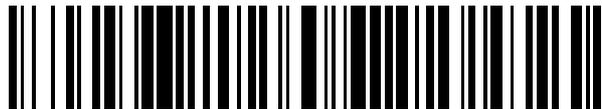


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 875**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 5/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2011 PCT/EP2011/006061**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072269**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11791447 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2646557**

54 Título: **Método para la expresión de ARN celular**

30 Prioridad:

**03.12.2010 WO PCT/EP2010/007362**

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

**07.11.2017**

73 Titular/es:

**BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH  
(50.0%)**

**An der Goldgrube 12**

**55131 Mainz, DE y**

**TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JGU MAINZ  
GMBH (TRON) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;**

**BEISSERT, TIM;**

**POLEGANOV, MARCO y**

**HERZ, STEPHANIE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 640 875 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la expresión de ARN celular

Campo técnico de la invención

5 La presente enseñanza se refiere a la mejora de la expresión de ARN en una célula tal como una célula transfectada con ARN reduciendo la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR). Por lo tanto, la presente enseñanza se refiere a métodos *in vitro* para expresar ARN en una célula que comprende la etapa de reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en la célula. La reducción de la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en la célula aumenta la estabilidad del ARN y/o aumenta la expresión de ARN en la célula.

10 Antecedentes de la invención

15 Las ventajas de usar ARN como una clase de terapia génica reversible incluyen la expresión transitoria y un carácter no transformante. El ARN no necesita entrar en el núcleo para ser expresado y además no puede integrarse en el genoma huésped, eliminando así el riesgo de oncogénesis. Las velocidades de transfección alcanzables con ARN son relativamente altas, para muchos tipos de células incluso > 90%, y, por lo tanto, no hay necesidad de selección de células transfectadas. De hecho, la transfección de ARNm de varias líneas celulares y células primarias se considera como un medio altamente eficaz para la sobreexpresión transitoria (Ryser et al., Molecular Therapy 2006: 13, Suppl.1, S198). Además, las cantidades de proteína obtenidas corresponden a aquellas en expresión fisiológica.

20 El ARN se ha descrito como útil en la desdiferenciación de células somáticas en células como las células madre sin generar embriones o fetos. La desdiferenciación de células somáticas en células que tienen características de células madre, en particular pluripotencia, puede efectuarse introduciendo factores de codificación de ARN que inducen la desdiferenciación de células somáticas en células somáticas y cultivo de células somáticas permitiendo que las células se desdiferencien. Después de ser desdiferenciadas, las células podrían ser inducidas a volver a diferenciarse en la misma o un tipo de células somáticas diferentes, tales como tipos de células neuronales, hematopoyéticas, musculares, epiteliales y otros tipos de células. De este modo, dichas células tipo células madre  
25 tienen aplicaciones médicas para el tratamiento de enfermedades degenerativas por "terapia celular" y pueden utilizarse en nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de trastornos cardíacos, neurológicos, endocrinológicos, vasculares, retinianos, dermatológicos, musculoesqueléticos y otras enfermedades.

30 Además, el uso de ARN proporciona una alternativa atractiva para eludir los riesgos potenciales de las vacunas basadas en ADN. Al igual que con el ADN, la transferencia de ARN en las células también puede inducir tanto las respuestas inmunes celulares como humorales *in vivo*.

35 En particular, se han seguido dos estrategias diferentes para la inmunoterapia con el ADN transcrito *in vitro* (ARN IVT), que han sido probados exitosamente en varios modelos animales. O bien el ARN se inyecta directamente en el paciente mediante diferentes vías de inmunización o las células se transfectan con ARN IVT utilizando métodos de transfección convencionales *in vitro* y luego se administran las células transfectadas al paciente. El ARN puede, por ejemplo, ser traducido y la proteína expresada se presenta en las moléculas del MHC en la superficie de las células para provocar una respuesta inmune.

40 Se ha intentado estabilizar el ARN-IVT mediante diversas modificaciones con el fin de conseguir una expresión más alta y prolongada del ARN IVT transferido. Sin embargo, a pesar del éxito de las estrategias basadas en transfección de ARN para expresar péptidos y proteínas en células, quedan cuestiones relacionadas con la estabilidad del ARN, la expresión sostenida del péptido codificado o la proteína y la citotoxicidad del ARN. Por ejemplo, se sabe que el ARN monocatenario exógeno activa mecanismos de defensa en células de mamífero. Henry et al. 1994 (JBRHA, 8: 15-25) describe la identificación de un elemento de ARN en el ARNm del reovirus S1 que activa la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) para inhibir selectivamente la traducción del ARNm de S1. Los mecanismos de defensa celular pueden incluir la producción de interferón como mediador de una respuesta inmune innata para las infecciones virales. Marcus et al. 1988 (Journal of General Virology 69: 1637-1645) y Chen et al. 2006 (Am J Respir Cell Mol. Biol. 34: 192-203) describen que la inhibición de PKR usando 2-aminopurina puede bloquear la producción de interferón después de la infección de las células con virus de ARN.

Sumario de la invención

50 La presente enseñanza se refiere a un método para expresar ARN en una célula que comprende la etapa de reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en la célula.

En una realización, el ARN está o ha sido introducido en la célula tal como mediante electroporación.

En una realización, el ARN es ARN transcrito *in vitro*.

En una realización, la etapa de reducir la actividad de PKR en la célula da como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en la célula, en donde la mejora de la expresión del ARN en la

célula preferiblemente comprende un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en la célula.

5 En una realización, la etapa de reducir la actividad de PKR en la célula comprende tratar la célula con al menos un inhibidor de PKR. En una realización, el tratamiento de la célula con al menos un inhibidor de PKR es durante un tiempo suficiente para dar como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en la célula. En una realización, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor dirigido al sitio de unión al ATP de PKR. En una realización, el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazol-oxindol. En una realización, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrol[2,3-g]benzotiazol-7-ona o 2-aminopurina. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor viralmente derivado de PKR, en el que el inhibidor viralmente derivado de PKR se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en virus vacuna E3 y/o K3, o su ARN.

10 En una realización, la etapa de reducir la actividad de PKR en la célula comprende silenciar la expresión del gen de PKR.

15 En una realización, la célula es una célula que tiene una función de barrera. En una realización, la célula es un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial, en donde la célula endotelial es preferiblemente una célula endotelial del corazón, una célula endotelial del pulmón o una célula endotelial de la vena umbilical. Preferiblemente, la célula es una célula humana.

20 La presente enseñanza también se refiere al uso de medios que son adecuados para reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una célula como medio como se describe en este documento, en particular al menos un inhibidor de PKR, tal como al menos uno de los inhibidores de PKR como se describe en la presente memoria, para tratar una célula en la que se va a expresar el ARN.

En una realización, el ARN está o ha sido introducido en la célula tal como mediante electroporación.

En una realización, el ARN es ARN transcrito *in vitro*.

25 En una realización, el tratamiento de la célula da como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en la célula, en donde la mejora de la expresión del ARN en la célula comprende preferiblemente un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en la célula.

30 En una realización, el tratamiento de la célula con al menos un inhibidor de PKR es durante un tiempo suficiente para dar como resultado un aumento de la estabilidad y/o un aumento de la expresión del ARN en la célula. En una realización, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor dirigido al sitio de unión al ATP de PKR. En una realización, el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazol-oxindol. En una realización, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrol[2,3-g] benzotiazol-7-ona o 2-aminopurina. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor viralmente derivado de PKR, en el que el inhibidor viralmente derivado de PKR se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en virus vacuna E3 y/o K3, o su ARN.

35 En una realización, los medios para reducir la actividad de PKR en la célula comprenden medios para silenciar la expresión del gen de PKR.

40 En una realización, la célula es una célula que tiene una función de barrera. En una realización, la célula es un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial, en donde la célula endotelial es preferiblemente una célula endotelial del corazón, una célula endotelial del pulmón o una célula endotelial de la vena umbilical. Preferiblemente, la célula es una célula humana.

45 La presente enseñanza se refiere también a un método para proporcionar células que tienen características de células madre que comprenden las etapas de (i) proporcionar una población de células que comprende células somáticas, (ii) reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en las células somáticas (iii) introducir ARN capaz de expresar uno o más factores que permitan la reprogramación de las células somáticas en células que tienen características de células madre en al menos una porción de las células somáticas y (iv) permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre.

En una realización, el ARN se introduce en al menos una porción de las células somáticas por electroporación.

En una realización, el ARN es ARN transcrito *in vitro*.

50 En una realización, uno o más factores comprenden OCT4 y SOX2. Los uno o más factores pueden comprender además KLF4 y/o c-MYC y/o NANOG y/o LIN28. En una realización, uno o más factores comprenden OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC y pueden comprender además LIN28. En una realización, uno o más factores comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28.

En una realización, la etapa de reducir la actividad de PKR en las células da como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en las células, en donde la mejora de la expresión del ARN en

las células preferiblemente comprende un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en las células.

5 En una realización, la etapa de reducir la actividad de PKR en las células comprende tratar las células con al menos un inhibidor de PKR. En una realización, el tratamiento de las células con al menos un inhibidor de PKR es durante un tiempo suficiente para dar como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en las células. En una realización, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor dirigido al sitio de unión del ATP de PKR. En una realización, el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazol-oxindol. En una realización, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetil)-7H-pirrol[2,3-g]benzotiazol-7-ona o 2-amino-purina. En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor viralmente derivado de PKR, en donde el inhibidor viralmente derivado de PKR se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en virus vacuna E3 y/o K3, o su ARN.

10 En una realización, la etapa de reducir la actividad de PKR en las células comprende silenciar la expresión del gen de PKR.

15 En una realización, el método comprende además la etapa de cultivar las células somáticas en presencia de al menos un inhibidor de la histona desacetilasa, en donde al menos un inhibidor de la histona desacetilasa comprende preferiblemente ácido valproico, butirato de sodio, tricostatina A y/o scriptaid.

En una realización, la etapa (iv) comprende cultivar las células somáticas bajo condiciones de cultivo de células madre embrionarias.

20 En una realización, las características de las células madre comprenden una morfología de células madre embrionarias.

En una realización, las células que tienen características de células madre tienen cariotipos normales, expresan actividad de telomerasa, expresan marcadores de superficie celular que son característicos de células madre embrionarias y/o expresan genes que son característicos de células madre embrionarias.

En una realización, las células que tienen características de células madre exhiben un estado pluripotente.

25 En una realización, las células que tienen características de células madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivados avanzados de las tres capas germinales primarias.

En una realización, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos. Preferiblemente, las células somáticas son células humanas.

30 La presente enseñanza se refiere también a un método para proporcionar tipos celulares diferenciados que comprende las etapas de (i) proporcionar células que tienen características de células madre utilizando el método para proporcionar células que tienen características de células madre de acuerdo con la invención, y (ii) cultivar las células que tienen características de células madre bajo condiciones que inducen o dirigen la diferenciación parcial o completa hasta un tipo celular diferenciado.

35 Como se describe en la presente memoria, la inhibición de PKR en células induce la producción de interferones. Por lo tanto, la enseñanza también se refiere a un método para aumentar la producción de interferón por una célula que comprende la etapa de reducir la actividad de PKR en la célula. De acuerdo con la presente enseñanza, la producción de interferón por una célula puede aumentarse *in vitro* o *in vivo*. Si la producción de interferón por una célula se incrementa *in vitro*, la célula puede ser administrada posteriormente a un sujeto.

40 Los interferones son conocidos por sus efectos antiproliferativos y apoptóticos, sus efectos antiangiogénicos y su capacidad para modular una respuesta inmune. Por lo tanto, la enseñanza también se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, preferiblemente un paciente tal como un paciente de cáncer, que comprende la etapa de reducir la actividad de PKR en una célula de dicho sujeto tal como mediante la administración de un inhibidor de expresión y/o actividad de PKR. El tratamiento de dicho sujeto puede tener como objetivo modular, preferiblemente activar, el sistema inmune de dicho sujeto. El tratamiento de dicho sujeto puede tener como objetivo, en particular, lograr o potenciar un efecto anticancerígeno, en particular una respuesta inmune anticancerígena, en dicho sujeto. Tales tratamientos también se pueden lograr incrementando la producción de interferón por una célula *in vitro* y posteriormente administrando la célula al sujeto. En una realización, la célula es una célula autóloga.

45 La célula en los aspectos anteriores de la invención puede ser una célula tal como se describe en la presente memoria. El interferón preferiblemente es interferón  $\alpha$  y/o interferón  $\beta$ , más preferiblemente interferón  $\alpha$ . La actividad de PKR puede reducirse en la célula como se describe en la presente memoria. Además, cuando se reduce la actividad de PKR en los aspectos anteriores de la invención, se puede introducir ARN en la célula, por ejemplo, como se describe en la presente memoria, o el ARN no se puede introducir en la célula. Si se introduce ARN en la célula, el ARN puede ser ARN como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Inducción de interferones por ARN IVT

Se electroporaron fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079SK) con 1  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y 5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifican para GFP desestabilizada (luc + GFP). Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  2  $\mu\text{M}$  (inhibidor de PKR). Se observó sobrerregulación de interferón alfa y transcritos beta de interferón en fibroblastos humanos inducidos por electroporación de ARN (Figura 1A y 1C). La inhibición de PKR usando  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  dio como resultado un abrumador aumento de los transcritos de interferón (Figura 1B y 1D).

Figura 2: Incremento dependiente de la dosis de la expresión de luciferasa mediante la inhibición de PKR

(AC) Se electroporaron fibroblastos primarios de prepucio humano de diferentes donantes y proveedores (panel A: fibroblastos BJ, panel B CCD1079Sk, panel C: HFF) y (D) fibroblastos embrionarios murinos (MEF) con 0,5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifican luciferasa de luciérnaga y 1,25  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para GFP mejorada (eGFP). Las células se sembraron en placas de 96 pozos por duplicado a una densidad de 30.000 células/pozo. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con cantidades crecientes de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  (inhibidor de PKR) que varían de 0,5  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  como se indica en las leyendas del panel. La actividad de luciferasa se midió en los momentos indicados. Se presentan los valores medios de los duplicados. Se observó un aumento dependiente de la dosis de luciferasa del gen informador.

Figura 3: Aumento dependiente de la dosis de la expresión de GFP mediante la inhibición de PKR

(AB) Se sometieron a electroporación los fibroblastos primarios de prepucio humano de diferentes donantes y proveedores (panel A: fibroblastos BJ, panel B CCD1079Sk) y (C) MEF con 0,5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y 1,25  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifican para GFP mejorada (eGFP). Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 250.000 células/pozo. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con cantidades crecientes de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  (inhibidor de PKR) que varían de 0,5  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  como se indica en las leyendas del panel. La expresión de GFP se midió por citometría de flujo en los momentos indicados. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las fracciones de células GFP positivas transfectadas. Se observó un aumento dependiente de la dosis de GFP del gen informador.

Figura 4: Efecto de la inhibición de PKR sobre la expresión del gen informador basado en ARN IVT en células endoteliales de vena umbilical humana primaria

Las células endoteliales de vena umbilical humana primaria (HUVEC) fueron electroporadas con 1  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica luciferasa de luciérnaga y 5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para la GFP desestabilizada. Las células se sembraron en placa por duplicado en placas de 96 pozos a una densidad de 10.000 células/pozo. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con cantidades crecientes de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  (inhibidor de PKR) en el intervalo de 0,5  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  como se indica en la leyenda del panel. La actividad de luciferasa se midió en los momentos indicados. Se suministran los valores medios de los duplicados. La expresión de luciferasa se mejoró en HUVEC de una forma dependiente de la dosis.

Figura 5: Efecto de la inhibición de PKR sobre la expresión del gen informador basado en ARN IVT en células T CD4+ y CD8+ primarias transfectadas y células dendríticas inmaduras

Se aislaron células T CD4+ y CD8+ positivas, primarias humanas, así como células dendríticas inmaduras (iDC) y se electroporaron con 5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para GFP desestabilizada. Se coelectroporaron iDC con 1  $\mu\text{g}$  ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con cantidades crecientes de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  (inhibidor de PKR) en el intervalo de 0,5  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  como se indica en las leyendas del panel. (A) Se recolectaron células T y (B) iDC en los momentos indicados y se evaluó la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las fracciones de células positivas para GFP transfectadas. (C) Para ensayos de luciferasa, se sembraron en placa iDC por duplicado en placas de 96 pozos a una densidad de 10.000 células/pozo. La actividad de luciferasa se midió en los momentos indicados. Se presentan los valores medios de los duplicados. Ni en las células ni en las iDC, la inhibición de PKR condujo a una mayor expresión de GFP (Figura 5A, B). En las iDC, la inhibición de la PKR dio lugar a la pérdida de expresión de luciferasa (Figura 5C)

Figura 6: Inhibición transitoria de la PKR después de la electroporación

Los fibroblastos BJ y CCD1079SK se electroporaron con 0,5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y 2,5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para eGFP. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para cada tipo de célula. Se sembraron en placa 10.000 células/pozo por duplicado en placas de 96 pozos. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con (A)  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  2  $\mu\text{M}$  o (B) 2-aminopurina 2  $\mu\text{M}$  (2-AP) durante 8 h, 24 h 48 h o permanentemente como se indica en las leyendas del panel. La actividad de la luciferasa se midió colectivamente 72 h después de la electroporación. Se presentan los valores medios de los duplicados. Estos datos muestran que la inhibición de la PKR es reversible. La inhibición permanente produce altos niveles de expresión de luciferasa durante 5 días.

Figura 7: Inhibición de PKR usando las proteínas E3 y K3 del virus vacuna cotransfectadas en fibroblastos y HUVEC

Los fibroblastos CCD1079SK y HUVEC fueron electroporados con ARN IVT que codifica luciferasa de luciérnaga (1 µg), GFP desestabilizado (5 µg) y 3 µg de E3 o K3 o ambos, como se indicó. Las electroporaciones se realizaron utilizando parámetros optimizados para cada tipo de célula. Se sembraron en placa 10.000 células/pozo por duplicado en placas de 96 pozos. CCD1079Sk se dejaron (A) sin tratar (símbolos con relleno) o (B) incubadas con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM (símbolos sin relleno). (C) Las HUVEC se dejaron sin tratar o se incubaron con concentraciones crecientes de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS como se indicó. La actividad de la luciferasa se midió en los momentos indicados después de la electroporación. Se presentan los valores medios de los duplicados. Ambas proteínas virales condujeron a un aumento de 2 veces en la expresión de luciferasa 24 horas después de la electroporación (Figura 7A). La aplicación adicional de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS dio como resultado un aumento aditivo de la expresión de luciferasa y estabilización (Figura 7B). Experimentos similares con células HUVEC revelaron que la combinación de E3 y K3 aumentó la expresión de luciferasa, que se incrementó adicionalmente mediante C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS de una forma dependiente de la dosis (Figura 7C).

Figura 8: Inhibición de la PKR usando proteínas E3 y K3 del virus vacuna cotransfectadas en células T humanas e iDC

(A) Las células T CD4 positivas primarias humanas y (B) CD8 positivas primarias humanas se aislaron y electroporaron con ARN IVT que codifica GFP desestabilizada (10 µg) y 5 µg de ambas, E3 y K3. Las electroporaciones se realizaron utilizando cubetas de 4 mm de separación y parámetros optimizados para cada tipo de célula. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con concentraciones crecientes de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS. Las células se recogieron en los momentos de tiempo indicados y la expresión de GFP se evaluó mediante citometría de flujo. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las fracciones de células positivas para GFP transfectadas. (C) Las iDC humanas se aislaron y electroporaron con ARN IVT que codificaba GFP desestabilizada (10 µg), 1 µg de luciferasa y 5 µg de ambas, E3 y K3. Las electroporaciones se realizaron utilizando cubetas de 4 mm de separación y parámetros optimizados para cada tipo de célula. Las células se sembraron en placa por duplicado en placas de 96 pozos a una densidad de 10.000 células/pozo y se dejaron sin tratar (panel izquierdo) o se incubaron con concentraciones crecientes de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS (panel derecho). La actividad de luciferasa se midió en los momentos de tiempo indicados. Se presentan los valores medios de los duplicados. Como se representa en la Figura 8A y 8B, las proteínas virales que inhiben PKR no aumentaron la expresión del gen informador en células T, ni en presencia ni en ausencia de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS. En las iDC, las proteínas virales, como se observó antes con el inhibidor, disminuyeron la expresión de luciferasa. Además, E3 y K3 no revirtieron el efecto negativo de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS en la expresión luciferasa (Figura 8C).

Figura 9: Efecto de la inhibición de PKR en la expresión del gen informador en fibroblastos transfectados con ARN compuesto de nucleótidos modificados

(A) Los fibroblastos CCD1079Sk se coelectroporaron con 1 µg de ARN IVT que codifica luciferasa y 5 µg de ARN IVT que codifica GFP desestabilizada, o bien no modificados o modificados con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (PU) como se indicó. Inmediatamente después de la electroporación, las células se sembraron por duplicado en placas de 96 pozos a una densidad de 10.000 células/pozo. Las células permanecieron sin tratar o se cultivaron en presencia del inhibidor de PKR 2 µM. Después de 7 h, 24 h, 48 h y 72 h, se evaluó la actividad de luciferasa. La incorporación de 5mC y PU en los transcritos aumenta la expresión de la luciferasa en aproximadamente 2 veces en comparación con el control no modificado. El uso de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM incrementa y estabiliza adicionalmente la expresión de luciferasa codificada por ARN IVT modificado.

Figura 10: Expresión aumentada y estabilizada de factores de transcripción de reprogramación por inhibición de PKR

(AB) Se sometieron a electroporación los fibroblastos del prepucio humano primario de diferentes donantes y proveedores (panel A: fibroblastos BJ; panel B: CCD1079Sk) y MEF con 0,5 µg de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y 1,25 µg de ARN IVT que codifica para eGFP y 2,5 µg de ARN IVT que codifica para cada uno de los factores de reprogramación individuales OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para cada tipo de célula. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 250.000 células/pozo. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con cantidades crecientes de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS (inhibidor de PKR) en el intervalo de 0,5 µM a 2 µM como se indica en la leyenda del panel. La expresión de OCT4 se detectó mediante tinción intracelular con un anticuerpo marcado fluorescentemente y se midió por citometría de flujo en los momentos de tiempo indicados. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las fracciones de células positivas para OCT4 transfectadas. (D) Los fibroblastos CCD1079Sk se electroporaron con ARN IVT como en B y se trataron durante 24 h o 48 h con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM. 72 h después de la electroporación se recogieron las células y se realizó tinción intracelular con anticuerpos marcados de forma fluorescente reactivos contra los factores de transcripción indicados. Se muestra la MFI de las fracciones de células positivas para el factor de transcripción. La expresión de los factores de transcripción OCT4, Nanog y SOX2 se incrementó fuertemente y se estabilizó en células tratadas de una forma dependiente de la dosis y del tiempo.

Figura 11: Inducción mejorada de genes marcadores de pluripotencia tras tratamiento con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS

Los fibroblastos CCD1079SK fueron electroporados en forma simulada o electroporados con ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga (1 µg), eGFP (1,25 µg), T grande de SV40 (1,25 µg), HPV16-E6 (1,25 µg), OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG y LIN28 (2,5 µg de OCT4 y cantidades equimolares para los otros). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación utilizando parámetros optimizados para CCD. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 250.000 células/pozo y se dejaron sin tratar o se incubaron con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM como se indicó. 72 h después de la electroporación se recogieron las células para extraer el ARN total y realizar análisis qRT-PCR para los marcadores de pluripotencia (A) GDF3 y (B) hTERT. La inducción de GDF3 e hTERT se incrementó por el tratamiento 72 h después de la electroporación.

