 Como se describe con más detalle a continuación, ciertas modalidades de la invención se basan, al menos en parte, en el reconocimiento de que la modulación, por ejemplo, la activación, de la vía Wnt es útil en la reprogramación de células somáticas. Algunos de los métodos comprenden aumentar la actividad de la vía Wnt en células somáticas de manera que al menos algunas de las células se reprogramen, por ejemplo, a un estado pluripotente. Algunos de los métodos comprenden el cultivo de células somáticas en medio acondicionado Wnt de manera que al menos algunas de las células se reprogramen, por ejemplo, a un estado pluripotente.

35 La reprogramación, como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso que altera o revierte el estado de diferenciación de una célula somática. La célula puede estar parcial o terminalmente diferenciada antes de la reprogramación. La reprogramación abarca la reversión completa del estado de diferenciación de una célula somática a un estado pluripotente. Como se conoce en la técnica, una célula "pluripotente" tiene la capacidad de diferenciarse o dar lugar a células derivadas de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) y típicamente tiene el potencial de dividirse in vitro durante un largo período de tiempo, por ejemplo, más de un año o más de 30 pases. Las células ES son un ejemplo de células pluripotentes. La reprogramación abarca, además, la reversión parcial del estado de diferenciación de una célula somática a un estado multipotente. Una célula "multipotente" es una célula que puede diferenciarse en algunas, pero no en todas, las células derivadas de las tres capas germinales. Por lo tanto, una célula multipotente es una célula parcialmente diferenciada. Las células madre adultas son células multipotentes. Las células madre adultas incluyen, por ejemplo, células madre hematopoyéticas y células madre neurales. La reprogramación también abarca la reversión parcial del estado de diferenciación de una célula somática a un estado que hace que la célula sea más susceptible a la reprogramación completa a un estado pluripotente cuando se somete a manipulaciones adicionales como las descritas en la presente descripción. Tal contacto puede dar como resultado la expresión de genes particulares por las células, cuya expresión contribuye a la reprogramación. En el primer aspecto de la invención, la reprogramación de una célula somática de mamífero hace que la célula somática asuma un estado pluripotente, similar a ES. En la presente descripción, las células resultantes se denominan células somáticas pluripotentes reprogramadas o células madre pluripotentes inducidas (iPS).

55 La reprogramación implica la alteración, por ejemplo, reversión, de al menos algunos de los patrones heredables de modificación de ácido nucleico (por ejemplo, metilación), condensación de cromatina, cambios epigenéticos, impronta genómica, etc., que ocurren durante la diferenciación celular a medida que un cigoto se desarrolla en un adulto. La reprogramación es distinta de simplemente mantener el estado no diferenciado existente de una célula que ya es pluripotente o mantener el estado existente menos que completamente diferenciado de una célula que ya es una célula multipotente (por ejemplo, una célula madre hematopoyética). Además, la reprogramación es distinta de promover la autorrenovación o la proliferación de células que ya son pluripotentes o multipotentes, aunque las composiciones y métodos de la invención pueden, además, ser útiles para tales fines. Algunas de las composiciones y métodos de la presente invención contribuyen a establecer el estado pluripotente. Los métodos pueden practicarse en células que se diferencian y/o se restringen por completo para dar lugar solo a células de ese tipo en particular, en lugar de células que ya son multipotentes o pluripotentes.

Las células somáticas se tratan en cualquiera de una variedad de formas para provocar la reprogramación de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. El tratamiento puede comprender poner en contacto las células con uno o más agentes que contribuyen a la reprogramación ("agente de reprogramación"). Tal contacto puede realizarse al mantener la célula en medio de cultivo que comprende el(los) agente(s). En algunas modalidades, las células somáticas están genéticamente modificadas. La célula somática puede modificarse genéticamente para expresar uno o más agentes de reprogramación como se describe más adelante.

En los métodos de la presente invención, las células somáticas pueden, en general, cultivarse en condiciones estándar de temperatura, pH y otras condiciones ambientales, por ejemplo, como células adherentes en placas de cultivo de tejidos a 37 °C en una atmósfera que contiene 5-10 % CO<sub>2</sub>. Las células y/o el medio de cultivo se modifican apropiadamente para lograr la reprogramación como se describe en la presente descripción. En ciertas modalidades, las células somáticas se cultivan sobre o en presencia de un material que imita una o más características de la matriz extracelular o que comprende uno o más componentes de la matriz extracelular o de la membrana basal. En algunas modalidades se usa Matrigel™. Otros materiales incluyen proteínas o mezclas de las mismas, tales como gelatina, colágeno, fibronectina, etc. En ciertas modalidades de la invención, las células somáticas se cultivan en presencia de una capa de células de alimentación. Dichas células pueden ser, por ejemplo, de origen murino o humano. Las células pueden irradiarse, inactivarse químicamente mediante tratamiento con un inactivador químico tal como mitomicina c, o tratarse de otra manera para inhibir su proliferación si se desea. En otras modalidades, las células somáticas se cultivan sin células alimentadoras.

Generar células pluripotentes o multipotentes mediante la reprogramación de células somáticas mediante el uso de los métodos de la presente invención tiene una serie de ventajas. Primero, los métodos de la presente invención permiten generar células pluripotentes autólogas, que son células específicas y genéticamente compatibles con un individuo. Las células se derivan de células somáticas obtenidas del individuo. En general, las células autólogas tienen menos probabilidades que las células no autólogas de estar sujetas a rechazo inmunológico. En segundo lugar, los métodos de la presente invención permiten al técnico generar células pluripotentes sin utilizar embriones, ovocitos y/o tecnología de transferencia nuclear. Los resultados de los solicitantes demuestran que (i) las células somáticas pueden reprogramarse a un estado similar a ES sin la necesidad de modificarlas por ingeniería genética las células para expresar un oncogén como c-Myc; y (ii) la reprogramación de las células somáticas puede efectuarse, al menos en parte, por medios distintos a la ingeniería de las células para expresar los factores de reprogramación, es decir, al poner en contacto las células con un agente de reprogramación que no sea un ácido nucleico o un vector viral capaz de ser absorbido y causar una modificación genética estable a las células. En particular, la invención abarca el reconocimiento de que las moléculas de señalización extracelular, por ejemplo, las moléculas que, cuando están presentes, se unen extracelularmente a los receptores de la superficie celular y activan las cascadas de transducción de señal intracelular, son útiles para reprogramar las células somáticas. La invención abarca, además, el reconocimiento de que la activación de tales vías de señalización por medios distintos de la aplicación de moléculas de señalización extracelular es útil, además, para reprogramar células somáticas. Además, los métodos de la presente invención potenciaron la formación de colonias de células similares a ES que eran detectables en base a criterios morfológicos, sin la necesidad de emplear un marcador seleccionable. La presente descripción, por lo tanto, refleja varios avances fundamentalmente importantes en el área de la tecnología de reprogramación de células somáticas in vitro. Si bien ciertos aspectos de la invención se ilustran en la presente descripción mediante el uso de la señalización de la vía Wnt, los métodos descritos en la presente descripción abarcan la activación de otras vías de señalización con el propósito de reprogramar las células somáticas.

A continuación, se presentan definiciones de ciertos términos útiles para comprender aspectos de la invención:

"Agente", como se usa en la presente descripción, significa cualquier compuesto o sustancia tal como, pero sin limitación, una molécula pequeña, ácido nucleico, polipéptido, péptido, fármaco, ion, etc.

Un "medio de cultivo celular" (también denominado en la presente descripción "medio de cultivo" o "medio") es un medio para cultivar células que contiene nutrientes que mantienen la viabilidad celular y apoyan la proliferación. El medio de cultivo celular puede contener cualquiera de los siguientes en una combinación apropiada: sal(es), tampón(es), aminoácidos, glucosa u otro(s) azúcar(es), antibióticos, suero o sustituyente de suero, y otros componentes tales como factores de crecimiento de péptidos, etc. Los expertos en la materia conocen los medios de cultivo celular normalmente utilizados para tipos de células particulares. En la presente descripción se proporcionan algunos ejemplos no limitantes. "Línea celular" se refiere a una población de células en gran parte o sustancialmente idénticas que típicamente se ha derivado de una sola célula ancestral o de una población definida y/o sustancialmente idéntica de células ancestrales. La línea celular puede haber sido o ser capaz de mantenerse en cultivo durante un período prolongado (por ejemplo, meses, años, durante un período de tiempo ilimitado). Es posible que haya sufrido un proceso de transformación espontáneo o inducido que confiere una vida útil ilimitada a las células en cultivo. Las líneas celulares incluyen todas aquellas líneas celulares reconocidas en la técnica como tales. Se apreciará que las células adquieren mutaciones y posiblemente cambios epigenéticos con el tiempo, de manera que al menos algunas propiedades de las células individuales de una línea celular pueden diferir entre sí.

El término "exógeno" se refiere a una sustancia presente en una célula u organismo, que es distinto de su fuente nativa. Por ejemplo, los términos "ácido nucleico exógeno" o "proteína exógena" se refieren a un ácido nucleico o proteína que ha sido introducido por un proceso que involucra la mano del hombre en un sistema biológico tal

como una célula u organismo en el que normalmente no se encuentra o en el que se encuentra en cantidades más bajas. Una sustancia se considerará exógena si se introduce en una célula o en un ancestro de la célula que hereda la sustancia. En contraste, el término "endógeno" se refiere a una sustancia que es nativa del sistema biológico.

"Expresión" se refiere a los procesos celulares implicados en la producción de ARN y proteínas y, según sea apropiado, secretar proteínas, que entre otros incluyen cuando corresponda, sin limitación, por ejemplo, transcripción, traducción, plegamiento, modificación y procesamiento. Los "productos de expresión" incluyen ARN transcrito a partir de un gen y polipéptidos obtenidos por traducción de ARNm transcrito a partir de un gen.

Una célula "genéticamente modificada" o "modificada por ingeniería genética", como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico exógeno mediante un proceso que involucra la mano del hombre (o un descendiente de dicha célula que ha heredado al menos una parte del ácido nucleico). El ácido nucleico puede contener, por ejemplo, una secuencia que es exógena a la célula puede contener secuencias nativas (es decir, secuencias que se encuentran naturalmente en las células) pero en una disposición no natural (por ejemplo, una región codificante unida a un promotor de un gen diferente), o versiones alteradas de secuencias nativas, etc. El proceso de transferir el ácido nucleico a la célula puede lograrse mediante cualquier técnica adecuada. Las técnicas adecuadas incluyen fosfato de calcio o transfección mediada por lípidos, electroporación y transducción o infección mediante el uso de un vector viral. En algunas modalidades, el polinucleótido o una porción del mismo están integrados en el genoma de la célula. El ácido nucleico puede haberse eliminado o extirpado posteriormente del genoma, siempre que dicha eliminación o escisión produzca una alteración detectable en la célula con respecto a una célula no modificada pero equivalente de otra manera.

"Identidad" se refiere al grado en cual la secuencia de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos es la misma. El porcentaje de identidad entre una secuencia de interés y una segunda secuencia sobre una ventana de evaluación, por ejemplo, a lo largo de la secuencia de interés, puede calcularse al alinear las secuencias, determinar el número de residuos (nucleótidos o aminoácidos) dentro de la ventana de evaluación opuestos a un residuo idéntico que permite la introducción de brechas para maximizar la identidad, dividir por el número total de residuos de la secuencia de interés o la segunda secuencia (la que sea mayor) que caen dentro de la ventana, y multiplicar por 100. Cuando se calcula el número de residuos idénticos necesarios para lograr un porcentaje de identidad particular, las fracciones deben redondearse al número entero más cercano. El porcentaje de identidad puede calcularse mediante el uso de una variedad de programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los programas informáticos como BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, etc., generan alineamientos y proporcionan un porcentaje de identidad entre las secuencias de interés. El algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 22264-2268, 1990) modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993 se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y otros, (Altschul, y otros, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Para obtener alineaciones con brechas para propósitos de comparación, Gapped BLAST se utiliza como se describe en Altschul y otros. (Altschul, y otros, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas. Puede usarse una matriz PAM250 o BLOSUM62. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Ver el sitio web que tiene la URL [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para estos programas. En una modalidad específica, el porcentaje de identidad se calcula mediante el uso de BLAST2 con los parámetros predeterminados proporcionados por el NCBI.

"Aislado" o "parcialmente purificado", como se usa en la presente descripción, se refiere, en el caso de un ácido nucleico o polipéptido, a un ácido nucleico o polipéptido separado de al menos otro componente (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) que está presente con el ácido nucleico o polipéptido tal como se encuentra en su fuente natural y/o que estaría presente con el ácido nucleico o polipéptido cuando se expresa por una célula, o se secreta en el caso de polipéptidos secretados. Un ácido nucleico o polipéptido sintetizado químicamente o uno sintetizado mediante el uso de transcripción/traducción in vitro se considera "aislado". Una "célula aislada" es una célula que se ha eliminado de un organismo en el que se encontraba originalmente o un descendiente de dicha célula. Opcionalmente, la célula se ha cultivado in vitro, por ejemplo, en presencia de otras células. Opcionalmente, la célula se introduce más tarde en un segundo organismo o se reintroduce en el organismo del que se aisló (o la célula de la que desciende).

El término "gen cuya función está asociada con la pluripotencia", como se usa en la presente descripción, se refiere a un gen cuya expresión en condiciones normales (por ejemplo, en ausencia de ingeniería genética u otra manipulación diseñada para alterar la expresión génica) se produce y normalmente se limita a células madre pluripotentes, y es crucial para su identidad funcional como tal. Se apreciará que el polipéptido codificado por un gen funcionalmente asociado con la pluripotencia puede estar presente como un factor materno en el ovocito. Al menos algunas células del embrión pueden expresar el gen, por ejemplo, durante al menos una parte del período de preimplantación y/o en precursores de células germinales del adulto.

"Modular" se usa de manera consistente con su uso en la técnica, es decir, significa causar o facilitar un cambio, alteración o modificación cualitativa o cuantitativa en un proceso, vía o fenómeno de interés. Sin limitación, tal cambio puede ser un aumento, disminución o cambio en la fuerza o actividad relativa de diferentes componentes o ramas del proceso, vía o fenómeno. Un "modulador" es un agente que causa o facilita un cambio, alteración o modificación cualitativa o cuantitativa en un proceso, vía o fenómeno de interés.

El término "factor de pluripotencia" se usa para referirse al producto de expresión de un gen cuya función está asociada con la pluripotencia, por ejemplo, un polipéptido codificado por el gen. En algunas modalidades, el factor de pluripotencia es uno que normalmente no se expresa sustancialmente en los tipos de células somáticas que

constituyen el cuerpo de un animal adulto (con la excepción de las células germinales o sus precursoras). Por ejemplo, el factor de pluripotencia puede ser uno cuyo nivel promedio en las células ES sea al menos 50 veces o 100 veces mayor que su nivel promedio en los tipos de células terminalmente diferenciados presentes en el cuerpo de un mamífero adulto. En algunas modalidades, el factor de pluripotencia es uno que es esencial para mantener la viabilidad o el estado pluripotente de las células ES in vivo y/o las células ES derivadas mediante el uso de métodos convencionales. Por lo tanto, si el gen que codifica el factor es desactivado o inhibido (es decir, su expresión se elimina o se reduce sustancialmente), las células ES no se forman, mueren o, en algunas modalidades, se diferencian. En algunas modalidades, inhibir la expresión de un gen cuya función está asociada con la pluripotencia en una célula ES (lo que da como resultado, por ejemplo, una reducción en el nivel promedio, en estado estacionario, de la transcripción de ARN y/o proteína codificada por el gen de al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) da como resultado una célula que es viable pero que ya no es pluripotente. En algunas modalidades, el gen se caracteriza porque su expresión en una célula ES disminuye (da como resultado, por ejemplo, una reducción en el nivel promedio, en estado estacionario, de la transcripción de ARN y/o proteína codificada por el gen de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) cuando la célula se diferencia en una célula terminalmente diferenciada.

Un "gen inductor de pluripotencia", como se usa en la presente descripción, se refiere a un gen cuya expresión contribuye a reprogramar las células somáticas a un estado pluripotente. "Factor inductor de pluripotencia" se refiere a un producto de expresión de un gen inductor de pluripotencia. Un factor inductor de pluripotencia puede ser, pero no necesariamente es, un factor de pluripotencia. La expresión de un factor inductor de pluripotencia introducido de forma exógena puede ser transitoria, es decir, puede ser necesaria durante al menos una parte del proceso de reprogramación con el fin de inducir la pluripotencia y/o establecer un estado pluripotente estable, pero después no es necesario mantener la pluripotencia. Por ejemplo, el factor puede inducir la expresión de genes endógenos cuya función está asociada con la pluripotencia. Estos genes pueden mantener las células reprogramadas en un estado pluripotente.

El "polinucleótido" se usa en la presente descripción de manera intercambiable con el "ácido nucleico" para indicar un polímero de nucleósidos. Típicamente, un polinucleótido de esta descripción está compuesto de nucleósidos que se encuentran naturalmente en el ADN o el ARN (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina) unidos por enlaces fosfodiéster. Sin embargo, el término abarca moléculas que comprenden nucleósidos o análogos de nucleósidos que contienen bases modificadas química o biológicamente, cadenas principales modificadas, etc., se encuentren o no en ácidos nucleicos naturales, y tales moléculas pueden preferirse para ciertas aplicaciones. Cuando esta solicitud se refiere a un polinucleótido, se entiende que se proporcionan ADN y ARN y, en cada caso, formas monocatenarias y bicatenarias (y complementos de cada molécula monocatenaria). "Secuencia de polinucleótidos" como se usa en la presente descripción puede referirse al material polinucleotídico mismo y/o a la información de la secuencia (es decir, la sucesión de letras usadas como abreviaturas para las bases) que caracteriza bioquímicamente un ácido nucleico específico. Una secuencia de polinucleótidos presentada en la presente descripción se presenta en una dirección de 5' a 3' a menos que se indique de otra manera.

"Polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos. Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente descripción. Un péptido es un polipéptido relativamente corto, típicamente entre aproximadamente 2 y 60 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos usados en la presente descripción típicamente contienen aminoácidos tales como los 20 L-aminoácidos que se encuentran más comúnmente en las proteínas. Sin embargo, pueden usarse otros aminoácidos y/o análogos de aminoácidos conocidos en la técnica. Uno o más de los aminoácidos en un polipéptido pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo ácido graso, un conector para conjugación, funcionalización, etc. Un polipéptido que tiene un resto no polipeptídico asociado covalentemente o no covalentemente al mismo todavía se considera un "polipéptido". Las modificaciones ilustrativas incluyen glicosilación y palmitoilación. Los polipéptidos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producirse mediante el uso de tecnología de ADN recombinante, sintetizarse a través de medios químicos tales como síntesis convencional de péptidos en fase sólida, etc. El término "secuencia de polipéptidos" o "secuencia de aminoácidos" como se usa en la presente descripción puede referirse al material del polipéptido en sí mismo y/o a la información de secuencia (es decir, la sucesión de letras o códigos de tres letras usados como abreviaturas para nombres de aminoácidos) que caracteriza bioquímicamente un polipéptido. Una secuencia de polipéptidos presentada en la presente descripción se presenta en una dirección N-terminal a C-terminal a menos que se indique de otra manera.

"Variante de polipéptido" se refiere a cualquier polipéptido que difiere de un polipéptido natural por inserción, delección y/o sustitución de aminoácidos. Las variantes pueden ser naturales o creadas mediante el uso, por ejemplo, de técnicas de ADN recombinante o síntesis química. En algunas modalidades, las "sustituciones" de aminoácidos son el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, reemplazos conservadores de aminoácidos. Las sustituciones "conservadoras" de aminoácidos pueden hacerse en base a la similitud en cualquiera de una variedad de propiedades tales como el tamaño de la cadena lateral, polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o anfipaticidad de los residuos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares (hidrofilicos) incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las inserciones o delecciones pueden variar en tamaño de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 10 aminoácidos. En algunos casos, pueden eliminarse

dominios más grandes sin afectar sustancialmente la función. En ciertas modalidades de la invención, la secuencia de una variante puede obtenerse al hacer no más de un total de 5, 10, 15 o 20 adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos a la secuencia de una enzima natural. En algunas modalidades, no más del 1 %, 5 %, 10 % o 20 % de los aminoácidos en un polipéptido son inserciones, deleciones o sustituciones con respecto al polipéptido original. Puede obtenerse orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden reemplazarse, añadirse o eliminarse sin eliminar o reducir sustancialmente las actividades de interés, mediante comparación de la secuencia del polipéptido particular con la de polipéptidos homólogos (por ejemplo, de otros organismos) y minimizar el número de cambios realizados en la secuencia de aminoácidos en regiones de alta homología (regiones conservadas) o reemplazar los aminoácidos con los que se encuentran en secuencias homólogas, ya que los residuos de aminoácidos que se conservan entre varias especies tienen más probabilidades de ser importantes para la actividad que los aminoácidos que no se conservan.

"Purificado" o "sustancialmente purificado" como se usa en la presente descripción denota que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas y similares. En una modalidad, el polinucleótido o polipéptido se purifica de manera que constituya al menos el 90 % en peso, por ejemplo, al menos el 95 % en peso, por ejemplo, al menos el 99 % en peso, de polinucleótidos o polipéptidos presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones, iones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1000 daltons).

"Interferencia de ARN" se usa en la presente descripción de manera consistente con su significado en la técnica para referirse a un fenómeno por el cual el ARN bicatenario (ARNds) desencadena la degradación secuencia específica o la represión traduccional de un ARNm correspondiente que tiene complementariedad con una cadena del ARNds. Se apreciará que la complementariedad entre la cadena del ARNds y el ARNm no necesita ser del 100 %, sino que solo debe ser suficiente para mediar la inhibición de la expresión génica (también denominada "silenciamiento" o "derribo"). Por ejemplo, el grado de complementariedad es tal que la cadena puede (i) guiar la escisión del ARNm en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC); o (ii) causar represión traduccional del ARNm. En ciertas modalidades, la porción bicatenaria del ARN tiene menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 17 y 29 nucleótidos de longitud. En las células de mamíferos, el ARNi puede lograrse mediante la introducción de un ácido nucleico bicatenario apropiado en las células o la expresión de un ácido nucleico en las células que luego se procesa intracelularmente para producir dsRNA en el mismo. Los ácidos nucleicos capaces de mediar ARNi se denominan en la presente descripción "agentes de ARNi". Los ácidos nucleicos ilustrativos capaces de mediar ARNi son un ARN de horquilla corto (ARNsh), un ARN interferente corto (ARNsi) y un precursor de microARN. Estos términos son bien conocidos y se usan en la presente descripción de manera consistente con su significado en la técnica. Los ARNsi típicamente comprenden dos cadenas de ácido nucleico separadas que se hibridan entre sí para formar un dúplex. Ellos pueden sintetizarse in vitro, por ejemplo, mediante el uso de técnicas estándar de síntesis de ácido nucleico. Ellos pueden comprender una amplia variedad de nucleósidos modificados, análogos de nucleósidos y pueden comprender bases modificadas química o biológicamente, cadenas principales modificadas, etc. Puede usarse cualquier modificación reconocida en la técnica como útil para ARNi. Algunas modificaciones dan como resultado un aumento de la estabilidad, captación celular, potencia, etc. En ciertas modalidades, el ARNsi comprende un dúplex de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud y uno o dos voladizos 3' de 1-5 nucleótidos de longitud, que pueden estar compuestos por desoxirribonucleótidos. El ARNsh comprende una única cadena de ácido nucleico que contiene dos porciones complementarias separadas por una región predominantemente no autocomplementaria. Las porciones complementarias se hibridan para formar una estructura dúplex y la región no autocomplementaria forma un bucle que conecta el extremo 3' de una cadena del dúplex y el extremo 5' de la otra cadena. Los ARNsh se someten a un procesamiento intracelular para generar ARNsi.

Los microARN (miARN) son pequeños ARN no codificantes monocatenarios de aproximadamente 21-25 nucleótidos (en sistemas de mamíferos) que inhiben la expresión génica de manera secuencia específica. Ellos se generan intracelularmente a partir de precursores que tienen una estructura secundaria característica que comprende una horquilla corta (de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud) que contiene un dúplex que a menudo incluye una o más regiones de complementariedad imperfecta. Los miARN de origen natural son solo parcialmente complementarios a su ARNm diana y típicamente actúan mediante represión traduccional. Los agentes de ARNi modelados sobre precursores de microARN endógenos son útiles en la invención. En algunas modalidades, una secuencia que codifica la porción del tallo de una estructura de bucle tallo o que codifica un bucle tallo completo puede insertarse en un ácido nucleico que comprende al menos una porción de un transcrito primario de microARN endógeno, por ejemplo, en lugar de la secuencia que codifica el microARN endógeno o la horquilla de microARN mínima (~ 70 nucleótidos).

El "factor de reprogramación" se refiere a un gen, ARN o proteína que promueve o contribuye a la reprogramación celular, por ejemplo, in vitro. Los factores de reprogramación pueden ser de interés para reprogramar células somáticas a la pluripotencia in vitro. Ejemplos de factores de reprogramación de interés para la reprogramación de células somáticas a la pluripotencia in vitro son Oct4, Nanog, Sox2, Lin28, Klf4, c-Myc y cualquier gen/proteína que pueda sustituir a uno o más de estos en un método de reprogramación de células somáticas in vitro. "Reprogramar a un estado pluripotente in vitro", o "reprogramar a pluripotencia in vitro", se usa en la presente descripción para referirse a métodos de reprogramación in vitro que no requieren y típicamente no incluyen transferencia nuclear o citoplasmática o fusión celular, por ejemplo, con ovocitos, embriones, células germinales o células pluripotentes. Cualquier modalidad o reivindicación de la invención puede excluir específicamente composiciones o métodos relacionados o que implican transferencia nuclear o citoplasmática o fusión celular, por ejemplo, con ovocitos, embriones, células germinales o células pluripotentes.

"Marcador seleccionable" se refiere a un gen, ARN o proteína que, cuando se expresa, confiere a las células un fenotipo seleccionable, tal como resistencia a un agente citotóxico o citostático (por ejemplo, resistencia a antibióticos), prototrofia nutricional o expresión de una proteína particular que puede usarse como base para distinguir las células que expresan la proteína de las células que no lo hacen. Las proteínas cuya expresión puede detectarse fácilmente, tales como una proteína fluorescente o luminiscente o una enzima que actúa sobre un sustrato para producir una sustancia coloreada, fluorescente o luminiscente ("marcadores detectables") constituyen un subconjunto de marcadores seleccionables. La presencia de un marcador seleccionable vinculado a elementos de control de expresión nativos de un gen que normalmente se expresa selectiva o exclusivamente en células pluripotentes permite identificar y seleccionar células somáticas que han sido reprogramadas a un estado pluripotente. Puede utilizarse una variedad de genes marcadores seleccionables, tales como el gen de resistencia a la neomicina (neo), gen de resistencia a la puromicina (puro), guanina fosforibosil transferasa (gpt), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosina desaminasa (ada), puromicina-N-acetiltransferasa (PAC), gen de resistencia a la higromicina (hyg), gen de resistencia a múltiples fármacos (mdr), timidina quinasa (TK), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) y gen hisD. Los marcadores detectables incluyen proteínas fluorescentes verdes (GFP), proteínas fluorescentes azules, zafiros, amarillos, rojos, naranjas y cian y variantes de cualquiera de estos. Además, son útiles las proteínas luminiscentes tales como la luciferasa (por ejemplo, Luciérnaga o luciferasa de Renilla). Como será evidente para un experto en la técnica, el término "marcador seleccionable" como se usa en la presente descripción puede referirse a un gen o a un producto de expresión del gen, por ejemplo, una proteína codificada.

En algunas modalidades, el marcador seleccionable confiere una ventaja de proliferación y/o supervivencia a las células que lo expresan en relación con las células que no lo expresan o que lo expresan a niveles significativamente más bajos. Dicha ventaja de proliferación y/o supervivencia ocurre típicamente cuando las células se mantienen bajo ciertas condiciones, es decir, "condiciones selectivas". Para garantizar una selección efectiva, puede mantenerse una población de células por debajo de las condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que las células que no expresan el marcador no proliferen y/o no sobrevivan y se eliminen de la población o que sus números se reduzcan a solo una fracción muy pequeña de la población. El proceso de selección de células que expresan un marcador que confiere una ventaja de proliferación y/o de supervivencia al mantener una población de células en condiciones selectivas para eliminar en gran medida o completamente las células que no expresan el marcador se denomina en la presente descripción "selección positiva", y se dice que el marcador es "útil para la selección positiva". La selección negativa y los marcadores útiles para la selección negativa son de interés, además, en algunos de los métodos descritos en la presente descripción. La expresión de tales marcadores confiere una desventaja de proliferación y/o de supervivencia en las células que expresan el marcador en relación con las células que no expresan el marcador o lo expresan en niveles significativamente más bajos (o, considerado de otra manera, las células que no expresan el marcador tienen una ventaja de proliferación y/o de supervivencia en relación con las células que expresan el marcador). Por lo tanto, las células que expresan el marcador pueden eliminarse en gran parte o completamente de una población de células cuando se mantienen en condiciones selectivas durante un período de tiempo suficiente.

Los términos "tratar", "tratando", "tratamiento", etc., tal como se aplican a una célula aislada, incluyen someter la célula a cualquier tipo de proceso o condición o realizar cualquier tipo de manipulación o procedimiento en la célula. Como se aplica a un sujeto, los términos se refieren a proporcionar atención médica o quirúrgica, cuidado, o manejo a un individuo. El individuo generalmente está enfermo o lesionado, o tiene un riesgo aumentado de enfermarse en relación con un miembro promedio de la población y necesita dicha atención, cuidado o manejo.

El término "Wnt" o "proteína Wnt", como se usa en la presente descripción, se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos natural de una proteína Wnt o un fragmento, variante o derivado de la misma que al menos en parte retiene la capacidad de la proteína natural para unirse a los receptores de Wnt y activar la señalización de Wnt. Además de las variantes alélicas naturales de las secuencias Wnt que pueden existir en la población, se apreciará que, como es el caso de prácticamente todas las proteínas, pueden introducirse una variedad de cambios en las secuencias enumeradas bajo los números de acceso en La Tabla 1 (denominada secuencias de "tipo salvaje") sin alterar sustancialmente la actividad funcional (biológica) de los polipéptidos. Dichas variantes están incluidas dentro del alcance de los términos "Wnt", "proteína Wnt", etc.

La variante podría ser, por ejemplo, un polipéptido al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntico a la Wnt de longitud completa. La variante podría ser un fragmento Wnt de longitud completa. La variante podría ser una variante de empalme natural. La variante podría ser un polipéptido al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntico a un fragmento de Wnt, en donde el fragmento es al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % tan largo como el polipéptido de tipo salvaje de longitud completa o un dominio del mismo que tenga una actividad de interés tal como la capacidad de unirse a un receptor Wnt. En algunas modalidades, el dominio tiene al menos 100, 200, 300 o 400 aminoácidos de longitud, que comienza en cualquier posición de aminoácidos en la secuencia y se extiende hacia el extremo C-terminal. Las variaciones conocidas en la técnica para eliminar o reducir sustancialmente la actividad de la proteína Wnt preferiblemente se evitan. En algunas modalidades, la variante carece de una porción N- y/o C-terminal del polipéptido de longitud completa, por ejemplo, faltan hasta 10, 20 o 50 aminoácidos de cualquiera de los extremos. En algunas modalidades, el polipéptido tiene la secuencia de un polipéptido Wnt maduro, por lo que se entiende un polipéptido Wnt que ha tenido una o más porciones tales como un péptido señal eliminado durante el procesamiento proteolítico intracelular normal (por ejemplo, durante el proceso de cotraducción o postraducción). En algunas modalidades en donde la proteína Wnt se produce de otra manera que no es purificarla a partir de células que la expresan naturalmente, la proteína es un polipéptido quimérico, lo que significa que contiene porciones de dos o más especies diferentes. En algunas

modalidades en donde la proteína Wnt se produce de otra manera que no es purificarla a partir de células que la expresan naturalmente, la proteína es un derivado de Wnt, lo que significa que la proteína comprende secuencias adicionales no relacionadas con Wnt siempre que esas secuencias no lo hagan sustancialmente reducir la actividad biológica de la proteína.

Un experto en la materia sabrá, o podrá determinar fácilmente, si una variante, fragmento o derivado particular de Wnt es funcional mediante el uso de ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de una variante de un polipéptido Wnt para unirse a un receptor Wnt puede evaluarse mediante el uso de ensayos estándar de unión a proteínas. Los ensayos convenientes incluyen medir la capacidad de activar la transcripción de un constructo reportero que contiene un sitio de unión TCF unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador detectable tal como luciferasa. Un ensayo implica determinar si la variante Wnt induce la fosforilación de  $\beta$ -catenina. El estado de fosforilación puede determinarse mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo, inmunotransferencia. Otros ensayos implican probar la variante o fragmento para actividades biológicas conocidas de Wnt. Ver, por ejemplo, Barker, N. y Clevers, H., *Nat Rev Drug Discov.* 5(12):997-1014, 2006, que describe ensayos adecuados para identificar agentes que modulan la actividad de la vía Wnt. Tales ensayos pueden adaptarse fácilmente para identificar o confirmar la actividad de los agentes que activan la actividad de la vía Wnt. En ciertas modalidades de la invención, una variante funcional o fragmento tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la actividad del polipéptido de tipo salvaje de longitud completa.

La "actividad de la vía de Wnt" o la "señalización de Wnt" se refieren a la serie de eventos bioquímicos que se producen después de la unión de un ligando estimulador (por ejemplo, una proteína Wnt) a un receptor para un miembro de la familia Wnt, que en última instancia conduce a cambios en la transcripción génica y, si es in vivo, a menudo conduce a un efecto biológico característico en un organismo.

#### Reprogramación de células somáticas mediante la activación de la vía Wnt

La presente invención proporciona el reconocimiento de que la activación de la vía Wnt es útil para reprogramar células somáticas. La invención proporciona el reconocimiento adicional de que la activación de la vía Wnt aumenta la eficiencia de la reprogramación de células somáticas, por ejemplo, cuando tales células se someten a un tratamiento que resultaría en la reprogramación de al menos algunas células. "Aumentar la eficiencia de la reprogramación" significa causar un aumento en el porcentaje de células que se someten a reprogramación cuando una población de células se somete a un tratamiento de reprogramación, lo que típicamente resulta en un mayor número de colonias individuales de células reprogramadas después de un período de tiempo determinado. En algunas modalidades de la invención, la activación de la vía Wnt de acuerdo con la invención aumenta el número de células reprogramadas y/o el número de colonias de células reprogramadas y/o el porcentaje de células que se reprograman. La invención proporciona, además, el reconocimiento de que la activación de la vía Wnt permite la reprogramación de células somáticas que no han sido genéticamente modificadas para aumentar su expresión de un oncogén como c-Myc. Por lo tanto, la invención proporciona formas de sustituir la expresión de c-Myc modificada por ingeniería genética en cualquier método de reprogramación de células somáticas que de otro modo implicaría modificar por ingeniería genética las células para expresar c-Myc. La activación de la vía Wnt puede ser suficiente para permitir la reprogramación en condiciones en las cuales de otra manera no se produciría la reprogramación.

En la presente descripción se describen métodos para generar células somáticas reprogramadas que comprenden modular, por ejemplo, aumentar la actividad de la vía Wnt. Además, se describen composiciones útiles en los métodos. En la presente descripción se describe un método para reprogramar una célula somática que comprende modular, por ejemplo, aumentar la actividad de la vía Wnt en la célula. Además, se describen métodos mejorados para la reprogramación de células somáticas, el método comprende someter las células somáticas a un tratamiento que puede reprogramar al menos algunas de las células, en donde la mejora comprende aumentar la actividad de una vía Wnt en dichas células. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento conocido en la técnica útil para reprogramar células somáticas o considerado como de uso potencial para este propósito. La actividad de la vía Wnt puede aumentarse mediante el uso de activadores de la vía Wnt tales como moléculas pequeñas, proteínas Wnt solubles o agentes que median la interferencia de ARN y por lo tanto inhiben los inhibidores endógenos de la vía Wnt. Las células somáticas a reprogramar pueden cultivarse en medio acondicionado con Wnt. A menos que se indique de otra manera o sea evidente por el contexto, "reprogramar" puede referirse a la reprogramación a un estado pluripotente.

Las Wnt son una familia de proteínas secretadas importantes para una amplia gama de procesos de desarrollo y fisiológicos (Mikels, AJ y Nusse, R., *Oncogene*, 25:7461-7468, 2006). Las Wnt están relacionadas entre sí en secuencia y están fuertemente conservadas en estructura y función en múltiples especies. Por lo tanto, una proteína Wnt que muestra actividad en una especie puede usarse en otras especies para activar la vía Wnt en tales especies y puede esperarse que muestre una actividad similar. Los miembros de la familia Wnt incluyen Wnt1, Wnt2, Wnt2b (también llamado Wnt13), Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15, o Wnt16. Las secuencias de genes y proteínas Wnt son conocidas en la técnica. Un experto en la materia puede encontrar fácilmente la ID del gen, los números de acceso y la información de secuencia para los miembros de la familia Wnt y otros genes y proteínas de interés en la presente descripción en bases de datos disponibles públicamente (ver la Tabla 1 para ejemplos).

**Tabla 1: proteínas, efectores y reguladores de la vía Wnt**

Gen	ID del gen	Números de acceso (ARNm/proteína)
Wnt3a (ratón)	22416	NM_009522/NP_033548
Wnt3a (humano)	89780	NM_033131/NP_149122
$\beta$ -catenina (ratón)	12387	NM_007614/NP_031640
$\beta$ -catenina (humana)	1499	NM_001098209/NP_001091679 NM_001098210/NP_001091680 NM_001904/NP_001895
GSK3 $\alpha$ (ratón)	606496	NM_001031667/NP_001026837
GSK3 $\alpha$ (humano)	2931	NM_019884/NP_063937
GSK3 $\beta$ (ratón)	56637	NM_019827/NP_062801
GSK3 $\beta$ (humano)	605004	NM_002093/NP_002084
Sox2 (ratón)	20674	NM_011443/NP_035573
Sox2 (humano)	6657	NM_003106/NP_003097
Klf4 (ratón)	16600	NM_010637/NP_034767
Klf4 (humano)	9314	NM_004235/NP_004226
Oct4 (ratón)	18999	NM_013633/NP_038661
Oct4 (humano)	5460	NM_203289/NP_976034
Oct4 (humano)	5460	NM_002701/NP_002692
Nanog (ratón)	71950	NM_028016.2/NP_082292.1
Nanog (humano)	79923	NM_024865/NP_079141
Lin28 (ratón)	83557	NM_145833/NP_665832
Lin28 (humano)	79727	NM_024674/NP_078950

La señalización de Wnt se inicia mediante la interacción de las proteínas Wnt con una variedad de receptores, incluidos los miembros de la familia de receptores transmembrana Frizzled (Fz) y los miembros de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) (por ejemplo, LRP5/LRP6). La señal Wnt extracelular estimula las cascadas de transducción de señal intracelular, incluida la vía canónica, que regula la expresión génica en el núcleo (revisado por Logan CY y Nusse, R. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 20:781-810, 2004) y varias vías no canónicas (revisado por Kohn, AD y Moon, RT, Cell Calcium, 38:439-446, 2005). Brevemente, la señalización de Wnt a través de la vía canónica conduce a la estabilización y localización nuclear de la  $\beta$ -catenina, que se ensambla con miembros de la familia de factores de transcripción del factor de células T/factor de potenciador linfocitario (TCF/LEF) para formar complejos que generalmente activan la transcripción. En ausencia de señalización Wnt, la  $\beta$ -catenina se vuelve diana para degradación por el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, y los TCF/LEF forman complejos que generalmente reprimen la transcripción. En ausencia de señalización de Wnt, las quinasas tales como la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y la caseína quinasa 1 (CK1) fosforilan la  $\beta$ -catenina, que como consecuencia está ubiquitinada y es diana de destrucción por el proteasoma. Por lo tanto, la activación de la vía Wnt da como resultado una disminución de la fosforilación de  $\beta$ -catenina, lo que conduce a su estabilización. Se han identificado varias proteínas endógenas como inhibidores de la señalización de Wnt, incluidas Dickkopf (Dkk), proteína de la región del grupo de punto de interrupción (Bcr), proteínas que comprenden un dominio WIF (factor inhibidor de Wnt), etc.

Los métodos de reprogramación descritos en la presente descripción pueden comprender poner en contacto una célula con un agente que modula, por ejemplo, aumenta, la actividad de una vía Wnt. El aumento de la vía Wnt puede inducir a la célula a volverse pluripotente y poseer características de las células ES. Por lo tanto, los métodos son útiles para generar células pluripotentes, similares a ES (células iPS). En ciertas modalidades de la invención, un tratamiento que causa un aumento de la actividad de una vía Wnt es uno que da como resultado niveles intracelulares aumentados de  $\beta$ -catenina. En ciertas modalidades de la invención, un tratamiento que causa un aumento de la actividad de una vía Wnt es uno que da como resultado un aumento de la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina. En ciertas modalidades de la invención, un tratamiento que causa un aumento de la actividad de una vía Wnt es capaz de causar cambios en la expresión génica característica de las células expuestas a una fuente de proteína Wnt biológicamente activa. La reprogramación puede modularse mediante el uso de un inhibidor de la vía Wnt.

Se logró un avance considerable hacia el objetivo de reprogramar células somáticas a un estado pluripotente in vitro cuando se demostró que podían producirse líneas celulares con algunas de las propiedades de las células ES mediante la introducción de genes que codifican cuatro factores de transcripción asociados con la pluripotencia, es decir, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, en fibroblastos de piel de ratón mediante infección retroviral, y luego seleccionar células que expresan un marcador de pluripotencia, Fbx15, en respuesta a estos factores (Takahashi, K. & Yamanaka, S. Cell 126, 663-676, 2006). Sin embargo, las células resultantes diferían de las células ES en su expresión génica y en los patrones de metilación del ADN, y cuando se inyectaron en blastocistos normales de ratón no dieron lugar a quimeras vivas (animales que llevan células en sus cuerpos desde el blastocisto original y desde las células introducidas). El trabajo posterior mejoró estos resultados al realizar una selección más rigurosa, lo que resultó en la derivación de líneas celulares reprogramadas estables que, en base a la transcripción, la impresión (expresión de alelos predeterminada por el parental del que se originaron) y los perfiles de modificación de cromatina reportados, parecían esencialmente idénticas a células ES (Okita, K., y otros, 448, 313-317, 2007; Wernig, M. y otros Nature 448, 318-324, 2007; Maherali, N. y otros Cell Stem Cell 1, 55 -70, 2007). Las células somáticas que se han reprogramado a un estado pluripotente in vitro mediante el uso de estos métodos u otros métodos (por ejemplo, que implican la aplicación de moléculas pequeñas) se denominan en la presente descripción de manera consistente con el uso en la técnica como "células madre pluripotentes inducidas" (iPS). Posteriormente, se demostró que las células somáticas humanas pueden, además, reprogramarse a la pluripotencia mediante el uso de estos factores. Además, se demostró que la combinación de Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28 podía reprogramar las células somáticas a un estado pluripotente in vitro (Yu J, Science, 318(5858):1917-20, 2007). Sin embargo, la generación de estas células implicó, además, la modificación por ingeniería genética de las células para expresar múltiples factores de transcripción y se empleó transducción retroviral.

Los solicitantes ahora han demostrado que se desarrolló un mayor número de colonias compuestas por células similares a ES cuando las células somáticas genéticamente modificadas para expresar Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc se cultivaron en medio acondicionado Wnt3a, que cuando las células se cultivaron en medio acondicionado por células de control o en medio de cultivo celular estándar usado convencionalmente para la propagación de células ES. Los solicitantes mostraron, además, que las colonias compuestas por células similares a ES se desarrollaron cuando las células somáticas genéticamente modificadas para expresar Oct4, Sox2 y Klf4 pero no modificadas para expresar c-Myc se cultivaron en medio acondicionado Wnt3a, mientras que no se formaron colonias de células similares a ES dentro del período de tiempo de 20 días que se muestra en la Figura 1 cuando tales células se cultivaron en medio no acondicionado o medio acondicionado por células de control. En ambos casos, las colonias mostraron características morfológicas características de las colonias de células ES y la expresión de un marcador detectable indicativo de la expresión de Oct4. Según todos los criterios probados, las células parecen ser pluripotentes, células similares a ES (células iPS). Además, el cultivo de las células somáticas en medio acondicionado Wnt3a parece que seleccionó las células reprogramadas. Las colonias formadas en presencia de medio acondicionado Wnt3a parecían más homogéneas que las obtenidas en ausencia del medio acondicionado Wnt3a. Por lo tanto, los métodos son útiles para facilitar la identificación de células reprogramadas y, opcionalmente, para facilitar la separación de dichas células de las células que no se han reprogramado, sin la necesidad de una selección química que se base en un elemento genético introducido, tal como un gen cuyo producto de expresión confiere resistencia a fármaco o fluorescencia. Por lo tanto, los métodos son útiles para generar células reprogramadas que no portan modificaciones genéticas con fines de selección o detección de las células reprogramadas. Además, los métodos son útiles para aumentar el porcentaje promedio de células reprogramadas en una colonia que comprende células reprogramadas en relación con el porcentaje promedio de células que serían reprogramadas en ausencia de un agente que aumente la actividad de la vía Wnt.

Los solicitantes y otros han notado que algunas células similares a iPS pueden formarse sin infectar las células con el virus c-Myc. Sin embargo, este es un evento de baja eficiencia y podría ser al menos en parte el resultado de una mutagénesis de inserción en donde un evento de integración viral activa directamente c-Myc o los genes diana de c-Myc. En los experimentos de los solicitantes, en puntos de tiempo muy tardíos, se observaron algunas colonias en las placas que sobreexpresaban Klf4, Sox2 y Oct4 (sin introducir el virus c-Myc), incluso sin medio acondicionado Wnt. El medio acondicionado Wnt redujo significativamente el tiempo requerido y aumentó la eficiencia del proceso de reprogramación. Un aspecto de la invención es que la reprogramación más rápida lograda mediante el uso de los métodos de la invención facilitará el uso de medios transitorios de sobreexpresión de factores inductores de pluripotencia para la formación de iPS (por ejemplo, transfección transitoria) y/o reprogramación mediante el tratamiento de células somáticas con agentes de reprogramación tales como proteínas, moléculas pequeñas, etc., en lugar de infección viral. Además, los solicitantes proponen que la mayor eficiencia de la formación de iPS mediante el uso de los métodos de la invención podría ser útil en particular en la reprogramación de células humanas, con o sin sobreexpresión de Myc.