Figura 12: Estabilización de constructos de ARN IVT bajo inhibición de PKR

(A) Los fibroblastos CCD1079SK fueron electroporados en forma simulada o electroporados con ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga (1 µg), eGFP (1,25 µg), T grande de SV40 (1,25 µg), HPV16-E6 (1,25 µg), OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG y LIN28 (2,5 µg de OCT4 y cantidades equimolares para los otros). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación utilizando parámetros optimizados para CCD. Después de la electroporación, las células se dejaron sin tratar o se incubaron con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM durante 24 horas o 48 horas. Después de 72 h se recolectaron las células para extraer el ARN total y realizar el análisis de qRT-PCR para los constructos de ARN IVT de codón optimizado OCT4 y SOX2. (B) Para determinar si C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS tiene un efecto sobre la semivida *in vivo* del ARN IVT, los fibroblastos CCD1079SK fueron electroporados en forma simulada o electroporados con ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga (1 µg), T grande de SV40 (1,25 µg), GPL mejorado (1,25 µg), E3 (3 µg) y K3 (3 µg) con adición de ARN IVT que codifica para OCT4, SOX2, KLF4, cMYC (cada 2,5 µg) o adición de eGFP (10 µg) como control. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación utilizando parámetros optimizados para CCD. Se sembraron en placa 250.000 células/pozo en placas de 6 pozos y se dejaron sin tratar o se incubaron con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM durante 80 h. Después de 8 h, 32 h, 56 h, 80 h se recolectaron las células para extraer el ARN total y realizar análisis de qRT-PCR para los constructos de ARN IVT de codón optimizado OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC. La decadencia de los transcritos se representó gráficamente en función del tiempo y se calculó la diferencia entre las semividas ( $t_{1/2}$ ) del constructo en ausencia o presencia de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS ( $\Delta t_{1/2} = t_{1/2} (+C_{13}H_8N_4OS) - t_{1/2} (-C_{13}H_8N_4OS)$ ). El tratamiento transitorio de las células con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM aumentó la abundancia de ARN IVT durante 72 h (A). La semivida de los constructos de ARN IVT se prolonga durante 1-2,5 h bajo la Inhibición de PKR (B). Por lo tanto, la estabilización de la expresión informadora bajo la inhibición de PKR se basa en cierta medida en la estabilización de los constructos de ARN IVT.

Figura 13: Secreción de interferones después de la electroporación de ARN IVT y bajo el efecto de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS

Los fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF) se electroporaron con ARN IVT que codifica eGFP (10 µg) sin modificar o modificado (mod.) con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (PU) o eGFP no modificada (10 µg) y con 3 µg de E3 y K3 (5mC y PU) como se indica.

ARN IVT induce la secreción de IFN β después de la electroporación. La secreción se mejora notablemente cuando las células se incuban con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS. La inducción de IFNβ se reduce cuando se modifica el ARN IVT con 5mC y PU.

Figura 14: La desactivación de PKR conduce a una estabilización de la expresión del transcripto similar a la inhibición de PKR

(A) Se electroporaron fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079Sk) con una cantidad creciente de una mezcla de ARNpi dirigida a PKR (Santa Cruz, sc-36263) que varía de 20 nM a 80 nM. El nivel de expresión de PKR se evaluó mediante qRT-PCR. Se representan los niveles relativos de expresión en comparación con las células de tipo silvestre. PKR se redujo hasta 5-10% con todas las concentraciones de la mezcla de ARNpi 24 h después de la electroporación. Sólo 80nM son suficientes para reducir PKR más de 48 h.

(B) Se electroporaron fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079Sk) con ARN IVT que codificaba eGFP no modificado (1,5 µg) ya sea solo o con una cantidad creciente de una mezcla de ARNpi dirigida a PKR que varía de 20 nM a 80 nM. El nivel de expresión de los genes de respuesta a IFN, OAS1 y OAS2, se evaluó mediante qRT-PCR. Se representan los niveles relativos de expresión en comparación con las células de tipo silvestre. Los niveles de expresión de OAS1 y OAS2 no se alteran significativamente por la adición de mezcla de ARNpi lo que indica que el ARNpi no induce IFN después de la electroporación.

(C) Los fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079Sk) se electroporaron con o sin 80 nM de mezcla de ARNpi dirigida a PKR y 48 horas después con 1 µg de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y para eGFP (2,5 µg). Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM. La actividad de luciferasa se midió en los momentos indicados. La electroporación de células incubadas previamente con ARNpi dirigidas a PKR y por lo tanto que están en un estado de carencia de PKR conduce a una cinética bastante similar y al aumento de la expresión del gen informador como incubación con 2 µM del inhibidor de PKR C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS con un efecto estabilizador ligeramente inferior. La combinación de incubación previa con mezcla de ARNpi dirigida a PKR y el uso del inhibidor conduce a un nivel de expresión aún más alto del transcripto informador.

Figura 15: Efecto de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS en la traducción de ARN IVT usando lipofección

Se empaquetaron 1,2 µg de ARN IVT 5'-trifosforilado y no modificado (0,8 µg que codifica la luciferasa, 0,4 µg de GFP) con 6 µL de reactivo de transfección de RNAiMAX (Invitrogen) y se transfectaron en fibroblastos de prepucio humano y el medio complementado con concentraciones crecientes de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS. En los momentos indicados se lisaron las células y se midió la actividad de luciferasa de los lisados. C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS tuvo un efecto estabilizador sobre la traducción de la luciferasa. Este efecto dependió de la dosis.

Figura 16: Efecto de 2-aminopurina sobre la expresión de luciferasa

Los fibroblastos de prepucio humano se electroporaron con 2 µg de ARN IVT que codifica la luciferasa de luciérnaga y 5 µg de ARN IVT que codifican la GFP y se incubaron con las concentraciones de 2-AP indicadas en la leyenda del panel. 10 mM a 20 mM de 2-AP condujeron a un aumento similar de la traducción que C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM.

#### Descripción detallada de la invención

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que la enseñanza como tal no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos aquí, ya que pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enlistan con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier cantidad para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos descritos y las realizaciones preferidas no deben ser interpretados para limitar la presente invención a sólo las realizaciones explícitamente descritas. Esta descripción debe entenderse como soporte y abarca realizaciones que combinan las realizaciones explícitamente descritas con cualquier cantidad de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe ser considerada divulgada por la descripción de la presente enseñanza a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, si en una realización preferida el ARN comprende una cola de poli(A) que consta de 120 nucleótidos y en otra realización preferida la molécula de ARN comprende un análogo de caperuza 5', entonces en una realización preferida, el ARN comprende la cola de poli(A) que consistente en 120 nucleótidos y el análogo de caperuza 5'.

Preferiblemente, los términos usados en la presente memoria se definen como se describe en el "Glosario multilingüe de términos biotecnológicos: (Recomendaciones de la IUPAC)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, bioquímica y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura relacionada con este campo (consultar, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, la palabra "comprende" y variaciones tales como "que comprende" y "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un miembro declarado, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas, aunque en algunas realizaciones dicho otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas puede ser excluido, es decir, el objeto consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas establecidos. Los términos "un" y "uno, una" y "el, la" y la referencia similar utilizados en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben ser interpretados en el sentido de abarcar tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o sea claramente contradicho por el contexto. La mención de intervalos de valores en la presente memoria pretende simplemente servir como un método abreviado de referencia individual a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual se incorpora en la especificación como si estuviera mencionado individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o bien se contradiga claramente con el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o un ejemplo de expresión (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en la presente memoria, sólo pretende ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Los términos tales como "reducción" o "inhibición" se refieren a la capacidad de causar una disminución global, preferiblemente del 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente del 50% o más, y la mayoría preferiblemente del 75% o más, en el nivel. El término "inhibir" o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente cercana a cero.

5 Los términos tales como "aumentar", "mejorar" o "prolongar" se refieren preferiblemente a un aumento, mejora o prolongación en aproximadamente al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, preferiblemente al menos 80%, preferiblemente al menos 100%, preferiblemente al menos 200% y en particular al menos 300%. Estos términos también pueden referirse a un aumento, mejora o prolongación desde cero o un nivel no medible o no detectable hasta un nivel de más de cero o un nivel que sea medible o detectable.

10 El término "recombinante" en el contexto de la presente invención significa "hecho mediante ingeniería genética". Preferiblemente, una "entidad recombinante" tal como una proteína recombinante en el contexto de la presente invención no es de origen natural, y preferiblemente es el resultado de una combinación de entidades tales como secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico que no están combinadas en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína recombinante en el contexto de la presente invención puede contener varias secuencias de aminoácidos derivadas de diferentes proteínas fusionadas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos.

15 El término "de origen natural" tal como se usa en la presente memoria se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluyendo virus) y puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificado por el hombre en el laboratorio, es de origen natural.

20 Un ácido nucleico está de acuerdo con la enseñanza preferiblemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARNm), más preferiblemente ARN, lo más preferiblemente ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT). Los ácidos nucleicos incluyen, de acuerdo con la invención, ADN, ADNc, ARNm genómicos, moléculas producidas de forma recombinante y químicamente sintetizadas. Según la enseñanza, un ácido nucleico puede estar presente como una molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o cerrada en forma circular de manera covalente. De acuerdo con la enseñanza, puede aislarse un ácido nucleico. El término ácido nucleico aislado significa, de acuerdo con la invención, que el ácido nucleico (i) se amplificó *in vitro*, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se produjo en forma recombinante por clonación, (iii) se purificó, por ejemplo, por escisión y separación por electroforesis en gel, o (iv) se sintetizó, por ejemplo, mediante síntesis química. Se puede emplear un ácido nucleico para su introducción en, es decir, transfección de, células, en particular, en forma de ARN que puede prepararse por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. Además, el ARN puede modificarse antes de su aplicación por secuencias estabilizadoras, protección y poliadenilación.

30 Como ácido nucleico, se pueden usar en particular ADN, para la expresión de más de un péptido o proteína, ya sea de un tipo de ácido nucleico en el que los diferentes péptidos o proteínas están presentes en diferentes moléculas de ácido nucleico o un tipo de ácido nucleico en el que los péptidos o proteínas están presentes en la misma molécula de ácido nucleico.

35 En el contexto de la presente enseñanza, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido y preferiblemente está compuesto total o sustancialmente de residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β-D-ribofuranosilo. El término "ARN" comprende ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcial o completamente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético y ARN generado de forma recombinante tal como ARN modificado que difiere del ARN de origen natural por adición, supresión, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al extremo o los extremos de un ARN o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos no naturales o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden ser denominados como análogos o análogos del ARN de origen natural.

45 De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm". El término "ARNm" significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcrito" que se genera usando una plantilla de ADN y que codifica un péptido o proteína. Típicamente, un ARNm comprende una 5'-UTR, una región codificante de la proteína y una 3'-UTR. El ARNm sólo posee una semivida limitada en las células e *in vitro*. En el contexto de la presente invención, el ARNm puede generarse por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. La metodología de transcripción *in vitro* es conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción *in vitro* comercialmente disponibles.

55 De acuerdo con la enseñanza, la estabilidad y eficacia de la traducción del ARN puede modificarse según se requiera. Por ejemplo, el ARN puede estabilizarse y aumentar su traducción por una o más modificaciones que tienen efectos estabilizadores y/o aumento de la eficacia de la traducción del ARN. Tales modificaciones se describen, por ejemplo, en el documento PCT/EP2006/009448 (documento WO2007/036366). Con el fin de aumentar la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, se puede modificar dentro de la región codificante, es decir, la secuencia que codifica el péptido o proteína expresada, preferiblemente sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresada, para aumentar el contenido de GC para aumentar la estabilidad del ARNm y para realizar una optimización de codones y, por lo tanto, mejorar la traducción en células.

El término "modificación" en el contexto del ARN utilizado en la presente enseñanza incluye cualquier modificación

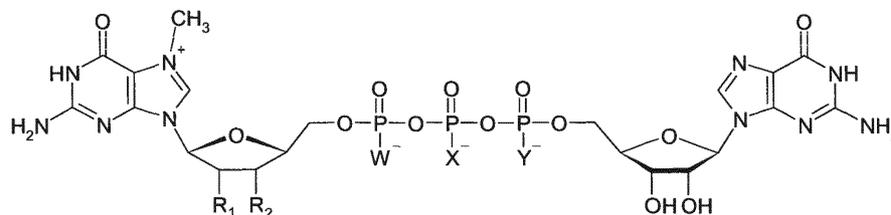
de un ARN que no esté presente naturalmente en dicho ARN.

En una realización, el ARN utilizado de acuerdo con la invención no tiene 5'-trifosfatos sin caperuza. La eliminación de estos 5'-trifosfatos sin caperuza se puede conseguir tratando el ARN con una fosfatasa.

5 El ARN puede tener ribonucleótidos modificados con el fin de aumentar su estabilidad y/o disminuir la citotoxicidad. Por ejemplo, en una realización, en el ARN utilizado de acuerdo con la invención, la 5-metilcitosina está sustituida parcial o totalmente, preferiblemente completamente, por la citidina. Alternativamente o adicionalmente, en una realización, en el ARN usado de acuerdo con la invención se sustituye la pseudouridina parcial o totalmente, preferiblemente completamente, por la uridina.

10 En una realización, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con una caperuza 5' o análogo de caperuza 5'. El término "caperuza 5'" se refiere a una estructura de caperuza encontrada en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de un enlace inusual de 5' con 5' trifosfato. En una forma de realización, esta guanosina se metila en la posición 7. El término "camp 5' convencional" se refiere a un camp 5' de ARN de origen natural, preferiblemente a la caperuza 7-metilguanosina (m<sup>7</sup>G). En el contexto de la presente invención, el término "caperuza 5'" incluye un análogo de caperuza 5' que se asemeja a la estructura de caperuza de ARN y se modifica para que posea la capacidad de estabilizar ARN y/o mejorar la traducción de ARN si está unido a la misma, preferiblemente *in vivo* y/o en una célula.

Preferiblemente, el extremo 5' del ARN incluye una estructura de Caperuza que tiene la siguiente fórmula general:



20 en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente hidroxilo o metoxi y W<sup>-</sup>, X<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup> son independientemente oxígeno, azufre, selenio o BH<sub>3</sub>. En una realización preferida, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidroxilo y W<sup>-</sup>, X<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup> son oxígeno. En otra realización preferida, uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, preferiblemente R<sub>1</sub> es hidroxilo y el otro es metoxi y W<sup>-</sup>, X<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup> son oxígeno. En otra realización preferida, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidroxilo y uno de W<sup>-</sup>, X<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup>, preferiblemente X<sup>-</sup> es azufre, selenio o BH<sub>3</sub>, preferiblemente azufre, mientras que el otro es oxígeno. En otra realización preferida, uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, preferiblemente R<sub>2</sub> es hidroxilo y el otro es metoxi y uno de W<sup>-</sup>, X<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup>, preferiblemente X<sup>-</sup> es azufre, selenio o BH<sub>3</sub>, preferiblemente azufre mientras que el otro es oxígeno.

En la fórmula anterior, el nucleótido en el lado derecho está conectado a la cadena de ARN a través de su grupo 3'.

Aquellas estructuras de Caperuza en las que al menos uno de W<sup>-</sup>, X<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup> es azufre, es decir, que tienen una fracción fosforotioato, existen en diferentes formas diastereoisómeras, todas las cuales están incluidas aquí. Además, la presente invención abarca todos los tautómeros y estereoisómeros de la fórmula anterior.

30 Por ejemplo, la estructura de Caperuza que tiene la estructura anterior en la que R<sub>1</sub> es metoxi, R<sub>2</sub> es hidroxilo, X<sup>-</sup> es azufre y W<sup>-</sup> e Y<sup>-</sup> son oxígeno existe en dos formas diastereoisoméricas (Rp y Sp). Estas se pueden resolver mediante HPLC de fase inversa y se denominan D1 y D2 de acuerdo con su orden de elución de la columna de HPLC de fase inversa. De acuerdo con la invención, el isómero D1 de m<sub>2</sub><sup>7,2'-0</sup>GnpspG es particularmente preferido.

35 Proporcionar un ARN con una caperuza 5' o análogo de caperuza 5' puede lograrse mediante la transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN en presencia de dicha caperuza 5' o análogo de caperuza 5', donde dicha caperuza 5' es co-transcripcionalmente incorporada en la cadena de ARN generada, o el ARN puede ser generado, por ejemplo, mediante la transcripción *in vitro*, y la caperuza 5' puede unirse al ARN después de la transcripción usando enzimas de remate, por ejemplo, enzimas de remate del virus vacuna.

40 El ARN puede comprender otras modificaciones. Por ejemplo, una modificación de ARN adicional puede ser una extensión o truncamiento de la cola de poli(A) de origen natural o una alteración de las regiones no traducidas 5' o 3' (UTR) tales como la introducción de una UTR que no está relacionada con las regiones de codificación de dicho ARN, por ejemplo, el intercambio de la 3'-UTR existente con o la inserción de una o más, preferiblemente dos copias de una 3'-UTR derivada de un gen de globina, tal como alfa2-globina, alfa1-globina, preferiblemente beta-globina, más preferiblemente beta-globina humana.

45 El ARN que tiene una secuencia de poli-A no enmascarada se traduce más eficazmente que el ARN que tiene una secuencia de poli-A enmascarada. El término "cola de poli (A)" o "secuencia de poli-A" se refiere a una secuencia de residuos de adenilo (A) que típicamente se encuentra en el extremo 3' de una molécula de ARN y "secuencia de poli-A no enmascarada" significa que la secuencia de poli-A en el extremo 3' de una molécula de ARN termina con una A de la secuencia de poli-A y no es seguida por nucleótidos distintos de A situados en el extremo 3', es decir, en

dirección 3', de la secuencia de poli-A. Además, una secuencia larga de poli-A de aproximadamente 120 pares de bases da como resultado una estabilidad óptima del transcrito y eficacia de traducción del ARN.

5 Por lo tanto, con el fin de aumentar la estabilidad y/o la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, se puede modificar para que esté presente junto con una secuencia de poli-A, preferiblemente con una longitud de 10 a 500, más preferiblemente de 30 a 300, incluso más preferiblemente de 65 a 200 y especialmente de 100 a 150 residuos de adenosina. En una realización especialmente preferida, la secuencia de poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Para aumentar aún más la estabilidad y/o la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza, la secuencia de poli-A puede estar no enmascarada.

10 Además, la incorporación de una región 3' no traducida (UTR) en la región no traducida en 3' de una molécula de ARN puede dar como resultado una mejora en la eficacia de la traducción. Se puede conseguir un efecto sinérgico incorporando dos o más de tales regiones 3' no traducidas. Las regiones 3' no traducidas pueden ser autólogas o heterólogas al ARN en el que se introducen. En una realización particular, la región 3' no traducida se deriva del gen de β-globina humana.

15 Una combinación de las modificaciones descritas anteriormente, es decir, la incorporación de una secuencia de poli-A, el desenmascaramiento de una secuencia de poli-A y la incorporación de una o más regiones 3' no traducidas, tiene una influencia sinérgica sobre la estabilidad del ARN y el aumento de la eficiencia de la traducción.

20 El término "estabilidad" del ARN se refiere a la "semivida" del ARN. La "semivida" se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, la cantidad o el número de moléculas. En el contexto de la presente invención, la semivida de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La semivida del ARN puede influir en la "duración de la expresión" del ARN. Se puede esperar que el ARN que tiene una semivida larga se exprese durante un período de tiempo prolongado.

Por supuesto, si de acuerdo con la presente invención se desea disminuir la estabilidad y/o la eficacia de la traducción del ARN, es posible modificar el ARN para interferir con la función de los elementos como se ha descrito anteriormente, incrementando la estabilidad y/o eficacia de la traducción del ARN.

25 El término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN y/o péptidos o proteínas, por ejemplo, por transcripción y/o traducción. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable.

30 Según la enseñanza, términos tales como "expresión de ARN" o "que expresa ARN" se refieren a la producción de péptido o proteína codificada por el ARN. Preferiblemente, dichos términos se refieren a la traducción de ARN para expresar, es decir, producir péptido o proteína codificada por el ARN.

35 En el contexto de la presente enseñanza, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. Según la presente invención, el término "transcripción" comprende la "transcripción *in vitro*", en donde el término "transcripción *in vitro*" se refiere a un proceso en el que ARN, en particular ARNm, es sintetizado *in vitro* en un sistema libre de células, preferiblemente usando extractos celulares apropiados. Preferiblemente, se aplican vectores de clonación para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de transcripción y están de acuerdo con la presente invención abarcados por el término "vector". De acuerdo con la presente enseñanza, el ARN usado en la presente enseñanza preferiblemente es un ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT) y puede obtenerse por transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor para cualquier ARN polimerasa. Ejemplos particulares de ARN polimerasas son las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. Preferiblemente, la transcripción *in vitro* de acuerdo con la invención está controlada por un promotor T7 o SP6. Una plantilla de ADN para la transcripción *in vitro* puede obtenerse por clonación de un ácido nucleico, en particular ADNc, e introducirlo en un vector apropiado para la transcripción *in vitro*. El ADN puede obtenerse por transcripción inversa de ARN.

40 La plantilla vectorial que contiene ADNc puede comprender vectores que portan diferentes insertos de ADNc que después de la transcripción dan como resultado una población de diferentes moléculas de ARN opcionalmente capaces de expresar diferentes péptidos o proteínas o pueden comprender vectores que portan sólo una especie de inserto de ADNc que tras la transcripción sólo dan como resultado una población de una especie de ARN capaz de expresar sólo un péptido o proteína. De este modo, es posible producir ARN capaz de expresar un único péptido o proteína solamente o producir composiciones de diferentes ARN tales como bibliotecas de ARN y ARN de células completas capaces de expresar más de un péptido o proteína, por ejemplo, una composición de péptidos o proteínas. La presente enseñanza prevé la introducción de todos dichos ARN en las células.

45 El término "traducción" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante la cual una cadena de ARN mensajero dirige el montaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

Las secuencias de control de expresión o secuencias reguladoras, que de acuerdo con la enseñanza pueden estar

- ligadas funcionalmente con un ácido nucleico, pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificadora y una secuencia reguladora están unidas entre sí "funcionalmente" si están unidas conjuntamente de forma covalente, de modo que la transcripción o traducción de la secuencia codificante está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia reguladora. Si la secuencia codificadora se traduce en una proteína funcional, con enlace funcional de una secuencia reguladora con la secuencia codificante, la inducción de la secuencia reguladora conduce a una transcripción de la secuencia codificante, sin provocar un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante o incapacidad de la secuencia codificante de ser traducida en la proteína o péptido deseado.
- El término "secuencia de control de expresión" o "secuencia reguladora" comprende, de acuerdo con la enseñanza, promotores, secuencias de unión al ribosoma y otros elementos de control, que controlan la transcripción de un ácido nucleico o la traducción del ARN derivado. En ciertas realizaciones de la invención, las secuencias reguladoras pueden ser controladas. La estructura precisa de las secuencias reguladoras puede variar dependiendo de la especie o dependiendo del tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y secuencias 5' y 3' no traducidas, que están implicadas en el inicio de la transcripción o traducción, tales como la caja TATA, secuencia de remate, secuencia CAAT y similares. En particular, las secuencias reguladoras 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido funcionalmente. Las secuencias reguladoras también pueden comprender secuencias mejoradoras o secuencias activadoras en dirección 5'.
- Términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza que la cantidad de péptido o proteína expresada por un número dado de moléculas de ARN es mayor que la cantidad de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN, en el que la expresión de las moléculas de ARN se realiza bajo las mismas condiciones excepto la condición que da como resultado la expresión aumentada o incrementada del ARN, tal como una reducción de la actividad de proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una célula frente a la no reducción de la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una célula. En este contexto, las "mismas condiciones" se refieren a una situación en la que las mismas secuencias de ARN que codifican el mismo péptido o proteína se introducen por los mismos medios en las mismas células, las células se cultivan bajo las mismas condiciones (excepto la condición que da lugar al aumento o incremento de la expresión) y las cantidades de péptido o proteína se miden por los mismos medios. La cantidad de péptido o proteína se puede expresar en moles, o en peso, por ejemplo, en gramos, o en masa o por actividad polipeptídica, por ejemplo, si el péptido o proteína es una enzima, puede expresarse como actividad catalítica o si el péptido o proteína es un anticuerpo o antígeno o un receptor, puede expresarse como afinidad de unión. En una realización, términos tales como "aumento de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente invención que la cantidad de péptido o proteína expresada por un número dado de moléculas de ARN y dentro de un período dado de tiempo es mayor que la cantidad de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN y dentro del mismo período de tiempo. Por ejemplo, el valor máximo de péptido o proteína expresado por un número dado de moléculas de ARN en un momento determinado puede ser superior al valor máximo de péptido o proteína expresado por el mismo número de moléculas de ARN. En otras realizaciones, el valor máximo de péptido o proteína expresado por un número dado de moléculas de ARN no necesita ser mayor que el valor máximo de péptido o proteína expresado por el mismo número de moléculas de ARN. Sin embargo, la cantidad media de péptido o proteína expresada por el número dado de moléculas de ARN dentro de un periodo de tiempo dado puede ser mayor que la cantidad media de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN. Los últimos casos se denominan en la presente memoria como "nivel de expresión superior" o "nivel de expresión aumentado" y se refieren a valores máximos de expresión más altos y/o valores medios de expresión más altos. Alternativa o adicionalmente, términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza también que el tiempo en el cual el péptido o la proteína es expresado por moléculas de ARN puede ser más largo que el tiempo en la que el péptido o proteína es expresado por las mismas moléculas de ARN. Por lo tanto, en una realización, términos tales como "mejora de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza también que la cantidad de péptido o proteína expresada por un número dado de moléculas de ARN es mayor que la cantidad de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN, puesto que el periodo de tiempo en el que el ARN está presente y expresado de forma estable es más largo que el período de tiempo en el que está presente y expresado el mismo número de moléculas de ARN. Estos casos se denominan en la presente memoria también como "duración aumentada de la expresión".
- Preferiblemente, dichos periodos de tiempo más largos se refieren a la expresión durante al menos 48 h, preferiblemente durante al menos 72 h, más preferiblemente durante al menos 96 h, en particular durante al menos 120 h o incluso más después de la introducción del ARN o después de la primera introducción (por ejemplo, en el caso de transfecciones repetidas) de ARN en una célula.
- El nivel de expresión y/o duración de expresión del ARN puede determinarse midiendo la cantidad, tal como la cantidad total expresada y/o la cantidad expresada en un período de tiempo dado, y/o el tiempo de expresión del péptido o proteína codificada por el ARN, por ejemplo, utilizando un procedimiento ELISA, un procedimiento de inmunohistoquímica, un procedimiento de análisis cuantitativo de imágenes, una transferencia Western, espectrometría de masas, un procedimiento de inmunohistoquímica cuantitativa o un ensayo enzimático.

5 En realizaciones particulares, el ARN de acuerdo con la enseñanza comprende una población de diferentes moléculas de ARN, por ejemplo, una mezcla de diferentes moléculas de ARN que codifican opcionalmente diferentes péptidos y/o proteínas, ARN de células enteras, una biblioteca de ARN, o una parte de las mismas, por ejemplo, una biblioteca de moléculas de ARN expresadas en un tipo de célula particular, tales como células no diferenciadas, en particular células madre, tales como células madre embrionarias, o una fracción de la biblioteca de moléculas de ARN, tal como ARN con expresión enriquecida en células no diferenciadas, en particular células madre tales como células madre embrionarias en relación con células diferenciadas. Por lo tanto, de acuerdo con la enseñanza, el término "ARN" puede incluir una mezcla de moléculas de ARN, ARN de células enteras o una fracción de las mismas, que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende el aislamiento de ARN de células y/o por medios recombinantes, en particular por transcripción *in vitro*.

10 Preferiblemente, de acuerdo con la enseñanza, el ARN a expresar en una célula se introduce en dicha célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. El ARN puede introducirse en una célula antes, después y/o simultáneamente con la reducción de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en la célula. Preferiblemente, la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en la célula se reduce mientras se desea la expresión del ARN en la célula. En una realización de los métodos de acuerdo con la invención, el ARN que ha de introducirse en una célula se obtiene por transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada.

15 El ARN utilizado de acuerdo con la presente invención puede tener una composición conocida (en esta realización se sabe con preferencia qué péptidos o proteínas están siendo expresados por el ARN) o la composición del ARN puede ser parcial o totalmente desconocida. Alternativamente, el ARN puede tener una función conocida o la función del ARN puede ser parcial o totalmente desconocida.

20 De acuerdo con la enseñanza, los términos "ARN capaz de expresar" y "codificación de ARN" se usan indistintamente en la presente memoria y con respecto a un péptido o proteína particular significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede ser expresado para producir dicho péptido o proteína. Preferiblemente, el ARN de acuerdo con la enseñanza es capaz de interactuar con la maquinaria de traducción celular para proporcionar el péptido o proteína que es capaz de expresar.

25 Según la enseñanza, el ARN puede introducirse en células ya sea *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. Las células en las que se ha introducido el ARN *in vitro* podrían, preferiblemente después de la expresión del RNA *in vitro* por los métodos de la enseñanza, ser administradas a un paciente.

30 Los términos tales como "transferencia", "introducción" o "transfección" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva y se refieren a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos exógenos o heterólogos, en particular RNA en una célula. De acuerdo con la presente enseñanza, la célula puede ser una célula aislada o puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo. Puede usarse cualquier técnica que sea adecuada para introducir ARN en las células. Preferiblemente, el ARN se introduce en células mediante técnicas estándar. Tales técnicas comprenden la transfección de precipitados de fosfato de calcio de ácido nucleico, la transfección de ácidos nucleicos que están asociados con DEAE, la transfección o infección con virus que portan los ácidos nucleicos de interés, electroporación, lipofección y microinyección. De acuerdo con la presente enseñanza, la administración de un ácido nucleico se logra como ácido nucleico desnudo o en combinación con un reactivo de administración. Preferiblemente, la administración de ácidos nucleicos está en forma de ácidos nucleicos desnudos. Preferiblemente, el ARN se administra en combinación con sustancias estabilizadoras tales como inhibidores de RNasa. La presente enseñanza también prevé la introducción repetida de ácidos nucleicos en las células para permitir la expresión sostenida durante períodos de tiempo prolongados.

35 Las células pueden transfectarse, por ejemplo, utilizando kits de transfección basados en liposomas comercialmente disponibles tales como Lipofectamina<sup>MR</sup> (Invitrogen) y pueden transfectarse con cualquier vehículo con el que se pueda asociar el ARN, por ejemplo, formando complejos con el ARN o formando vesículas en las que el ARN está encerrado o encapsulado, dando como resultado una estabilidad incrementada del ARN en comparación con el ARN desnudo. Los vehículos útiles de acuerdo con la enseñanza incluyen, por ejemplo, vehículos que contienen lípidos tales como lípidos catiónicos, liposomas, en particular liposomas catiónicos, y micelas. Los lípidos catiónicos pueden formar complejos con ácidos nucleicos cargados negativamente. Se puede usar cualquier lípido catiónico de acuerdo con la enseñanza.

40 Preferiblemente, la introducción de ARN que codifica un péptido o proteína en una célula da como resultado la expresión de dicho péptido o proteína en la célula. En realizaciones particulares, se prefiere el direccionamiento de los ácidos nucleicos a células particulares. En tales realizaciones, un vehículo que se aplica para la administración del ácido nucleico a una célula (por ejemplo, un retrovirus o un liposoma), exhibe una molécula de direccionamiento. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo que es específico para una proteína de membrana de superficie sobre la célula objetivo o un ligando para un receptor en la célula objetivo puede incorporarse en el vehículo de ácido nucleico o puede unirse al mismo. En el caso de que el ácido nucleico sea administrado por liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie que está asociada con endocitosis pueden incorporarse en la formulación de liposomas con el fin de permitir el direccionamiento y/o absorción. Tales proteínas abarcan proteínas de la cápside de fragmentos de las mismas que son específicas para un tipo de célula particular, anticuerpos contra proteínas que están internalizadas, proteínas que apuntan a una localización intracelular, etc.

5 La electroporación o electropermeabilización se refiere a un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Se utiliza generalmente en biología molecular como una manera de introducir alguna sustancia en una célula. La electroporación se hace generalmente con electroporadores, aparatos que crean un campo electromagnético en la solución celular. La suspensión de células se pipetea en una cubeta de vidrio o plástico que tiene dos electrodos de aluminio en sus costados. Para la electroporación, se usa típicamente una suspensión de células de aproximadamente 50 microlitros. Antes de la electroporación, se mezcla con el ácido nucleico a transfectar. La mezcla se pipetea en la cubeta, se ajusta la tensión y la capacitancia y se inserta la cubeta en el electroporador. Preferiblemente, el medio líquido se añade inmediatamente después de la electroporación (en la cubeta o en un tubo Eppendorf) y el tubo se incuba a la temperatura óptima de las células durante una hora o más para permitir la recuperación de las células y opcionalmente la expresión de resistencia a los antibióticos.

10 De acuerdo con la enseñanza se prefiere que un ácido nucleico tal como ARN que codifica un péptido o proteína una vez tomado o introducido en una célula la cual puede estar presente *in vitro* o en un sujeto da como resultado la expresión de dicho péptido o proteína. La célula puede expresar el péptido o proteína codificados intracelularmente, puede secretar el péptido o proteína codificado, o puede expresarlo en la superficie.

15 Si de acuerdo con la enseñanza, el ARN capaz de expresar ciertos factores para la reprogramación de células somáticas se introduce en células somáticas, se prefiere que esta introducción de ARN resulte en la expresión de dichos factores durante un período de tiempo para completar el proceso de reprogramación y en el desarrollo de células que tienen características de células madre. Preferiblemente, la introducción de ARN capaz de expresar ciertos factores tal como se describe en la presente memoria en células somáticas da como resultado la expresión de dichos factores durante un período de tiempo prolongado, preferiblemente durante al menos 10 días, preferiblemente durante al menos 11 días y más preferiblemente durante al menos 12 días. Para conseguir dicha expresión a largo plazo, el ARN se introduce preferiblemente periódicamente en las células más de una vez, preferiblemente usando electroporación. Preferiblemente, el ARN se introduce en las células al menos dos veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, incluso más preferiblemente al menos 5 veces hasta preferiblemente 6 veces, más preferiblemente hasta 7 veces o incluso hasta 8 , 9 o 10 veces, preferiblemente durante un periodo de tiempo de al menos 10 días, preferiblemente durante al menos 11 días y más preferiblemente durante al menos 12 días para asegurar la expresión de uno o más factores durante un período de tiempo prolongado. Preferiblemente, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN son de 24 horas a 120 horas, preferiblemente de 48 horas a 96 horas. En una realización, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN no son mayores de 72 horas, preferiblemente no más de 48 horas o 36 horas. En una realización, antes de la siguiente electroporación, se permite que las células se recuperen de la electroporación previa. En esta realización, los períodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN son al menos de 72 horas, preferiblemente al menos de 96 horas, más preferiblemente al menos de 120 horas. En cualquier caso, las condiciones deben seleccionarse de manera que los factores se expresen en las células en cantidades y por periodos de tiempo que soportan el proceso de reprogramación.

20 Preferiblemente se utiliza por electroporación al menos 1 µg, preferiblemente al menos 1,25 µg, más preferiblemente al menos 1,5 µg y preferiblemente hasta 20 µg, más preferiblemente hasta 15 µg, más preferiblemente hasta 10 µg, más preferiblemente hasta 5 µg, preferiblemente 1 a 10 µg, incluso más preferiblemente 1 a 5 µg, o 1 a 2,5 µg de ARN para cada péptido, proteína o factor.

25 Preferiblemente, si se produce una pérdida de viabilidad de las células por electroporaciones repetidas, se añaden células previamente no electroporadas como células portadoras. Preferiblemente, se añaden previamente células no sometidas a electroporación antes, durante o después de una o más de la 4a y subsiguientes, preferiblemente, la 5a y siguientes electroporaciones tales como antes, durante o después de la 4a y 6a electroporación. Preferiblemente, se añaden previamente células no electroporadas antes, durante o después de la cuarta o quinta y cada electroporación subsiguiente. Preferiblemente, las células previamente no electroporadas son las mismas células que aquellas en las que se introduce ARN.

30 La proteína quinasa dependiente de ARN de la proteína de unión a ARN (proteína quinasa activada por ARN, PKR) se une a los ARN de una manera dependiente de la longitud. La PKR es una proteína quinasa de serina/treonina inducida por interferón identificada inicialmente en la respuesta viral en virtud de su unión a y activación por la estructura secundaria extensa formada por secuencias de ARN viral. La PKR humana es de 68 kDa con un dominio de unión a ARNbc en el extremo terminal N de aproximadamente 20 kDa y un dominio de proteína quinasa en el extremo terminal C. La PKR *in vitro* se activa por unión a moléculas de ARN con estructura secundaria dúplex extensa. Se cree que la enzima *in vivo* es activada por ARN bicatenario viral (ARNbc) o intermedios replicativos virales que comprenden ARNbc. La unión del ARN bicatenario a la PKR provoca un cambio conformacional en la enzima que altera el sitio de unión a ATP en el dominio quinasa y conduce a la autofosforilación en múltiples residuos de serina y treonina a lo largo de la secuencia de PKR. La autofosforilación estimulada por ARN aumenta la sensibilidad celular a los estímulos apoptóticos y proinflamatorios a través de una serie de vías putativas, incluyendo la fosforilación de su conocido factor 2 sustrato de iniciación eucariota (eIF2a).

35 El término "PKR" se refiere preferiblemente a PKR humana, y en particular a una proteína que comprende la

5 secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 13 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "PKR" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 32. El término "PKR" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes naturalmente. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuyo significado a menudo no está claro. La secuenciación genética completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de una especie es un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos con una especie de origen diferente a la de un ácido nucleico dado o secuencia de aminoácidos. Un experto en la técnica comprenderá que la secuencia de ADNc de PKR como se ha descrito anteriormente sería equivalente a ARNm de PKR y puede ser usado para la generación de ácidos nucleicos inhibidores contra PKR.

10 La actividad de proteína quinasa que incluye la autofosforilación de proteína quinasa puede medirse mediante una variedad de técnicas conocidas por el experto en la materia. Un método implica la separación de ATP sin reaccionar del sustrato de quinasa fosforilada, por ejemplo, precipitando fosfoproteína sobre tiras de celulosa mediante ácido tricloroacético seguido por lavado o adsorción de fosfoproteína sobre tiras de fosfocelulosa. Por ejemplo, se puede activar PKR desfosforilada mediante incubación con poli[I:C] y se puede permitir que la autofosforilación continúe en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. La capacidad de los compuestos para bloquear esta autofosforilación de PKR inducida por ARN puede ser probada. Otro método implica la detección y cuantificación de fosfo-PKR en relación con la cantidad total de PKR en el mismo lisado de células mediante transferencia Western con anticuerpos específicos para fosfo-PKR o PKR de longitud completa. Otro método implica la detección y cuantificación del sustrato fosforilado de PKR, por ejemplo, fosfo-eIF2 $\alpha$  en relación con la cantidad total de eIF2 $\alpha$  en el mismo lisado de células por transferencia Western con anticuerpos específicos para fosfo-eIF2 $\alpha$  o eIF2 $\alpha$  de longitud completa.

15 Mecanismos de defensa vírica contra la función de PKR, por ejemplo, a través de ARNbc de señuelo (ARN de adenovirus VAI, virus de Epstein-Barr EBER; TAR de VIH), degradación de PKR (poliovirus 2A<sup>pro</sup>), ocultamiento de ARNbc viral (virus vacuna E3L, reovirus sigma3, virus de la influenza NS1), bloqueo de dimerización (virus de la influenza p58<sup>PK</sup>; Virus de la hepatitis C NS5A), seudosustratos (virus vacuna K3L; Tat de VIH) o desfosforilación del sustrato (virus del herpes simple ICP34.5).

20 Un ARN de señuelo es un ARN de pseudosustrato que tiene una estructura similar al sustrato de ARN de una enzima, con el fin de hacer que la enzima se una al pseudosustrato en lugar de al sustrato real, bloqueando así la actividad de la enzima.

25 De acuerdo con la presente enseñanza, el término "reducción de la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR)" se refiere a medidas que dan lugar a un menor grado de homodimerización de PKR, en un grado menor de autofosforilación de PKR y/o en un grado menor de fosforilación de objetivos que son sustratos de quinasa de PKR tales como eIF2 $\alpha$  en comparación con la situación normal, en particular la situación normal en una célula, en la que la actividad de PKR no se reduce/no ha sido reducida por el hombre. Preferiblemente, dicho término incluye todas las medidas que resultan en un grado menor de autofosforilación de PKR y/o en un grado menor de fosforilación de objetivos que son sustratos de quinasa de PKR.

30 De acuerdo con la enseñanza, se prevé reducir la actividad de PKR en una célula *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. De este modo, de acuerdo con la presente invención, la célula puede ser una célula aislada o puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo.

35 De acuerdo con la enseñanza, todas las medidas y medios que resultan en una reducción de la actividad de PKR son adecuados para reducir la actividad de PKR. La reducción de la actividad de PKR en una célula conduce preferiblemente a un aumento de la estabilidad y/o a una mejora de la expresión del ARN en la célula en comparación con la situación normal, en particular la situación normal en una célula, en la que la actividad de PKR no es reducida/no ha sido reducida por el hombre. El aumento de la expresión de ARN en una célula comprende preferiblemente un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en la célula en comparación con la situación normal, en particular la situación normal en una célula, en donde la actividad de PKR no se reduce/no ha sido reducida por el hombre.

40 En una realización, reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una célula comprende tratar la célula con un inhibidor de la expresión de cualquier actividad de PKR. De acuerdo con la enseñanza, la expresión "inhibir expresión y/o actividad" incluye una inhibición completa o esencialmente completa de la expresión y/o actividad y una reducción en la expresión y/o actividad. Preferiblemente, el tratamiento de la célula con un inhibidor de PKR es durante un tiempo suficiente para dar como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en la célula.

45 Preferiblemente, dicha inhibición de la expresión de PKR puede tener lugar mediante la inhibición de la producción o reducción del nivel del transcrito, es decir ARNm, que codifica para PKR, por ejemplo, inhibiendo la transcripción o induciendo la degradación del transcrito, y/o inhibiendo la producción de PKR, por ejemplo, inhibiendo la traducción de la codificación del transcrito para PKR. En una realización, dicho inhibidor de PKR es específico para un ácido nucleico que codifica PKR. En una realización particular, el inhibidor de la expresión de PKR es un ácido nucleico

inhibidor (por ejemplo, molécula antisentido, ribozima, ARNi, ARNpi o un ADN que codifica el mismo) hibridando selectivamente y siendo específico para PKR, inhibiendo de este modo (por ejemplo, reduciendo) la transcripción y/o traducción de los mismos.

5 Los ácidos nucleicos inhibidores de esta invención incluyen oligonucleótidos que tienen secuencias en la orientación antisentido con relación a los ácidos nucleicos objetivo. Los oligonucleótidos inhibidores adecuados típicamente varían en longitud de cinco a varios cientos de nucleótidos, más típicamente de aproximadamente 20-70 nucleótidos de longitud o más cortos, incluso más típicamente de aproximadamente 10-30 nucleótidos de longitud. Estos oligonucleótidos inhibidores pueden aplicarse, ya sea *in vitro* o *in vivo*, como ácidos nucleicos libres (desnudos) o en formas protegidas, por ejemplo, encapsulados en liposomas. El uso de formas liposomales u otras formas protegidas puede ser ventajoso ya que puede mejorar la estabilidad *in vivo* y facilitar así el suministro a sitios objetivo.

10 También, el ácido nucleico objetivo puede usarse para diseñar ribozimas que apuntan a la escisión de los ARNm correspondientes en las células. De manera similar, estos ribozimas se pueden administrar en forma libre (desnuda) o mediante el uso de sistemas de suministro que aumentan la estabilidad y/o direccionamiento, por ejemplo, liposomas.

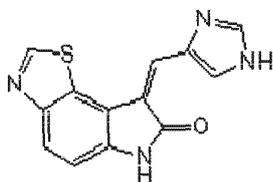
15 También, el ácido nucleico objetivo se puede usar para diseñar ARNpi que pueden inhibir (por ejemplo, reducir) la expresión del ácido nucleico. Los ARNpi pueden administrarse en forma libre (desnuda) o mediante el uso de sistemas de suministro que aumentan la estabilidad y/o el direccionamiento, por ejemplo, liposomas. También se pueden administrar en forma de sus precursores o ADN codificantes.

20 El ARNpi comprende preferiblemente una cadena de ARN sentido y una cadena de ARN antisentido, en la que las cadenas de ARN sentido y antisentido forman un dúplex de ARN y en la que la cadena de ARN sentido comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una secuencia objetivo de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos en un ácido nucleico objetivo, preferiblemente ARNm que codifica para PKR.

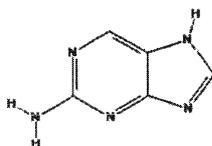
25 En una realización, dicho inhibidor de PKR se dirige a la proteína PKR y preferiblemente es específico para PKR. La PKR se puede inhibir de varias maneras, por ejemplo, a través de la inhibición de la autofosforilación y/o dimerización de PKR, proporcionando un pseudoactivador de PKR o proporcionando un pseudosustrato de PKR. El inhibidor de PKR puede ser un agente que está implicado en un mecanismo de defensa viral tal como se discutió anteriormente. Por ejemplo, el virus vacuna E3L codifica una proteína de unión a ARNbc que inhibe PKR en células infectadas con virus, presumiblemente secuestrando activadores de ARNbc. K3, también codificada por el virus vacuna, funciona como un inhibidor de pseudosustrato por unión a PKR. Por lo tanto, proporcionar el virus vacuna E3L puede dar como resultado la inhibición de PKR. Proporcionar ARN VAI de adenovirus, ARN de Tat de HIV o del virus de Epstein-Barr EBER1 puede dar lugar a pseudoactivación de PKR. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden usar todos los factores virales, es decir, inhibidores viralmente derivados, bloqueando la actividad de PKR tal como aquellos descritos en la presente memoria, para reducir la actividad de PKR. Tales factores pueden proporcionarse a una célula ya sea en forma de ácido nucleico tal como ARN o péptido/proteína, según sea apropiado.