Sin limitación, los métodos se usan para aumentar la velocidad de reprogramación de células somáticas en células iPS. Por lo tanto, en la presente descripción se describe un método para aumentar la velocidad de reprogramación de células somáticas, que comprende cultivar una población de células somáticas de mamífero en medio de cultivo celular acondicionado Wnt de manera que al menos algunas de las células se induzcan a convertirse en células similares a ES en un período de tiempo más corto que como sería en ausencia de medio acondicionado Wnt. Además, se describe un método para aumentar la velocidad de reprogramación de células somáticas que comprende activar la vía Wnt en una población de células somáticas en cultivo de manera que al menos algunas de las células se induzcan a

convertirse en células similares a ES en un período de tiempo más corto que como sería si la vía Wnt no estuviera activada. Además, se describe un método para aumentar la velocidad de reprogramación de células somáticas que comprende cultivar una población de células somáticas de mamífero en presencia de un agente que aumenta la actividad de la vía Wnt de manera que al menos algunas de las células se induzcan a convertirse en células similares a ES dentro de un período de tiempo más corto que como sería en ausencia de dicho agente. El período de tiempo puede ser de 7 días, o 10, 15 o 20 días. Las células pueden tratarse (por ejemplo, modificarse por ingeniería genética) para que expresen Sox2, Klf4, Oct4 y c-Myc a niveles mayores que como sería en ausencia de dicho tratamiento. Las células pueden tratarse de manera que sobreexpresen Sox2, Klf4 y Oct4 a niveles mayores que como sería en ausencia de dicho tratamiento, pero no están genéticamente modificadas para sobreexpresar c-Myc. Un método de tratamiento es infectar las células con virus (por ejemplo, retrovirus, lentivirus) o transfectar las células con vectores virales (por ejemplo, retrovirales, lentivirales) que contienen las secuencias de los factores unidos operativamente a elementos de control de expresión adecuados para impulsar la expresión en el células después de infección o transfección y, opcionalmente, la integración en el genoma como se conoce en la técnica.

En la presente descripción se describe un método para reprogramar una célula somática, que comprende cultivar la célula en medio de cultivo celular acondicionado Wnt de manera que la célula se re programe. El cultivo de la célula en medio de cultivo celular acondicionado Wnt puede inducir a la célula a volverse pluripotente y poseer características de las células ES. Por lo tanto, los métodos son útiles para generar células pluripotentes, similares a ES (células iPS). El medio de cultivo celular acondicionado Wnt puede comprender medio acondicionado Wnt3a.

El término "medio acondicionado" se refiere a un medio de cultivo celular que se ha usado previamente para cultivar células. Un medio acondicionado se caracteriza porque contiene sustancias solubles, por ejemplo, moléculas de señalización, factores de crecimiento, hormonas, etc., que son producidas por las células durante su cultivo y se liberan al medio. Como se usa en la presente descripción, "medio acondicionado Wnt" se refiere al medio acondicionado que se ha usado previamente para cultivar células que producen y secretan Wnt. El medio puede describirse, además, por referencia a una proteína Wnt particular producida por las células. Por ejemplo, "medio acondicionado Wnt3a" se refiere al medio acondicionado que se ha usado previamente para cultivar células que producen Wnt3a. Las células pueden producir otros Wnt además del Wnt particular al que se hace referencia específicamente. Cualquier modalidad de la invención que emplee medio acondicionado Wnt puede emplear medio acondicionado Wnt3a a menos que se indique de otra manera.

Se apreciará que ciertos Wnt tienen actividades biológicas similares a Wnt3a y/o están estrechamente relacionados en secuencia con Wnt3a. Los medios acondicionados preparados mediante el uso de células que producen tales Wnt se usan en ciertas modalidades de la invención.

El medio acondicionado puede prepararse por métodos conocidos en la técnica. Tales métodos típicamente comprenden cultivar una primera población de células en un medio de cultivo celular y luego cosechar el medio (típicamente sin cosechar las células). El medio cosechado puede filtrarse para eliminar los restos celulares, etc. El medio acondicionado (que contiene componentes secretados en el medio por las células) puede usarse para apoyar el crecimiento de una segunda población de células. Las células se cultivan en el medio durante el tiempo suficiente para permitir una concentración adecuada de factores liberados, tales como Wnt (y/o consumo de componentes de los medios) para producir un medio que respalde la reprogramación de las células somáticas. En algunas modalidades, el medio se acondiciona mediante cultivo durante 24 horas a 37 °C. Sin embargo, pueden usarse períodos más largos o más cortos, como entre 24 y 72 horas. Las células pueden usarse para acondicionar múltiples lotes de medio durante períodos de cultivo adicionales, siempre y cuando las células retengan su capacidad de acondicionar el medio de manera adecuada para el propósito deseado.

El medio en el cual se cultivan las células para producir medio acondicionado puede ser un medio de cultivo celular convencional capaz de mantener la viabilidad de las células. En algunas modalidades, el medio se define químicamente. En algunas modalidades, el medio es similar o idéntico en composición al medio usado convencionalmente para cultivar células madre embrionarias de la misma especie que las células somáticas a reprogramar mediante el uso del medio acondicionado. El medio base que se usa para el acondicionamiento puede tener cualquiera de varias composiciones diferentes, en dependencia, en parte, de los tipos de células que se usan. El medio tiene que ser capaz de soportar el cultivo de la línea celular que se usa para el acondicionamiento del medio. En algunas modalidades, el medio soporta, además, el cultivo de células somáticas antes de su reprogramación y, opcionalmente, células somáticas que han sido reprogramadas. Sin embargo, el medio acondicionado puede suplementarse con otros componentes, combinarse con otro medio, etc., después del acondicionamiento para hacerlo adecuado para el cultivo de células somáticas y células somáticas reprogramadas.

Pueden prepararse medios de base adecuados a partir de los siguientes componentes: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Invitrogen Cat. No. 11965-092; Medio Eagle modificado Knockout Dulbecco (KO DMEM), Invitrogen Cat. No. 10829-018; Ham's F12/50 % DMEM medio basal; 200 mM L-glutamina, Invitrogen Cat. No. 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Invitrogen Cat. No. 11140-050; beta-mercaptoetanol; factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano básico (bFGF). El medio ES ilustrativo que contiene suero se prepara con 80 % de DMEM (típicamente KO DMEM), 20 % de suero fetal bovino definido (FBS) no inactivado por calor, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 mM de L-glutamina y 0,1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. El medio se filtra y se

almacena a 4 °C durante no más de 2 semanas. El medio ES sin suero puede prepararse con 80 % de KO DMEM, 20 % de reemplazo de suero, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 mM de L-glutamina y 0,1 mM de β-mercaptoetanol y un reemplazo de suero como Invitrogen Cat. No. 10828-028. El medio se filtra y se almacena a 4 °C. Antes de combinar con las células que se usan para el acondicionamiento, puede añadirse bFGF humano a una concentración final de 4 ng/ml. StemPro® hESC SFM (Invitrogen Cat. No. A1000701), es un medio totalmente definido, libre de suero y alimentador (SFM) especialmente formulado para el crecimiento y la expansión de células madre embrionarias humanas que es útil.

Las células que se usan para preparar el medio acondicionado pueden producir naturalmente Wnt. En algunas modalidades, las células que se usan para preparar el medio están modificadas genéticamente para aumentar su expresión de Wnt, por ejemplo, al transfectarlas con un ADNc que codifica Wnt, en donde la secuencia codificadora de Wnt está unida operativamente a las secuencias de control de expresión activas en las células. Ver, por ejemplo, Cai, L., y otros, Cell Res. 17:62-72, 2007. En algunas modalidades, las células producen y secretan Wnt en su medio, lo que da como resultado un medio que tiene una concentración entre 100 ng/ml y 1000 ng/ml de proteína Wnt. En algunas modalidades, las células producen y secretan Wnt en su medio, lo que da como resultado un medio que tiene una concentración de entre 200 ng/ml y 500 ng/ml de proteína Wnt. Las células que sobreexpresan Wnt también podrían usarse como células alimentadoras con el propósito de reprogramar células somáticas.

El medio acondicionado puede combinarse con medio no acondicionado antes de su uso. Por brevedad, el medio resultante todavía se conoce como medio acondicionado si comprende al menos 5 % de medio acondicionado en volumen. En algunas modalidades, la cantidad (en volumen) de medio acondicionado es al menos 10 %, por ejemplo, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de medio acondicionado. En algunas modalidades, la cantidad de medio acondicionado está entre aproximadamente 50 % y 75 % en volumen. El medio no acondicionado puede ser medio de cultivo celular estándar. En algunas modalidades, el medio no acondicionado se usa convencionalmente para propagar células ES de la misma especie que las células somáticas a reprogramar.

El medio acondicionado puede usarse inmediatamente después de ser cosechado de las células que se usan para producirlo o puede almacenarse (por ejemplo, a aproximadamente 4 °C o congelado) antes de su uso. El medio puede almacenarse en condiciones y durante un período de tiempo consistente con el mantenimiento de la capacidad del medio acondicionado para soportar la reprogramación en los métodos de la invención. Sin limitación, tales condiciones y tiempo pueden ser consistentes con mantener al menos el 20 % de la actividad biológica original de la Wnt secretada presente en el medio, que puede evaluarse mediante el uso de los métodos mencionados anteriormente. El medio acondicionado puede concentrarse o procesarse de otra manera, por ejemplo, mediante el uso de métodos estándar, siempre que dicha concentración o procesamiento sea consistente con mantener la capacidad del concentrado para soportar la reprogramación cuando se agregue al medio no acondicionado. Sin limitación, tal concentración o procesamiento puede ser consistente con mantener al menos el 20 % de la actividad biológica original de la Wnt secretada presente en el medio. Como se señaló en los ejemplos, los resultados de los solicitantes sugieren que los fibroblastos normales (no modificados por ingeniería genética para sobreexpresar Wnt) pueden secretar factores, tal vez incluido Wnt3a, que promueven la reprogramación, lo que pone a la vista la posibilidad de que las células somáticas se reprogramen in vitro, por ejemplo, células en cultivo que se han tratado con retrovirus o se han modificado por ingeniería genética para expresar Oct4, Sox2, Klf4 y, opcionalmente, c-Myc, pueden secretar dichos factores y contribuir así a su propia reprogramación. En ciertas modalidades de la presente invención, el medio acondicionado Wnt tiene una mayor concentración de proteína Wnt y/o actividad activadora de la vía de Wnt que como sería cuando las células somáticas no modificadas, por ejemplo, fibroblastos, sometidos a reprogramación se cultivan en un medio conocido en la técnica como útil para cultivar células somáticas en proceso de reprogramación. En algunas modalidades, tal concentración y/o capacidad de activación de la vía de Wnt puede ser al menos 1,5, 2, 5, 10, 20 o más veces mayor que la presente en un medio en el cual se cultivan fibroblastos de control como se describe en el Ejemplo 5.

Ciertos métodos descritos en la presente descripción implican poner en contacto una célula somática in vitro con uno o más agentes definidos que modulan, por ejemplo, aumentan la actividad de la vía Wnt. Las células pueden mantenerse en un medio de cultivo celular estándar conocido en la técnica. Los agentes pueden añadirse al medio antes de usarlo para cultivar las células o durante el cultivo celular. El término "agente definido" en este contexto significa que la estructura, secuencia o identidad del agente que modula, por ejemplo, aumenta la actividad de la vía Wnt se conoce y/o el agente se sintetiza químicamente y/o el agente es (antes de la adición al medio) aislado o al menos parcialmente purificado. Por ejemplo, el agente puede no ser un componente no caracterizado o no identificado de medio acondicionado, lisado o extracto de células o tejidos, citoplasma celular o material nuclear, etc.

Puede usarse una variedad de agentes para aumentar la actividad de la vía Wnt. Dichos agentes se denominan en la presente descripción "activadores de la vía de Wnt" o "agonistas de Wnt". El activador de la vía Wnt puede actuar directamente al interactuar con un receptor Wnt o indirectamente al interactuar con uno o más componentes intracelulares de la vía de señalización Wnt, tales como la β-catenina, una quinasa o fosfatasa que actúa sobre la β-catenina, un factor de transcripción que se ensambla con β-catenina, etc. El activador puede aumentar la expresión de Wnt o un componente de la vía de Wnt tal como β-catenina. En ciertas modalidades, el activador de la vía Wnt aumenta la actividad de la vía Wnt a niveles suficientes para mejorar la reprogramación de las células somáticas. En ciertas modalidades de la invención, el activador de la vía Wnt inhibe la degradación de β-catenina, lo que mejora la

reprogramación de las células somáticas. Puede ser de interés inhibir la vía Wnt en células somáticas o en células somáticas reprogramadas. Por ejemplo, los inhibidores de la vía Wnt pueden usarse para caracterizar o explorar el mecanismo por el cual ocurre la reprogramación y/o para identificar agentes de reprogramación (por ejemplo, agentes que no actúan a través de la vía Wnt). Además, los inhibidores de la vía Wnt (por ejemplo, moléculas pequeñas, ARNs, proteínas, etc.) pueden ser útiles para facilitar la diferenciación de células reprogramadas y pluripotentes a un tipo de célula deseado, por ejemplo, en protocolos de diferenciación in vitro.

En ciertas modalidades de la invención, el activador de la vía Wnt es una proteína que se une a un receptor Wnt. Por ejemplo, el activador de la vía Wnt puede ser una proteína Wnt soluble y biológicamente activa.

En algunas modalidades, la concentración de proteína Wnt añadida al medio está entre 10 y 10,000 ng/ml, por ejemplo, entre 100 y 5,000 ng/ml, por ejemplo, entre 1,000 y 2,500 ng/ml o entre 2,500 y 5,000 ng/ml, o entre 5,000 y 10,000 ng/ml.

Como se señaló anteriormente, ciertas Wnt tienen actividades biológicas similares a Wnt3a y/o están estrechamente relacionadas en secuencia con Wnt3a. Tales Wnt y/o agentes que imitan la actividad de tales Wnt se usan en ciertas modalidades de la invención.

La proteína Wnt puede aislarse de fuentes naturales (por ejemplo, células de mamíferos que producen naturalmente la proteína), producirse en células eucariotas o procariotas mediante el uso de tecnología de expresión recombinante, o sintetizarse químicamente. Las proteínas Wnt solubles y biológicamente activas pueden prepararse en forma purificada mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. Pub. núm. 20040248803 y Willert, K., y otros, Nature, 423: 448-52, 2003. En ciertas modalidades, la proteína Wnt soluble y biológicamente activa es Wnt3a. En ciertas modalidades, la proteína Wnt se modifica cotraduccionalmente o postraduccionalmente como ocurre cuando la proteína Wnt se produce en una célula huésped que expresa naturalmente la proteína Wnt. En otras modalidades, la proteína Wnt no se modifica cotraduccionalmente o postraduccionalmente como en la naturaleza. En ciertas modalidades, la proteína Wnt soluble, biológicamente activa, se modifica con un resto lipídico tal como palmitato. El resto lipídico puede estar unido a una cisteína conservada. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la proteína Wnt está palmitoilada en una cisteína conservada como se conoce en la técnica. En ciertas modalidades, la proteína Wnt está glicosilada como ocurre cuando la proteína Wnt se produce en una célula huésped de mamífero que expresa naturalmente la proteína Wnt. En otras modalidades, la proteína Wnt no está glicosilada como se encuentra en la naturaleza. La Wnt3a recombinante de ratón está disponible comercialmente (por ejemplo, de Millipore cat. No. GF145 o R & D Systems cat. No. 1324-WN-002).

Los activadores de la vía Wnt pueden aumentar el nivel de  $\beta$ -catenina, promover su localización nuclear o activar de otra manera la señalización de  $\beta$ -catenina.

Una molécula pequeña es un compuesto orgánico que tiene múltiples enlaces carbono-carbono y un peso molecular de menos de 1500 daltons. Típicamente, tales compuestos comprenden uno o más grupos funcionales que median interacciones estructurales con proteínas, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y pueden incluir al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes de molécula pequeña pueden comprender estructuras cíclicas o heterocíclicas de carbono y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos químicos funcionales y/o heteroátomos.

En ciertas modalidades de la invención, el activador de la vía Wnt es un agente que inhibe la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Estos agentes efectivamente "activan" la vía Wnt sin la necesidad de Wnt extracelular. GSK3 es una quinasa serina/treonina, originalmente identificada como un regulador del metabolismo de la glucosa (revisado en Frame y Cohen, Bio-chem J 359:1-16, 2001; ver también Cohen, Biochem Soc Trans 7:459-80, 1979; Embi y otros, Eur J Biochem 107:519-27, 1980). "GSK3" como se usa en la presente descripción, se refiere a una o ambas isoformas de GSK3 (GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ ). Los inhibidores que inhiben una o ambas de estas isoformas son útiles. En ciertas modalidades, el inhibidor de GSK3 inhibe específicamente GSK3 y no inhibe sustancialmente la mayoría de otras quinasas de mamíferos. En algunas modalidades, el inhibidor de GSK3 no inhibe sustancialmente al menos 10 quinasas diversas de mamíferos. En algunas modalidades, el inhibidor de GSK3 inhibe específicamente tanto GSK3 $\beta$  como GSK3 $\alpha$ . En algunas modalidades, el inhibidor de GSK3 inhibe específicamente GSK3 $\beta$  pero no GSK3 $\alpha$ . Por ejemplo, la IC50 para GSK3 $\alpha$  puede ser al menos 10 veces mayor que para GSK3 $\beta$ . En algunas modalidades, el inhibidor de GSK3 inhibe específicamente GSK3 $\alpha$  pero no GSK3 $\beta$ . Por ejemplo, la IC50 para GSK3 $\beta$  puede ser al menos 10 veces mayor que para GSK3 $\alpha$ . En ciertas modalidades, la IC50 del inhibidor de GSK3 para GSK3 es al menos 10 veces menor que su IC50 para la mayoría de otras quinasas de mamíferos. En ciertas modalidades, la IC50 del inhibidor de GSK3 para GSK3 es inferior a 10  $\mu$ M. En ciertas modalidades, la IC50 del inhibidor de GSK3 para GSK3 es inferior a 1  $\mu$ M. Se entenderá que el inhibidor de GSK3 debe ser capaz de entrar en las células en cantidades suficientes en las condiciones que se usan para inhibir GSK3 en el mismo. En algunas modalidades, la concentración del inhibidor de GSK3 que se usa es al menos igual a la IC50 del compuesto tal como se mide in vitro. En algunas modalidades, la concentración de inhibidor de GSK3 que se usa no es más de 100 veces la IC50 del compuesto tal como se mide in vitro. En algunas modalidades, la concentración que se usa oscila entre 5 y 50 veces la IC50 del agente tal como se mide in vitro.

Ahora se han identificado muchos inhibidores potentes y selectivos de GSK3 de molécula pequeña (Wagman AS, Johnson KW, Bussiere DE, Curr Pharm Des., 10(10):1 105-37, 2004). Ejemplos de inhibidores útiles de GSK3 incluyen los siguientes: (1) BIO: (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxima. La 6-bromoindirubina-3'-oxima (BIO) es un inhibidor de GSK-3 potente, reversible y competitivo con ATP (Polychronopoulos, P. y otros J. Med. Chem. 47, 935-946, 2004). (2) AR-A014418: N-(4-metoxi-bencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea. AR-A014418, inhibe GSK3 (IC50 = 104 nM), de manera competitiva con ATP (Ki = 38 nM). AR-A014418 no inhibe significativamente cdk2 o cdk5 (IC50 > 100 µM) u otras 26 quinasas, lo que demuestra una alta especificidad para GSK3 (Bhat, R., y otros, J. Biol. Chem. 278, 45937-45945, 2003). (3) SB 216763: 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona. Ver, por ejemplo, Smith, DG, y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 635-639, (2001) y Cross, DA, y otros, J. Neurochem. 77, 94-102, (2001), (4) SB 415286: 3-[(3-Cloro-4-hidroxifenil) amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona. SB 415286 se describe en Smith, DG, y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 635-639, 2001 y Coughlan, MP, y otros, Chem. Biol. 10, 793-803, 2000, (5) TDZD-8: 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona. Este compuesto es un inhibidor selectivo de GSK-3, un derivado de tiadiazolidinona, un inhibidor no competitivo de ATP de GSK-3β (IC50 = 2 µM). No inhibe Cdk-1/ciclina B, CK-II, PKA o PKC a > 100 µM. Se ha propuesto que se une al sitio de quinasas de GSK-3β. (Martinez y otros, J. Med. Chem. 45, 1292-1299, 2002); CHIR-911 y CHIR-837 (también conocidos como CT-99021 y CT-98023, respectivamente). Chiron Corporation (Emeryville, California) y compuestos relacionados son útiles. El cloruro de litio, el valproato de sodio y el inhibidor II de GSK3 (Calbiochem) son otros inhibidores útiles de GSK3. En las patentes de EE.UU. núms. 6,057,117 y 6,608,063; Publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. núms. 20040092535, 20040209878, 20050054663, se describen inhibidores adicionales de GSK3. Otros inhibidores útiles de GSK3 se describen en el documento núm. WO/2003/049739, que describe COMPUESTOS DE PIRIMIDINA ÚTILES COMO INHIBIDORES DE GSK-3; en el documento núm. WO/2002/085909, que describe DERIVADOS DE 9-DEAZAGUANINA COMO INHIBIDORES DE GSK-3, en el documento núm. WO/2003/011287, que describe DERIVADOS DE PYRAZOLON COMO INHIBIDORES DE GSK-3, WO/2005/039485, y/o WO/2006/091737.

Otro ejemplo de un activador de una vía Wnt es un inhibidor de la caseína quinasa 1 (CK1). Los ejemplos incluyen D4476, IC261 y CKI-7 (ver, por ejemplo, Rena, G., y otros, EMBO reports 5(1), 60-65, 2004). Los compuestos que inhiben CK1 y GSK3 se describen en la patente de EE.UU. No. 7098204.

Otro ejemplo de un activador de la vía Wnt es un activador de una fosfatasa que desfosforila naturalmente la β-catenina en uno o más de los sitios fosforilados por GSK3 o CK1.

La proteína de unión a CREB (CBP) y la proteína p300 estrechamente relacionada pueden ensamblarse con β-catenina y actuar como coactivadores transcripcionales de unión a β-catenina. Por ejemplo, para generar un complejo transcripcionalmente activo, la β-catenina recluta los coactivadores transcripcionales, la proteína de unión a CREB (CBP) o su homólogo p300 estrechamente relacionado (Hecht y otros, EMBO J. 19:1839-50 (2000); Takemaru y otros, J. Cell Biol. 149:249-54 (2000)) así como otros componentes de la maquinaria de transcripción basal. Otros coactivadores de β-catenina incluyen TBP, BRG1, BCL9/PYG, etc. La invención abarca la modulación directa o indirecta de las interacciones entre β-catenina y uno o más de estos coactivadores para mejorar la reprogramación de las células somáticas. Por ejemplo, la invención abarca la alteración de la participación relativa de β-catenina en uno o más de estos complejos en relación con su participación en uno o más de otros complejos. Pueden usarse agentes tales como moléculas pequeñas para interrumpir selectivamente la interacción de β-catenina con un coactivador particular, lo que reduce potencialmente la transcripción que inhibiría la reprogramación o favorecería la diferenciación. La interrupción selectiva puede cambiar el equilibrio hacia la interacción con un coactivador diferente para formar un complejo que mejora la reprogramación. El agente puede actuar directamente sobre el complejo o indirectamente, por ejemplo, al causar modificación postraducciona tal como la fosforilación de β-catenina o un coactivador. El agente puede ser un compuesto descrito en la Patente Pub. de EE.UU. núm. 20070128669 o un análogo o derivado del mismo, o un agente que tiene el mismo mecanismo de acción. La proteína que interactúa con β-catenina (también conocida como ICAT o CTNNBIP1) se une a β-catenina e inhibe la interacción entre β-catenina y miembros de la familia TCF (Gottardi, y otros, Am J Physiol Cell Physiol. 286(4):C747-56, 2004). La proteína codificada es un regulador negativo de la vía de señalización de Wnt. Los métodos descritos en la presente descripción abarcan la inhibición de ICAT (término que incluye cualquier variante de transcripción o miembros de la familia que inhiben la interacción de β-catenina y TCF) con el fin de activar la vía Wnt. En ciertos métodos descritos en la presente descripción, el agente que activa una vía Wnt lo hace al inhibir la expresión o actividad de un inhibidor endógeno o regulador negativo de la vía Wnt. En ciertos métodos descritos en la presente descripción, el agente inhibe la expresión por interferencia de ARN (ARNi). En algunas modalidades, el agente inhibe la expresión o actividad de GSK3, ICAT, CK1 o CTNNBIP1.