35 En una realización, el inhibidor de PKR es un inhibidor químico. Preferiblemente, el inhibidor de PKR es un inhibidor de la autofosforilación de PKR inducida por ARN. Preferiblemente, el inhibidor de PKR es un inhibidor dirigido al sitio de unión al ATP de PKR.

40 En una realización, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrolol[2,3-g]benzotiazol-7-ona. En una realización, el inhibidor de PKR tiene la siguiente fórmula:



En una realización, el inhibidor de PKR es 2-aminopurina. En una realización, el inhibidor de PKR tiene la siguiente fórmula:



45 Preferiblemente, se utiliza un inhibidor como se ha descrito anteriormente en una concentración de al menos 0,5  $\mu\text{M}$  o superior, al menos 1  $\mu\text{M}$  o superior o al menos 2  $\mu\text{M}$  o superior y preferiblemente en una concentración de hasta 5  $\mu\text{M}$ , hasta 4  $\mu\text{M}$ , hasta 3  $\mu\text{M}$  o hasta 2  $\mu\text{M}$ .

En una realización adicional, el inhibidor de actividad de PKR es un anticuerpo que se une específicamente a PKR. La unión del anticuerpo a PKR puede interferir con la función de PKR, por ejemplo, inhibiendo la actividad de unión o la actividad catalítica.

5 En una realización, se prevé reducir la actividad de PKR en una célula tratando la célula con uno o más inhibidores viralmente derivados tales como el virus vacuna E3 y/o K3, así como tratando la célula con uno o más productos químicos inhibidores de PKR tales como 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrol[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina.

10 En una realización, las células se tratan para reducir la actividad de PKR antes, simultáneamente y/o después de la introducción de ARN o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN. En una realización, las células se tratan para reducir la actividad de PKR siguiente, preferiblemente inmediatamente después de la introducción de ARN o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN.

15 En una realización, las células se tratan para reducir la actividad de PKR durante al menos 24 h, al menos 48 h, al menos 72 h, al menos 96 h, al menos 120 h o incluso más. Más preferiblemente, las células se tratan para reducir la actividad de PKR durante todo el período de tiempo en el que se desea la expresión de ARN, tal como permanentemente, opcionalmente con transfección repetida de ARN.

20 Se pueden usar "moléculas antisentido" o "ácidos nucleicos antisentido" para regular, en particular la reducción, de la expresión de un ácido nucleico. El término "molécula antisentido" o "ácido nucleico antisentido" se refiere de acuerdo con la invención a un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, un oligodesoxirribonucleótido, un oligorribonucleótido modificado o un oligodesoxirribonucleótido modificado y que hibrida bajo condiciones fisiológicas con ADN que comprende un gen particular o con ARNm de dicho gen, inhibiendo de este modo la transcripción de dicho gen y/o la traducción de dicho ARNm. Según la invención, una "molécula antisentido" también comprende un constructo que contiene un ácido nucleico o una parte del mismo en orientación inversa con respecto a su promotor natural. Un transcrito antisentido de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede formar un dúplex con ARNm de origen natural y, de este modo, evitar la acumulación o la traducción del ARNm. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para inactivar un ácido nucleico.

25 En realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido se hibrida con un extremo terminal N o un sitio en dirección 5' tal como un sitio de iniciación de la traducción, un sitio de iniciación de transcripción o un sitio promotor. En otras realizaciones, el oligonucleótido antisentido hibrida con una región 3' no traducida o un sitio de empalme de ARNm.

30 Por "ARN pequeño de interferencia" o "ARNpi", como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende una molécula de ARN, preferiblemente de más de 10 nucleótidos de longitud, más preferiblemente mayor de 15 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente de 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud que se utiliza para identificar un gen objetivo o ARNm que se va a degradar. Un intervalo de 19-25 nucleótidos es el tamaño más preferido para ARNpi.

35 Una o ambas hebras del ARNpi pueden comprender también una saliente 3'. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "saliente 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' de una hebra de ARN. Así, en una realización, el ARNpi comprende al menos una saliente 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxinucleótidos) de longitud, preferiblemente de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, y de forma especialmente preferible de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En la realización en la que ambas hebras de la molécula de ARNpi comprenden una saliente 3', la longitud de las salientes puede ser igual o diferente para cada hebra. En una realización más preferida, la saliente 3' está presente en ambas cadenas del ARNpi y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena de ARNpi de la invención puede comprender salientes 3' de ácido didesoxitimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

40 Con el fin de aumentar la estabilidad del ARNpi, las salientes 3' pueden estabilizarse también contra la degradación. En una realización, las salientes se estabilizan incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de nucleótidos de uridina en las salientes 3' con 2'-desoxitimidina, se tolera y no afecta la eficacia de la degradación de ARNi. En particular, la ausencia de un 2'-hidroxilo en la 2'-desoxitimidina aumenta significativamente la resistencia a la nucleasa de la saliente 3' en medio de cultivo tisular.

45 Las cadenas sentido y antisentido del ARNpi pueden comprender dos moléculas de ARN de cadena sencilla complementarias o pueden comprender una única molécula en la que dos porciones complementarias son bases apareadas y están unidas covalentemente por un área de "horquilla" de una sola hebra. Es decir, la región sentido y la región antisentido pueden conectarse covalentemente a través de una molécula enlazadora. La molécula enlazadora puede ser un enlazador polinucleótido o no nucleotídico. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que el área de la horquilla del último tipo de molécula de ARNpi se escinde intracelularmente por la proteína "Dicer" (o su equivalente) para formar un ARNpi de dos moléculas individuales de ARN de bases apareadas.

Como se usa en la presente memoria, "ARNm objetivo" se refiere a una molécula de ARN que es un objetivo para subregulación.

5 El ARNpi se puede expresar a partir de vectores de expresión de pol III sin un cambio en el sitio de direccionamiento, ya que la expresión de ARN de los promotores pol III sólo se cree que es eficaz cuando el primer nucleótido transcrito es una purina.

10 El ARNpi de acuerdo con la invención puede dirigirse a cualquier tramo de aproximadamente 19-25 nucleótidos contiguos en cualquiera de las secuencias de ARN objetivo (la "secuencia objetivo"). Las técnicas para seleccionar secuencias objetivo para ARNpi se dan, por ejemplo, en Tuschl T. et al., "The siRNA User Guide", revisado el 11 de octubre de 2002, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia. "The siRNA User Guide", está disponible en la web en un sitio web mantenido por el Dr. Thomas Tuschl, Laboratorio de Biología Molecular de ARN, Universidad de Rockefeller, Nueva York, EE.UU., y se puede acceder al sitio web de la Universidad Rockefeller y buscando con la palabra clave "siRNA". De este modo, la cadena sentido del ARNpi presente comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a cualquier tramo contiguo de aproximadamente 19 hasta aproximadamente 25 nucleótidos en el ARNm objetivo.

15 Generalmente, una secuencia objetivo en el ARNm objetivo se puede seleccionar de una secuencia dada de ADN que corresponde al ARNm objetivo, que comienza preferiblemente entre 50 y 100 nt secuencia abajo (es decir, en la dirección 3') a partir del codón de inicio. Sin embargo, la secuencia objetivo puede estar localizada en las regiones no traducidas 5' o 3', o en la región cercana al codón de inicio.

20 El ARNpi se puede obtener usando una serie de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ARNpi puede ser sintetizado químicamente o producido en forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica, tales como el sistema *in vitro* de Drosophila descrito en la solicitud publicada de patente de los Estados Unidos No. 2002/0086356 de Tuschl et al., cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia.

25 Preferiblemente, el ARNpi se sintetiza químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósido apropiadamente protegidas y un sintetizador de ADN/ARN convencional. El ARNpi se puede sintetizar como dos moléculas complementarias separadas de ARN, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias.

Alternativamente, el ARNpi también puede expresarse a partir de plásmidos de ADN lineales o circulares recombinantes usando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar ARNpi de la invención a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias del promotor pol III de ARN de U6 o H1 y el promotor de citomegalovirus.

30 La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los plásmidos recombinantes también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNpi en un tejido particular o en un entorno intracelular particular.

35 El ARNpi expresado a partir de plásmidos recombinantes puede ser aislado de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas estándar, o puede ser expresado intracelularmente. El uso de plásmidos recombinantes para administrar ARNpi a células *in vivo* está dentro de la experiencia en la técnica. El ARNpi puede expresarse a partir de un plásmido recombinante bien como dos moléculas de ARN complementarias separadas, o como una única molécula de ARN con dos regiones complementarias.

40 La selección de plásmidos adecuados para expresar ARNpi, métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar el ARNpi en el plásmido, y métodos para suministrar el plásmido recombinante a las células de interés están dentro de la experiencia en la técnica.

45 El término "célula" o "célula huésped" se refiere preferiblemente a una célula intacta, es decir una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, organelos o material genético. Preferiblemente, una célula intacta es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente, dicho término abarca cualquier célula que pueda ser transformada o transfectada con un ácido nucleico exógeno. El término "célula" incluye, de acuerdo con la invención, células procariontas (por ejemplo, E. coli) o células eucariotas. Se prefieren particularmente células de mamífero, tales como células de seres humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. La célula es preferiblemente una célula en la que una reducción de la actividad de PKR da como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión de ARN en la célula. En una realización, la célula es una célula somática como se describe aquí. En una realización, la célula es una célula que tiene una función de barrera. Preferiblemente, la célula es un fibroblasto tal como un fibroblasto descrito en la presente memoria, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial tal como una célula endotelial del corazón, una célula endotelial del pulmón o una célula endotelial de la vena umbilical. Preferiblemente, la célula es una célula humana.

55 Un fibroblasto es un tipo de célula que sintetiza la matriz extracelular y el colágeno y desempeña un papel crítico en la cicatrización de heridas. La función principal de los fibroblastos es mantener la integridad estructural de los tejidos conectivos segregando continuamente precursores de la matriz extracelular. Los fibroblastos son las células más comunes del tejido conectivo en los animales. Los fibroblastos son morfológicamente heterogéneos con diversas

apariencias dependiendo de su localización y actividad.

Los queratinocitos son el tipo celular predominante en la epidermis, la capa más externa de la piel humana. La función primaria de los queratinocitos es la formación de la capa de queratina que protege la piel y el tejido subyacente de los daños ambientales tales como el calor, la radiación UV y la pérdida de agua.

5 El epitelio es un tejido compuesto de células que alinean las cavidades y las superficies de las estructuras en todo el cuerpo. Muchas glándulas también se forman a partir de tejido epitelial. Se encuentra en la parte superior del tejido conectivo, y las dos capas están separadas por una membrana basal. En los seres humanos, el epitelio se clasifica como un tejido primario del cuerpo, el otro es el tejido conectivo, el tejido muscular y el tejido nervioso. Las funciones de las células epiteliales incluyen secreción, absorción selectiva, protección, transporte transcelular y detección de sensaciones.

10 El endotelio es la capa delgada de células que recubre la superficie interior de los vasos sanguíneos, formando una interfaz entre la circulación de sangre en el lumen y el resto de la pared del vaso. Estas células se llaman células endoteliales. Las células endoteliales alinean todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta el capilar más pequeño. El tejido endotelial es un tipo especializado de tejido del epitelio.

15 De acuerdo con la invención, el ARN codifica/es capaz de expresar un péptido o proteína, tal como un factor de reprogramación también denominado "factor" en la presente memoria, cuya expresión en una célula es deseada.

20 De acuerdo con la presente enseñanza, el término "péptido" comprende oligopéptidos y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 más, preferiblemente 21 o más y preferiblemente hasta 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

25 La presente enseñanza también incluye "variantes" de los péptidos, proteínas o secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria.

30 Para los propósitos de la presente enseñanza, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de supresión de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de supresión de aminoácidos que comprenden la supresión en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento del extremo terminal N y/o del extremo terminal C.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción aleatoria con un cribado apropiado del producto resultante.

35 Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones en el extremo terminal amino y/o el extremo terminal carboxilo de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos.

Las variantes de supresión de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como mediante la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las supresiones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

40 Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por el hecho de que al menos un residuo en la secuencia se retira y otro residuo se inserta en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que están en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas homólogas o péptidos y/o para reemplazar aminoácidos por otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados de forma similar o sin carga. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales se dividen generalmente en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

55 Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente del 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, o 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos

aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente por al menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, se puede hacer con herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencias, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS:: needle, Matriz: Blosum62, abertura de espacio 10,0, extensión de espacio 0,5.

"Semejanza de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "identidad en porcentaje" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenida después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando distribuidas las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineadas óptimamente, realizándose dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para comparación puede producirse, además manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Las secuencias de aminoácidos homólogas exhiben de acuerdo con la invención al menos un 40%, en particular al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% y preferiblemente al menos un 95% al menos 98% o al menos 99% de identidad de los residuos de aminoácidos.

Las variantes de secuencia de aminoácidos descritas en la presente memoria pueden prepararse fácilmente por el experto en la materia, por ejemplo, mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para preparar péptidos o proteínas que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o supresiones, se describe en detalle en Sambrook et al. (1989), por ejemplo. Además, los péptidos y variantes de aminoácidos descritos en el presente documento pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas conocidas de síntesis de péptidos tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida y métodos similares.

La invención incluye derivados de los péptidos o proteínas descritos en la presente memoria que están comprendidos por los términos "péptido" y "proteína". Según la invención, los "derivados" de proteínas y péptidos son formas modificadas de proteínas y péptidos. Tales modificaciones incluyen cualquier modificación química y comprenden sustituciones únicas o múltiples, supresiones y/o adiciones de cualquier molécula asociada con la proteína o péptido, tales como hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas o péptidos. En una realización, los "derivados" de proteínas o péptidos incluyen los análogos modificados resultantes de la glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivatización, introducción de grupos protectores/bloqueadores, escisión proteolítica o unión a un anticuerpo o a otro ligando celular. El término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos. Preferiblemente, un péptido modificado tiene una mayor estabilidad y/o una mayor inmunogenicidad.

De acuerdo con la enseñanza, una variante de un péptido o proteína preferiblemente tiene una propiedad funcional del péptido o proteína de la que se ha derivado. Tales propiedades funcionales se describen aquí para OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC, respectivamente. Preferiblemente, una variante de un péptido o proteína tiene la misma propiedad en la reprogramación de una célula diferenciada de un animal que el péptido o proteína de la que se ha derivado. Preferiblemente, la variante induce o mejora la reprogramación de una célula diferenciada de un animal.

En una realización, el péptido o proteína codificada por el ARN es un factor que permite la reprogramación de células somáticas a células que tienen características de células madre. En una realización, el péptido o proteína comprende uno o más antígenos y/o uno o más péptidos antigénicos. Preferiblemente, dicho ARN es capaz de expresar dicho péptido o proteína, en particular si se introduce en una célula.

- Una "célula madre" es una célula con la capacidad de autorrenovarse, permanecer no diferenciada y diferenciarse. Una célula madre puede dividirse sin límite, por lo menos durante la vida del animal en el que reside naturalmente. Una célula madre no es diferenciada totalmente; no está en la etapa final de una vía de diferenciación. Cuando una célula madre se divide, cada célula hija puede permanecer como una célula madre o embarcarse en un curso que conduce hacia la diferenciación terminal.
- Las células madre totipotentes son células que tienen propiedades de diferenciación totipotencial y son capaces de desarrollarse en un organismo completo. Esta propiedad es poseída por las células hasta la etapa de 8 células después de la fertilización del ovocito por el esperma. Cuando estas células son aisladas y trasplantadas en el útero, pueden convertirse en un organismo completo.
- Las células madre pluripotentes son células capaces de desarrollarse en diversas células y tejidos derivados de las capas ectodérmica, mesodérmica y endodérmica. Las células madre pluripotentes que se derivan de la masa celular interna localizada dentro de los blastocistos, generados 4-5 días después de la fecundación se denominan "células madre embrionarias" y pueden diferenciarse en otras células del tejido, pero no pueden formar nuevos organismos vivos.
- Las células madre multipotentes son células madre que se diferencian normalmente en sólo tipos celulares específicos de su tejido y órgano de origen. Las células madre multipotentes están implicadas no sólo en el crecimiento y desarrollo de diversos tejidos y órganos durante los períodos fetal, neonatal y adulto, sino también en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos y en la función de inducir regeneración sobre el daño tisular. Las células multipotentes específicas de tejidos se denominan colectivamente "células madre adultas". Una "célula madre embrionaria" es una célula madre que está presente o aislada de un embrión. Puede ser pluripotente, teniendo la capacidad de diferenciarse en todas y cada una de las células presentes en el organismo, o multipotente, con la capacidad de diferenciarse en más de un tipo de célula.
- Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "embrión" se refiere a un animal en las primeras etapas de su desarrollo. Estas etapas se caracterizan por implantación y gastrulación, donde se definen y establecen las tres capas germinales y por diferenciación de las capas germinales en los respectivos órganos y sistemas de órganos. Las tres capas germinales son el endodermo, el ectodermo y el mesodermo.
- Un "blastocisto" es un embrión en una etapa temprana de desarrollo en la que el óvulo fertilizado ha sufrido escisión, y se está formando o se ha formado una capa esférica de células que rodea una cavidad llena de fluido. Esta capa esférica de células es el trofotodermo. Dentro del trofotodermo hay un grupo de células denominado masa celular interna (ICM). El trofotodermo es el precursor de la placenta, y la ICM es la precursora del embrión.
- Una célula madre adulta, también llamada célula madre somática, es una célula madre encontrada en un adulto. Una célula madre adulta se encuentra en un tejido diferenciado, puede renovarse y puede diferenciarse, con algunas limitaciones, para producir tipos celulares especializados de su tejido de origen. Los ejemplos incluyen células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y células madre neurales.
- Una "célula diferenciada" es una célula madura que ha sufrido cambios de desarrollo progresivos a una forma o función más especializada. La diferenciación celular es el proceso que una célula sufre a medida que madura a un tipo de célula abiertamente especializada. Las células diferenciadas tienen características distintas, desempeñan funciones específicas y son menos propensas a dividirse que sus contrapartidas menos diferenciadas.
- Una célula "no diferenciada", por ejemplo, una célula inmadura, embrionaria o primitiva, tiene típicamente un aspecto inespecífico, puede llevar a cabo múltiples actividades no específicas, y puede desempeñarse pobremente, como mucho, en funciones normalmente realizadas por células diferenciadas.
- "Célula somática" se refiere a todas y cada una de las células diferenciadas y no incluye células madre, células germinales o gametos. Preferiblemente, una "célula somática" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula diferenciada totalmente.
- Tal como se usa en la presente memoria, "comprometida" se refiere a células que se considera que están permanentemente comprometidas con una función específica. Las células comprometidas también se denominan "células totalmente diferenciadas".
- Tal como se usa en el presente documento, "diferenciación" se refiere a la adaptación de células a una forma o función particular. En las células, la diferenciación conduce a una célula más comprometida.
- Tal como se usa en el presente documento, la "desdiferenciación" se refiere a la pérdida de especialización en forma o función. En las células, la desdiferenciación conduce a una célula menos comprometida.
- Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la "reprogramación" se refiere al restablecimiento del programa genético de una célula. Una célula reprogramada exhibe preferiblemente pluripotencia.
- Los términos "desdiferenciada" y "reprogramada" o similares se usan indistintamente en la presente memoria para

indicar células derivadas de células somáticas que tienen características de células madre. Sin embargo, dichos términos no pretenden limitar el objeto descrito en la presente memoria por consideraciones mecánicas o funcionales.

5 El término "ARN que induce el desarrollo de características de células madre" o "ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de células somáticas en células que tienen características de células madre" se refiere a ARN que cuando se introduce en una célula somática induce la célula a desdiferenciarse.

Tal como se usa en la presente memoria, "célula germinal" se refiere a una célula reproductiva tal como un espermatozoido o un ovocito, o una célula que se convertirá en una célula reproductiva.

10 Tal como se usa en la presente memoria, "pluripotente" se refiere a células que pueden dar lugar a cualquier tipo de célula excepto las células de la placenta u otras células de soporte del útero.

15 Términos tales como "célula que tiene características de célula madre", "célula que tiene propiedades de célula madre" o "células semejantes a células madre" se usan en la presente memoria para designar células que, aunque se derivan de células no madre somáticas diferenciadas, exhiben una o más características típicas de las células madre, en particular de células madre embrionarias. Tales características incluyen una morfología de células madre embrionarias tales como colonias compactas, una alta relación de núcleo a citoplasma y nucléolos prominentes, cariotipos normales, expresión de actividad de telomerasa, expresión de marcadores de superficie celular que son característicos de células madre embrionarias y/o expresión de genes que son característicos de las células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias se seleccionan, por ejemplo, del grupo que consiste en el antígeno embrionario específico del estadio 3 (SSEA-3), SSEA-4, el antígeno 1-60 relacionado con el tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E. Los genes que son característicos de las células madre embrionarias se seleccionan, por ejemplo, a partir del grupo consistente en OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), el gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), asociado con pluripotencia de desarrollo 2 (DPPA2), DPPA4 y la transcriptasa inversa de telomerasa (TERT). En una realización, las una o más características típicas para las células madre incluyen pluripotencia.

20 En una realización del método de la enseñanza, las características de células madre comprenden una morfología de célula madre embrionaria, en donde dicha morfología de célula madre embrionaria comprende preferiblemente criterios morfológicos seleccionados del grupo que consiste en colonias compactas, una alta relación de núcleo a citoplasma y nucléolos prominentes. En ciertas realizaciones, las células que tienen características de células madre tienen cariotipos normales, expresan actividad de telomerasa, expresan marcadores de superficie celular que son característicos de células madre embrionarias y/o expresan genes que son característicos de células madre embrionarias. Los marcadores de superficie celular que son característicos de las células madre embrionarias pueden seleccionarse del grupo que consiste en el antígeno embrionario específico del estadio 3 (SSEA-3), SSEA-4, el antígeno 1-60 relacionado con el tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E y los genes que son característicos de las células madre embrionarias pueden seleccionarse del grupo consistente en OCT4 endógeno, NANOG endógeno, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), el gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), asociado con pluripotencia de desarrollo 2 (DPPA2), DPPA4 y transcriptasa inversa de telomerasa (TERT).

30 Preferiblemente, las células que tienen características de célula madre son células somáticas desdiferenciadas y/o reprogramadas. Preferiblemente, las células que tienen características de célula madre presentan las características esenciales de células madre embrionarias tales como un estado pluripotente. Preferiblemente, las células que tienen características de célula madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivados avanzados de las tres capas germinales primarias. En una realización, la capa germinal primaria es endodermo y el derivado avanzado es un tejido epitelial tipo intestino. En una realización adicional, la capa germinal primaria es mesodermo y el derivado avanzado es músculo estriado y/o cartílago. En aún una realización más, la capa germinal primaria es ectodermo y el derivado avanzado es tejido neural y/o tejido epidérmico. En una realización preferida, las células que tienen características de célula madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células neuronales y/o células cardíacas.

40 En una realización, las células somáticas son células somáticas derivadas de células madre embrionarias con un fenotipo mesenquimal. En una realización preferida, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos fetales o fibroblastos o queratinocitos posnatales, preferiblemente queratinocitos derivados de folículos pilosos. En otras realizaciones, los fibroblastos son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos. En realizaciones particulares, los fibroblastos son fibroblastos como los depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de catálogo CCL-186, como los depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de catálogo. CRL-2097 o como se depositan en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de catálogo CRL-2522, o como los distribuidos por System Biosciences bajo el número de catálogo PC501A-HFF. En una realización, los fibroblastos son fibroblastos dérmicos humanos adultos. Preferiblemente, las células somáticas son células humanas. De acuerdo con la presente enseñanza, las células somáticas pueden ser genéticamente modificadas.