En algunas modalidades, un inhibidor útil en la presente invención es un agente de ARNi. Un experto en la materia podrá identificar un agente de ARNi apropiado para inhibir la expresión de un gen de interés. Ver, por ejemplo, Yu, JY., y otros Molecular Therapy, 7(2):228-236, 2003. El agente de ARNi puede inhibir la expresión lo suficiente como para reducir el nivel promedio en estado estacionario del ARN transcrito a partir del gen (por ejemplo, ARNm) o su proteína codificada, por ejemplo, al menos en 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más). El agente de ARNi puede contener una secuencia entre 17-29 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 19-23 nucleótidos de longitud que es 100% complementaria al ARNm o contiene hasta 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos, o hasta aproximadamente 10-30 % de nucleótidos, que no participan en pares de bases Watson-Crick cuando se alinean con el ARNm para lograr el número máximo de pares de bases complementarias. El agente de ARNi puede contener un dúplex entre 17-29 nucleótidos de longitud en el cual todos los nucleótidos participan en pares de bases Watson-Crick o en el cual hasta

aproximadamente el 10-30 % de los nucleótidos no participan en un par de bases Watson-Crick. Un experto en la técnica sabrá qué características de secuencia se asocian a menudo con una funcionalidad superior de ARNs y los algoritmos y reglas mediante los cuales pueden diseñarse tales ARNs (ver, por ejemplo, Jagla, B., y otros, ARN, 11(6): 864-72, 2005). Los métodos de la invención pueden, pero no necesariamente, emplear ARNs que tengan tales características. En algunas modalidades, la secuencia de una o ambas cadenas del agente de ARNi se elige para evitar silenciar genes no diana, por ejemplo, la cadena o cadenas pueden tener menos del 70 %, 80 % o 90 % de complementariedad con cualquier ARNm distinto del ARNm diana. En algunas modalidades, se usan múltiples secuencias diferentes. La Tabla 1 enumera las ID de genes de humanos y de ratón que codifican GSK3 y los números de acceso a la secuencia de ácidos nucleicos (ARNm) y proteínas. Los agentes de ARNi capaces de silenciar genes de mamíferos están disponibles comercialmente (por ejemplo, de proveedores como Qiagen, Dharmacon, Invitrogen, etc.). Si existen múltiples isoformas, pueden diseñarse ARNs o ARNs dirigidos contra una región presente en todas las isoformas expresadas en una célula de interés dada.

Los métodos para silenciar genes mediante la transfección de células con ARNs o constructos que codifican ARNs se conocen en la técnica. Para expresar un agente de ARNi en células somáticas, puede introducirse en las células un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el agente de ARNi, operativamente unido a elementos de control de expresión adecuados, por ejemplo, un promotor, como se conoce en la técnica. Para los fines de la presente invención, un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un ARN o polipéptido de interés, la secuencia que está operativamente unida a elementos de control de la expresión, como un promotor que dirige la transcripción en una célula de interés, se denomina "casete de expresión". El promotor puede ser un promotor de ARN polimerasa I, II o III funcional en células somáticas de mamíferos. En ciertas modalidades, la expresión del agente de ARNi es condicional. En algunas modalidades, la expresión se regula al colocar la secuencia que codifica el agente de ARNi bajo el control de un promotor regulable (por ejemplo, inducible o reprimible).

Además, son útiles las versiones constitutivamente activas de proteínas tales como la  $\beta$ -catenina u otros componentes de la vía de señalización de Wnt. El truncamiento N-terminal o la delección del sitio potencial de fosforilación de GSK-3 en la región N-terminal o una mutación sin sentido de residuos de serina o treonina en los mismos resulta en la acumulación de  $\beta$ -catenina truncada o de tamaño normal y luego en la activación de señal mediada por  $\beta$ -catenina (de La Coste PNAS, 95(15): 8847-8851, 1998). Son útiles, además, las versiones negativas dominantes de proteínas endógenas que inhiben la señalización de Wnt. En algunas modalidades, las células somáticas están modificadas por ingeniería genética para expresar estas proteínas. En algunas modalidades, la proteína se añade al medio de cultivo.

En algunas modalidades, las células se tratan para potenciar la absorción de un activador de la vía Wnt que actúa intracelularmente. Por ejemplo, la membrana celular puede estar parcialmente permeabilizada. En algunas modalidades, un activador de la vía Wnt se modifica para comprender una secuencia de aminoácidos que mejora la captación celular de moléculas por las células (también denominado "dominio de transducción de proteínas"). Dichas secuencias de aminoácidos que mejoran la absorción se encuentran, por ejemplo, en la proteína TAT del VIH-1, la proteína de unión al ADN del virus del herpes simple 1 (HSV-1) VP22, el factor de transcripción Drosophila Antennapedia (Antp), etc. Las secuencias artificiales también son útiles. Ver, por ejemplo, Fischer y otros, Bioconjugate Chem., Vol. 12, No. 6, 2001 y la patente de EE.UU. núm. 6,835,810.

Las composiciones y enfoques descritos en la Patente Pub. de EE.UU. núm. 20060147435 como útiles para promover la señalización de Wnt / $\beta$ -catenina pueden usarse en los métodos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de la invención, las células somáticas se tratan de manera que expresen una proteína Wnt a niveles mayores que como sería sin dicho tratamiento. En algunas modalidades, las células somáticas se modifican genéticamente para expresar de forma estable o transitoria una proteína Wnt a niveles mayores que como sería sin dicho tratamiento. En algunas modalidades de la invención, las células somáticas se tratan de manera que expresen un componente de la vía Wnt tal como  $\beta$ -catenina o un TCF/LEF a niveles mayores que como sería sin dicho tratamiento. En algunas modalidades de la invención, las células somáticas se modifican genéticamente para expresar de manera estable o transitoria un componente de la vía Wnt tal como  $\beta$ -catenina o un TCF/LEF a niveles mayores que como sería sin dicho tratamiento.

Los métodos de la invención pueden incluir el tratamiento de las células con múltiples agentes de reprogramación de forma concurrente (es decir, durante períodos de tiempo que se solapan al menos en parte) o secuencialmente y/o repetir las etapas de tratamiento de las células con un agente. El agente que se usa en el tratamiento repetido puede ser el mismo o diferente del que se usa durante el primer tratamiento. Las células pueden ponerse en contacto con un agente de reprogramación durante períodos de tiempo variables. En algunas modalidades, las células se ponen en contacto con el agente durante un período de tiempo entre 1 hora y 60 días, por ejemplo, entre 10 y 30 días, por ejemplo, durante aproximadamente 15-20 días. Pueden agregarse agentes de reprogramación cada vez que se reemplaza el medio de cultivo celular. Los agentes de reprogramación pueden eliminarse antes de realizar una selección para enriquecer las células pluripotentes o evaluar las características de pluripotencia de las células.

Los agentes de reprogramación o agentes candidatos de reprogramación de interés incluyen una variedad de compuestos. Los compuestos ilustrativos incluyen agentes que inhiben la desacetilación de histonas, por ejemplo, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) y agentes que inhiben la metilación de ADN, por ejemplo, inhibidores de

metiltransferasa de ADN. Sin desear limitarse por la teoría, la desmetilación del ADN puede regular la expresión génica al "abrir" la estructura de la cromatina detectable a medida que aumenta la sensibilidad a la nucleasa. Esta remodelación de la estructura de la cromatina permite que los factores de transcripción se unan a las regiones promotoras, el ensamblaje del complejo de transcripción y la expresión génica.

Las principales clases de inhibidores de HDAC incluyen (a) ácidos grasos de cadena pequeña (por ejemplo, ácido valproico); (b) inhibidores de moléculas pequeñas de hidroxamato (por ejemplo, SAHA y PXD101); (c) inhibidores de molécula pequeña no hidroxamato, por ejemplo, MS-275; y (d) Péptidos cíclicos: por ejemplo, depsipéptido (ver, por ejemplo, Carey N y La Thangue NB, *Curr Opin Pharmacol.*; 6(4):369-75, 2006). Los ejemplos de inhibidores de histona desacetilasa incluyen Tricostatina A: [R-(E,E)]-7-[4-(Dimetilamino)fenil]-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida, que inhibe la histona desacetilasa a concentraciones nanomolares; la hiperacetilación de histonas resultante conduce a la relajación de la cromatina y la modulación de la expresión génica. (Yoshida, M., y otros, *Bioessays* 17, 423-430, 1995; Minucci, S., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11295-11300, 1997; Brehm, A., y otros, 1998; Medina, V., y otros, *Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. Cancer Res.* 57, 3697-3707, 1997; Kim, MS, y otros, *Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. Cancer Res.* 63, 7291-7300, 2003); Apicidin: Cyclo[(2S)-2-amino-8-oxodecanoyl-1-methoxy-L-tryptophyl-L-isoleucyl-(2R)-2-piperidinexcarbonyl] (Kwon, SH, y otros, *J. Biol. Chem.* 18, 2073, 2002; Han, JW, y otros, *Cancer Res.* 60, 6068, 2000; Colletti, SL, y otros, *Bioorg. Med. Chem.* 11, 107, 2001; Kim, JS y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 866, 2001).

Se conoce una variedad de inhibidores de metilación del ADN en la técnica y son útiles en la invención. Ver, por ejemplo, Lyko, F. y Brown, R., *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 97(20):1498-1506, 2005. Los inhibidores de la metilación del ADN incluyen inhibidores de la metiltransferasa de nucleósidos de ADN como la decitabina (2'-desoxi-5-azacitidina), 5-azadeoxicitidina y zebularina, inhibidores no nucleósidos como el polifenol (-)-epigalaloquina-3-galato (EGCG) y la molécula pequeña RG108 (ácido 2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)-3-(1H-indol-3-il)propanoico), compuestos descritos en el documentos núm. WO2005085196 y ftalamidas, succinimidas y compuestos relacionados como se describe en el documento núm. WO2007007054. Tres clases adicionales de compuestos son: (1) derivados del ácido 4-aminobenzoico, tales como el fármaco antiarrítmico procainamida y el anestésico local procaína; (2) las psamaplinas, que además, inhiben la histona desacetilasa (Pina, IC, *J Org Chem.*, 68(10):3866-73, 2003); y (3) oligonucleótidos, incluidos ARNs, ARNs y oligonucleótidos antisentido específicos, tales como MG98. Los inhibidores de la metilación del ADN pueden actuar mediante una variedad de mecanismos diferentes. Los inhibidores de nucleósidos se metabolizan por vías celulares antes de incorporarse al ADN. Después de la incorporación, ellos funcionan como sustratos suicidas para las enzimas DNMT. Se ha propuesto que los inhibidores no nucleósidos procaína, epigalocatequina-3-galato (EGCG) y RG108 inhiben las metiltransferasas de ADN por enmascaramiento de secuencias diana de DNMT (es decir, procaína) o por bloqueo del sitio activo de la enzima (es decir, EGCG y RG108). En algunas modalidades de la invención, se usan combinaciones de inhibidores de metilación del ADN. En algunas modalidades, las concentraciones se seleccionan para minimizar los efectos tóxicos sobre las células. En algunas modalidades, no se usan agentes que se incorporan al ADN (o cuyos productos metabólicos se incorporan al ADN).

La ADN metiltransferasa (DNMT1, 3a y/o 3b) y/o uno o más miembros de la familia HDAC pueden inhibirse de manera alternativa o adicional mediante el uso de agentes de ARNi.

Además, en la presente descripción se describe el uso de medio condicionado Wnt, Wnt soluble o moléculas pequeñas que modulan la vía de señalización de Wnt en combinación con otras señales transitorias, por ejemplo, moléculas pequeñas, que pueden reemplazar Oct4, Sox2, Klf4, Nanog y/o retrovirus Lin28 en la reprogramación de células somáticas a la pluripotencia. Además, en la presente descripción se describe una composición que comprende un modulador de la vía Wnt y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: inhibidores de HDAC e inhibidores de metilación de ADN. Además, en la presente descripción se describe una composición que comprende un modulador de la vía Wnt, al menos un inhibidor de HDAC y al menos un inhibidor de metilación del ADN. Además, en la presente descripción se describe un medio de cultivo celular que contiene cualquiera de las combinaciones de agentes anteriores. El inhibidor de HDAC puede ser cualquier inhibidor de HDAC mencionado anteriormente. El inhibidor de metilación del ADN puede ser cualquier inhibidor de HDAC mencionado anteriormente. El modulador de la vía Wnt puede activar la vía Wnt. El medio de cultivo celular puede comprender medio acondicionado Wnt, por ejemplo, Wnt3a-CM, como la fuente del modulador de la vía de Wnt. El modulador de la vía Wnt puede ser una molécula pequeña. La composición puede comprender células somáticas. Las células somáticas pueden modificarse por ingeniería genética para expresar al menos uno de los factores de transcripción Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 y Lin28.

Células Somáticas y Células Somáticas Reprogramadas

Las células somáticas útiles en la invención pueden ser células primarias (células no inmortalizadas), tales como las recién aisladas de un animal, o pueden derivarse de una línea celular capaz de una proliferación prolongada en cultivo (por ejemplo, durante más de 3 meses) o proliferación indefinida (células inmortalizadas). Las células somáticas adultas pueden obtenerse a partir de individuos, por ejemplo, sujetos humanos, y cultivarse de acuerdo con protocolos de cultivo celular estándar disponibles para los expertos en la técnica. Las células pueden mantenerse en cultivo

celular después de su aislamiento de un sujeto. En ciertas modalidades, las células se pasan una o más veces después de su aislamiento del individuo (por ejemplo, entre 2-5, 5-10, 10-20, 20-50, 50-100, veces o más) antes de su uso en un método de la invención. Ellas pueden congelarse y descongelarse posteriormente antes de su uso. En algunas modalidades, las células se habrán pasado no más de 1, 2, 5, 10, 20 o 50 veces después de su aislamiento del individuo antes de su uso en un método de la invención.

Las células somáticas de mamíferos útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, células humanas, células de primates no humanas o células de ratón. Pueden obtenerse por métodos bien conocidos a partir de varios órganos, por ejemplo, piel, pulmón, páncreas, hígado, estómago, intestino, corazón, órganos reproductivos, vejiga, riñón, uretra y otros órganos urinarios, etc., generalmente a partir de cualquier órgano o tejido que contiene células somáticas vivas. Las células somáticas de mamíferos útiles en diversas modalidades de la presente invención incluyen, por ejemplo, fibroblastos, células madre adultas, células de Sertoli, células de granulosa, neuronas, células de islotes pancreáticos, células epidérmicas, células epiteliales, células endoteliales, hepatocitos, células del folículo piloso, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (linfocitos B y T), eritrocitos, macrófagos, monocitos, células mononucleares, células del músculo cardíaco, células del músculo esquelético, etc., generalmente cualquier célula somática viva.

Las células somáticas pueden tratarse para hacer que expresen o contengan uno o más factores de reprogramación, factor de pluripotencia y/o factor inductor de pluripotencia, a niveles mayores que como sería en ausencia de dicho tratamiento. Por ejemplo, las células somáticas pueden modificarse por ingeniería genética para expresar uno o más genes que codifican uno o más de tales factores y/o pueden tratarse con uno o más agentes que aumentan la expresión de uno o más genes endógenos que codifican tales factores y/o estabilizan tales factores. El agente podría ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido, etc. En algunas modalidades, factores tales como los factores de pluripotencia se introducen en las células somáticas, por ejemplo, por microinyección o al poner en contacto las células con los factores en condiciones en las cuales las células toman esos factores. En algunas modalidades, los factores se modifican para incorporar un dominio de transducción de proteínas. En algunas modalidades, las células se permeabilizan o se tratan de otra manera para aumentar su absorción de los factores. A continuación, se discuten factores ilustrativos.

El factor de transcripción Oct4 (también llamado Pou5f1, Oct-3, Oct3/4) es un ejemplo de factor de pluripotencia. Se ha demostrado que Oct4 es necesario para establecer y mantener el fenotipo indiferenciado de las células ES y desempeña un papel importante en la determinación de eventos tempranos en la embriogénesis y la diferenciación celular (Nichols y otros, 1998, Cell 95:379-391; Niwa y otros, 2000, Nature Genet. 24:372-376). La expresión de Oct4 se regula negativamente a medida que las células madre se diferencian en células más especializadas. Nanog es otro ejemplo de factor de pluripotencia. Nanog es un factor de transcripción que contiene homeobox con una función esencial en el mantenimiento de las células pluripotentes de la masa celular interna y en la derivación de las células ES a partir de ellas. Además, la sobreexpresión de Nanog es capaz de mantener la pluripotencia y las características de autorrenovación de las ESC bajo lo que normalmente serían condiciones de cultivo que inducen la diferenciación. (Ver Chambers y otros, 2003, Cell 113: 643-655; Mitsui y otros, Cell. 2003, 113(5):631-42). Sox2, otro factor de pluripotencia, es un factor de transcripción que contiene el dominio HMG que se sabe que es esencial para el desarrollo y mantenimiento normal de células pluripotentes (Avilion, A., y otros, Genes Dev. 17, 126-140, 2003). Klf4 es un factor de transcripción de dedos de zinc tipo Krüppel inicialmente identificado como un miembro de la familia Klf que se expresa en el intestino (Shields, J.M, y otros, J. Biol. Chem. 271:20009-20017, 1996). Se descubrió que la sobreexpresión de Klf4 en células ES de ratón previene la diferenciación en cuerpos embrioides formados en cultivo en suspensión, lo que sugiere que Klf4 contribuye a la auto renovación de ES (Li, Y., y otros, Blood 105:635-637, 2005). Sox2 es un miembro de la familia de factores de transcripción de SOX (región Y-caja determinante del sexo) y es importante para mantener la autorrenovación de las células ES. c-Myc es un factor de transcripción que desempeña una miríada de papeles en el desarrollo normal y la fisiología, además de ser un oncogén cuya expresión o mutación desregulada está implicada en varios tipos de cáncer (revisado en Pelengaris S, Khan M., Arch Biochem Biophys. 416(2):129-36, 2003; Cole MD, Nikiforov MA, Curr Top Microbiol Immunol., 302:33-50, 2006). En algunas modalidades, tales factores se seleccionan de: Oct4, Sox2, Klf4 y combinaciones de los mismos. En algunas modalidades, un miembro diferente de la familia Klf que se solapa funcionalmente, como Klf2, se sustituye por Klf4. En algunas modalidades, los factores incluyen al menos Oct4. En algunas modalidades, los factores incluyen al menos Oct4 y un miembro de la familia Klf, por ejemplo, Klf2. Lin28 es una proteína de unión al ARN regulada por el desarrollo. En algunas modalidades, las células somáticas se tratan de manera que expresen o contengan uno o más factores de reprogramación seleccionados de: Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28 y combinaciones de los mismos. La CCAAT/proteína alfa potenciadora de unión (C/EBPalpha) es otra proteína que promueve la reprogramación al menos en ciertos tipos de células, por ejemplo, las células linfoides tales como las células de linaje B, se considera un factor de reprogramación para tales tipos de células, y es útil en ciertas modalidades de la invención, por ejemplo, en combinación con uno o más de los genes de pluripotencia y/o moduladores de la vía de Wnt descritos en la presente descripción.

Otros genes de interés están involucrados en la remodelación de la cromatina y/o se ha demostrado que son importantes para mantener la pluripotencia de las células ES. Opcionalmente, el gen es uno que se regula negativamente a medida que las células se diferencian y/o no se expresa en células somáticas adultas. Otros genes de interés codifican precursores de microARN que se han asociado con multipotencia o pluripotencia y/o que se

expresan naturalmente en células multipotentes o pluripotentes. Otros genes de interés incluyen codificar agentes de ARNi que inhiben genes que son dianas de microARN endógenos que se expresan naturalmente en células multipotentes o pluripotentes.

- 5 En una modalidad, el gen introducido de forma exógena puede expresarse a partir de un locus cromosómico distinto del locus cromosómico de un gen endógeno cuya función está asociada con la pluripotencia. Tal locus cromosómico puede ser un locus con estructura de cromatina abierta y contener genes cuya expresión no se requiere en las células somáticas, por ejemplo, el locus cromosómico contiene genes cuya interrupción no hará que las células mueran. Los loci cromosómicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, el locus ROSA 26 de ratón y el locus de colágeno tipo II (Col2a1) (ver Zambrowicz y otros, 1997).

10 Los métodos para expresar genes en células se conocen en la técnica. Generalmente, una secuencia que codifica un polipéptido o ARN funcional tal como un agente de ARNi está operativamente unida a secuencias reguladoras apropiadas. El término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Se describen secuencias reguladoras ilustrativas en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar ADNc.

15 El gen introducido de manera exógena puede expresarse a partir de una secuencia reguladora inducible o reprimible de manera que su expresión pueda regularse. El término "secuencia reguladora inducible", como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia reguladora que, en ausencia de un inductor (tal como un agente químico y/o biológico) o una combinación de inductores, no dirige la expresión o dirige niveles bajos de expresión de una secuencia de ácidos nucleicos unida operativamente, tal como un ADNc, y, en respuesta a un inductor, se mejora su capacidad para dirigir la expresión. Los promotores inducibles ilustrativos incluyen, por ejemplo, promotores que responden a metales pesados (CRC Boca Raton, Fla. (1991), 167-220; Brinster y otros, Nature (1982), 296, 39-42), a los choques térmicos, a las hormonas (Lee y otros, P.N.A.S. USA (1988), 85, 1204-1208; (1981), 294, 228-232; Klock y otros, Nature (1987), 329, 734-736; Israel y Kaufman, Nucleic Acids Res. (1989), 17, 2589-2604), promotores que responden a agentes químicos, como glucosa, lactosa, galactosa o antibióticos. Una "secuencia reguladora reprimible" es aquella que dirige la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos unida operativamente en ausencia de un agente específico o combinación de agentes que inhiben la expresión.

20 Un promotor inducible por tetraciclina es un ejemplo de un promotor inducible que responde a un antibiótico. Ver Gossen, M. y Bujard, H., Annu Rev Genet. Vol. 36: 153-173 2002 y referencias en el mismo. El promotor inducible por tetraciclina comprende un promotor mínimo unido operativamente a uno o más operadores de tetraciclina. La presencia de tetraciclina o uno de sus análogos conduce a la unión de un activador de la transcripción a las secuencias del operador de tetraciclina, lo cual activa el promotor mínimo y, por lo tanto, la transcripción del ADNc asociado. El análogo de tetraciclina incluye cualquier compuesto que muestra similitud estructural con la tetraciclina y es capaz de activar un promotor inducible por tetraciclina. Los análogos de tetraciclina ilustrativos incluyen, por ejemplo, doxiciclina, clorotetraciclina y anhidrotetraciclina.

25 En algunas modalidades de la invención, la expresión de un gen introducido, por ejemplo, un gen que codifica un factor de reprogramación o un agente de ARNi es transitoria. La expresión transitoria puede lograrse mediante transfección transitoria o mediante la expresión de un promotor regulable. En algunas modalidades, la expresión puede regularse por, o depende de, la expresión de una recombinasa específica del sitio. Los sistemas de recombinasa incluyen los sistemas Cre-Lox y Flp-Frt, entre otros (Gossen, M. y Bujard, H., 2002). En algunas modalidades, se usa una recombinasa para activar la expresión mediante la eliminación de una secuencia de detención que de otro modo separaría la secuencia de codificación de las secuencias de control de la expresión. En algunas modalidades, se usa una recombinasa para escindir al menos una porción de un gen después de que se ha inducido la pluripotencia. En algunas modalidades, la recombinasa se expresa de forma transitoria, por ejemplo, se vuelve indetectable después de aproximadamente 1-2 días, 2-7 días, 1-2 semanas, etc. En algunas modalidades, la recombinasa se introduce de fuentes externas. Opcionalmente, la recombinasa en estas modalidades es un dominio de transducción de proteínas.

30 Las células somáticas reprogramadas pueden evaluarse para una o más características de pluripotencia. La presencia de características de pluripotencia indica que las células somáticas se han reprogramado a un estado pluripotente. El término "características de pluripotencia", como se usa en la presente descripción, se refiere a características asociadas e indicativas de pluripotencia, que incluyen, por ejemplo, la capacidad de diferenciarse en células derivadas de las tres capas germinales embrionarias de todos los tipos y un patrón de expresión génica distinto para una célula pluripotente, incluida la expresión de factores de pluripotencia y la expresión de otros marcadores de células ES.

35 Para evaluar las características de pluripotencia de las células somáticas potencialmente reprogramadas, pueden analizarse las características particulares de crecimiento y la morfología de las células similares a ES. Las células pueden inyectarse por vía subcutánea en ratones SCID inmunocomprometidos para determinar si inducen teratomas (un ensayo estándar para células ES). Las células similares a ES se pueden diferenciar en cuerpos embrioides (otra característica específica de ES). Además, las células similares a ES pueden diferenciarse in vitro mediante la adición de ciertos factores de crecimiento que se sabe que impulsan la diferenciación en tipos celulares específicos. La

capacidad de autorrenovación, marcada por la inducción de la actividad de la telomerasa, es otra característica de la pluripotencia que puede controlarse. Pueden realizarse ensayos funcionales de las células somáticas reprogramadas al introducirlas en blastocistos y determinar si las células son capaces de dar lugar a todos los tipos de células. Ver Hogan y otros, 2003. Si las células reprogramadas son capaces de formar unos cuantos tipos de células del cuerpo, ellas son multipotentes; Si las células reprogramadas son capaces de formar todos los tipos de células del cuerpo, incluidas las células germinales, ellas son pluripotentes.

Además, puede examinarse la expresión de un factor individual de pluripotencia en las células somáticas reprogramadas para evaluar sus características de pluripotencia. Adicionalmente o alternativamente, uno puede evaluar la expresión de otros marcadores de células ES. Los antígenos embrionarios 15 estadio específicos -1, -3 y -4 (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4) son glucoproteínas expresadas específicamente en el desarrollo embrionario temprano y son marcadores de células ES (Solter y Knowles, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5565-5569; Kannagi y otros, 1983, EMBO J 2: 2355-2361). La expresión elevada de la enzima fosfatasa alcalina (AP) es otro marcador asociado con células madre embrionarias indiferenciadas (Wobus y otros, 1984, Exp. Cell 152:212-219; Pease y otros, 1990, Dev. Biol. 141:322-352). Se describen marcadores de células ES adicionales en Ginis, I., y otros, Dev. Biol., 269: 369-380, 2004 y en The International Stem Cell Initiative, Adewumi O, y otros, Nat Biotechnol., 25(7):803-16, 2007 y referencias allí. Por ejemplo, TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 y GCT343, y los antígenos proteicos CD9, Thy1 (también conocido como CD90), HLA clase 1, NANOG, TDGF1, DNMT3B, GABRB3 y GDF3, REX-1, TERT, UTF-1, TRF-1, TRF-2, connexin43, connexin45, Foxd3, FGFR-4, ABCG-2 y Glut-1 son de utilidad.

Pueden realizarse perfiles de expresión de las células somáticas reprogramadas para evaluar sus características de pluripotencia. Se sabe que las células pluripotentes, tales como las células madre embrionarias, y las células multipotentes, tales como las células madre adultas, tienen un patrón distinto de expresión génica global. Ver, por ejemplo, Ramalho-Santos y otros, Science 298:597-600, 2002; Ivanova y otros, Science 298:601-604, 2002; Boyer, LA, y otros, Nature 441, 349, 2006, y Bernstein, BE, y otros, Cell 125 (2), 315, 2006. Puede evaluarse la metilación del ADN, la expresión génica y/o el estado epigenético del ADN celular, y/o el potencial de desarrollo de las células, por ejemplo, como se describe en Wernig, M., y otros, Nature, 448:318-24, 2007. Las células que son capaces de formar teratomas que contienen células que tienen características de endodermo, mesodermo y ectodermo cuando se inyectan en ratones SCID y/o poseen la capacidad de participar (después de la inyección en blastocistos murinos) en la formación de quimeras que sobreviven a término se consideran pluripotentes. Otro método útil para evaluar la pluripotencia es determinar si las células han reactivado un cromosoma X silente.

Las células somáticas pueden reprogramarse para obtener un conjunto completo de las características de pluripotencia. Alternativamente, las células somáticas pueden reprogramarse para obtener solo un subconjunto de las características de pluripotencia.

Ciertos métodos de la invención incluyen una etapa de selección de células que expresan un marcador que se expresa por células multipotentes o pluripotentes. El marcador puede expresarse específicamente en tales células. Pueden usarse métodos estándar de separación celular, por ejemplo, citometría de flujo, separación por afinidad, etc. Alternativa o adicionalmente, podrían seleccionarse células que no expresan marcadores característicos de las células somáticas de las cuales se derivaron las células potencialmente reprogramadas y que no se expresan en las células ES generadas mediante el uso de métodos convencionales. Otros métodos de separación de células pueden usar diferencias en el tamaño o densidad promedio de las células, que pueden existir entre las células pluripotentes y las células somáticas. Por ejemplo, las células pueden filtrarse a través de materiales que tienen poros que permitirán que solo pasen ciertas células.

En algunas modalidades, las células somáticas contienen un ácido nucleico que comprende secuencias reguladoras de un gen que codifica un factor de pluripotencia unido operativamente a un marcador seleccionable o detectable (por ejemplo, GFP o neo). La secuencia de ácidos nucleicos que codifica el marcador puede estar integrada en el locus endógeno del gen que codifica el factor de pluripotencia (por ejemplo, Oct4) o el constructo puede comprender secuencias reguladoras unidas operativamente al marcador. La expresión del marcador puede usarse para seleccionar, identificar y/o cuantificar células reprogramadas.

Cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción que se relacionan con la generación de una célula somática reprogramada puede incluir una etapa de obtener una célula somática u obtener una población de células somáticas de un individuo que necesita terapia celular. Las células somáticas reprogramadas se generan, seleccionan o identifican entre las células obtenidas o las células que descienden de las células obtenidas. Opcionalmente, las células se expanden en cultivo antes de generar, seleccionar o identificar células somáticas reprogramadas genéticamente adaptadas al donante.

Las colonias pueden subclonarse y/o pasarse una o más veces con el fin de obtener una población de células enriquecidas para células similares a ES. La población enriquecida puede contener al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, por ejemplo, 100 % de células similares a ES. En la presente descripción se describen líneas celulares de células somáticas que se han reprogramado de manera estable y hereditaria a un estado similar a ES.

En algunas modalidades, los métodos se practican mediante el uso de células somáticas que no están modificadas por ingeniería genética para identificar o seleccionar células reprogramadas. Las células somáticas reprogramadas resultantes no contienen material genético exógeno que se haya introducido en dichas células (o antepasados de dichas células) por la mano del hombre, por ejemplo, con el fin de identificar o seleccionar células reprogramadas. En algunas modalidades, las células somáticas y las células somáticas reprogramadas derivadas de ellas sí contienen material genético exógeno en su genoma, pero dicho material genético se introduce con el fin de corregir un defecto genético en tales células o para permitir que esas células sinteticen una proteína deseada con fines terapéuticos y no se usa para identificar o seleccionar células reprogramadas.

En algunas modalidades, los métodos emplean criterios morfológicos para identificar células somáticas reprogramadas entre una población de células somáticas que no están reprogramadas. En algunas modalidades, los métodos emplean criterios morfológicos para identificar células somáticas que se han reprogramado a un estado similar a ES entre una población de células que no están reprogramadas o están reprogramadas solo parcialmente a un estado similar a ES. Los "criterios morfológicos" se usan en un sentido amplio para referirse a cualquier característica visualmente detectable de las células o colonias. Los criterios morfológicos incluyen, por ejemplo, la forma de las colonias, la nitidez de los límites de las colonias, la densidad, el tamaño pequeño y la forma redondeada de las células en relación con las células no reprogramadas, etc. La Figura 1 muestra colonias de células que muestran criterios morfológicos indicativos de células que han sido reprogramadas a un estado similar a ES. Nótese las colonias densas compuestas de células pequeñas y redondeadas, y los límites definidos de las colonias. La invención abarca la identificación y, opcionalmente, el aislamiento de colonias (o células de colonias) en donde las colonias muestran una o más de tales características. Las células somáticas reprogramadas pueden identificarse como colonias que crecen en una primera placa de cultivo celular (término que se refiere a cualquier vaso, placa, plato, receptáculo, contenedor, etc., en el cual las células vivas pueden mantenerse *in vitro*) y las colonias, o sus porciones, transferidos a una segunda placa de cultivo celular, para aislar así las células somáticas reprogramadas. Las células pueden entonces expandirse aún más.

Métodos de detección de un agente que reprograma o contribuye a la reprogramación de células somáticas

En la presente descripción se describen métodos para identificar un agente que, solo o en combinación con uno o más agentes, reprograma las células somáticas a un estado menos diferenciado. Además, se describen agentes identificados de acuerdo con los métodos. Los métodos pueden comprender poner en contacto las células somáticas con un activador de la vía Wnt y un agente candidato y determinar si la presencia del agente candidato da como resultado una reprogramación mejorada (por ejemplo, una mayor velocidad y/o eficiencia de reprogramación) en relación con lo que ocurriría si las células no se hubieran puesto en contacto con el agente candidato. El activador de Wnt y el agente candidato pueden estar presentes juntos en el medio de cultivo celular o el activador de Wnt y el agente candidato pueden no estar presentes juntos (por ejemplo, las células se exponen a los agentes secuencialmente). Las células pueden mantenerse en cultivo durante, por ejemplo, al menos 3 días, al menos 5 días, hasta 10 días, hasta 15 días, hasta 30 días, etc., tiempo durante el cual ellas se ponen en contacto con el activador Wnt y el agente candidato durante todo el tiempo o durante una parte del tiempo. El agente puede identificarse como un agente que reprograma células si hay al menos 2, 5 o 10 veces más células o colonias reprogramadas que comprenden predominantemente células reprogramadas después de dicho período de tiempo que si las células no se hubieran puesto en contacto con el agente.

Un agente candidato puede ser cualquier molécula o complejo supramolecular, por ejemplo, un polipéptido, un péptido (que se usa en la presente descripción para referirse a un polipéptido que contiene 60 aminoácidos o menos), una pequeña molécula orgánica o inorgánica (es decir, moléculas que tienen un peso molecular inferior a 1500 Da, 1000 Da o 500 Da), polisacárido, polinucleótido, etc., que se probará para determinar la capacidad de reprogramar las células. Los agentes candidatos pueden ser moléculas orgánicas, particularmente moléculas orgánicas pequeñas, que comprenden grupos funcionales que median interacciones estructurales con proteínas, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y opcionalmente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos químicos funcionales y/o heteroátomos.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, como apreciarán los expertos en la técnica, incluidas las bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Los agentes candidatos pueden ser compuestos sintéticos. Existen numerosas técnicas disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas. Los moduladores candidatos pueden proporcionarse como mezclas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, caldos de fermentación, medios acondicionados, etc., que están disponibles o se producen fácilmente.

Puede examinarse una biblioteca de compuestos. Una biblioteca es típicamente una colección de compuestos que pueden presentarse o mostrarse de manera que los compuestos puedan identificarse en un ensayo de selección. Los compuestos en la biblioteca pueden alojarse en pozos individuales (por ejemplo, de placas de microtitulación), recipientes, tubos, etc., para facilitar la transferencia conveniente a los pocillos individuales o recipientes para contactar células, realizar ensayos sin células, etc. La biblioteca puede estar compuesta por moléculas que tienen características

estructurales comunes que difieren en el número o tipo de grupo unido a la estructura principal o pueden ser completamente aleatorias. Las bibliotecas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, bibliotecas de exhibición de fagos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de polisomas, bibliotecas de aptámeros, bibliotecas de moléculas pequeñas sintéticas, bibliotecas de compuestos naturales y bibliotecas químicas. Los métodos para preparar bibliotecas de moléculas se conocen bien en la técnica y muchas bibliotecas están disponibles de fuentes comerciales o no comerciales. Las bibliotecas de interés incluyen bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas. Las bibliotecas, tales como las bibliotecas sintéticas de moléculas pequeñas y las bibliotecas químicas, pueden comprender una colección estructuralmente diversa de moléculas químicas. Las moléculas pequeñas incluyen moléculas orgánicas que a menudo tienen múltiples enlaces carbono-carbono. Las bibliotecas pueden comprender estructuras de carbono cíclico o heterocíclico y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos funcionales. La molécula pequeña puede tener entre 5 y 50 átomos de carbono, por ejemplo, entre 7 y 30 carbonos. Los compuestos pueden ser macrocíclicos. Las bibliotecas de interés incluyen, además, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de oligonucleótidos aleatorizados y similares. Pueden sintetizarse bibliotecas de peptoides y de restos sintéticos no peptídicos. Además, pueden sintetizarse tales bibliotecas que contienen restos sintéticos no peptídicos que están menos sujetos a la degradación enzimática en comparación con sus homólogos naturales. También pueden generarse bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Una biblioteca combinatoria de compuestos orgánicos pequeños puede comprender una colección de análogos estrechamente relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad y se sintetizan mediante técnicas orgánicas que usan procesos de etapas múltiples. Las bibliotecas combinatorias pueden incluir una gran cantidad de compuestos orgánicos pequeños. Una "matriz compuesta", como se usa en la presente descripción, es una colección de compuestos identificables por sus direcciones espaciales en coordenadas cartesianas y se disponen de tal manera que cada compuesto tiene un núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variable. Los compuestos en dicha matriz de compuestos se producen en paralelo en recipientes de reacción separados, con cada compuesto identificado y rastreado por su dirección espacial. Ejemplos de mezclas de síntesis paralelas y métodos de síntesis paralelos se proporcionan en la Patente de EE.UU. núm. 5,712,171. Pueden seleccionarse mezclas que contienen dos o más compuestos, extractos u otras preparaciones obtenidas de fuentes naturales (que pueden comprender docenas de compuestos o más), y/o compuestos inorgánicos, etc.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para seleccionar "fármacos aprobados". Un "fármaco aprobado" es cualquier compuesto (cuyo término incluye moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos) que ha sido aprobado para su uso en humanos por la FDA o una agencia gubernamental similar en otro país, para cualquier propósito. Esta puede ser una clase particularmente útil de compuestos para examinar porque representa un conjunto de compuestos que se consideran seguros y, al menos en el caso de fármacos aprobados por la FDA, terapéuticos para al menos un propósito. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de que estos fármacos sean al menos seguros para otros fines.

Los ejemplos representativos de bibliotecas que podrían examinarse incluyen DIVERSet™, disponible de ChemBridge Corporation, 16981 Via Tazon, San Diego, California, 92127. DIVERSet contiene entre 10 000 y 50 000 moléculas pequeñas sintetizadas a mano, similares a fármacos. Los compuestos se preseleccionan para formar una biblioteca "universal" que cubre la máxima diversidad de farmacóforos con el número mínimo de compuestos y es adecuada para el examen de alto rendimiento o de menor rendimiento. Para descripciones de bibliotecas adicionales, ver, por ejemplo, Tan, y otros, Am. Chem Soc. 120, 8565-8566, 1998; Floyd CD, Leblanc C, Whittaker M, Prog Med Chem 36:91-168, 1999. Numerosas bibliotecas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de AnalytiCon USA Inc., PO Box 5926, Kingwood, Tex. 77325; 3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 665 Stockton Drive, Suite 104, Exton, Pa. 19341-1151; Tripos, Inc., 1699 Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144-2913, etc. Por ejemplo, bibliotecas basadas en ácido quínico y ácido shiquímico, hidroxiprolina, santonina, dianhidro-D-glucitol, ácido hidroxipipecolínico y andrografólido, la biblioteca basada en ácido piperazin-2-carboxílico, citosina, etc., están disponibles comercialmente.

Los agentes candidatos pueden ser ADNc de una biblioteca de expresión de ADNc preparada a partir de células, por ejemplo, células pluripotentes. Dichas células pueden ser células madre embrionarias, ovocitos, blastómeros, teratocarcinomas, células germinales embrionarias, células de masa celular interna, etc.

Se apreciará que el agente candidato de reprogramación a probarse es típicamente uno que no está presente en un medio de cultivo estándar, o si está presente es en cantidades menores que cuando se usa en los métodos descritos en la presente descripción.

También se apreciará que un agente de reprogramación útil u otra forma de tratamiento de reprogramación no necesita ser capaz de reprogramar todos los tipos de células somáticas y no necesita ser capaz de reprogramar todas las células somáticas de un tipo celular dado. Sin limitación, es útil un agente candidato que da como resultado una población enriquecida para células reprogramadas por un factor de 2, 5, 10, 50, 100 o más (es decir, la fracción de células reprogramadas en la población es 2, 5, 10, 50, o 100 veces más que la presente en una población inicial de células tratadas de la misma manera, pero sin haber estado en contacto con el agente candidato).

El método de detección descrito en la presente descripción puede usarse para identificar un agente o combinación de agentes que sustituye a Klf4 en la reprogramación de células a un estado similar a ES. El método puede practicarse mediante el uso de células somáticas modificadas por ingeniería genética para expresar Sox2 y Oct4 y puestas en

contacto con un activador de la vía Wnt. El método puede usarse para identificar un agente que sustituya a Sox2 en la reprogramación de células a un estado similar a ES. El método puede practicarse mediante el uso de células somáticas modificadas por ingeniería genética para expresar Klf4 y Oct4 y puestas en contacto con un activador de la vía Wnt. El método puede usarse para identificar un agente que sustituya a Oct4 en la reprogramación de células a un estado similar a ES. El método puede practicarse mediante el uso de células somáticas modificadas por ingeniería genética para expresar Sox2 y Klf 4 y puestas en contacto con un activador de la vía Wnt. Se contempla que la expresión modificada por ingeniería genética de Klf4, Sox2, Oct4 y c-Myc se reemplaza mediante el tratamiento de células somáticas con una combinación de moléculas pequeñas y/o polipéptidos u otros agentes que no implican modificación del genoma. Los métodos pueden practicarse mediante el uso de células humanas. Los métodos pueden practicarse mediante el uso de células de ratón. Los métodos pueden practicarse mediante el uso de células de primates no humanas.

Ciertos métodos descritos en la presente descripción abarcan la prueba de moduladores de la vía Wnt, por ejemplo, bibliotecas de moléculas pequeñas conocidas o sospechosas de modular la vía Wnt, para identificar aquellas que son efectivas para mejorar la reprogramación y/o tienen una capacidad superior para mejorar la reprogramación de las células somáticas a la pluripotencia, por ejemplo, en relación con otros compuestos probados. Pueden probarse al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, o al menos 1000 moléculas pequeñas, por ejemplo, moléculas relacionadas estructuralmente, al menos algunas de las cuales se sabe o se cree que modulan la actividad de la vía Wnt. Puede usarse un inhibidor de Wnt para confirmar que un compuesto que mejora la reprogramación y se sospecha que lo hace mediante modulación de la actividad de la vía de Wnt, de hecho, actúa a través de la vía de Wnt. Por ejemplo, si el inhibidor de la vía Wnt bloquea el efecto de un compuesto de prueba en la reprogramación, puede concluirse que el compuesto de prueba actúa a través de la vía Wnt.

Los métodos y composiciones de la presente invención relacionados con la modulación de la vía de Wnt pueden aplicarse o usarse en combinación con varios otros métodos y composiciones útiles para la reprogramación de células somáticas y/o para identificar agentes de reprogramación para usar en la reprogramación de células somáticas. Por ejemplo, algunas modalidades de la invención emplean tipos de células (por ejemplo, células madre neurales o células progenitoras) que expresan de forma natural uno o más factores de reprogramación a niveles más altos que como dichos factores se expresan en muchos otros tipos de células (ver, por ejemplo, Eminli, y otros, *Reprogramming of Neural Progenitor Cells into iPS Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression*, *Stem Cells*. 2008 Jul. 17., epub antes de imprimir).

Los métodos y composiciones pueden usarse junto con los métodos y composiciones descritos en PCT/US2008/004516.

Se han derivado células somáticas 'secundarias' genéticamente homogéneas que portan factores de reprogramación como los transgenes definidos inducibles por doxiciclina (dox). Wernig, et al., *A novel drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types*. *Nature Biotechnology*; publicado en línea el 1 de julio de 2008; doi: 10.1038/nbt1483). Estas células se produjeron al infectar fibroblastos con lentivirus inducibles por dox, reprogramar por adición de dox, seleccionar células madre pluripotentes inducidas y producir ratones quiméricos. Las células derivadas de estas quimeras se reprograman tras la exposición a dox sin necesidad de infección viral con eficiencias de 25 a 50 veces mayores que las observadas mediante el uso de infección directa y selección de fármacos para la reactivación del marcador de pluripotencia. En algunas modalidades de la invención, tales células somáticas secundarias se usan en modalidades de la presente invención y/o las células somáticas secundarias se generan sin el uso del virus c-Myc al emplear la estimulación de la vía Wnt como se describe en la presente descripción. La presente invención contempla el uso de la modulación de la vía Wnt en composiciones y métodos relacionados con células somáticas secundarias.

En algunas modalidades de la invención, las células somáticas contienen una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable, unido operativamente a un promotor de un gen endógeno de pluripotencia, por ejemplo, Oct4 o Nanog. La secuencia que codifica el marcador puede integrarse en el genoma en el locus endógeno. El marcador seleccionable puede ser, por ejemplo, una proteína fácilmente detectable tal como una proteína fluorescente, por ejemplo, GFP o un derivado de la misma. La expresión del marcador es indicativa de reprogramación y, por lo tanto, puede usarse para identificar o seleccionar células reprogramadas, cuantificar la eficiencia de la reprogramación y/o para identificar, caracterizar o usar agentes que mejoran la reprogramación y/o se están probando sus capacidades para mejorar la reprogramación.

#### Células somáticas reprogramadas y sus usos

En la presente descripción se describen células somáticas reprogramadas (RSC), que incluyen células madre pluripotentes inducidas (células iPS), producidas por los métodos de la invención o por otros métodos descritos en la presente descripción. Estas células tienen numerosas aplicaciones en medicina, agricultura y otras áreas de interés, algunas de las cuales se describen en la presente descripción.