El término "factor" de acuerdo con la invención cuando se usa junto con su expresión mediante ARN incluye proteínas y péptidos, así como derivados y variantes de los mismos. Por ejemplo, el término "factor" comprende OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC.

5 Los factores pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a primates humanos y no humanos. Los primates incluyen, pero no se limitan a humanos, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus, y cualquier otro mono del Nuevo Mundo o del Viejo Mundo. Los roedores incluyen, pero no se limitan a ratón, rata, cobaya, hámster y gerbo.

10 De acuerdo con la presente enseñanza, uno o más factores capaces de permitir la reprogramación de células somáticas a células que tienen características de células madre comprenden un conjunto de factores seleccionados del grupo que consiste en (i) OCT4 y SOX2, (ii) OCT4, SOX2 y uno o ambos de NANOG y LIN28, (iii) OCT4, SOX2 y uno o ambos de KLF4 y c-MYC. En una realización, dichos uno o más factores capaces de ser expresados por el ARN comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 u OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC. Preferiblemente, el ARN se introduce en dicha célula somática diferenciada animal mediante electroporación o microinyección. Preferiblemente, el método de la enseñanza comprende además permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre, por ejemplo, cultivando la célula somática bajo condiciones de cultivo de células madre embrionarias, preferiblemente condiciones adecuadas para mantener células madre pluripotentes en un estado no diferenciado.

15 OCT4 es un factor de transcripción de los factores de transcripción de POU eucarióticos y un indicador de pluripotencia de células madre embrionarias. Es una proteína de unión al octámero expresada en la madre. Se ha observado que está presente en los ovocitos, en la masa celular interna de los blastocistos y también en la célula germinal primordial. El gen *POU5F1* codifica la proteína OCT4. Los sinónimos del nombre del gen incluyen *OCT3*, *OCT4*, *OTF3* y *MGC22487*. La presencia de OCT4 en concentraciones específicas es necesaria para que las células madre embrionarias permanezcan no diferenciadas.

20 Preferiblemente, la "proteína OCT4" o simplemente "OCT4" se refiere a OCT4 humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. Un experto en la técnica entendería que la secuencia de ADNc de OCT4 como se describió anteriormente sería equivalente al ARNm de OCT4 y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar OCT4.

25 Sox2 es un miembro de la familia de genes Sox (caja HMG relacionada con SRY) que codifica factores de transcripción con un único dominio de unión al ADN de HMG. Se ha descubierto que SOX2 controla las células progenitoras neurales inhibiendo su capacidad para diferenciarse. La represión del factor da lugar a la deslaminación de la zona ventricular, que es seguida por una salida del ciclo celular. Estas células también comienzan a perder su carácter progenitor a través de la pérdida del progenitor y de los marcadores de diferenciación neuronal temprana.

30 Preferiblemente, la "proteína SOX2" o simplemente "SOX2" se refiere a SOX2 humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4. Un experto en la técnica comprendería que la secuencia de ADNc de SOX2 como se ha descrito anteriormente sería equivalente al ARNm de SOX2 y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar SOX2.

35 NANOG es un gen de homeodominio de tipo NK-2, y se ha propuesto que desempeña un papel clave en el mantenimiento de la pluripotencia de células madre presumiblemente regulando la expresión de genes críticos para la renovación y diferenciación de células madre embrionarias. NANOG se comporta como un activador de transcripción con dos dominios de activación inusualmente fuertes incrustados en su extremo terminal C. La reducción de la expresión de NANOG induce la diferenciación de las células madre embrionarias.

40 Preferiblemente, la "proteína NANOG" o simplemente "NANOG" se refiere a NANOG humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6. Un experto en la técnica entendería que la secuencia de ADNc de NANOG tal como se ha descrito anteriormente sería equivalente al ARNm de NANOG y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar NANOG.

45 LIN28 es una proteína citoplásmica conservada con un emparejamiento inusual de motivos de unión a ARN: un dominio de choque frío y un par de dedos de zinc CCHC de tipo retroviral. En los mamíferos, es abundante en diversos tipos de células no diferenciadas. En células de mamíferos pluripotentes, LIN28 se observa en complejos sensibles a RNasa con proteína de unión a poli(A), y en fracciones polisomales de gradientes de sacarosa, lo que sugiere que está asociada con la traducción de los ARNm.

50 Preferiblemente, la "proteína LIN28" o simplemente "LIN28" se refiere a LIN28 humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 8. Un experto en la técnica comprendería que la secuencia de ADNc de LIN28 tal como se ha descrito anteriormente sería equivalente al ARNm de LIN28 y puede usarse para la generación de ARN capaz de expresar LIN28.

El factor de tipo Krueppel (KLF4) es un factor de transcripción de dedo de cinc, que se expresa fuertemente en células epiteliales posmitóticas de diferentes tejidos, por ejemplo, el colon, el estómago y la piel. KLF4 es esencial para la diferenciación terminal de estas células y está implicado en la regulación del ciclo celular.

5 Preferiblemente, la "proteína KLF4" o simplemente "KLF4" se refiere a KLF4 humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 10. Un experto en la técnica entendería que la secuencia de ADNc de KLF4 como se describió anteriormente sería equivalente al ARNm de KLF4 y se puede usar para la generación de ARN capaz de expresar KLF4.

10 MYC (cMYC) es un protooncogén, que se sobreexpresa en una amplia gama de cánceres humanos. Cuando es mutado específicamente, o sobreexpresado, aumenta la proliferación celular y funciona como un oncogén. El gen MYC codifica para un factor de transcripción que regula la expresión del 15% de todos los genes a través de la unión a secuencias de caja mejoradora (cajas E) y el reclutamiento de histona acetiltransferasas (HAT). MYC pertenece a la familia de MYC de factores de transcripción, que también incluye genes N-MYC y L-MYC. Los factores de transcripción de la familia de MYC contienen el dominio bHLH/LZ (cierre de leucina de hélice del bucle de hélice básica)

15 Preferiblemente, la "proteína cMYC" o simplemente "cMYC" se refiere a cMYC humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 12. Un experto en la técnica comprendería que la secuencia de ADNc de cMYC como se ha descrito anteriormente sería equivalente al ARNm de cMYC y puede ser usada para la generación de ARN capaz de expresar cMYC.

20 Debe entenderse que una referencia en la presente memoria descriptiva a factores específicos tales como OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 o c-MYC o a secuencias específicas de los mismos, incluye también todas las variantes de estos factores específicos o las secuencias específicas de los mismos como se describe en el presente documento. En particular, debe entenderse de modo que también incluya todas las variantes de empalme, variantes modificadas postraduccionalmente, conformaciones, isoformas y homólogos de especies de estos factores/secuencias específicos que se expresan naturalmente por parte de las células.

25 Preferiblemente, la etapa de permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre usadas en los métodos para proporcionar células que tienen características de células madre descritas aquí comprende cultivar células somáticas bajo condiciones de cultivo de células madre embrionarias, preferiblemente condiciones adecuadas para mantener células madre pluripotentes en un estado no diferenciado.

30 Preferiblemente, para permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre, las células se cultivan en presencia de uno o más inhibidores de ADN metiltransferasa y/o uno o más inhibidores de histona desacetilasa. Los compuestos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en 5'-azacitidina (5'-azaC), ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA), dexametasona, tricostatina A (TSA), butirato de sodio (NaBu), Scriptaid y ácido valproico (VPA). Preferiblemente, las células se cultivan en presencia de ácido valproico (VPA), preferiblemente en una concentración de entre 0,5 y 10 mM, más preferiblemente entre 1 y 5 mM, lo más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 2 mM.

35 Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para efectuar la desdiferenciación de cualquier tipo de célula somática. Las células que pueden usarse incluyen células que pueden ser desdiferenciadas o reprogramadas por los métodos de la presente enseñanza, en particular células que están total o parcialmente diferenciadas, más preferiblemente diferenciadas totalmente. Preferiblemente, la célula somática es una célula diploide derivada de organismos multicelulares preembrionarios, embrionarios, fetales y postnatales. Ejemplos de células que pueden usarse incluyen pero no se limitan a fibroblastos, tales como fibroblastos fetales y neonatales o fibroblastos adultos, queratinocitos, en particular queratinocitos primarios, más preferiblemente queratinocitos derivados de cabello, células adiposas, células epiteliales, células epidérmicas, condrocitos, células del cúmulo, células neurales, células gliales, astrocitos, células cardíacas, células esofágicas, células musculares, melanocitos, células hematopoyéticas, osteocitos, macrófagos, monocitos y células mononucleares.

40 Las células con las que pueden usarse los métodos de la enseñanza pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Ejemplos de células de mamífero que pueden ser desdiferenciadas y rediferenciadas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a células de primates humanos y no humanos. Las células de primate con las que puede realizarse la invención incluyen, pero no se limitan a, células de seres humanos, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus y cualquier otro mono del Nuevo Mundo o del Viejo Mundo. Las células de roedor con las que se puede realizar la invención incluyen, pero sin limitación, células de ratón, rata, cobaya, hámster y gerbo.

45 Se espera que las células desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente enseñanza muestren muchos de los mismos requisitos que las células madre pluripotentes y se pueden expandir y mantener bajo condiciones usadas para células madre embrionarias, por ejemplo, medio celular ES o cualquier medio que soporte el crecimiento de las células embrionarias. Las células madre embrionarias conservan su pluripotencia *in vitro* cuando se mantienen en

- 5 fibroblastos fetales inactivados tales como fibroblastos embrionarios de ratón o fibroblastos humanos irradiados (por ejemplo, fibroblastos de prepucio humano, fibroblastos de piel humana, fibroblastos de endometrio humano, fibroblastos de oviducto humano) en cultivo. En una realización, las células alimentadoras humanas pueden ser células alimentadoras autólogas derivadas del mismo cultivo de células reprogramadas mediante diferenciación directa.
- Además, las células madre embrionarias humanas pueden propagarse con éxito en Matrigel en un medio condicionado por fibroblastos fetales de ratón. Las células madre humanas pueden desarrollarse en cultivo durante un periodo prolongado de tiempo y permanecer no diferenciadas bajo condiciones de cultivo específicas.
- 10 En ciertas realizaciones, las condiciones de cultivo de células pueden incluir el contacto de las células con factores que pueden inhibir la diferenciación o potenciar de otra manera la desdiferenciación de células, por ejemplo, prevenir la diferenciación de células en células no ES, trofotodermo u otros tipos celulares.
- 15 Las células desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente invención pueden ser evaluadas por métodos que incluyen monitorear cambios en el fenotipo de las células y caracterizar su expresión de genes y proteínas. La expresión génica puede determinarse por RT-PCR, y los productos de traducción se pueden determinar por inmunocitoquímica y transferencia Western. En particular, las células diferenciadas pueden caracterizarse para determinar el patrón de expresión de genes y si las células reprogramadas exhiben un patrón de expresión de genes similar al patrón de expresión esperado de células de control pluripotentes no diferenciadas tales como células madre embrionarias usando técnicas bien conocidas en el arte incluyendo transcriptómica.
- 20 A este respecto, se puede evaluar la expresión de los siguientes genes de células desdiferenciadas: OCT4, NANOG, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), asociado con pluripotencia de desarrollo 2 (DPPA2), DPPA4 y la transcriptasa inversa de telomerasa (TERT), antígeno embrionario 3 (SSEA-3), SSEA-4, antígeno relacionado con tumores 1-60 (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E.
- 25 Las células madre no diferenciadas o embrionarias con las que pueden compararse las células reprogramadas pueden ser de la misma especie que las células somáticas diferenciadas. Alternativamente, las células madre no diferenciadas o embrionarias con las que pueden compararse las células reprogramadas pueden ser de una especie diferente que las células somáticas diferenciadas.
- 30 En algunas realizaciones, existe una similitud en el patrón de expresión génica entre una célula reprogramada y una célula no diferenciada, por ejemplo, una célula madre embrionaria, si ciertos genes expresados específicamente en una célula no diferenciada también se expresan en la célula reprogramada. Por ejemplo, se pueden usar ciertos genes, por ejemplo, telomerasa, que son típicamente indetectables en células somáticas diferenciadas para monitorear el grado de reprogramación. Del mismo modo, para ciertos genes, la ausencia de expresión puede utilizarse para evaluar el grado de reprogramación.
- 35 La capacidad de autorrenovación, marcada por la inducción de la actividad telomerasa, es otra característica de las células madre que pueden monitorearse en células desdiferenciadas.
- El análisis cariotípico puede realizarse por medio de separaciones de cromosomas a partir de células mitóticas, cariotipo espectral, ensayos de longitud de telómeros, hibridación genómica total u otras técnicas bien conocidas en la técnica.
- 40 Usando la presente enseñanza, se incorporan factores apropiados de codificación de ARN en una o más células somáticas, por ejemplo, por electroporación. Después de la incorporación, las células se cultivan preferiblemente utilizando condiciones que soporten el mantenimiento de células desdiferenciadas (es decir, condiciones de cultivo de células madre). Las células desdiferenciadas pueden entonces ser expandidas e inducidas a volver a diferenciarse en diferentes tipos de células somáticas que son necesarias para la terapia celular. Las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente enseñanza pueden inducirse a diferenciarse en uno o más tipos de células somáticas deseadas *in vitro* o *in vivo*.
- 45 Preferiblemente, las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente invención pueden dar lugar a células de cualquiera de las tres capas germinales embrionarias, es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo. Por ejemplo, las células diferenciadas pueden diferenciarse en músculo esquelético, esqueleto, dermis de piel, tejido conectivo, sistema urogenital, corazón, sangre (células linfáticas) y bazo (mesodermo); estómago, colon, hígado, páncreas, vejiga urinaria; revestimiento de la uretra, partes epiteliales de la tráquea, pulmones, faringe, tiroides, paratiroides, intestino (endodermo); o sistema nervioso central, retina y lente, craneal y sensorial, ganglios y nervios, células pigmentarias, tejido conjuntivo de la cabeza, epidermis, cabello, glándulas mamarias (ectodermo). Las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente enseñanza pueden volver a diferenciarse *in vivo* o *in vitro*, usando técnicas conocidas en el arte.
- 50
- 55 En una realización, las células reprogramadas que resultan de los métodos descritos aquí se usan para producir progenie diferenciada. Por lo tanto, en un aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para producir células diferenciadas, que comprende: (i) obtener células reprogramadas usando los métodos de esta enseñanza; y

- (ii) inducir la diferenciación de las células reprogramadas para producir células diferenciadas. La etapa (ii) se puede realizar *in vivo* o *in vitro*. Además, la diferenciación puede inducirse mediante la presencia de factores de diferenciación apropiados que pueden ser añadidos o están presentes *in situ*, por ejemplo, en un cuerpo, órgano o tejido en el que se han introducido las células reprogramadas. Las células diferenciadas se pueden utilizar para derivar células, tejidos y/u órganos que se usan ventajosamente en el área de trasplante de células, tejidos y/u órganos. Si se desea, se pueden introducir modificaciones genéticas, por ejemplo, en células somáticas antes de la reprogramación. Las células diferenciadas de la presente enseñanza preferiblemente no poseen la pluripotencia de una célula madre embrionaria, o una célula germinal embrionaria, y son, en esencia, células parcial o totalmente diferenciadas específicas de tejido.
- Una ventaja de los métodos de la presente invención es que las células reprogramadas obtenidas por la presente enseñanza pueden diferenciarse sin selección previa ni purificación o establecimiento de una línea celular. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, una población heterogénea de células que comprenden células reprogramadas se diferencian en un tipo celular deseado. En una realización, una mezcla de células obtenida a partir de los métodos de la presente invención se expone a uno o más factores de diferenciación y cultivo *in vitro*.
- Los métodos de diferenciación de células reprogramadas obtenidas por los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender una etapa de permeabilización de la célula reprogramada. Por ejemplo, las células generadas por las técnicas de reprogramación descritas en este documento, o alternativamente una mezcla heterogénea de células que comprenden células reprogramadas, pueden ser permeabilizadas antes de la exposición a uno o más factores de diferenciación o extracto celular u otra preparación que comprende factores de diferenciación.
- Por ejemplo, se pueden obtener células diferenciadas cultivando células reprogramadas no diferenciadas en presencia de al menos un factor de diferenciación y seleccionando células diferenciadas del cultivo. La selección de células diferenciadas puede basarse en el fenotipo, tal como la expresión de ciertos marcadores celulares presentes en células diferenciadas, o mediante ensayos funcionales (por ejemplo, la capacidad para realizar una o más funciones de un tipo celular particular diferenciado).
- En otra realización, las células reprogramadas de acuerdo con la presente invención se modifican genéticamente mediante la adición, supresión o modificación de su o sus secuencias de ADN.
- Las células reprogramadas o desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente enseñanza o células derivadas de las células reprogramadas o desdiferenciadas son útiles en investigación y en terapia. Las células pluripotentes reprogramadas pueden diferenciarse en cualquiera de las células del cuerpo incluyendo, sin limitación, células de piel, cartílago, músculo esquelético óseo, músculo cardíaco, renales, hepáticas, sanguíneas y de formación de sangre, precursoras vasculares y endoteliales vasculares, beta pancreáticas, gliales, de retina, células neuronales, intestinales, pulmonares y hepáticas.
- Las células reprogramadas son útiles para terapia regenerativa/reparadora y pueden ser trasplantadas a un paciente que lo necesite. En una realización, las células son autólogas con el paciente.
- Las células reprogramadas proporcionadas de acuerdo con la presente invención pueden usarse, por ejemplo, en estrategias terapéuticas en el tratamiento de enfermedades cardíacas, neurológicas, endocrinológicas, vasculares, retinianas, dermatológicas, musculoesqueléticas y otras enfermedades.
- Por ejemplo, y no pretende ser una limitación, las células reprogramadas de la presente enseñanza pueden utilizarse para reponer células en animales cuyas células naturales se han agotado debido a la edad o terapia de ablación tal como radioterapia de cáncer y quimioterapia. En otro ejemplo no limitativo, las células reprogramadas de la presente invención son útiles en la regeneración de órganos y la reparación de tejidos. En una realización de la presente enseñanza, se pueden usar células reprogramadas para revigorizar tejido muscular dañado incluyendo músculos distróficos y músculos dañados por eventos isquémicos tales como infartos de miocardio. En otra realización, las células reprogramadas descritas en la presente memoria pueden usarse para mejorar la cicatrización en animales, incluyendo seres humanos, después de una lesión traumática o cirugía. En esta realización, las células reprogramadas de la presente invención se administran sistémicamente, tal como por vía intravenosa, y migran al sitio del tejido recién traumatizado reclutado por citoquinas circulantes secretadas por las células dañadas. En otra realización, las células reprogramadas pueden administrarse localmente a un sitio de tratamiento que lo requiera o reparación o regeneración.
- En otras realizaciones, el ARN usado de acuerdo con la presente enseñanza codifica un péptido o proteína, que tiene un valor terapéutico. Las células que contienen el ARN pueden, por ejemplo, ser manipuladas *in vitro* para expresar el ARN y, por lo tanto, el péptido o proteína, utilizando los métodos descritos en el presente documento. Posteriormente, las células que expresan el péptido o la proteína pueden introducirse en un paciente.
- En una realización particularmente preferida, el ARN utilizado en la presente invención codifica un péptido o proteína que comprende un inmunógeno, antígeno o péptido antigénico. En una realización, el péptido o proteína se procesa después de la expresión para proporcionar dicho inmunógeno, antígeno o péptido antigénico. En otra realización, el péptido o la propia proteína es el inmunógeno, antígeno o péptido antigénico. Las células que expresan dicho

péptido o proteína que comprende un inmunógeno, antígeno o péptido antigénico se pueden usar, por ejemplo, en inmunoterapia para provocar una respuesta inmune contra el inmunógeno, antígeno o péptido antigénico en un paciente.

5 Un "antígeno" de acuerdo con la invención cubre cualquier sustancia que provoque una respuesta inmune. En particular, un "antígeno" se refiere a cualquier sustancia que reaccione específicamente con anticuerpos o linfocitos T (células T). De acuerdo con la presente enseñanza, el término antígeno comprende cualquier molécula que comprende al menos un epítipo. Preferiblemente, un antígeno en el contexto de la presente invención es una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, induce una reacción inmune, que es preferiblemente específica para el antígeno. De acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier antígeno adecuado, que sea un candidato para una reacción inmune, en donde la reacción inmune puede ser tanto una reacción inmune humoral como celular. En el contexto de las realizaciones de la presente enseñanza, el antígeno es preferiblemente presentado por una célula, preferiblemente por una célula presentadora de antígeno, en el contexto de moléculas de MHC, lo que da como resultado una reacción inmune contra el antígeno. Un antígeno es preferiblemente un producto que corresponde a, o se deriva de, un antígeno natural. Tales antígenos de origen natural pueden incluir o pueden derivarse de alérgenos, virus, bacterias, hongos, parásitos y otros agentes infecciosos y patógenos o un antígeno también puede ser un antígeno tumoral. De acuerdo con la presente invención, un antígeno puede corresponder a un producto natural, por ejemplo, una proteína viral, o una parte de la misma.

20 En una realización preferida, el antígeno es un antígeno tumoral, es decir, una parte de una célula tumoral, que puede derivarse del citoplasma, de la superficie celular o del núcleo celular, en particular aquellos que se producen principalmente intracelularmente o como antígenos de superficie de células tumorales. Por ejemplo, los antígenos tumorales incluyen el antígeno carcinoembrionario,  $\alpha$ 1-fetoproteína, isoferritina y sulfoglicoproteína fetal,  $\alpha$ 2-H-ferroproteína y  $\gamma$ -fetoproteína, así como diversos antígenos tumorales de virus. De acuerdo con la presente invención, un antígeno tumoral comprende preferiblemente cualquier antígeno que sea característico de tumores o cánceres, así como de células tumorales o cancerosas con respecto al tipo y/o nivel de expresión. En otra realización, el antígeno es un antígeno de virus tal como ribonucleoproteína viral o proteína de cubierta. En particular, el antígeno debe ser presentado por moléculas de MHC que da como resultado la modulación, en particular la activación de células del sistema inmunitario, preferiblemente linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, en particular a través de la modulación de la actividad de un receptor de células T.

30 En las realizaciones preferidas, el antígeno es un antígeno tumoral y la presente enseñanza implica la estimulación de una respuesta de CTL antitumorales contra células tumorales que expresan dicho antígeno tumoral y que presenta preferiblemente dicho antígeno tumoral con MHC de clase I.

El término "inmunogenicidad" se refiere a la efectividad relativa de un antígeno para inducir una reacción inmune.

35 El término "patógeno" se refiere a microorganismos patógenos y comprende virus, bacterias, hongos, organismos unicelulares y parásitos. Ejemplos de virus patógenos son el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el citomegalovirus (CMV), el virus del herpes (VHS), el virus de la hepatitis A (VHA), el VHB, el VHC, el virus del papiloma y el virus linfotrófico T humano. Los organismos unicelulares comprenden plasmodios tripanosomas, amebas, etc.

40 Los ejemplos de antígenos que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la presente enseñanza son p53, ART-4, BAGE, ss-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDAG4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 menor BCR-abL, Plac-1, Pm1/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE y WT, preferiblemente WT-1.

"Una porción o fragmento de un antígeno" o "un péptido antigénico" de acuerdo con la enseñanza es preferiblemente una representación incompleta de un antígeno y es capaz de provocar una respuesta inmune contra el antígeno.

50 En este contexto, la enseñanza también hace uso de péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de antígenos, también denominados "péptidos antigénicos" en la presente memoria. Por "péptido antigénico", o "péptido antigénico derivado de un antígeno" se entiende un oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos de un fragmento o péptido de un antígeno. Un péptido antigénico puede ser de cualquier longitud.

55 Preferiblemente, los péptidos antigénicos son capaces de estimular una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta celular contra el antígeno o células caracterizadas por la expresión del antígeno y preferiblemente por la presentación del antígeno. Preferiblemente, un péptido antigénico es capaz de estimular una respuesta celular contra una célula caracterizada por la presentación de un antígeno con MHC de clase I y preferiblemente es capaz de estimular un CTL sensible al antígeno. Preferiblemente, los péptidos antigénicos de acuerdo con la invención son péptidos presentados por MHC clase I y/o clase II o se pueden procesar para producir péptidos presentados por

- 5 MHC clase I y/o clase II. Preferiblemente, los péptidos antigénicos comprenden una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos de un fragmento de un antígeno. Preferiblemente, dicho fragmento de un antígeno es un péptido presentado por MHC clase I y/o clase II. Preferiblemente, un péptido antigénico de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos de dicho fragmento y se procesa para producir dicho fragmento, es decir, un péptido presentado por MHC de clase I y/o clase II derivado de un antígeno.
- 10 Si se va a presentar directamente un péptido antigénico, es decir, sin procesamiento, en particular sin escisión, tiene una longitud que es adecuada para la unión a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente es de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 8-11 aminoácidos de longitud, en particular de 9 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia de un péptido antigénico que se va a presentar directamente se deriva de la secuencia de aminoácidos de un antígeno, es decir, su secuencia corresponde sustancialmente y es preferiblemente completamente idéntica a un fragmento de un antígeno.
- 15 Si se presenta un péptido antigénico después del procesamiento, en particular después de la escisión, el péptido producido por procesamiento tiene una longitud que es adecuada para la unión a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente es de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 8-11 aminoácidos de longitud, en particular de 9 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia del péptido que ha de presentarse después del procesamiento se deriva de la secuencia de aminoácidos de un antígeno, es decir, su secuencia corresponde sustancialmente y es preferiblemente completamente idéntica a un fragmento de un antígeno. De este modo, un péptido antigénico de acuerdo con la invención en una realización comprende una secuencia de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 8-11 aminoácidos de longitud, en particular de 9 o 10 aminoácidos de longitud que corresponde sustancialmente y es preferiblemente completamente idéntico a un fragmento de un antígeno y después del procesamiento del péptido antigénico constituye el péptido presentado. Sin embargo, el péptido antigénico puede comprender también una secuencia que corresponde sustancialmente y preferiblemente es completamente idéntica a un fragmento de un antígeno que es incluso más largo que la secuencia indicada anteriormente. En una realización, un péptido antigénico puede comprender toda la secuencia de un antígeno.
- 20 Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden sustancialmente a una secuencia de un péptido que es presentada por el MHC de clase I pueden diferir en uno o más residuos que no son esenciales para el reconocimiento de TCR del péptido tal como se presenta por el MHC de clase I, para la unión de péptidos a MHC. Tales péptidos sustancialmente correspondientes son también capaces de estimular un CTL sensible al antígeno. Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de un péptido presentado en residuos que no afectan al reconocimiento de TCR, pero mejoran la estabilidad de unión a MHC pueden mejorar la inmunogenicidad del péptido antigénico, y pueden ser denominados en la presente memoria como "péptidos optimizados". Utilizando el conocimiento existente sobre cuáles de estos residuos pueden tener más probabilidades de afectar la unión al MHC o al TCR, puede emplearse un enfoque racional para el diseño de péptidos sustancialmente correspondientes. Los péptidos resultantes que son funcionales se contemplan como péptidos antigénicos.
- 25 Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden sustancialmente a una secuencia de un péptido que es presentada por el MHC de clase I pueden diferir en uno o más residuos que no son esenciales para el reconocimiento de TCR del péptido tal como se presenta por el MHC de clase I, para la unión de péptidos a MHC. Tales péptidos sustancialmente correspondientes son también capaces de estimular un CTL sensible al antígeno. Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de un péptido presentado en residuos que no afectan al reconocimiento de TCR, pero mejoran la estabilidad de unión a MHC pueden mejorar la inmunogenicidad del péptido antigénico, y pueden ser denominados en la presente memoria como "péptidos optimizados". Utilizando el conocimiento existente sobre cuáles de estos residuos pueden tener más probabilidades de afectar la unión al MHC o al TCR, puede emplearse un enfoque racional para el diseño de péptidos sustancialmente correspondientes. Los péptidos resultantes que son funcionales se contemplan como péptidos antigénicos.
- 30 "Procesamiento de antígeno" se refiere a la degradación de un antígeno en fragmentos (por ejemplo, la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, mediante unión) con moléculas de MHC para su presentación por "células presentadoras de antígenos" a células T específicas.
- 35 Las "células presentadoras de antígeno" (APC) son células que presentan fragmentos peptídicos de antígenos proteicos en asociación con moléculas de MHC en su superficie celular. Algunas APC pueden activar células T específicas de antígeno.
- 40 El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que implica la activación de una reacción inmune específica.
- 45 El término "*in vivo*" se refiere a la situación en un sujeto.
- 50 Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente invención son humanos, primates no humanos, animales domesticados tales como perros, gatos, ovejas, ganado vacuno, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas, etc., así como animales en cautiverio tales como animales de zoológicos. El término "animal", tal como se utiliza aquí, también incluye seres humanos. El término "sujeto" también puede incluir un paciente, es decir, un animal, preferiblemente un ser humano que tiene una enfermedad.
- 55 Si de acuerdo con la enseñanza, se desea la administración a un sujeto, la composición para administración se administra generalmente en cantidades farmacéuticamente compatibles y en preparaciones farmacéuticamente compatibles. El término "farmacéuticamente compatible" se refiere a un material no tóxico, que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica. Las preparaciones de este tipo pueden contener normalmente sales, sustancias reguladoras, conservantes, excipientes y vehículos y se administran de una manera conocida por el experto en la materia.

La presente enseñanza se describe en detalle mediante las figuras y ejemplos que se presentan a continuación, que se utilizan únicamente con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

5 Cultivo de células

Los fibroblastos primarios de prepucio neonatal humano (CCD-1079Sk, CCD), fibroblastos de prepucio neonatal humano BJ se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA, EE.UU.) y se cultivaron en MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementados con 10% de suero bovino fetal dorado inactivado por calor (Invitrogen), (PAA Laboratories, Pasching, Austria), aminoácidos no esenciales 1x (Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen), glutamina 2 mM (Invitrogen), 50 U/mL de penicilina (Invitrogen) y 50 µg/mL de estreptomycin (Invitrogen). Otra carga de fibroblastos de prepucio neonatal humano (HFF) se obtuvieron de SBI (Mountain View, CA, EE.UU.) y se cultivaron en forma similar a CCD y BJ. Se aislaron fibroblastos embrionarios murinos (MEF) de embriones de ratones C57BL/6 de 14 días de edad y se cultivaron en DMEM (Invitrogen) complementado con 15% de suero bovino fetal inactivado por calor, aminoácidos no esenciales 1x, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, 50U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin. Los queratinocitos epidérmicos humanos se obtuvieron de PromoCell (Heidelberg, Alemania) y se cultivaron en medio basal de queratinocitos 2 con aditivos incluidos por el proveedor (PromoCell, Heidelberg, Alemania). Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) de Lonza (Walkersville, MD, EE.UU.) se cultivaron usando el sistema de células endoteliales Clonetics® (Lonza).

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll Hypaque (Amersham Biosciences, Glattbrugg, Suiza) a partir de capas leucocitarias obtenidas de donantes sanos de bancos de sangre. Los monocitos se enriquecieron a partir de PBMC con microperlas anti-CD 14 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para obtener células dendríticas inmaduras (iDC), los monocitos se diferenciaron durante 5 días en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 1x, 10% de suero AB humano inactivado por calor complementado con 1.000 U/mL de GM-CSF (Essex, Lucerna, Suiza) y 1.000 U/mL de IL-4 (Strathmann Biotech, Hamburgo, Alemania).

Generación de ARN transcrito *in vitro*

Se utilizaron constructos de plásmido como plantillas para la transcripción *in vitro* de los ARN que codifican la luciferasa, eGFP, eGFP desestabilizada (d2eGFP), OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG, antígeno de T grande de SV40, E6, p53-DD, E3 y K3 con base en pST1-2hBgUTR-A120 (Holtkamp 2006). La secuencia de nucleótidos de los genes estaba optimizada en codones para aumentar el contenido de GC y para mejorar la traducción en células objetivo. Para la generación de los ARN transcritos *in vitro*, los plásmidos se linealizaron en dirección 3' de la cola de poli(A) usando una endonucleasa de restricción de clase II. Los plásmidos linealizados se purificaron mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, se cuantificaron espectrofotométricamente, y se sometieron a una transcripción *in vitro* con ARN T7, polimerasa usando el kit MEGAscript T7 (Ambion, Austin, TX, EE.UU.). Para la incorporación del análogo de caperuza β-S-ARCA (D1), se añadió 6 mM del análogo a la reacción mientras que la concentración de GTP se redujo a 1,5 mM. Las reacciones se incubaron de 3 a 6 horas a 37°C, se trataron con DNasa (Ambion) y se purificaron usando el kit MEGAclear (Ambion) de acuerdo con el fabricante.

40 Transferencia de ARN IVT en células

La transferencia de ARN IVT en células se realizó por electroporación (EP). Para ello, se recolectaron 1-10x10<sup>7</sup> células por EP, se lavaron secuencialmente con PBS complementado con EDTA 2 mM y medio X-VIVO 15 (Lonza), se resuspendieron en 125 µl de medio X-VIVO 15 y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm de separación (Bio-RAD, Hercules, CA, EE.UU.). Se añadió la cantidad apropiada de ARN transcrito *in vitro* y se electroporaron las células usando un sistema de electroporación BTX ECM® 830 (BTX, Holliston, MA, EE.UU.) y parámetros de electroporación previamente optimizados para CCD (110V, pulso 3x12 ms, intervalo de 400 ms), BJ (110V, pulso de 3x12 ms, intervalo de 400 ms), MEF (125V, pulso de 5x6 ms, intervalo de 400 ms), HFF (125V, pulso de 1x24 ms), queratinocitos (125V, pulso de 4x6 ms, intervalo de 200 ms) y HUVEC (125V, pulso 1x20 ms). Las PBMC e iDC humanas se electroporaron en una cubeta estéril de electroporación de 4 mm de separación (Bio-RAD) utilizando un aparato Gene-Pulser-II (Bio-Rad, Munich, Alemania) con ajustes de voltaje y capacitancia de 450 V/250 µF (PBMC), 300 V/150 µF (iDC). Las células se diluyeron en medio de cultivo inmediatamente después de la electroporación.

Ensayos de genes informadores

Para los ensayos de luciferasa, las células electroporadas con ARN transcrito *in vitro* que codifica para luciferasa se sembraron en microplacas de fondo plano blancas de 96 pozos (Nunc, Langensfeld, Alemania) y se incubaron a 37°C. La lisis de células se realizó usando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El flujo de bioluminiscencia se midió con el lector de luminiscencia de microplacas Infinite M200 (Tecan,

Crailsheim, Alemania) con un tiempo de integración de 1 s. Los datos de la actividad de luciferasa presentados en este documento están en conteos por segundo.

5 Para la cuantificación de la proteína d2eGFP y eGFP, las células se lavaron en PBS, se fijaron usando PBS complementado con formaldehído al 2% y se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). La conmutación se realizó en células vivas y se cuantificó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las poblaciones de células que expresan GFP utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EE.UU.). Las subpoblaciones de células T humanas de PBMC electroporadas se tiñeron con anticuerpos fluorescentes reactivos CD4 o CD8 antes de la citometría de flujo. La conmutación se realizó en células T CD4+ y CD8+ vivas y la expresión de GFP y se determinó MFI de ambas subpoblaciones de células T por citometría de flujo.

Cuantificación de los niveles de transcritos por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real

15 El ARN celular total se extrajo de células con el Kit RNeasy Mini o el Kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemania), se transcribió de forma inversa con oligo-dT18 utilizando Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se sometió a análisis cuantitativo en tiempo real en un instrumento y software del sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), usando el kit de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen). Las reacciones se realizaron por triplicado con cebador amplificando una región específica del codón optimizado de OCT4

(OCT4-s: 5'-ACCTGGAAAACCTGTTCTCTGC-3' (SEQ ID NO: 14); OCT4-as: 5'-AGCTCGGATCCTCATCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 15)),

20 SOX2-SOX2-s: 5'-AACCAGCGGATGGACAGCTAC-3' (SEQ ID NO: 16), SOX2-as: 5'-GCTTTTCACCACGCTGCCCAT-3'

KLF4 (KLF4-s: 5'-AAGACCTACACCAAGAGCAGC-3' (SEQ ID NO: 18), KLF4-as: 5'-AGGTGGTCAGATCTGCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 19)) y

25 cMYC (cMYC-s:5'-CCCCTGAACGACAGCTCTAGC-3' (SEQ ID NO: 20); cMYC-as: 5'-TTCTCCACGGACACCACGTCG-3' (SEQ ID NO: 21)) o

los transcritos endógenos de

IFN $\alpha$  (IFN $\alpha$ -s: 5'-AAATACAGCCCTTGTGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 22), IFN $\alpha$ -as: 5'-GGTGAGCTGGCATACGAATCA-3' (SEQ ID NO: 23)),

30 IFN $\beta$  (IFN $\beta$ -s: 5'-AAGGCCAAGGAGTACAGTC-3' (SEQ ID NO: 24); IFN $\beta$ -as: 5'-ATCTTCAGTTTCGGAGGTAA-3' (SEQ ID NO: 25)),

GDF3 (GDF3-s: 5'-TCCCAGACCAAGGTTTCTTTC-3' (SEQ ID NO: 26); GDF3-as: 5'-TTACCTGGCTTAGGGGTGGTC-

3' (SEQ ID NO: 27)) y

35 TERT (TERT-s: 5'-CCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTG-3' (SEQ ID NO: 28); TERT-as: 5'-GGAAAAGCTGGCCTGGGGTGGAGC-3' (SEQ ID NO: 29)) (cada 333 nM)

40 con desnaturalización/activación inicial durante 15 min a 95°C y 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30°C a la temperatura de hibridación específica del cebador (OCT4, cMYC, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , GDF3, TERT: 60°C; SOX2: 64°C; KLF4: 58°C) y 30s a 72°C. La expresión de los transcritos se cuantificó usando el cálculo de  $\Delta\Delta C_t$  en relación con el ARN que codifica HPRT como estándar interno (HPRT-s, 5'-TGACACTGGCAAACAATGCA-3' (SEQ ID NO: 30), HPRT-as: 5'-GGTCCTTTT CACCAGCAAGCT-3' (SEQ ID NO: 31), las condiciones de la PCR como anteriormente con 62°C (como temperatura de hibridación) para normalizar las variaciones en la calidad del ARN y la cantidad de ADN complementario de entrada.

Tinción intracelular mediante FACS para OCT4, SOX2 y NANOG

45 La tinción intracelular mediante FACS de OCT4, SOX2 y NANOG se realizó usando el kit de análisis del factor de transcripción de células madre pluripotentes humanas siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Bioscience). En resumen, se recolectaron 3-5x10<sup>5</sup> células, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron durante 20 min en 250  $\mu$ L de regulador BD Cytifix (BD Biosciences) a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron mediante lavado dos veces con 1x Perm/Regulador de lavado (BD Bioscience) seguido 10 minutos de incubación en 50  $\mu$ L de 1x Perm/lavado a temperatura ambiente. La tinción con control de isotipo y anticuerpos específicos se realizó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad seguido por lavado dos veces con 1xPerm/lavado. Las células se resuspendieron en PBS complementado con formaldehído al 2% y se analizaron mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

## Ejemplo 2

- Se electroporaron fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079SK) con 1  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y 5  $\mu\text{g}$  de ARN IVT que codifican para GFP desestabilizada (luc + GFP). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación utilizando parámetros optimizados. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 30.0000 células/pozo y se dejaron sin tratar o se incubaron con  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  2  $\mu\text{M}$  (inhibidor de PKR). 24 horas más tarde se recogieron las células para extracción de ARN total y transcripción inversa. La inducción de interferones de tipo I se evaluó mediante qRT-PCR usando un cebador específico para IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  en presencia o ausencia de inhibidor de PKR como se indica en la Figura 1. Los paneles A y C muestran las mismas muestras que B y D con valores reducidos del eje y.
- Se observó una sobre regulación de los transcritos de interferón en fibroblastos humanos inducidos por electroporación de ARN (Figura 1A y 1C). Sorprendentemente, la inhibición de PKR utilizando  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  dio lugar a un abrumador aumento de interferón transcripciones (Figura 1B y 1D): IFN- $\alpha$  se indujo, incluso en ausencia de ARN, IFN- $\beta$  se indujo mediante  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  sólo en presencia de ARN. Estos datos muestran que la inhibición de PKR usando un inhibidor de molécula pequeña no elimina la vía de respuesta al interferón.

## Ejemplo 3

- Los fibroblastos primarios humanos y de ratón se electroporaron con ARN IVT que codifica los genes informadores de luciferasa de luciérnaga y GFP. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para cada tipo de célula. Inmediatamente después de la electroporación, las células se sembraron en placas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de PKR de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$ .
- Tal como se representa en las Figuras 2 y 3, se observó un aumento dependiente de la dosis de los genes informadores de luciferasa y GFP en fibroblastos humanos y de ratón. En presencia de la concentración más alta utilizada (2  $\mu\text{M}$ ), se observó un alto nivel de estabilización de la luciferasa y la expresión de GFP.

## Ejemplo 4

- Las células endoteliales de la vena umbilical humana primaria (HUVEC) fueron electroporadas con ARN IVT y el efecto de la inhibición de PKR en la expresión del gen informador se analizó en entornos experimentales similares como se describió anteriormente. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para HUVEC. La expresión de luciferasa se aumentó en HUVEC de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, la expresión no es tan duradera como la observada en los fibroblastos (Figura 4).
- A continuación, se realizaron experimentos similares con células T humanas CD4 y CD8 positivas, así como células dendríticas inmaduras (iDC). Se realizaron electroporaciones utilizando parámetros optimizados para cada tipo de célula. En contraste con nuestras observaciones anteriores en fibroblastos y células endoteliales, ni en las células T ni en iDC la inhibición de PKR condujo a un aumento de la expresión de GFP (Figura 5A, B). En iDC, la inhibición de PKR dio como resultado la pérdida de la expresión de luciferasa (Figura 5C).

## Ejemplo 5

- Con el fin de investigar si la estabilización observada de la expresión del gen informador es debida a una inhibición irreversible de la PKR por concentraciones altas de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$ , se decidió realizar tratamientos transitorios de células electroporadas. Además, se incluyó en este experimento un segundo inhibidor de PKR, 2-aminopurina (2-AP). Ambos inhibidores se usaron a concentraciones finales de 2  $\mu\text{M}$ . Como se representa en la Figura 6, el aumento de la traducción de proteínas a partir de ARN IVT depende del tiempo de incubación con ambos inhibidores. Un período de incubación de 7 h con cualquier inhibidor de PKR no dio como resultado un aumento significativo de la expresión de luciferasa y un tratamiento de 24h se invirtió rápidamente después de la eliminación de los inhibidores. Incluso un tratamiento de 48 horas fue menos eficiente que un tratamiento permanente. Estos datos muestran que la inhibición de la PKR es reversible. La inhibición permanente da como resultado altos niveles de expresión durante 5 días.

## Ejemplo 6

- Se investigaron proteínas virales que se sabe que inhiben la PKR, a saber, las proteínas E3 y K3 del virus vacuna. Ambas proteínas fueron codificadas por ARN IVT y cotransferidas por electroporación en fibroblastos, junto con ARN IVT que codifica los genes informadores. Además, se incubó una parte de las células con  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  2  $\mu\text{M}$  para investigar efectos aditivos. Ambas proteínas virales condujeron a un aumento de 2 veces en la expresión de luciferasa 24 horas después de la electroporación. No hubo efecto aditivo de las dos proteínas. Además, la expresión no se estabilizó como se observó con los inhibidores de molécula pequeña, pero disminuyó rápidamente al mismo nivel que los controles sin proteínas virales (Figura 7A). La aplicación adicional de  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$  dio como resultado un aumento aditivo de la expresión de luciferasa y una estabilización en comparación con los controles no tratados como se observó antes con la inhibición por moléculas pequeñas de PKR (Figura 7B). Experimentos similares con células HUVEC revelaron que la combinación de E3 y K3 aumentó la expresión de luciferasa, que se

mejoró adicionalmente mediante  $C_{13}H_8N_4OS$  de una manera dependiente de la dosis (Figura 7C).

En un conjunto similar de experimentos investigamos si las proteínas víricas podrían rescatar los efectos no existentes de  $C_{13}H_8N_4OS$  en células T o revertir los efectos inhibitorios en células dendríticas. Como se representa en la figura 8A y 8B, las proteínas virales que inhiben PKR no aumentaron la expresión del gen informador en células T, ni en presencia ni en ausencia de  $C_{13}H_8N_4OS$ . En las iDC, las proteínas virales, como se observó antes con el inhibidor, disminuyeron la expresión de luciferasa. También, E3 y K3 no revirtieron el efecto negativo de  $C_{13}H_8N_4OS$  sobre la expresión de luciferasa (Figura 8C).

Ejemplo 7

Experimentos similares como se describieron anteriormente se realizaron utilizando ARN IVT compuesto de nucleótidos no modificados como antes, e ARN IVT que estaba compuesto de 5mC y PU en lugar de citidina y uridina. Como se representa en la Figura 9, la expresión de luciferasa en células electroporadas con ARN-IVT no modificado se mejora mucho y se estabiliza mediante  $C_{13}H_8N_4OS$  2  $\mu M$  y recapitula nuestros hallazgos anteriores. La incorporación de 5mC y PU en los transcritos aumenta la expresión de la luciferasa en aproximadamente 2 veces en comparación con el control no modificado. El uso de  $C_{13}H_8N_4OS$  2  $\mu M$  aumenta y estabiliza adicionalmente la expresión de luciferasa codificada por el ARN IVT modificado.

Ejemplo 8

Se investigó la estabilidad de la reprogramación de la expresión del factor de transcripción tras la transferencia del ARN IVT. En experimentos similares descritos anteriormente, se trataron células electroporadas ya sea permanentemente con concentraciones crecientes de  $C_{13}H_8N_4OS$ , o transitoriamente con  $C_{13}H_8N_4OS$  2  $\mu M$ . Como se demuestra en la Figura 10, la expresión de los factores de transcripción OCT4, Nanog y SOX2 se incrementó fuertemente y se estabilizó en células tratadas de una manera dependiente de la dosis y del tiempo.

Una consecuencia directa de la reprogramación de la expresión del factor de transcripción es la inducción de genes marcadores de pluripotencia a nivel transcripcional. Para investigar si la expresión del factor de transcripción estabilizado y aumentado por inhibición de la PKR facilita la inducción del marcador, se electroporaron fibroblastos CCD1079Sk con ARN IVT que codifican T grande, HPV16-E6, p53DD, OCT4, SOX2, KLF4, CMYC, Nanog y LIN28 (TEP-OSKMLN). Como se representa en la Figura 11, la inducción de GDF3 e hTERT se incrementó mediante el tratamiento 72 h después de la electroporación.