En la presente descripción se describen métodos para el tratamiento o prevención de una afección en un mamífero. Los métodos pueden implicar la obtención de células somáticas del individuo, reprogramar las células somáticas así

obtenidas por los métodos de la presente invención para obtener RSC, por ejemplo, células iPS. Las RSC se cultivan luego en condiciones adecuadas para su desarrollo en células de un tipo celular deseado. Las células desarrolladas del tipo de célula deseado se introducen en el individuo para tratar la afección. Alternativamente, los métodos comienzan con la obtención de células somáticas del individuo y reprogramar las células somáticas así obtenidas por los métodos de la presente invención. Luego, las RPC se cultivan en condiciones adecuadas para el desarrollo de las RPC en un órgano deseado, se cosechan y se introducen en el individuo para tratar la afección. La afección puede ser cualquier afección en la cual la función de la célula o del órgano es anormal y/o reducida por debajo de los niveles normales. Así, en la presente descripción se describe la obtención de células somáticas de un individuo que necesita terapia celular, la reprogramación de las células mediante un proceso que comprende activar una vía Wnt y/o cultivar las células en medio acondicionado Wnt, diferenciar opcionalmente las células somáticas reprogramadas para generar células de uno o más tipos de células deseadas, y la introducción de las células en el individuo. Un individuo que necesita terapia celular puede sufrir cualquier afección, en donde la afección o uno o más síntomas de la afección pueden aliviarse mediante la administración de células al donante y/o la progresión de la afección puede ralentizarse mediante la administración de células al individuo. El método puede incluir una etapa para identificar o seleccionar células somáticas reprogramadas y separarlas de las células que no están reprogramadas.

Las RSC pueden ser células similares a ES, denominadas, además, células iPS, y por lo tanto puede inducirse diferenciación para obtener los tipos de células deseados de acuerdo con métodos conocidos para diferenciar células ES. Por ejemplo, las células iPS pueden inducirse a diferenciación en células madre hematopoyéticas, células musculares, células musculares cardíacas, células hepáticas, células pancreáticas, células de cartílago, células epiteliales, células del tracto urinario, células del sistema nervioso (por ejemplo, neuronas), etc., mediante el cultivo de tales células en medio de diferenciación y en condiciones que proporcionan la diferenciación celular. El medio y los métodos que dan como resultado la diferenciación de las células madre embrionarias obtenidas mediante el uso de métodos tradicionales son conocidos en la técnica, igual que las condiciones de cultivo adecuadas. Dichos métodos y condiciones de cultivo pueden aplicarse a las células iPS obtenidas de acuerdo con la presente invención. Ver, por ejemplo, Trounson, A., The production and directed differentiation of human embryonic stem cells, *Endocr Rev.* 27(2):208-19, 2006 y referencias en el mismo, todas las cuales se incorporan por referencia, para algunos ejemplos. Ver, además, Yao, S., y otros, Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(18): 6907-6912, 2006 y referencias al respecto.

Por lo tanto, mediante el uso de métodos conocidos y medios de cultivo, un experto en la técnica puede cultivar las células pluripotentes reprogramadas para obtener los tipos de células diferenciadas deseadas, por ejemplo, células neurales, células musculares, células hematopoyéticas, etc. Las células en cuestión pueden usarse para obtener cualquier tipo celular diferenciado. Tales células humanas diferenciadas ofrecen una multitud de oportunidades terapéuticas. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas humanas derivadas de células reprogramadas de acuerdo con la presente invención pueden usarse en tratamientos médicos que requieren trasplante de médula ósea. Tales procedimientos se usan para tratar muchas enfermedades, por ejemplo, cánceres en etapa tardía y malignidades como la leucemia. Dichas células también son útiles para tratar la anemia, enfermedades que comprometen el sistema inmunitario, tales como el SIDA, etc. Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para tratar, prevenir o estabilizar una enfermedad neurológica como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, o la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de almacenamiento lisosómico, esclerosis múltiple o una lesión de la médula espinal. Por ejemplo, las células somáticas pueden obtenerse del individuo que necesita tratamiento y reprogramarse para ganar pluripotencia, y cultivarse para derivar células de neurectodermo que pueden usarse para reemplazar o ayudar a la función normal del tejido enfermo o dañado.

Las células reprogramadas que producen un factor de crecimiento u hormona como la insulina, etc., pueden administrarse a un mamífero para el tratamiento o prevención de trastornos endocrinos. Pueden administrarse células epiteliales reprogramadas para reparar el daño al revestimiento de una cavidad u órgano del cuerpo, como un pulmón, intestino, glándula exocrina o tracto urogenital. Además, se contempla que las células reprogramadas puedan administrarse a un mamífero para tratar el daño o la deficiencia de células en un órgano como la vejiga, el cerebro, el esófago, las trompas de Falopio, el corazón, los intestinos, la vesícula biliar, los riñones, el hígado, los pulmones, los ovarios, el páncreas, la próstata, la médula espinal, el bazo, el estómago, los testículos, el timo, la tiroides, la tráquea, los uréteres, la uretra o el útero.

La presente invención tiene el potencial de proporcionar un suministro esencialmente ilimitado de células genéticamente concordantes adecuadas para trasplante. Tal suministro abordaría el problema significativo asociado con los métodos actuales de trasplante, es decir, el rechazo del tejido trasplantado que puede ocurrir debido al rechazo del huésped contra el injerto o del injerto contra el huésped. Las RSC pueden, además, combinarse con una matriz para formar un tejido u órgano in vitro o in vivo que puede usarse para reparar o reemplazar un tejido u órgano en un mamífero receptor. Por ejemplo, las RSC pueden cultivarse in vitro en presencia de una matriz para producir un tejido u órgano del sistema urogenital, cardiovascular o musculoesquelético. Alternativamente, puede administrarse una mezcla de las células y una matriz a un mamífero para la formación del tejido deseado in vivo. Las RSC producidas de acuerdo con la invención pueden usarse para producir células diferenciadas modificadas por ingeniería genética o células transgénicas, por ejemplo, al introducir un gen o genes deseados, o eliminar todo o parte de un gen endógeno o genes de RSC producidos de acuerdo con la invención, y permitir que tales células se diferencien en el tipo de célula

deseado. Un método para lograr tal modificación es mediante recombinación homóloga, técnica que puede usarse para insertar, eliminar o modificar un gen o genes en un sitio o sitios específicos en el genoma.

Esta metodología puede usarse para reemplazar genes defectuosos o para introducir genes que resultan en la expresión de proteínas terapéuticamente beneficiosas como factores de crecimiento, hormonas, linfoquinas, citoquinas, enzimas, etc. Por ejemplo, el gen que codifica el factor de crecimiento derivado del cerebro puede introducirse en células embrionarias humanas o células de tipo madre, las células se diferencian en células neurales y las células se trasplantan en un paciente con Parkinson para retrasar la pérdida de células neurales durante dicha enfermedad. Mediante el uso de métodos conocidos para introducir genes/mutaciones deseadas en las células ES, las RSC pueden modificarse por ingeniería genética y las células modificadas resultantes pueden diferenciarse en los tipos de células deseadas, por ejemplo, células hematopoyéticas, células neurales, células pancreáticas, células de cartílago, etc. Genes que pueden introducirse en los RSC incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor básico de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento neurotrófico derivado de la glía, factor de crecimiento similar a la insulina (I y II), neurotrofina3, neurotrofina-4/5, factor neurotrófico ciliar, AFT-1, genes de citoquinas (interleuquinas, interferones, factores estimulantes de colonias, factores de necrosis tumoral (alfa y beta), etc.), genes que codifican enzimas terapéuticas, colágeno, albúmina sérica humana, etc.

Los sistemas de selección negativa conocidos en la técnica pueden usarse para eliminar células terapéuticas de un paciente si se desea. Por ejemplo, las células transfectadas con el gen de timidina quinasa (TK) conducirán a la producción de células embrionarias (por ejemplo, similares a ES) que contienen el gen TK. La diferenciación de estas células conducirá al aislamiento de células terapéuticas de interés que también expresan el gen TK. Tales células pueden eliminarse selectivamente en cualquier momento de un paciente tras la administración de ganciclovir. Tal sistema de selección negativa se describe en la Patente de los Estados Unidos núm. 5,698,446. Las células pueden modificarse por ingeniería genética para contener un gen que codifica un producto tóxico cuya expresión está bajo control de un promotor inducible. La administración del inductor provoca la producción del producto tóxico, lo que conduce a la muerte de las células. Por lo tanto, cualquiera de las células somáticas descritas en la presente descripción puede comprender un gen suicida, opcionalmente contenido en un casete de expresión, que puede integrarse en el genoma. El gen suicida es aquel cuya expresión sería letal para las células. Los ejemplos incluyen genes que codifican la toxina de la difteria, la toxina del cólera, la ricina, etc. El gen suicida puede estar bajo el control de elementos de control de la expresión que no dirigen la expresión en circunstancias normales en ausencia de un agente inductor o estímulo específico. Sin embargo, la expresión puede inducirse en condiciones apropiadas, por ejemplo, (i) administrar un agente inductor apropiado a una célula u organismo o (ii) si un gen en particular (por ejemplo, un oncogén, un gen involucrado en el ciclo de división celular, o un gen indicativo de desdiferenciación o pérdida de diferenciación) se expresa en las células, o (iii) si se pierde la expresión de un gen tal como un gen de control del ciclo celular o un gen indicativo de diferenciación. Ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 6,761,884. El gen solo puede expresarse después de un evento de recombinación mediado por una recombinasa sitio específica. Tal evento puede llevar la secuencia de codificación a una asociación operable con elementos de control de expresión tales como un promotor. La expresión del gen suicida puede inducirse si se desea eliminar las células (o sus progenies) del cuerpo de un sujeto después de que las células (o sus ancestros) se hayan administrado a un sujeto. Por ejemplo, si una célula somática reprogramada da lugar a un tumor, el tumor puede eliminarse al inducir la expresión del gen suicida. La formación de tumores puede inhibirse porque las células se eliminan automáticamente tras la desdiferenciación o la pérdida del control adecuado del ciclo celular.

Los ejemplos de enfermedades, trastornos o afecciones que pueden tratarse o prevenirse incluyen neurológicas, endocrinas, estructurales, esqueléticas, vasculares, urinarias, digestivas, integumentarias, sanguíneas, inmunitarias, autoinmunes, inflamatorias, endocrinas, renales, vesicales, cardiovasculares, cánceres, enfermedades, trastornos y afecciones circulatorias, digestivas, hematopoyéticas y musculares. Además, las células reprogramadas pueden usarse para aplicaciones reconstructivas, tales como para reparar o reemplazar tejidos u órganos. Puede ser ventajoso incluir factores de crecimiento y proteínas u otros agentes que promuevan la angiogénesis. Alternativamente, la formación de tejidos puede realizarse totalmente in vitro, con medios y condiciones de cultivo apropiados, factores de crecimiento y matrices de polímeros biodegradables.

Con respecto a los métodos terapéuticos descritos en la presente descripción, la administración de RSC a un mamífero no se limita a un modo particular de administración, dosificación o frecuencia de dosificación; la presente invención contempla todos los modos de administración, incluidas las vías intramuscular, intravenosa, intraarticular, intralesional, subcutánea o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para prevenir o tratar una enfermedad. Las RSC pueden administrarse al mamífero en una dosis única o en dosis múltiples. Cuando se administran dosis múltiples, las dosis pueden separarse unas de otras por, por ejemplo, una semana, un mes, un año o diez años. Además, pueden administrarse uno o más factores de crecimiento, hormonas, interleuquinas, citoquinas u otras células antes, durante o después de la administración de las células para sesgarlas aún más hacia un tipo de célula particular.

Las RSC descritas en la presente descripción pueden usarse como un modelo de diferenciación in vitro, en particular para el estudio de genes que están involucrados en la regulación del desarrollo temprano. Las células, los tejidos y órganos diferenciados generados mediante el uso de las células reprogramadas pueden usarse para estudiar los efectos de fármacos y/o identificar agentes farmacéuticos potencialmente útiles.

Aplicaciones adicionales de métodos de reprogramación de células somáticas y células reprogramadas

Los métodos de reprogramación descritos en la presente descripción pueden usarse para generar RSC, por ejemplo, células iPS, para una variedad de especies animales. Las RSC generadas pueden ser útiles para producir animales deseados. Los animales incluyen, por ejemplo, aves y mamíferos, así como cualquier animal que sea una especie en peligro de extinción. Las aves ilustrativas incluyen aves domesticadas (por ejemplo, codornices, pollos, patos, gansos, pavos y gallinas de Guinea). Los mamíferos ilustrativos incluyen murinos, caprinos, ovinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y primates no humanos. De estos, los miembros preferidos incluyen animales domesticados, que incluyen, por ejemplo, ganado vacuno, cerdos, caballos, vacas, conejos, cobayas, ovejas y cabras.

Métodos para la identificación de genes

En la presente descripción se describen métodos para identificar un gen cuya expresión inhibe la generación de células reprogramadas. Un método comprende: (i) activar la vía Wnt en células somáticas; (ii) reducir la expresión de un gen candidato por ARNi; (iii) determinar si la reducción de la expresión del gen candidato da como resultado una mayor eficiencia de la reprogramación y, si es así, identificar el gen candidato como aquel cuya expresión inhibe la reprogramación de las células somáticas. Un método comprende: (i) cultivar células somáticas en medio acondicionado Wnt; (ii) reducir la expresión de un gen candidato por ARNi; (iii) determinar si la reducción de la expresión del gen candidato da como resultado una mayor eficiencia de la reprogramación y, si es así, identificar el gen candidato como aquel cuya expresión inhibe la reprogramación de las células somáticas. Opcionalmente, las células somáticas están modificadas por ingeniería genética para expresar al menos un gen seleccionado de: Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 y Klf4. Opcionalmente, las células se ponen en contacto con el modulador de la vía Wnt. Las bibliotecas de ARNsh o ARNsí útiles en el método están disponibles comercialmente. El gen identificado es una diana para la inhibición con el fin de mejorar la reprogramación celular. Los agentes que inhiben el gen (ya sea agentes de ARNi u otros agentes como moléculas pequeñas) se usan para reprogramar las células somáticas, por ejemplo, junto con un activador Wnt.

EJEMPLIFICACIÓN

La invención, que ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente con referencia al siguiente ejemplo, que se incluye simplemente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y modalidades de la presente invención, y no pretende limitar la invención.

Materiales y métodos para el Ejemplo 1

Cultivo celular, infecciones virales, inducción de la expresión génica. Las células se cultivaron en FBS al 15 %, DMEM-KO, Penn/Step, glutamina, aminoácidos no esenciales,  $\beta$ -ME y LIF. Fibroblastos de embrión de ratón (MEF) con un constructo Oct4-IRES-eGFP (Meissner, A., y otros, Nature Biotechnology, Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Publicado en línea: 27 de agosto de 2007 | doi: 10.1038/nbt1335) insertado en el locus endógeno Oct4 se infectaron con vectores lentivirales que impulsan la expresión inducible por doxiciclina de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc o solo Oct4, Sox2 y Klf4. Los vectores se basaron en la cadena principal del vector lentiviral FUGW (Lois C, y otros, Science 2002; 295: 868-872), modificado para incluir un promotor inducible por tet. Dos días después de la infección, las células se dividieron y se indujeron con doxiciclina en presencia o ausencia de medios acondicionados Wnt3a (usados en una dilución 1: 1 con medios ES normales con 2x LIF). Se monitorizó la expresión de GFP en estas células mediante citometría de flujo el día 13 y nuevamente el día 20. Paralelamente, los MEF con Oct4 inducible por doxiciclina expresado a partir del locus de colágeno y Oct4-IRES-(resistencia neo) insertada en el locus endógeno Oct4 se infectaron con lentivirus que impulsaron la sobreexpresión de Sox2, Klf4 y c-Myc o Sox2 y Klf4. Nuevamente, dos días después de la infección, las células se dividieron y se indujeron con doxiciclina en presencia o ausencia de medios acondicionados Wnt3a. Se seleccionaron placas separadas de estas células con G418 el día 7 y el día 13 respectivamente. Después de al menos una semana de la selección con G418, se examinaron y se contaron las colonias resistentes.

Medio acondicionado. Se recogieron medios acondicionados (CM) Wnt 3a a partir de células L de ratón que se habían transfectado con ADNc de Wnt3a (Shibamoto y otros, 1998). Estas células están disponibles a través de ATCC (CRL-2647) junto con la línea celular parental no transfectada (CRL-2648) para usar en el medio acondicionado de control. Las células transfectadas con Wnt3a secretan Wnt, y alcanzan niveles de hasta 400 ng/ml de la proteína Wnt3a en sus medios de crecimiento. El medio basal consistió en DMEM, 15 % de FBS, Penn/Strep, Glutamina y aminoácidos no esenciales, preparados de acuerdo con el protocolo de Singla y otros. (Singla, y otros, Biochem Biophys Res Commun., 345(2):789-95, 2006). Los medios recogidos de los fibroblastos secretores se filtraron y se diluyeron 1:1 con medios regulares de células ES (15 % de FBS, DMEM-KO, Penn/Step, glutamina, aminoácidos no esenciales,  $\beta$ -ME y LIF). Este medio se usó para tratar las células ES. Los solicitantes y otros han demostrado que los medios condicionados Wnt3a activan la vía de señalización de Wnt en células ES, como lo demuestran las inmunotransferencias que examinan la fosforilación de beta-catenina.

Ejemplo 1: Generación de células similares a ES mediante el uso de medios condicionados Wnt3a

Nosotros presumimos que la estimulación de la vía Wnt mediante el uso de factores solubles podría modular la eficiencia de la inducción de la pluripotencia en las células somáticas. Este Ejemplo describe los experimentos iniciales realizados para determinar el efecto de la estimulación de la vía Wnt sobre la reprogramación. Las células que contienen un constructo Oct4-IRES-eGFP o Oct4-IRES-neo se infectaron con vectores lentivirales que codifican tres o cuatro factores como se describió anteriormente. La expresión de los factores de pluripotencia se indujo el día 2. En algunos experimentos, las células se cultivaron en medios acondicionados Wnt3a o medios no acondicionados como se muestra en la Figura 4A (arriba) de los días 2-13. La expresión de GFP se analizó por FACS en los días 13 y 20. En otros experimentos, las células se cultivaron en medios acondicionados Wnt3a o medios no acondicionados como se muestra en la Figura 4A (parte inferior) de los días 2-13 o 2-20. La selección de G418 se impuso el día 7 o 13. Las colonias sobrevivientes se contaron el día 20.

Los resultados mostraron que los medios acondicionados Wnt 3a aumentan la tasa de formación de iPS en fibroblastos transducidos con los cuatro factores de transcripción de reprogramación. Como se muestra en la Figura 4B, Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Las células seleccionables que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc formaron colonias robustas resistentes a G418 más temprano, en presencia de medios condicionados Wnt3a, que en ausencia de estos medios. Cuando se seleccionó el día 7, solo se formaron pequeñas colonias en ausencia de Wnt, ninguna de las cuales pudo propagarse en cultivo. Las colonias formadas en presencia de medios acondicionados Wnt en este punto eran más grandes y podían pasarse como clones. Cuando se inició la selección el día 13, se observaron colonias en ausencia de medio acondicionado Wnt3a en que podían propagarse. Aunque había menos colonias en este momento en presencia de medios condicionados Wnt que en ausencia de medios condicionados Wnt, las colonias que se formaron eran grandes, de apariencia relativamente homogénea y nuevamente podían mantenerse en cultivo. Este resultado sugiere que el medio acondicionado Wnt3a no solo aumentó la tasa de reprogramación, sino que, además, seleccionó para colonias de células reprogramadas.

Los medios acondicionados Wnt3a permiten, además, que se formen células iPS sin la adición del factor de transcripción oncogénico c-Myc. Mientras que no se formaron células iPS en nuestro experimento inicial cuando los fibroblastos se transdujeron con Oct4, Sox2 y Klf4, nosotros sí observamos colonias de iPS con estos tres factores cuando las células se cultivaron en medios acondicionados Wnt3a. Estas colonias parecen ser verdaderas células iPS en base a la morfología y la activación del locus endógeno Oct4, un evento normalmente restringido a células pluripotentes. Como se muestra en la Figura 4C, en presencia de medios acondicionados Wnt3a, se observaron colonias robustas neoresistentes en las células que sobreexpresaban Oct4, Sox2, Klf4 seleccionadas en el día 7 y el día 13. En ausencia de medios acondicionados Wnt, no se encontró que las células no infectadas con el virus c-Myc fueran neo-resistentes en ninguno de los puntos de tiempo. Sin selección, se descubrió que las células Oct4-IRES-eGFP infectadas con Sox2 y lentivirus Klf4 expresaban GFP (indicativo de la activación del locus endógeno Oct4) el día 20 solo en presencia de medios acondicionados Wnt.

#### Discusión

Los hallazgos descritos anteriormente son significativos al menos por dos razones principales. Primero, hay un gran interés en crear células iPS que no tengan integraciones virales del factor de transcripción oncogénico c-Myc. Los ratones quiméricos con células iPS hechas con Myc muestran altas tasas de cáncer asociado con la reactivación somática del virus c-Myc. Incluso *in vitro*, nosotros observamos que las líneas celulares iPS generadas con el virus c-Myc contienen una población mixta con algunas células que aparecen morfológicamente de forma muy similar a las células ES y otras que crecen más como células cancerosas transformadas. Nuestros resultados obtenidos hasta el momento indican que las líneas iPS creadas sin c-Myc en medios acondicionados Wnt3a parecen ser más homogéneamente similares a ES en su morfología. En segundo lugar, los medios acondicionados Wnt3a parecen ejercer un efecto selectivo que favorece la formación de colonias grandes y homogéneas. El uso del medio acondicionado Wnt3a o de activadores de la vía Wnt3a podrían usarse como un proceso de selección alternativo en lugar de imponer un paso de selección que requiera la modificación genética de las células somáticas iniciales. El uso del medio acondicionado Wnt3a o de activadores de la vía Wnt3a durante la reprogramación proporcionaría una mejora valiosa para cualquier método de reprogramación de células somáticas actualmente conocido en la técnica o desarrollado en el futuro.

#### Materiales y métodos para los ejemplos 2 - 8

##### Cultivo de células.

Se cultivaron células ES murinas V6.5 (C57BL/6-129) y células iPS en condiciones típicas de ES sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEF). Los MEF transgénicos usados en las infecciones con lentivirus inducibles por DOX (T. Brambrink, R. Foreman, *Cell Stem Cell* 2, 151-159 (2008)) se cosecharon a 13,5 dpc y se seleccionaron en puromicina 2ug/ml de embriones después de la inyección al blastocisto de células ES inducibles con Oct4-IRES-GFPneo/Oct4 (M. Wernig, A. Meissner, *Nature* 448, 318-324 (2007)) o cosechadas de apareamientos F1 entre ratones R26-M2rtTA (C. Beard, K. Hochedlinger, *Genesis* 44, 23-28 (2006)) y ratones Oct4-GFP (A. Meissner, M. Wernig, *Nat Biotechnol* 25, 1177-1181 (2007)). Los medios condicionados Wnt3a y los medios condicionados de control se

generaron de acuerdo con protocolos estándar (ATCC) (K. Willert, J.D. Brown, Nature 423, 448-452 (2003), descritos anteriormente, además) y se usaron en una relación 1: 1 con medio estándar de células ES). El inhibidor de Wnt ICG-001 se disolvió en DMSO a una concentración de reserva de 0,1 M. La concentración final de trabajo del inhibidor de Wnt fue de 4  $\mu$ M.

5

Transducción viral.