Ejemplo 9

Con el fin de investigar si la expresión de proteína estabilizada observada está relacionada con una semivida aumentada del ARN IVT transfectado, se evaluó el ritmo de degradación del ARN IVT intracelular. Para este objetivo, se investigó el nivel intracelular de ARN IVT transferido 72 horas después de la electroporación en células tratadas y no tratadas transitoriamente. Como se muestra en la Figura 12A, el tratamiento transitorio de células con  $C_{13}H_8N_4OS$  2  $\mu M$  aumentó la abundancia de ARN IVT durante 72 h. De acuerdo con estos datos, la semivida de los constructos de ARN IVT, OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC se prolongó durante 1-2,5 h bajo inhibición de PKR como se ve en la Figura 12B. Por lo tanto, la estabilización de la expresión informadora bajo la inhibición de PKR se basa en cierta medida en la estabilización de constructos de ARN IVT.

Ejemplo 10

Los fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF) se sometieron a electroporación con ARN IVT que codifica eGFP (10  $\mu g$ ), ya sea modificado (mod.) o no modificado con 5-metilcitidina (5mC) y pseudouridina (PU) o eGFP no modificada (10  $\mu g$  y con 3  $\mu g$  de E3 y K3 no modificadas (5mC y PU) como se indica en la Figura 13. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para HFF. Se sembraron en placa 300.000 células/pozo en placas de 6 pozos y las células se dejaron sin tratar o se incubaron con  $C_{13}H_8N_4OS$  2  $\mu M$ . Después de 24 h se recogieron los sobrenadantes y se midió la secreción de IFN usando el kit IFN $\alpha$  y  $\beta$  humano a partir de una fuente de interferón de PBL.

El ARN IVT induce la secreción de IFN $\beta$  después de la electroporación. La secreción se mejora notablemente cuando las células se incuban con  $C_{13}H_8N_4OS$ . Estos resultados están en concordancia con los resultados de la qRT-PCR. Como se esperaba, la inducción de IFN $\beta$  se reduce cuando se modifica el ARN IVT con 5mC y PU. La adición de ARN IVT de E3 y K3 no tiene efecto. La secreción de IFN $\alpha$  no se observó en estos experimentos (datos no mostrados).

Ejemplo 11

Los fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079Sk) se electroporaron con una cantidad creciente de una mezcla de ARNpi dirigida a PKR (Santa Cruz, sc-36263) que variaba de 20 nM a 80 nM. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para CDD. Las células se sembraron en placas en 6 pozos y se recogieron después de 24 horas o 48 horas para la extracción de ARN total y la transcripción inversa. El nivel de expresión de PKR se evaluó mediante qRT-PCR usando cebador específico. Se

representan los niveles relativos de expresión en comparación con las células de tipo silvestre. Se encontró que PKR se desactiva hasta 5-10% con todas las concentraciones de mezcla de ARNpi 24h después de la electroporación. Sólo 80nM son suficientes para desactivar PKR por más de 48 h; consultar la Figura 14 (A).

5 Los fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079Sk) se electroporaron con ARN IVT que codifica eGFP no modificada (1,5 µg) ya sea sola o con una cantidad creciente de mezcla de ARNpi dirigida a PKR en el intervalo de 20 nM a 80 nM. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación utilizando parámetros optimizados para CCD. Las células se sembraron en placa en 6 pozos y se recogieron 24 horas después para extracción de ARN total y transcripción inversa. El nivel de expresión de los genes de respuesta a IFN OAS1 y OAS2 se evaluó por qRT-PCR utilizando un cebador específico. En la Figura 14 (B) se representan los relativos niveles de expresión en comparación con las células de tipo silvestre. Se encontró que los niveles de expresión de OAS1 y OAS2 no se alteran significativamente por la adición de mezcla de ARNpi lo que indica que el ARNpi no induce IFN después de la electroporación. (Por el contrario, parece que existe una tendencia a reducir la respuesta de IFN mediante la aplicación de altas dosis de mezcla ARNpi de PKR).

15 Los fibroblastos primarios de prepucio humano (CCD1079Sk) se electroporaron con o sin 80 nM de mezcla de ARNpi dirigida a PKR. 48 horas más tarde se recogieron las células y se electroporaron una segunda vez con 1 µg de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y para eGFP (2,5 µg). Todas las electroporaciones se realizaron en cubetas de 2 mm de separación usando parámetros optimizados para CCD. Las células se sembraron en placas por duplicado en placas de 96 pozos a una densidad de 10.000 células/pozo y se dejaron ya sea sin tratar o se incubaron con 2 µM de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS. La actividad de luciferasa se midió en los puntos de tiempo indicados en la Figura 14 (C). Se presentan los valores medios de los duplicados. Se encontró que la electroporación de células preincubadas con ARNpi dirigidas a PKR y por lo tanto que están en estado de decadencia de PKR conduce a una cinética bastante similar y aumento de la expresión del gen informador como incubación con 2 µM del inhibidor de PKR C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS con un efecto estabilizador ligeramente inferior. La combinación de incubación previa con mezcla de ARNpi dirigida a PKR y el uso del inhibidor conduce a un nivel de expresión aún más alto del transcrito informador, pero no está tan estabilizado como en presencia del inhibidor solo.

#### Ejemplo 12

30 Para estudiar si C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS podría también mejorar la traducción tras la transferencia liposómica de ARN IVT, se empacaron 1,2 µg de ARN IVT 5'-trifosforilado y no modificado (0,8 µg que codifica la luciferasa, 0,4 µg de GFP) con 6 µL de reactivo de transfección RNAiMAX (Invitrogen) y se transfectaron en fibroblastos de prepucio humano. Después de 3 h de incubación con la mezcla de transfección, se renovó el medio y se complementó con concentraciones crecientes de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS. En los puntos de tiempo indicados en la Figura 15, las células se lisaron usando regulador de lisis pasiva estabilizador de luciferasa (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al final del transcurso del tiempo, se midió la actividad luciferasa de todos los lisados. C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS tuvo un efecto estabilizador sobre la traducción de la luciferasa. Este efecto fue dependiente de la dosis. Se muestra uno de los tres experimentos realizados independientemente. Por lo tanto, el efecto de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS sobre la traducción del ARN IVT no está restringido a la administración mediante electroporación. C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS también mejora la traducción de la luciferasa cuando el ARN IVT se introduce en las células mediante liposomas. Por lo tanto, el efecto de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS es independiente de la vía de administración.

#### Ejemplo 13

40 Los fibroblastos de prepucio humano se electroporaron con 2 µg de ARN IVT que codifica para luciferasa de luciérnaga y 5 µg de ARN IVT que codifica para GFP. Después de la electroporación, las células se sembraron en placas en presencia de concentraciones crecientes de 2-AP, como se indica en la leyenda del panel en la Figura 16. 2 µM de C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS sirvieron como control positivo. Se siguió la expresión de luciferasa durante 72 h. La expresión de GFP demostró que todas las electroporaciones fueron exitosas (datos no mostrados). 2-AP 10 mM a 20 mM condujeron a un aumento similar de traducción como C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS 2 µM.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