Los constructos lentivirales inducibles por tetraciclina que expresan los ADNc para Oct4, Klf-4, Sox2 y c-Myc se usaron como se describió previamente (Brambrink, supra). El virus se preparó mediante la transfección de células HEK293T con una mezcla de plásmidos virales y constructos de empaquetamiento que expresan las funciones de empaquetamiento viral y la proteína VSV-G (Fugene, Roche). El medio se reemplazó 24 horas después de la transfección y se recogieron los sobrenadantes virales a las 48 y 72 horas. Después de la filtración, se reunieron los sobrenadantes y se incubaron  $2,5 \times 10^5$  MEF con sobrenadantes virales y medios frescos en una proporción de 1:1 durante 24 horas. Las células infectadas se dividieron en relaciones de 1:5 a 1:12 sobre placas de 10 cm recubiertas de gelatina. Un día después de la división, los medios ES se suplementaron con 2 g/ml de DOX y, en las placas apropiadas, medios acondicionados y/o inhibidor químico.

10

15

Inmunotinción y Anticuerpos Las células se tiñeron como se describió previamente (Wernig, supra). Los anticuerpos contra Nanog (Bethyl) y SSEA1 (R&D systems, Minneapolis, MN) se usaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

20

Formación de teratoma

La formación de teratoma se ensayó como se describió previamente. Brevemente, las células se tripsinizaron y se inyectaron  $5 \times 10^5$  células por vía subcutánea a ratones SCID. Después de 14-21 días, los teratomas se disecaron, se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 10 % durante toda la noche y posteriormente se embebieron en cera de parafina mediante el uso de una máquina de inclusión Tissue-Tek VIP (Miles Scientific, Naperville, IL) y un HistoCenter Thermo Shandon 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Las secciones se cortaron a un grosor de 2 mm mediante el uso de un Leica RM2065 (Leica, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (K. Hochedlinger, Y. Yamada, Cell 121, 465-477 (2005).

25

30

Inyección del blastocisto. Las inyecciones de células iPS a los blastocistos del huésped Balb/c se llevaron a cabo como se describió previamente (Beard, supra).

35

Ejemplo 2: Experimentos adicionales relacionados con la generación de células similares a ES mediante el uso de medios condicionados Wnt3a

Para definir aún más el efecto de Wnt3a en la reprogramación, nosotros infectamos MEF que albergan un ADNc de Oct4 inducible por (DOX) (Hochedlinger, 2005) con vectores lentivirales inducibles por DOX que codifican Sox2, Klf4 y c-Myc (Brambrink, y otros, 2008). Estas células también contenían un casete de resistencia G418 en el locus Oct4 endógeno que permite la selección de fármacos de células iPS (Meissner y otros, 2007).

40

45

La expresión de cuatro factores se indujo mediante la adición de DOX en células cultivadas en presencia o ausencia de medio acondicionado Wnt3a (Wnt3a-CM), la selección de G418 se inició después de 5 días y el número de colonias resistentes a los fármacos se determinó 24 días después de la inducción (**Figura 1a**). La Figura 1b muestra que el número total de colonias resistentes a los fármacos aumentó más de 7 veces cuando las células se cultivaron en Wnt3a-CM. Nosotros notamos, además, que las colonias resistentes a los fármacos eran más grandes y más similares a las células ES por morfología cuando se cultivaban en Wnt3a-CM que en medio de células ES (**Figura 1c**). Además, las colonias que aparecieron en Wnt3a-CM con la selección de G418 iniciada el día 5 podían propagarse más, en contraste con las pequeñas colonias derivadas en medio de células ES estándar.

50

Dado que Wnt3a-CM tuvo un efecto positivo sobre la reprogramación en concierto con los cuatro factores de transcripción, nosotros luego examinamos si Wnt3a-CM podría sustituir a cualquiera de los factores nucleares. En experimentos paralelos, se transdujeron fibroblastos con subconjuntos de factores de transcripción y se observaron en presencia y ausencia de Wnt3a-CM (**Figuras 1d y 1e**). No se formaron colonias resistentes en ausencia de infección Oct4 o Klf4. Se observó una colonia en ausencia de retrovirus Sox2, pero esta colonia no pudo propagarse más en condiciones de cultivo de células ES. En contraste, en presencia de Wnt3a-CM, se formaron múltiples colonias robustas resistentes a G418 en ausencia de c-Myc en células que sobreexpresan Oct4, Sox2 y Klf4 (**Figuras 1d y 1e**). De manera similar a las colonias de MEF transducidas con los cuatro factores, estas líneas iPS podían propagarse en medios estándar de células ES sin una selección adicional y retenían la morfología celular ES. En réplicas de experimentos, las colonias resistentes a G418 se formaron ocasionalmente sin transducción de c-Myc en ausencia de Wnt3a-CM. Sin embargo, de acuerdo con los informes publicados (8,9), estas colonias eran escasas. En lo adelante, las células iPS generadas con solo tres factores y sin c-Myc se designarán como células Myc<sup>cl</sup> iPS.

55

60

Para examinar más de cerca los efectos del tratamiento con Wnt3a-CM sobre el proceso de reprogramación, se cultivaron MEF que sobreexpresan Oct4/Sox2/Klf4 y Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc con y sin Wnt3a-CM, y se inició la selección

65

de G418 en diferentes momentos después de la adición de DOX. La **Figura 1f** muestra que cuando se cultivaron células que sobreexpresan tres factores en medio Wnt3a-CM, aparecieron aproximadamente 3 veces más colonias Myc<sup>-1</sup> iPS cuando se añadió G418 el día 5 y aproximadamente 20 veces más colonias cuando se añadió G418 el día 10 después de la inducción en comparación con el cultivo en medio de células ES (**Figura 1f, panel izquierdo**). El medio Wnt3a-CM también aumentó el número de colonias resistentes a los fármacos después de la inducción de los cuatro factores, aunque las veces que aumentó fueron menos que en las células inducidas por tres factores (**Figura 1f, panel derecho**). Estos resultados indican que Wnt3a-CM aumentó el número de colonias resistentes a fármacos en células inducidas por tres factores y por cuatro factores, con el efecto más pronunciado en las células que sobreexpresan tres factores con selección aplicada en el momento posterior.

Ejemplo 3: Generación de clones Myc<sup>-1</sup> iPS sin selección genética.

Recientemente, se han generado células iPS sin retrovirus c-Myc (Myc<sup>-1</sup>), pero en ausencia de c-Myc exógeno, la eficiencia y la cinética de la reprogramación se reducen significativamente (Nakagawa y otros, 2008; Wernig y otros, 2008). Nosotros probamos si Wnt3a-CM ayudaría, además, en la generación de células iPS en ausencia de selección para la reactivación de Oct4. Para esto, se utilizaron células con GFP impulsada por el promotor Oct4 endógeno (Meissner, y otros, 2008). Las células infectadas con Oct4/Sox2/Klf4 con y sin tratamiento con Wnt3a-CM se analizaron para determinar la expresión de GFP por citometría de flujo en los días 10, 15 y 20 después de la inducción por DOX. No hubo células positivas para GFP con o sin tratamiento con Wnt3a-CM el día 10 o el día 15. Hacia el día 20, se detectó una pequeña población de células que expresan GFP en células cultivadas en Wnt3a-CM pero no en medio estándar de células ES (**Figura 1g**). Los cultivos expuestos a Wnt3a-CM formaron colonias que expresan GFP con la morfología típica de las células ES o iPS (**Figura 1h**). Sin embargo, a diferencia de las células transducidas por cuatro factores, que generalmente forman una población de células altamente heterogénea cuando se propagan sin selección, las colonias Oct4/Sox2/Klf4/Wnt3a-CM parecían de manera homogénea similares a ES, semejante a los clones Myc<sup>-1</sup> iPS previamente informados (Nakagawa y otros, 2008).

Ejemplo 4: Desarrollo potencial de células Myc<sup>-1</sup> iPS derivadas con Wnt3a-CM

Se realizaron varios ensayos para caracterizar el desarrollo potencial de las células Myc<sup>-1</sup> iPS derivadas del tratamiento con Wnt3a-CM. La inmunocitoquímica confirmó la expresión de marcadores de pluripotencia, incluido el factor nuclear Nanog (**Figuras 2a y 2b**) y la glucoproteína de superficie SSEA1 (**Figuras 2c y 2d**). Los ensayos funcionales confirmaron que, al igual que las células ES, estas células iPS eran pluripotentes. Cuando se inyectó en ratones SCID por vía subcutánea, las células Myc<sup>-1</sup> iPS dieron lugar a teratomas con evidencia histológica de células que se diferencian en las tres capas germinales (**Figuras 2e, 2f y 2g**). Más importante aún, las células Myc<sup>-1</sup> iPS derivadas del tratamiento con Wnt3a-CM contribuyeron a la formación de tejidos diferenciados en ratones quiméricos (**Figura 2h**). Estos resultados indican que los clones Myc<sup>-1</sup> tratados con Wnt3a-CM son células pluripotentes que son morfológica y funcionalmente indistinguibles de las células ES.

Ejemplo 5: Efecto del inhibidor de la vía Wnt de molécula pequeña en la generación de células iPS Myc<sup>-1</sup> e iPS en presencia de Wnt3a-CM

Para cuantificar los efectos de Wnt3a-CM, se realizaron experimentos por triplicado en MEF inducibles por Oct4/Sox2/Klf4-, seleccionables por G418 (**Figura 3a**). Se añadió G418 a los cultivos a los 15 días después de la infección para seleccionar las células que habían reactivado el locus Oct4. Cuando se evaluó el día 28 después de la infección, solo se detectaron unas pocas colonias resistentes a Myc<sup>-1</sup> G418 (se forman entre 0-3 colonias en cada placa de diez centímetros) en condiciones estándar de cultivo de células ES. En contraste, se formaron ~ 20 veces más colonias resistentes a fármacos cuando se inició la selección de G418 en células tratadas con Wnt3a-CM, consistente con la conclusión de que la activación de la vía Wnt mejora la reprogramación. Cabe señalar que el medio acondicionado de los fibroblastos de control que carecen de sobreexpresión de Wnt3a causó, además, un aumento moderado en el número de colonias resistentes a G418 en relación con el medio ES estándar, lo que sugiere que los fibroblastos normales pueden secretar factores, tal vez incluido Wnt3a, que promueven la reprogramación.

Para evaluar de forma independiente el efecto de Wnt3a sobre la reprogramación, nosotros cultivamos células en presencia de ICG-001 (Teo y otros, 2005; McMillan y Kahn, 2005; ver Figura 5), un inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. La **Figura 3a** (columnas de la derecha) muestra que ICG-001, 4  $\mu$ M, inhibió fuertemente el efecto de Wnt3a-CM sobre la formación de Myc<sup>-1</sup> iPS. Además, se examinaron los efectos de Wnt3a-CM e ICG-001 sobre MEF que sobreexpresan los cuatro factores de reprogramación, incluido c-Myc (**Figura 3b**). Se observó un alto número de colonias resistentes a G418 en los medios estándar de células ES y Wnt3a-CM en células reprogramadas por cuatro factores, con solo un aumento sutil en el número de colonias con Wnt3aCM. En contraste con el efecto dramático de ICG-001 en las células Myc, a la misma dosis, el compuesto solo tuvo un efecto sutil sobre el número de colonias G418 en las células transducidas con c-Myc, y se observó un número relativamente alto de colonias resistentes bajo estas condiciones. A dosis más altas de ICG-001, los números de colonias iPS se redujeron aún más, pero incluso a 25 mM se observaron múltiples colonias de Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc iPS (datos no mostrados). Estos resultados son consistentes con la noción de que Wnt3a puede, al menos en parte, reemplazar el papel de c-Myc en la reprogramación.

Se ha demostrado que la vía de señalización de Wnt se conecta directamente a los circuitos reguladores transcripcionales centrales de las células ES, lo que sugiere un mecanismo por el cual esta vía podría promover directamente la inducción de pluripotencia en ausencia de transducción por c-Myc (**Figura 3c**). Se ha demostrado que la vía de señalización de Wnt se conecta directamente a los circuitos reguladores transcripcionales centrales de las células ES, lo que sugiere un mecanismo por el cual esta vía podría promover directamente la inducción de pluripotencia en ausencia de transducción por c-Myc (Figura 2c). En las células ES, Tcf3 ocupa y regula los promotores de Oct4, Sox2 y Nanog (Cole y otros, 2008; Tam y otros, 2008; Yi y otros, 2008). En los MEF, estos factores de transcripción de pluripotencia endógena están silenciados. Durante la reprogramación, como Oct4, Sox2 y Klf4 exógenos contribuyen a la reactivación de los factores de pluripotencia endógenos (Jaenisch y Young, 2008), la señalización Wnt podría potenciar directamente el efecto de estos factores de transcripción, como lo hace en las células ES (Cole y otros, 2008). Además, o alternativamente, Wnt podría servir para activar c-Myc endógeno directamente, y sustituir así a c-Myc exógeno. De hecho, c-Myc es una diana bien establecida de la vía Wnt en células de cáncer colorrectal (He y otros, 1998). En las células ES, Tcf3 ocupa el promotor c-Myc, y Wnt3a contribuye positivamente a la expresión del gen (Cole y otros, 2008). El hecho de que la sobreexpresión forzada de c-Myc contrarresta el efecto negativo del inhibidor ICG-001 de Wnt en el proceso de reprogramación sugiere que la estimulación de Wnt podría actuar aguas arriba del Myc endógeno. Los efectos inducidos por Wnt sobre la proliferación celular, mediados por c-Myc u otros factores de proliferación endógenos, podrían ayudar a acelerar la secuencia de eventos que conducen a la generación de colonias Myc[-] iPS.

Un objetivo principal de la presente investigación es identificar señales transitorias que puedan reprogramar las células somáticas, y eliminar la necesidad de retrovirus. Los estudios descritos aquí establecen que la estimulación Wnt puede usarse para mejorar la eficiencia de la reprogramación en combinación con factores nucleares, Oct4, Sox2 y Klf4. Al mejorar la eficiencia de la reprogramación en ausencia de retrovirus c-Myc, Wnt soluble o moléculas pequeñas que modulan la vía de señalización de Wnt probablemente resultarán útiles en combinación con otras señales transitorias que pueden reemplazar los retrovirus restantes.

#### Ejemplo 6: Identificación de agentes de reprogramación adicionales

El Ejemplo 3 se modifica porque el medio contiene, además de Wnt3a-CM, un agente candidato de reprogramación para analizar su potencial para mejorar o inhibir la reprogramación. En algunas modalidades, las células se infectan de manera que expresan solo 2 de los siguientes 3 factores de reprogramación: Oct4, Klf4 y Sox2. Se identifican los agentes que mejoran la generación de células reprogramadas (por ejemplo, aumentan la velocidad o la eficiencia de la reprogramación). El proceso se repite para identificar agentes capaces de sustituir la expresión modificada por ingeniería genética de Oct4, Klf4 y/o Sox2 en la reprogramación de células somáticas.

#### Ejemplo 7: Identificación de agentes de reprogramación adicionales

El Ejemplo 3 se modifica porque el medio Wnt3a-CM contiene, además, un agente candidato de reprogramación. En algunas modalidades, las células se infectan de manera que expresan solo 1 o 2 de los siguientes factores de reprogramación: Oct4, Lin28, Sox2 y Nanog (por ejemplo, solo Oct4, Oct-4 y Sox2). Se identifican los agentes que mejoran la generación de células reprogramadas. El proceso se repite para identificar agentes capaces de sustituir la expresión modificada por ingeniería genética Oct4, Lin28, Sox2 y/o Nanog en la reprogramación de células somáticas.

#### Ejemplo 8: Uso del modulador de la vía Wnt de molécula pequeña en la reprogramación

El Ejemplo 3 se repite, excepto que en lugar de usar Wnt3a-CM, se usa medio de células ES que contiene un activador de la vía Wnt de molécula pequeña.

#### Referencias

- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., y Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151-159.
- Cai, L., Ye, Z., Zhou, B. Y., Mali, P., Zhou, C., y Cheng, L. (2007). Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions. *Cell Res* 17, 62-72.
- Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H., y Young, R. A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes and Development* 15; 22(6):746-55 (2008).
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M., y Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., y Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

- Hochedlinger, K., Yamada, Y., (2005) *Cell* 121, 465-477.
- Jaenisch, R. y Young, R. A. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- 5 Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., y Orkin, S. H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049-1061.
- Knoepfler, P. S. (2008). Why Myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell* 2, 18-21.
- 10 McMillan, M. y Kahn, M. (2005). Investigating Wnt signaling: a chemogenomic safari. *Drug Discov Today* 10, 1467-1474.
- Meissner, A., Wernig, M., y Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1177-1181.
- 15 Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., y Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-106.
- 20 Ogawa, K., Nishinakamura, R., Iwamatsu, Y., Shimosato, D., y Niwa, H. (2006). Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 159-166.
- Okita, K., Ichisaka, T., y Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- 25 Reya, T. y Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., y Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- 30 Singla, D. K., Schneider, D. J., LeWinter, M. M., y Sobel, B. E. (2006). wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 789-795.
- 35 Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., y Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* en prensa.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., y Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- 40 Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tam, W. L., Lim, C. Y., Han, J., Zhang, J., Ang, Y. S., Ng, H. H., Yang, H., y Lim, B. (2008). Tcf3 Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal by the Transcriptional Control of Multiple Lineage Pathways. *Stem Cells*.
- 45 Teo, J. L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C., y Kahn, M. (2005). Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by apresenilin-1 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12171-12176.
- 50 Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P., y Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10-12.
- 55 Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd, y Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Yi, F., Pereira, L., and Merrill, B. J. (2008). Tcf3 Functions as a Steady State Limiter of Transcriptional Programs of Mouse Embryonic Stem Cell Self Renewal. *Stem Cells*.
- 60 Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., y otros (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- 65 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de genética de ratón, biología del desarrollo, biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica,

microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se describen en la literatura. Ver, por ejemplo, Current Protocols in Cell Biology, ed. por Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford, y Yamada, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999; Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual, 3ra Ed., por Hogan y otros Cold Spring Contain Laboratory Press, Cold Spring Contain, New York, 2003; Gene Targeting: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1993; y Gene Targeting Protocols, Human Press, Totowa, New Jersey, 2000..

Un experto en la técnica aprecia fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionadas, así como los inherentes a los mismos. Los métodos, sistemas y kits son representativos de ciertas modalidades, son ilustrativos y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención. Los expertos en la técnica generarán modificaciones y otros usos. Estas modificaciones están abarcadas y están definidas por el alcance de las reivindicaciones. Será evidente para una persona experta en la técnica que se pueden realizar una variedad de sustituciones y modificaciones a la invención descrita en la presente descripción sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Los artículos "un" y "una", como se usan aquí en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente de otra manera, debe entenderse que incluyen los referentes plurales. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique de otra manera o sea evidente por el contexto. La invención incluye modalidades en las cuales exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea o es relevante para un producto o proceso dado. La invención incluye, además, modalidades en las cuales más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes para un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente del mismo reclamo base (o, según corresponda, cualquier otro reclamo) a menos que se indique de otra manera o que sea evidente para un experto en la técnica que surgiría una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en grupo Markush o en un formato similar, debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, donde se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, como que comprende elementos, características, etc. particulares, ciertas modalidades de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en tales elementos, características, etc. Para fines de simplicidad, esas modalidades no se han establecido específicamente en la presente descripción. Además, debe entenderse que cualquier modalidad de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la especificación. Por ejemplo, puede excluirse cualquier modulador de Wnt, por ejemplo, cualquier agente activador de la vía de Wnt, cualquier tipo de célula somática, cualquier agente de reprogramación, etc.

Cuando se dan intervalos en la presente descripción, la invención incluye modalidades en las cuales se incluyen los puntos finales, modalidades en las que se excluyen ambos puntos finales y modalidades en las que se incluye un punto final y se excluye el otro. Debe suponerse que ambos puntos finales están incluidos a menos que se indique de otra manera. Además, debe entenderse que, a menos que se indique de otra manera, o sea evidente por el contexto y la comprensión por un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes modalidades de la invención, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Además, se entiende que donde se establece una serie de valores numéricos en la presente descripción, la invención incluye modalidades que se relacionan de manera análoga a cualquier valor que interviene o intervalo definido por cualquiera de dos valores en la serie, y que el valor más bajo puede tomarse como mínimo y el valor más alto puede tomarse como máximo. Los valores numéricos, como se usan en la presente descripción, incluyen valores expresados como porcentajes. Para cualquier modalidad de la invención en la cual un valor numérico esté precedido por "alrededor" o "aproximadamente", la invención incluye una modalidad en la cual se menciona el valor exacto. Para cualquier modalidad de la invención en la cual un valor numérico no esté precedido por "alrededor" o "aproximadamente", la invención incluye una modalidad en la cual el valor está precedido por "alrededor" o "aproximadamente". "Aproximadamente" o "alrededor" pretende abarcar números que se encuentran dentro de un intervalo de  $\pm 10\%$  de un número, en algunas modalidades dentro de  $\pm 5\%$  de un número, en algunas modalidades dentro de  $\pm 1\%$ , en algunas modalidades dentro de  $\pm 0,5\%$  de un número, en algunas modalidades dentro de  $\pm 0,1\%$  de un número, a menos que se indique de otra manera o sea evidente por el contexto (excepto donde dicho número excedería inadmisiblemente el  $100\%$  de un valor posible).

## REIVINDICACIONES

1. Un método de reprogramación de una célula somática de mamífero, que comprende:
- 5 (a) poner en contacto la célula somática de mamífero con un activador de la vía Wnt seleccionado del grupo que consiste en: (i) una proteína Wnt que activa un receptor Wnt, y (ii) un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en 3-[(3-cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 415286), cloruro de litio, valproato de sodio, inhibidor de GSK3 II, un agente de ARNi que inhibe la expresión de GSK3, un derivado de 9-deazaguanina, un derivado de pirazolona, una bisindolilmaleimida, roterlina, KN62, quercetina, SP600125, KT5823, una indirrubina, una paulona, una himenialdisina, una purina sustituida, CT 98016, una maleimida, una pirazolopiridazina, pirazolopiridina, una pirazolo[3,4-b] quinoxalina, un 1,3,4-oxadiazol, un 1,2,5-oxadiazol, una tiadiazolidinona, AF102B, AF150, una pirazolona, una pirazolamina, una amino pirimidina sustituida, una pirimidona, un acilaminoimidazol, un tiazol, un triarimidazol, una pirazina-2-carboxamina, una anilino pirimidina, una pirazolo[1,5-a]-1,3,4-triazina, CT 20026, una pirazina, una bencimidazol quinolinona, una pirazolopirimidina, un derivado de pirimidina, 15 un derivado de piridina, una pirimidina 2,4,5-trisustituida y una 2-aminopirimidina bicíclica; y
- (b) mantener la célula en medio de cultivo que comprende los factores de reprogramación Oct4, Sox2 y Klf4;
- reprogramar así la célula a un estado pluripotente.
- 20 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde:
- (a) el método comprende, además, cultivar la célula somática de mamífero en un medio de cultivo que contiene el activador de la vía Wnt; o
- (b) el método comprende, además, cultivar la célula somática de mamífero en un medio de cultivo que comprende el activador de la vía Wnt durante al menos 10 días; o
- 25 (c) el contacto la célula somática de mamífero con el activador de la vía Wnt y los factores de reprogramación aumenta el número de células somáticas reprogramadas en al menos 5 veces; o
- (d) el contacto la célula somática de mamífero con el activador de la vía Wnt y los factores de reprogramación, aumenta el número de células somáticas reprogramadas en al menos 10 veces.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en donde (i) el activador de la vía Wnt es un compuesto que es capaz de aumentar la expresión de un gen marcador operativamente unido a un sitio de unión TCF en un ensayo para la activación del receptor Wnt, o (ii) el activador de la vía Wnt es un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña que tiene una IC50 para GSK-3 de menos de 10  $\mu$ M.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en donde la célula somática de mamífero es:
- (a) una célula humana;
- (b) una célula terminalmente diferenciada;
- (c) un fibroblasto;
- (d) modificada para que exprese o contenga al menos un factor de reprogramación a niveles superiores a los normalmente presentes en las células de ese tipo;
- 40 (e) no modificada genéticamente;
- (f) no modificada genéticamente para que exprese c-Myc a niveles superiores a los normalmente presentes en una célula de ese tipo celular; o
- (g) una célula madre neural o una célula progenitora neural.
- 45 5. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, confirmar que la célula reprogramada es pluripotente.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, diferenciar la célula reprogramada a un tipo celular deseado in vitro después de reprogramar la célula somática de mamífero.
- 50 7. El método de la reivindicación 1, en donde el método se pone en práctica en:
- (a) una población de células y el método comprende, además, identificar células somáticas reprogramadas mediante criterios morfológicos para células ES; o
- 55 (b) una población de células y el método no comprende imponer una selección química para seleccionar células reprogramadas; o
- (c) una población de células y el método comprende, además, separar las células que se reprograman a un estado pluripotente de las células que no se reprograman a un estado pluripotente.
- 60 8. El método de la reivindicación 1, en donde poner en contacto la célula somática de mamífero con factores de reprogramación comprende modificar la célula para que exprese al menos un factor de reprogramación a niveles mayores que los normalmente presentes en una célula de ese tipo.
9. Una composición que comprende:
- 65

- (a) un medio de cultivo celular que contiene un activador de la vía Wnt seleccionado del grupo que consiste en: (i) una proteína Wnt que activa un receptor Wnt, y (ii) un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en 3-[(3-Cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 415286), cloruro de litio, valproato de sodio, inhibidor de GSK3 II, un agente de ARNi que inhibe la expresión de GSK3, un derivado de 9-deazaguanina, un derivado de pirazolón, una bisindolilmaleimida, roterlina, KN62, quercetina, SP600125, KT5823, una indirubina, una paulona, una himenialdisina, una purina sustituida, CT 98016, una maleimida, una pirazolopiridazina, pirazolopiridina, una pirazolo[3,4-b]quinoxalina, un 1,3,4-oxadiazol, un 1,2,5-oxadiazol, una tiadiazolidinona, AF102B, AF150, una pirazolona, una pirazolamina, una amino pirimidina sustituida, una pirimidona, un acilaminoimidazol, un tiazol, un triarimidazol, una pirazina-2-carboxamina, una anilinopirimidina, una pirazolo[1,5-a]-1,3,4-triazina, CT 20026, una pirazina, una bencimidazol quinolinona, una pirazolopirimidina, un derivado de pirimidina, un derivado de piridina, una pirimidina 2,4,5-trisustituida y una 2-aminopirimidina bicíclica; y
- (b) una célula somática de mamífero, en donde la célula se ha modificado para que exprese o contenga Oct4, Sox2 y Klf4.
- 5
- 10
- 15
10. La composición de la reivindicación 9, en donde la célula somática de mamífero se ha modificado para que exprese o contenga uno o más factores de reprogramación seleccionados del grupo que consiste en Nanog y Lin28.
- 20
11. La composición de la reivindicación 9 o 10, en donde la célula somática de mamífero no está genéticamente modificada.
- 25
12. La composición de la reivindicación 9, en donde la célula se ha modificado genéticamente para que contenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable, operativamente unido a un promotor para un gen de pluripotencia endógeno.
- 30
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde (i) el activador de la vía Wnt es un compuesto que es capaz de aumentar la expresión de un gen marcador operativamente unido a un sitio de unión TCF en un ensayo para la activación del receptor Wnt, o (ii) el activador de la vía Wnt es un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña que tiene una IC50 para GSK-3 de menos de 10 µM.
- 35
- 40
- 45
14. Una composición que comprende:
- (a) una célula madre pluripotente inducida (iPS); y
- (b) un activador de la vía Wnt seleccionado del grupo que consiste en: (i) una proteína Wnt que activa un receptor Wnt, y (ii) un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste en 3-[(3-Cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (SB 415286), cloruro de litio, valproato de sodio, inhibidor de GSK3 II, un agente de ARNi que inhibe la expresión de GSK3, un derivado de 9-deazaguanina, un derivado de pirazolón, una bisindolilmaleimida, roterlina, KN62, quercetina, SP600125, KT5823, una indirubina, una paulona, una himenialdisina, una purina sustituida, CT 98016, una maleimida, una pirazolopiridazina, una pirazolopiridina, una pirazolo[3,4-b]quinoxalina, un 1,3,4-oxadiazol, un 1,2,5-oxadiazol, una tiadiazolidinona, AF102B, AF150, una pirazolona, una pirazolamina, una amino pirimidina sustituida, una pirimidona, un acilaminoimidazol, un tiazol, un triarimidazol, una pirazina-2-carboxamina, una anilinopirimidina, una pirazolo[1,5-a]-1,3,4-triazina, CT 20026, una pirazina, una bencimidazol quinolinona, una pirazolopirimidina, un derivado de pirimidina, un derivado de piridina, una pirimidina 2,4,5-trisustituida y una 2-aminopirimidina bicíclica.
- 50
15. La composición de la reivindicación 14, en donde (i) el activador de la vía Wnt es un compuesto que es capaz de aumentar la expresión de un gen marcador operativamente unido a un sitio de unión TCF en un ensayo para la activación del receptor Wnt, o (ii) el activador de la vía Wnt es un inhibidor de GSK-3 de molécula pequeña que tiene una IC50 para GSK-3 de menos de 10 µM.

Figura 1

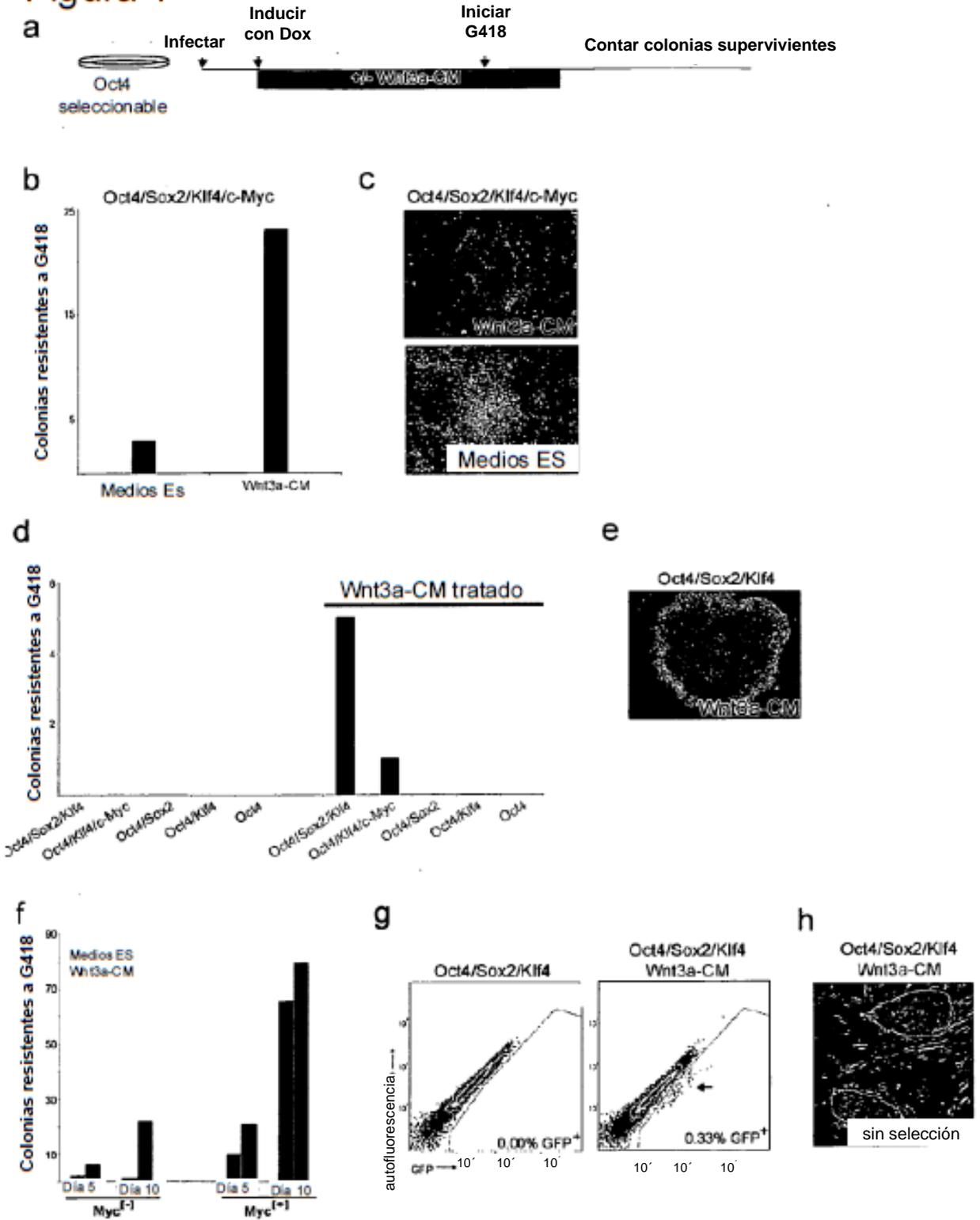


Figura 2

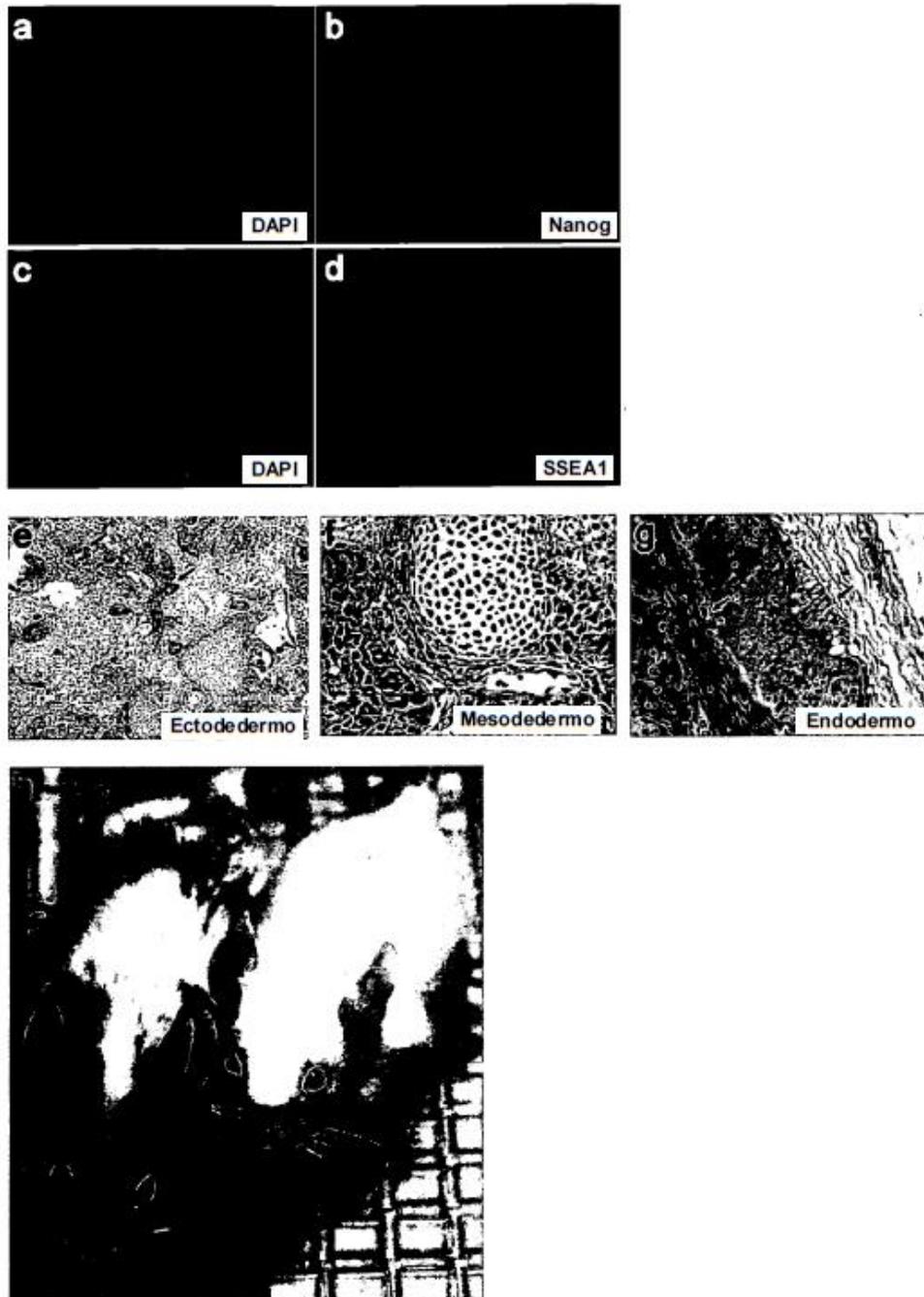
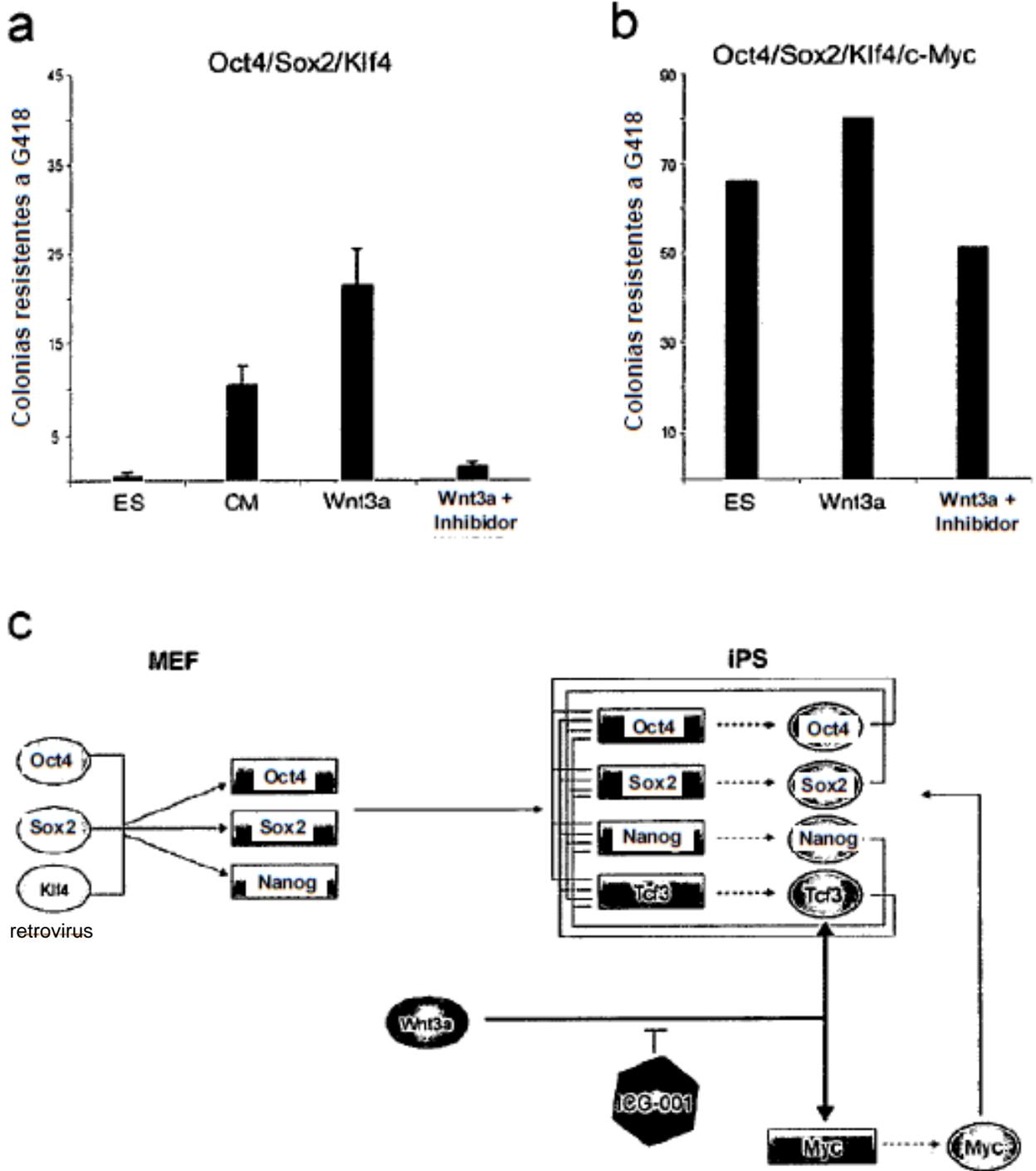
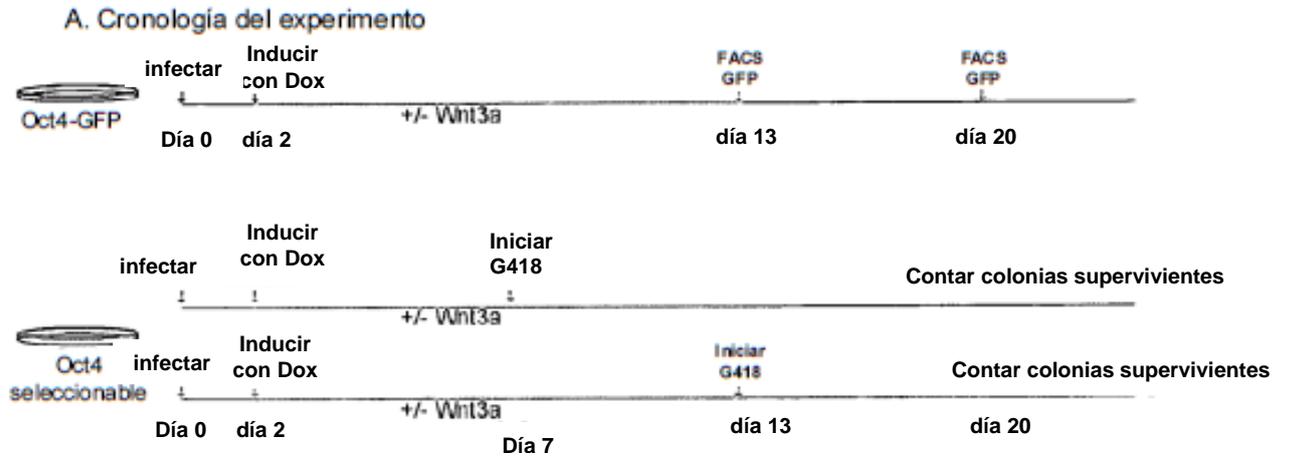
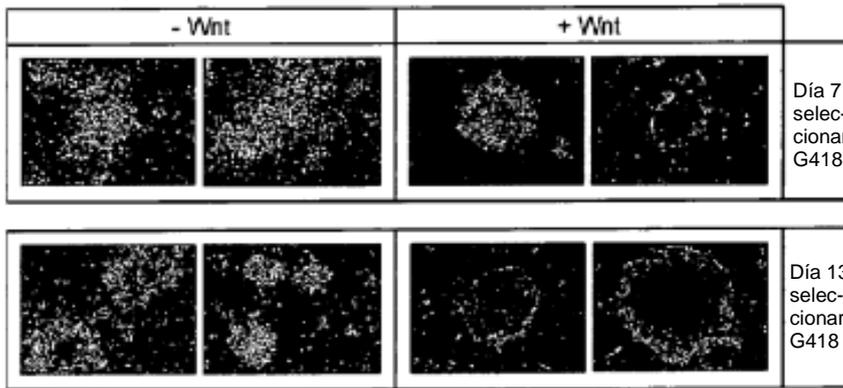


Figura 3





**B. Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc**



**C. Wnt3a promueve la formación de células iPS en células que sobreexpresan Oct4, Sox2, Klf4 (sin c-Myc)**

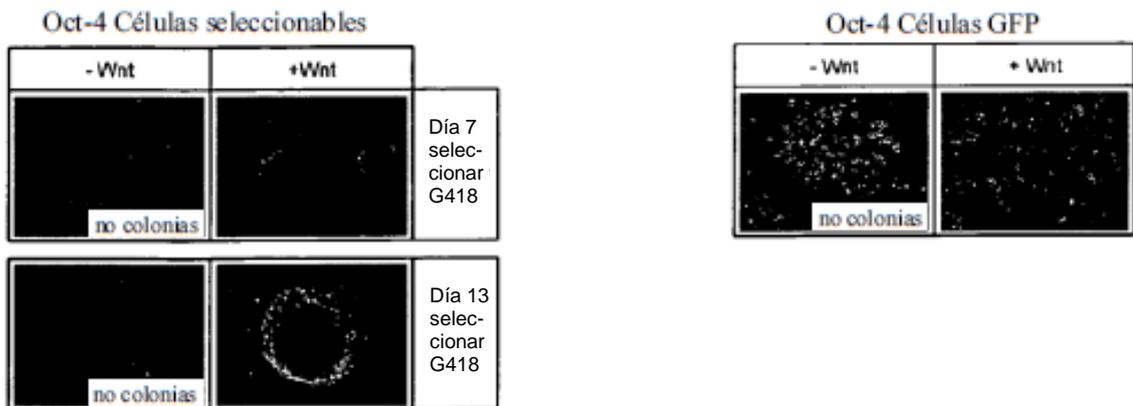


Figura 4

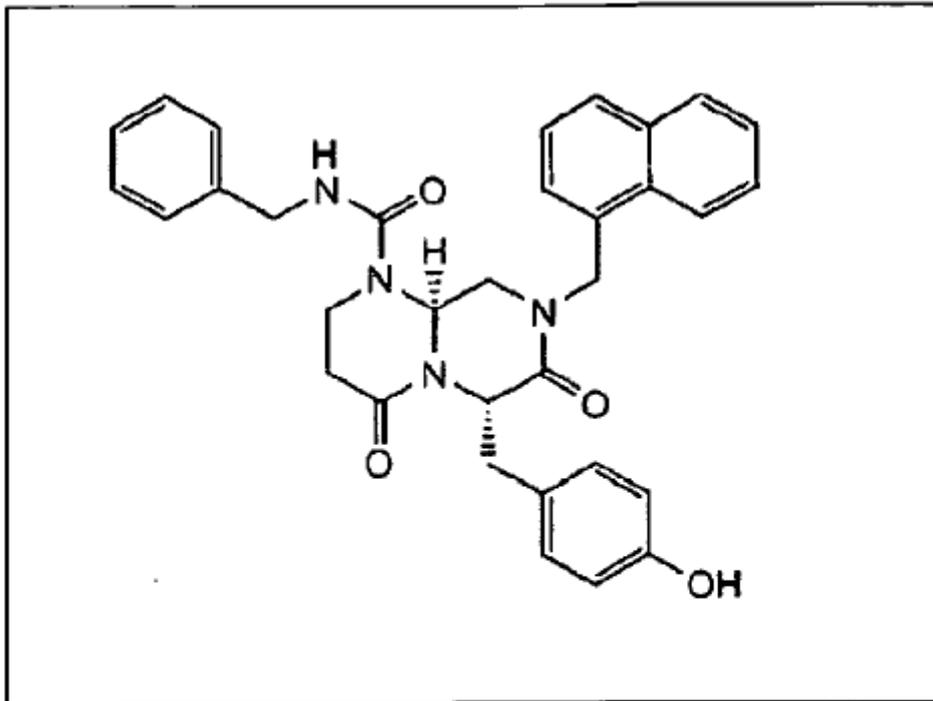


Figura 5