110> BioNTech AG

<120> MÉTODO PARA EXPRESIÓN DE ARN CELULAR

<130> 674-60 PCT

50 <150> PCT/EP2010/007362

<151> 2010-12-03

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 640 875 T3

<211> 1411

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ccttcgcaag ccctcatttc accaggcccc cggcttgggg cgccttcctt ccccatggcg      60
ggacacctgg cttcggattt cgccttctcg ccccctccag gtggtggagg tgatgggcca      120
ggggggccgg agccgggctg ggttgatcct cggacctggc taagcttcca aggccctcct      180
ggagggccag gaatcgggcc ggggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattccccca      240
tgccccccgc cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgact gtgggccccca ggttgagtg      300
gggctagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtcggg      360
gtggagagca actccgatgg ggcctccccg gagcctgca ccgtcacccc tgggtccgtg      420
aagctggaga aggagaagct ggagcaaac ccgaggagt cccaggacat caaagctctg      480
cagaaagaac tcgagcaatt tgccaagctc ctgaagcaga agaggatcac cctgggatat      540
acacaggccg atgtggggct caccctgggg gttctatttg ggaaggtatt cagccaaacg      600
accatctgcc gctttgaggc tctgcagctt agcttcaaga acatgtgtaa gctgcggccc      660
ttgctgcaga agtgggtgga ggaagctgac aacaatgaaa atcttcagga gatatgcaaa      720
gcagaaacct tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga      780
ggcaacctgg agaatttggt cctgcagtgc ccgaaaccca cactgcagca gatcagccac      840
atcggcccagc agcttgggct cgagaaggat gtggtccgag tgtggttctg taaccggcgc      900
cagaagggca agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggattttga ggctgctggg      960
tctcctttct cagggggacc agtgtccttt cctctggccc cagggccccca ttttggtagc     1020
ccaggctatg ggagccctca cttcactgca ctgtactcct cgggcccttt ccctgagggg     1080
gaagcctttc cccctgtctc cgtcaccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt     1140
gcctgccctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg     1200
agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt cttcattcac taaggaagga attgggaaca     1260
caaaggggtg gggcagggga gtttggggca actggttggg ggggaaggta agttcaatga     1320
tgctcttgat tttaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga     1380
5 cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a                                     1411

```

<210> 2

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 2

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



ES 2 640 875 T3

cacagcgccc gcatgtacaa catgatggag acggagctga agccgcccggg cccgcagcaa 60  
acttcggggg gcggcggcgg caactccacc gcggcggcgg ccggcggcaa ccagaaaaac 120  
agcccggacc gcgtcaagcg gcccatgaat gccttcatgg tgtgggtcccg cgggcagcgg 180  
cgcaagatgg cccaggagaa cccaagatg cacaactcgg agatcagcaa ggccttgggc 240  
gccgagtgga aacttttgtc ggagacggag aagcggccgt tcatcgacga ggctaagcgg 300  
ctgcgagcgc tgcacatgaa ggagaccccg gattataaat accggccccg gcggaaaacc 360  
aagacgctca tgaagaagga taagtacacg ctgcccggcg ggctgctggc ccccggcggc 420  
aatagcatgg cgagcggggg cggggtgggc gccggcctgg gcgcgggcgt gaaccagcgc 480  
atggacagtt acgcgcacat gaacggctgg agcaacggca gctacagcat gatgcaggac 540  
cagctgggct acccgagca cccgggcctc aatgcgcacg gcgcagcga gatgcagccc 600  
atgcaccgct acgacgtgag cgccctgcag tacaactcca tgaccagctc gcagacctac 660  
atgaacggct cgcccaccta cagcatgtcc tactcgcagc agggcacccc tggcatggct 720  
cttggctcca tgggttcggt ggtcaagtcc gaggccagct ccagcccccc tgtgggttacc 780  
tcttctccc actccagggc gccctgccag gccggggacc tccgggacat gatcagcatg 840  
tatctccccg gcgccgaggt gccggaacct gccgccccca gcagacttca catgtcccag 900  
cactaccaga gcggcccggg gcccggcacg gccattaacg gcacactgcc cctctcacac 960  
atgtgagggc cggacagcga actggagggg ggagaaattt tcaaagaaaa acgagggaaa 1020  
tgggaggggt gcaaaagagg agagtaagaa acagcatgga gaaaaccggg tacgctcaaa 1080  
aaaaa 1085

<210> 4

<211> 317

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 2098

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 640 875 T3

attataaatc	tagagactcc	aggattttaa	cgttctgctg	gactgagctg	gttgcctcat	60
gttattatgc	aggcaactca	ctttatccca	atctcttgat	acttttcctt	ctggagggtcc	120
tattttctcta	acatcttcca	gaaaagtctt	aaagctgcct	taaccttttt	tccagtccac	180
ctcttaaatt	ttttcctcct	cttcctctat	actaacatga	gtgtggatcc	agcttggtccc	240
caaagcttgc	cttgctttga	agcatccgac	tgtaaagaat	cttcacctat	gcctgtgatt	300
tgtgggcctg	aagaaaacta	tccatccttg	caaatgtctt	ctgctgagat	gcctcacacg	360
gagactgtct	ctcctcttcc	ttcctccatg	gatctgctta	ttcaggacag	ccctgattct	420
tccaccagtc	caaaggcaa	acaaccact	tctgcagaga	agagtgtcgc	aaaaaaggaa	480
gacaagggtcc	cggtaagaa	acagaagacc	agaactgtgt	tctcttccac	ccagctgtgt	540
gtactcaatg	atagatttca	gagacagaaa	tacctcagcc	tccagcagat	gcaagaactc	600
tccaacatcc	tgaacctcag	ctacaaacag	gtgaagacct	ggttccagaa	ccagagaatg	660
aaatctaaga	ggtggcagaa	aaacaactgg	ccgaagaata	gcaatggtgt	gacgcagaag	720
gcctcagcac	ctacctacc	cagcctttac	tcttcctacc	accagggatg	cctggtgaac	780
ccgactggga	accttccaat	gtggagcaac	cagacctgga	acaattcaac	ctggagcaac	840
cagaccaga	acatccagtc	ctggagcaac	cactcctgga	acactcagac	ctggtgcacc	900
caatcctgga	acaatcaggc	ctggaacagt	cccttctata	actgtggaga	ggaatctctg	960
cagtcctgca	tgagttcca	gccaaattct	cctgccagtg	acttgagggc	tgcttggaa	1020

ES 2 640 875 T3

gctgctgggg aaggccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtatnttag tactccacaa 1080  
 accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga 1140  
 gtgaaactga tattactcaa tttcagtctg gacactggct gaatccttcc tctcccctcc 1200  
 tcccatccct cataggattt ttcttgtttg gaaaccacgt gttctggttt ccatgatgcc 1260  
 catccagtca atctcatgga ggggtggagta tggttggagc ctaatcagcg aggtttcttt 1320  
 tttttttttt ttcctattgg atcttcctgg agaaaatact tttttttttt ttttttttga 1380  
 aacggagtct tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg cgcggtcttg gctcactgca 1440  
 agctccgtct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc ctcccgagca gctgggacta 1500  
 caggcgcccc ccacctcgcc cggctaatat tttgtatntt tagtagagac ggggtttcac 1560  
 tgtgttagcc aggatggtct cgatctcctg accttgatgac ccacccgcct cggcctccct 1620  
 aacagctggg atttacaggc gtgagccacc gcgccctgcc tagaaaagac atnttaataa 1680  
 ccttggtctgc cgtctctggc tatagataag tagatcctaat actagtttggt atatctntag 1740  
 ggtttagaat ctaacctcaa gaataagaaa tacaagtaca aattggtgat gaagatgat 1800  
 tcgtattgnt tgggattggg aggcnttgct tntttnttaa aaactattga ggtaaagggt 1860  
 taagctgtaa catacttaat tgatntctta ccgntnttggt ctctgntntg ctatatcccc 1920  
 taatntgntg gttgtgctaa tctntgtaga aagaggtctc gtatntgctg catcgtaatg 1980  
 acatgagtac tgctntagnt ggtntaagnt caaatgaatg aaacaactat tnttcntnta 2040  
 gntgatntta ccctgatntc accgagtgtt tcaatgagta aatatacagc tntaaacat 2098

<210> 6

<211> 305

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Val Asp Pro Ala Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala  
 1 5 10 15

Ser Asp Cys Lys Glu Ser Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu  
 20 25 30

Glu Asn Tyr Pro Ser Leu Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr  
 35 40 45

Glu Thr Val Ser Pro Leu Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp  
 50 55 60

Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala  
 65 70 75 80

Glu Lys Ser Val Ala Lys Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln  
 85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Phe Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp  
 100 105 110  
 Arg Phe Gln Arg Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu  
 115 120 125  
 Ser Asn Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln  
 130 135 140  
 Asn Gln Arg Met Lys Ser Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Asn Gly Val Thr Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Ser Tyr His Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn  
 180 185 190  
 Leu Pro Met Trp Ser Asn Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn  
 195 200 205  
 Gln Thr Gln Asn Ile Gln Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln  
 210 215 220  
 Thr Trp Cys Thr Gln Ser Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe  
 225 230 235 240  
 Tyr Asn Cys Gly Glu Glu Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro  
 245 250 255  
 Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu  
 260 265 270  
 Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln  
 275 280 285  
 Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp  
 290 295 300

Val  
305

<210> 7

ES 2 640 875 T3

<211> 780

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

5     gtgCGGGGga agatgtagca gcttcttctc cgaaccaacc ctttgccttc ggacttctcc     60  
       ggggccagca gccgcccgac caggggcccg gggccacggg ctCagccgac gaccatgggc     120  
       tccgtgtcca accagcagtt tgcaggtggc tgcgccaagg cggcagaaga ggcgcccgag     180  
       gaggcgcccg aggacgcggc ccgggcggcg gacgagcctc agctgctgca cggTgcgggc     240  
       atctgtaagt ggttcaacgt gcgcatgggg ttcggcttcc tgtccatgac cgcccgcgcc     300  
       ggggtcgcgc tcgaccccc agtggatgtc tttgtgcacc agagtaagct gcacatggaa     360  
       gggttccgga gcttgaagga gggtgaggca gtggagtcca cctttaagaa gtcagccaag     420  
       ggtctggaat ccatccgtgt caccggacct ggtggagtat tctgtattgg gAgtgagagg     480  
       cggccaaaag gaaagagcat gcagaagcgc agatcaaaag gagacaggTg ctacaactgt     540  
       ggaggTctag atcatcatgc caaggaatgc aagctgccac cccagcccaa gaagtgccac     600  
       ttctgccaga gcatcagcca tatggtagcc tcatgtccgc tgaaggccca gcagggccct     660  
       agtgcacagg gaaagccaac ctactttcga gaggaagaag aagaaatcca cagccctacc     720  
       ctgctcccgg aggcacagaa ttgagccaca atgggtgggg gctattcttt tgctatcagg     780

<210> 8

<211> 209

<212> PRT

10    <213> Homo sapiens

<400> 8

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

Asn

<210> 9

<211> 2639

ES 2 640 875 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

tcgaggcgac	cgcgacagtg	gtgggggacg	ctgctgagtg	gaagagagcg	cagcccggcc	60
accggacctt	cttactcgcc	ttgctgattg	tctatTTTTg	cgTTTacaac	TTTTctaaga	120
actTTTgtat	acaaggaac	TTTTtaaaaa	agacgcttcc	aagttatatt	taatccaaag	180
aagaaggatc	tcggccaatt	tggggTTTTg	ggTTTTggct	tcgTTTcttc	tcttcgTTTga	240
ctTTggggTt	caggtgcccc	agctgcttcg	ggctgcccag	gaccttctgg	gccccacat	300
taatgaggca	gccacctggc	gagtctgaca	tggctgtcag	cgacgcgctg	ctcccatctt	360
tctccacgTt	cgCgtctggc	ccggcgggaa	gggagaagac	actgcgtcaa	gcaggtgccc	420
cgaataaccg	ctggcgggag	gagctctccc	acatgaagcg	acttccccca	gtgcttccccg	480
gccgccccta	tgacctggcg	gcggcgaccg	tggccacaga	cctggagagc	ggcggagccg	540
gtgcggctTg	cggcggtagc	aacctggcgc	ccctacctcg	gagagagacc	gaggagttca	600
acgatctcct	ggacctggac	tttattctct	ccaattcgct	gacctatcct	ccggagtcag	660
tggccgccac	cgTgtctctg	tcagcgtcag	cctcctcttc	gtcgtcgccg	tcgagcagcg	720
gccctgccag	cgcgccctcc	acctgcagct	tcacctatcc	gatccgggcc	gggaacgacc	780
cgggcgtggc	gccgggcggc	acgggcggag	gcctcctcta	tggcagggag	tccgctcccc	840
ctccgacggc	tcccttcaac	ctggcggaca	tcaacgacgt	gagcccctcg	ggcggcttcg	900
tggccgagct	cctgcggcca	gaattggacc	cggtgtacat	tccgccgcag	cagccgcagc	960
cgccaggtgg	cgggctgatg	ggcaagttcg	tgctgaaggc	gtcgtctgagc	gcccctggca	1020
gcgagtacgg	cagcccgtcg	gtcatcagcg	tcagcaaagg	cagccctgac	ggcagccacc	1080
cggTggTggT	ggcgccttac	aacggcgggc	cgccgcgcac	gtgcccCaag	atcaagcagg	1140
aggcggTctc	ttcgtgcacc	cacttggggc	ctggaccccc	tctcagcaat	ggccaccggc	1200
cggctgcaca	cgacttcccc	ctggggcggc	agctccccag	caggactacc	ccgaccctgg	1260
gtcttgagga	agtgtctgagc	agcagggact	gtcacctctg	cctgcccgtt	cctcccggct	1320
tccatcccca	cccggggccc	aattacccat	ccttctctgcc	cgatcagatg	cagccgcaag	1380

ES 2 640 875 T3

tccccgccgct ccattaccaa gagctcatgc caccgcggtc ctgcatgccca gaggagccca 1440  
agccaaagag gggaagacga tcgtggcccc ggaaaaggac cgccaccac acttgtgatt 1500  
acgcgggctg cggcaaaacc tacacaaaga gttcccatct caaggcacac ctgcgaaccc 1560  
acacaggtga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttcgcccgct 1620  
cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca cgcgccgctc cagtgcctaaa 1680  
aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctcgcctt acacatgaag aggcattttt 1740  
aaatcccaga cagtggatat gaccacact gccagaagag aattcagtat tttttacttt 1800  
tcacactgtc ttcccgatga gggaaggagc ccagccagaa agcactacaa tcatggtcaa 1860  
gttcccaact gagtcatctt gtgagtggat aatcaggaaa aatgaggaat ccaaaagaca 1920  
aaaatcaaag aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcattccaat tctaaatccg 1980  
acttgaatat tcctggactt acaaaatgcc aagggggtga ctggaagttg tggatatcag 2040  
ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattcccttg aattgtgtat 2100  
tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtatttctt taccttctaa aagccattat 2160  
tatgatgtta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttaa atagcctaaa 2220  
tgatggtgct tggtagtct tggttctaaa ggtaccaaac aaggaagcca aagttttcaa 2280  
actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttgtctt ccgatcaaca tttatgacct 2340  
aagtcaggta atatacctgg ttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc 2400  
actgtggttt cagatgtgca ataatttgta caatggttta ttccaagta tgccttaagc 2460  
agaacaaatg tgtttttcta tatagttcct tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa 2520  
gcaaacgtct attttgata tttgtaaact acaaagtaaa atgaacattt tgtggagttt 2580  
gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaaataa acctataata ttttatctg 2639

<210> 10

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 640 875 T3

Met Ala Val Ser Asp Ala Leu Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser  
1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Arg Glu Lys Thr Leu Arg Gln Ala Gly Ala Pro Asn  
20 25 30

Asn Arg Trp Arg Glu Glu Leu Ser His Met Lys Arg Leu Pro Pro Val  
35 40 45

Leu Pro Gly Arg Pro Tyr Asp Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Thr Asp  
50 55 60

Leu Glu Ser Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Gly Gly Ser Asn Leu Ala



ES 2 640 875 T3

			340						345						350		
Pro	Leu	His	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Pro	Pro	Gly	Ser	Cys	Met	Pro	Glu		
		355					360					365					
Glu	Pro	Lys	Pro	Lys	Arg	Gly	Arg	Arg	Ser	Trp	Pro	Arg	Lys	Arg	Thr		
	370					375					380						
Ala	Thr	His	Thr	Cys	Asp	Tyr	Ala	Gly	Cys	Gly	Lys	Thr	Tyr	Thr	Lys		
385					390					395					400		
Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ala	His	Leu	Arg	Thr	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro		
				405					410					415			
Tyr	His	Cys	Asp	Trp	Asp	Gly	Cys	Gly	Trp	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Asp		
			420					425					430				
Glu	Leu	Thr	Arg	His	Tyr	Arg	Lys	His	Thr	Gly	His	Arg	Pro	Phe	Gln		
		435					440					445					
Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	His	Leu	Ala	Leu		
	450					455					460						
His	Met	Lys	Arg	His	Phe												
465					470												

<210> 11

<211> 2377

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 640 875 T3

acccccgagc	tgtgctgctc	gcggccgcca	ccgccgggcc	ccggccgtcc	ctggctcccc	60
tcctgcctcg	agaagggcag	ggcttctcag	aggcttggcg	ggaaaaagaa	cggagggagg	120
gatcgcgctg	agtataaaag	ccggttttcg	gggctttatc	taactcgctg	tagtaattcc	180
agcgagaggc	agagggagcg	agcgggcggc	cggctagggg	ggaagagccg	ggcgagcaga	240
gctgcgctgc	gggcgtcctg	ggaagggaga	tccggagcga	atagggggct	tcgcctctgg	300
cccagccctc	ccgctgatcc	cccagccagc	gggccgcaac	ccttgccgca	tccacgaaac	360
tttgcccata	gcagcgggcg	ggcactttgc	actggaactt	acaacacccg	agcaaggacg	420
cgactctccc	gacgcgggga	ggctattctg	cccatttggg	gacacttccc	cgccgctgcc	480
aggacccgct	tctctgaaag	gctctccttg	cagctgctta	gacgctggat	ttttttcggg	540
tagtggaaaa	ccagcagcct	cccgcgacga	tgccctcaa	cgtagcttc	accaacagga	600
actatgacct	cgactacgac	tcggtgcagc	cgtatttcta	ctgcgacgag	gaggagaact	660
tctaccagca	gcagcagcag	agcgagctgc	agccccggc	gcccagcgag	gatatctgga	720
agaaattcga	gctgctgccc	accccgccc	tgtcccctag	ccgccgctcc	gggctctgct	780
cgccctccta	cgttgcggtc	acacccttct	cccttcgggg	agacaacgac	ggcggtggcg	840

ES 2 640 875 T3

ggagcttctc cacggccgac cagctggaga tggtgaccga gctgctggga ggagacatgg 900  
 tgaaccagag ttatcatctgc gaccgagacg acgagacctt catcaaaaac atcatcatcc 960  
 aggactgtat gtggagcggc ttctcggccg ccgccaagct cgtctcagag aagctggcct 1020  
 cctaccaggc tgcgcgcaaa gacagcggca gcccgaacct cgcccgcggc cacagcgtct 1080  
 gctccacctc cagcttgtac ctgcaggatc tgagcggcgc cgctcagag tgcacgacc 1140  
 cctcgggtggt cttcccctac cctctcaacg acagcagctc gcccaagtcc tgcgcctcgc 1200  
 aagactccag cgccttctct ccgtcctcgg attctctgct ctcctcgacg gagtcctccc 1260  
 cgcagggcag ccccgagccc ctggtgctcc atgaggagac accgcccacc accagcagcg 1320  
 actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag aaatcgatgt tgtttctgtg gaaaagaggc 1380  
 aggctcctgg caaaaggcca gagtctggat caccttctgc tggaggccac agcaaacctc 1440  
 ctcacagccc actggtcctc aagaggtgcc acgtctccac acatcagcac aactacgag 1500  
 cgctccctc cactcgggaag gactatcctg ctgccaagag ggtcaagttg gacagtgtca 1560  
 gagtcctgag acagatcagc aacaaccgaa aatgcaccag cccaggtcc tcggacaccg 1620  
 aggagaatgt caagaggcga acacacaacg tcttggagcg ccagaggagg aacgagctaa 1680  
 aacggagctt ttttgccctg cgtgaccaga tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc 1740  
 ccaaggtagt tatcctaaa aaagccacag catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc 1800  
 aaaagctcat ttctgaagag gacttgttgc ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac 1860  
 ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaag gaaaagtaag gaaaacgatt ctttctaaca 1920  
 gaaatgtcct gagcaatcac ctatgaactt gtttcaaag catgatcaaa tgcaacctca 1980  
 caaccttggc tgagtcttga gactgaaaga tttagccata atgtaaactg cctcaaattg 2040  
 gactttgggc ataaaagaac tttttatgc ttaccatctt tttttttct ttaacagatt 2100  
 tgtatttaag aattgtttt aaaaaattt aagatttaca caatgtttct ctgtaaatat 2160  
 tgccattaaa tgtaataaac ttaataaaa cgtttatagc agttacacag aatttcaatc 2220  
 ctagtatata gtacctagta ttataggtac tataaacctt aattttttt atttaagtac 2280  
 attttgcttt ttaaagttga ttttttcta ttgtttttag aaaaaataaa ataactggca 2340  
 aatatatcat tgagccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2377

<210> 12

<211> 454

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp  
 20 25 30

ES 2 640 875 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 640 875 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Asn Ser Cys Ala  
450

<210> 13

<211> 551

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 640 875 T3

Met Ala Gly Asp Leu Ser Ala Gly Phe Phe Met Glu Glu Leu Asn Thr  
1 5 10 15

Tyr Arg Gln Lys Gln Gly Val Val Leu Lys Tyr Gln Glu Leu Pro Asn  
20 25 30

Ser Gly Pro Pro His Asp Arg Arg Phe Thr Phe Gln Val Ile Ile Asp  
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Pro Glu Gly Glu Gly Arg Ser Lys Lys Glu Ala Lys  
50 55 60

Asn Ala Ala Ala Lys Leu Ala Val Glu Ile Leu Asn Lys Glu Lys Lys  
65 70 75 80

ES 2 640 875 T3

Ala Val Ser Pro Leu<sub>85</sub> Leu Leu Thr Thr Thr<sub>90</sub> Asn Ser Ser Glu Gly<sub>95</sub> Leu  
 Ser Met Gly Asn<sub>100</sub> Tyr Ile Gly Leu Ile<sub>105</sub> Asn Arg Ile Ala Gln<sub>110</sub> Lys Lys  
 Arg Leu Thr<sub>115</sub> Val Asn Tyr Glu Gln<sub>120</sub> Cys Ala Ser Gly Val<sub>125</sub> His Gly Pro  
 Glu Gly<sub>130</sub> Phe His Tyr Lys Cys<sub>135</sub> Lys Met Gly Gln Lys<sub>140</sub> Glu Tyr Ser Ile  
 Gly Thr<sub>145</sub> Gly Ser Thr Lys<sub>150</sub> Gln Glu Ala Lys Gln<sub>155</sub> Leu Ala Ala Lys Leu<sub>160</sub>  
 Ala Tyr Leu Gln Ile<sub>165</sub> Leu Ser Glu Glu Thr<sub>170</sub> Ser Val Lys Ser Asp<sub>175</sub> Tyr  
 Leu Ser Ser Gly<sub>180</sub> Ser Phe Ala Thr Thr<sub>185</sub> Cys Glu Ser Gln Ser<sub>190</sub> Asn Ser  
 Leu Val Thr<sub>195</sub> Ser Thr Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ser Glu Gly Asp Phe  
 Ser Ala<sub>210</sub> Asp Thr Ser Glu Ile<sub>215</sub> Asn Ser Asn Ser Asp<sub>220</sub> Ser Leu Asn Ser  
 Ser<sub>225</sub> Ser Leu Leu Met Asn<sub>230</sub> Gly Leu Arg Asn Asn<sub>235</sub> Gln Arg Lys Ala Lys<sub>240</sub>  
 Arg Ser Leu Ala Pro<sub>245</sub> Arg Phe Asp Leu Pro<sub>250</sub> Asp Met Lys Glu Thr Lys<sub>255</sub>  
 Tyr Thr Val Asp<sub>260</sub> Lys Arg Phe Gly Met<sub>265</sub> Asp Phe Lys Glu Ile<sub>270</sub> Glu Leu  
 Ile Gly Ser<sub>275</sub> Gly Gly Phe Gly Gln<sub>280</sub> Val Phe Lys Ala Lys<sub>285</sub> His Arg Ile  
 Asp Gly<sub>290</sub> Lys Thr Tyr Val Ile<sub>295</sub> Lys Arg Val Lys Tyr<sub>300</sub> Asn Asn Glu Lys  
 Ala Glu Arg Glu Val Lys<sub>310</sub> Ala Leu Ala Lys Leu<sub>315</sub> Asp His Val Asn Ile<sub>320</sub>  
 Val His Tyr Asn Gly<sub>325</sub> Cys Trp Asp Gly Phe<sub>330</sub> Asp Tyr Asp Pro Glu Thr<sub>335</sub>  
 Ser Asp Asp Ser<sub>340</sub> Leu Glu Ser Ser Asp<sub>345</sub> Tyr Asp Pro Glu Asn<sub>350</sub> Ser Lys

ES 2 640 875 T3

Asn Ser Ser Arg Ser Lys Thr Lys Cys Leu Phe Ile Gln Met Glu Phe  
 355 360 365

Cys Asp Lys Gly Thr Leu Glu Gln Trp Ile Glu Lys Arg Arg Gly Glu  
 370 375 380

Lys Leu Asp Lys Val Leu Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Ile Thr Lys  
 385 390 395 400

Gly Val Asp Tyr Ile His Ser Lys Lys Leu Ile His Arg Asp Leu Lys  
 405 410 415

Pro Ser Asn Ile Phe Leu Val Asp Thr Lys Gln Val Lys Ile Gly Asp  
 420 425 430

Phe Gly Leu Val Thr Ser Leu Lys Asn Asp Gly Lys Arg Thr Arg Ser  
 435 440 445

Lys Gly Thr Leu Arg Tyr Met Ser Pro Glu Gln Ile Ser Ser Gln Asp  
 450 455 460

Tyr Gly Lys Glu Val Asp Leu Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Leu Ala Glu  
 465 470 475 480

Leu Leu His Val Cys Asp Thr Ala Phe Glu Thr Ser Lys Phe Phe Thr  
 485 490 495

Asp Leu Arg Asp Gly Ile Ile Ser Asp Ile Phe Asp Lys Lys Glu Lys  
 500 505 510

Thr Leu Leu Gln Lys Leu Leu Ser Lys Lys Pro Glu Asp Arg Pro Asn  
 515 520 525

Thr Ser Glu Ile Leu Arg Thr Leu Thr Val Trp Lys Lys Ser Pro Glu  
 530 535 540

Lys Asn Glu Arg His Thr Cys  
 545 550

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 14

acctggaaaa cctgttctcg c 21

10 <210> 15

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> oligonucleótido  
<400> 15  
agctcggatc ctcatcagtt g 21  
<210> 16  
<211> 21  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 16  
15 aaccagcggg tggacagcta c 21  
<210> 17  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 17  
gctttcacc acgctgccca t 21  
<210> 18  
25 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 18  
aagacctaca ccaagagcag c 21  
<210> 19  
<211> 21  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

<400> 19  
 aggtggtag atctgctgaa g 21  
 <210> 20  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 20  
 10 cccctgaacg acagctctag c 21  
 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 21  
 ttctccacgg acaccacgtc g 21  
 <210> 22  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 25 <400> 22  
 aaatacagcc cttgtgcctg g 21  
 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 23  
 ggtgagctgg catacgaatc a 21  
 35 <210> 24  
 <211> 19  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 24  
 5 aaggccaagg agtacagtc 19  
 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 25  
 atcttcagtt tcggaggtaa 20  
 <210> 26  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 20 <400> 26  
 tccagacca aggttcttt c 21  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 27  
 ttacctggct taggggtgt c 21  
 30 <210> 28  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> oligonucleótido  
 <400> 28  
 cctgctcaag ctgactcgac accgtg 26

<210> 29  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 29  
 ggaaaagctg gccctggggt ggagc 25  
 <210> 30  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 15 <400> 30  
 tgacactggc aaaacaatgc a 21  
 <210> 31  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 31  
 ggtccttttc accagcaagc t 21  
 25 <210> 32  
 <211> 2930  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 32

ES 2 640 875 T3

agcagacgag ggcttgtgcg agagggggcc gggcggctgc agggaaggcg gagtccaagg 60  
 ggaaaacgaa actgagaacc agctctcccg aagccgcggg tctccggccg gcggcggcgg 120  
 cggcggcggc ggcggcgcag tttgctcata ctttgtgact tgcggtcaca gtggcattca 180  
 gctccacact tggtagaacc acaggcacga caagcataga aacatcctaa acaatcttca 240  
 tcgaggcatc gaggtccatc ccaataaaaa tcaggagacc ctggctatca tagaccttag 300  
 tcttcgctgg tatcactcgt ctgtctgaac cagcggttgc atttttttaa gccttctttt 360  
 ttctctttta ccagtttctg gagcaaattc agtttgcctt cctggatttg taaattgtaa 420  
 tgacctcaaa actttagcag ttcttccatc tgactcaggt ttgcttctct ggcggctctc 480  
 agaatcaaca tccacacttc cgtgattatc tgcgtgcatt ttggacaaag cttccaacca 540  
 ggatacggga agaagaaatg gctggtgatc tttcagcagg tttcttcatg gaggaactta 600  
 atacataccg tcagaagcag ggagtagtac ttaaatatca agaactgcct aattcaggac 660  
 ctccacatga taggaggttt acatttcaag ttataataga tggaaagaaa tttccagaag 720  
 gtgaaggtag atcaaagaag gaagcaaaaa atgccgcagc caaattagct gttgagatac 780  
 ttaataagga aaagaaggca gttagtcctt tattattgac aacaacgaat tcttcagaag 840  
 gattatccat ggggaattac ataggcctta tcaatagaat tgcccagaag aaaagactaa 900  
 ctgtaaatta tgaacagtgt gcatcggggg tgcattggcc agaaggattt cattataaat 960  
 gcaaaatggg acagaaagaa tatagtattg gtacaggttc tactaaacag gaagcaaaac 1020  
 aattggccgc taaacttgca tatcttcaga tattatcaga agaaacctca gtgaaatctg 1080  
 actacctgtc ctctggttct tttgctacta cgtgtgagtc ccaaagcaac tctttagtga 1140  
 ccagcacact cgcttctgaa tcatcatctg aagggtgactt ctcagcagat acatcagaga 1200  
 taaattctaa cagtgacagt ttaaacagtt cttcgttgct tatgaatggt ctcagaaata 1260  
 atcaaaggaa ggcaaaaaga tctttggcac ccagatttga ccttcctgac atgaaagaaa 1320  
 caaagtatac tgtggacaag aggtttggca tggattttta agaaatagaa ttaattggct 1380  
 caggtggatt tggccaagtt ttcaaagcaa aacacagaat tgacggaaag acttacgtta 1440  
 ttaaactgtt taaatataat aacgagaagg cggagcgtga agtaaaaagca ttggcaaaac 1500  
 ttgatcatgt aaatattggt cactacaatg gctgttggga tggatttgat tatgatcctg 1560  
 agaccagtga tgattctctt gagagcagtg attatgatcc tgagaacagc aaaaatagtt 1620  
 caaggtcaaa gactaagtgc cttttcatcc aaatggaatt ctgtgataaa gggaccttgg 1680  
 aacaatggat tgaaaaaaga agaggcgaga aactagacaa agttttggct ttggaactct 1740  
 ttgaacaaat aacaaaaggg gtggattata tacattcaaa aaaattaatt catagagatc 1800  
 ttaagccaag taatatattc ttagtagata caaaacaagt aaagattgga gactttggac 1860  
 ttgtaacatc tctgaaaaat gatggaaagc gaacaaggag taagggaaact ttgcgataca 1920  
 tgagcccaga acagatttct tcgcaagact atggaaagga agtggacctc tacgctttgg 1980

ES 2 640 875 T3

ggctaattct	tgctgaactt	cttcatgtat	gtgacactgc	ttttgaaaca	tcaaagtttt	2040
tcacagacct	acgggatggc	atcatctcag	atatatttga	taaaaaagaa	aaaactcttc	2100
tacagaaatt	actctcaaag	aaacctgagg	atcgacctaa	cacatctgaa	atactaagga	2160
ccttgactgt	gtggaagaaa	agcccagaga	aaaatgaacg	acacacatgt	tagagccctt	2220
ctgaaaaagt	atcctgcttc	tgatatgcag	ttttccttaa	attatctaaa	atctgctagg	2280
gaatatcaat	agatatttac	cttttatttt	aatgtttcct	ttaatttttt	actattttta	2340
ctaactcttc	tgacagaaaca	gaaaggtttt	cttctttttg	cttcaaaaac	attcttacat	2400
tttacttttt	cctggctcat	ctctttattc	tttttttttt	tttaaagaca	gagtctcgct	2460
ctgttgccca	ggctggagtg	caatgacaca	gtcttggctc	actgcaactt	ctgcctcttg	2520
ggttcaagtg	attctcctgc	ctcagcctcc	tgagtagctg	gattacaggc	atgtgccacc	2580
caccaacta	atttttgtgt	ttttaataaa	gacagggttt	cacatgttg	gccaggctgg	2640
tctcaaactc	ctgacctcaa	gtaatccacc	tgcttcggcc	tcccaaagtg	ctgggattac	2700
agggatgagc	caccgcgccc	agcctcatct	ctttgttcta	aagatggaaa	aaccaccccc	2760
aaatcttctt	tttatactat	taatgaatca	atcaattcat	atctatttat	taaatttcta	2820
ccgcttttag	gccaaaaaaa	tgtaagatcg	ttctctgcct	cacatagctt	acaagccagc	2880
tggagaaata	tggtactcat	taaaaaaaaa	aaaaaaagtg	atgtacaacc		2930

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para proporcionar células que tienen características de células madre *in vitro* que comprende las etapas de (i) reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una población celular que comprende células somáticas, (ii) introducir ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre en al menos una porción de las células somáticas y (iii) permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre.
2. El método de la reivindicación 1, en el que uno o más factores comprenden OCT4 y SOX2.
3. El método de la reivindicación 2, en el que uno o más factores comprenden además ELF4 y/o c-MYC y/o NANOG y/o LIN28.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de reducción de la actividad de PKR en las células da como resultado una mejora de la estabilidad y/o una mejora de la expresión del ARN en las células.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la mejora de la expresión del ARN en las células comprende un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en las células.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de reducción de la actividad de PKR en las células comprende tratamiento de las células con al menos un inhibidor de PKR o silenciamiento de la expresión del gen de PKR.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN.
- 20 8. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazol-oxindol, 2-aminopurina o un inhibidor derivado viralmente de PKR.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho imidazol-oxindol es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrol-2,3,4-triazolo[4,5-b]pirrolo [2,3-g]benzotiazol-7-ona y en donde dicho inhibidor viralmente derivado de PKR se selecciona del grupo que consiste de E3 y/o K3 del virus vacuna, o su ARN.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células somáticas son fibroblastos.
- 25 11. El método de la reivindicación 10, en el que dichos fibroblastos son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos.
- 30 12. Un método para proporcionar tipos de células diferenciadas que comprende las etapas de (i) proporcionar células que tienen características de células madre usando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y (ii) cultivar las células que tienen características de células madre bajo condiciones que inducen o dirigen la diferenciación parcial o completa hasta un tipo de célula diferenciada.

Figura 1

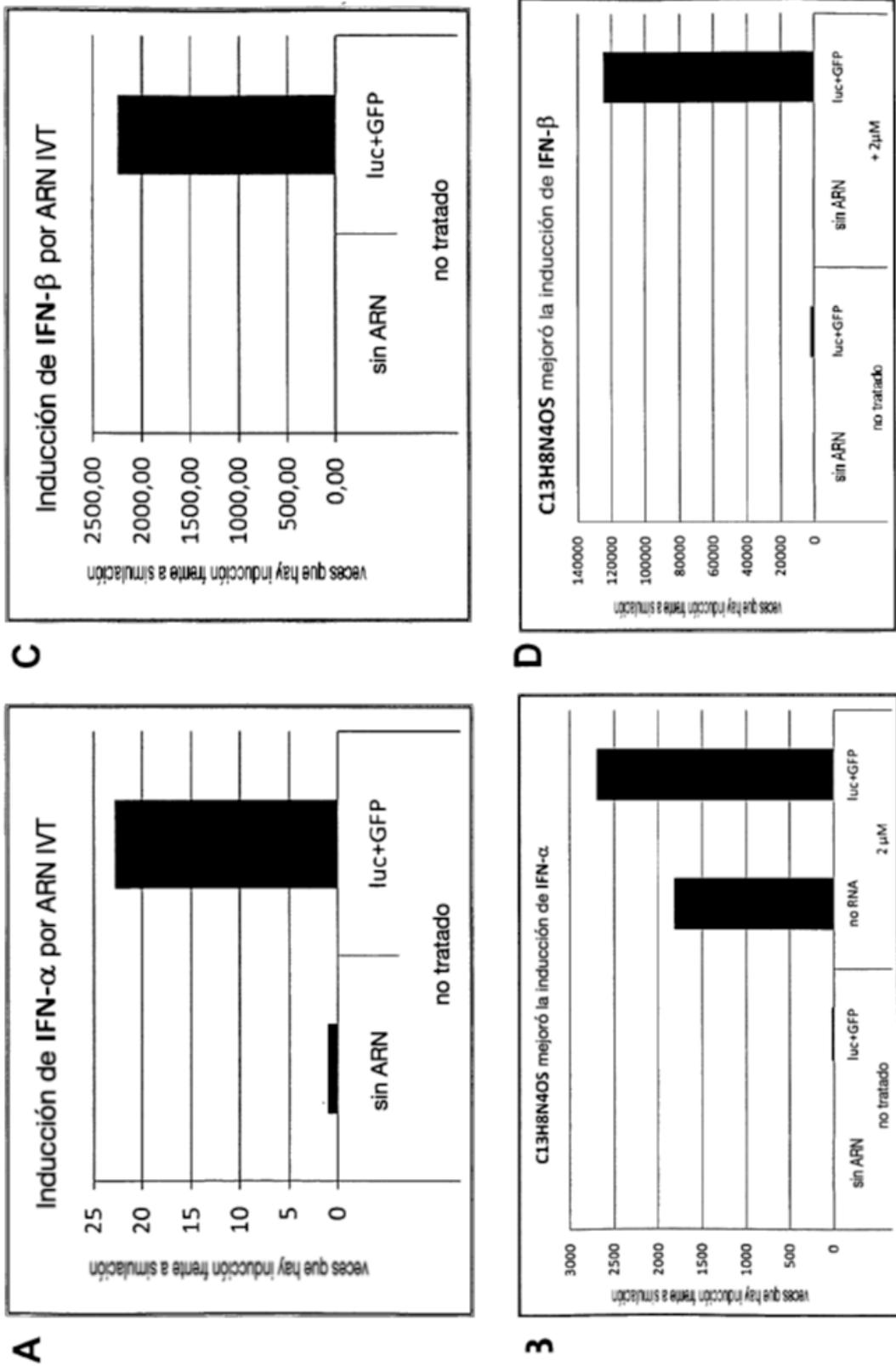


Figura 2

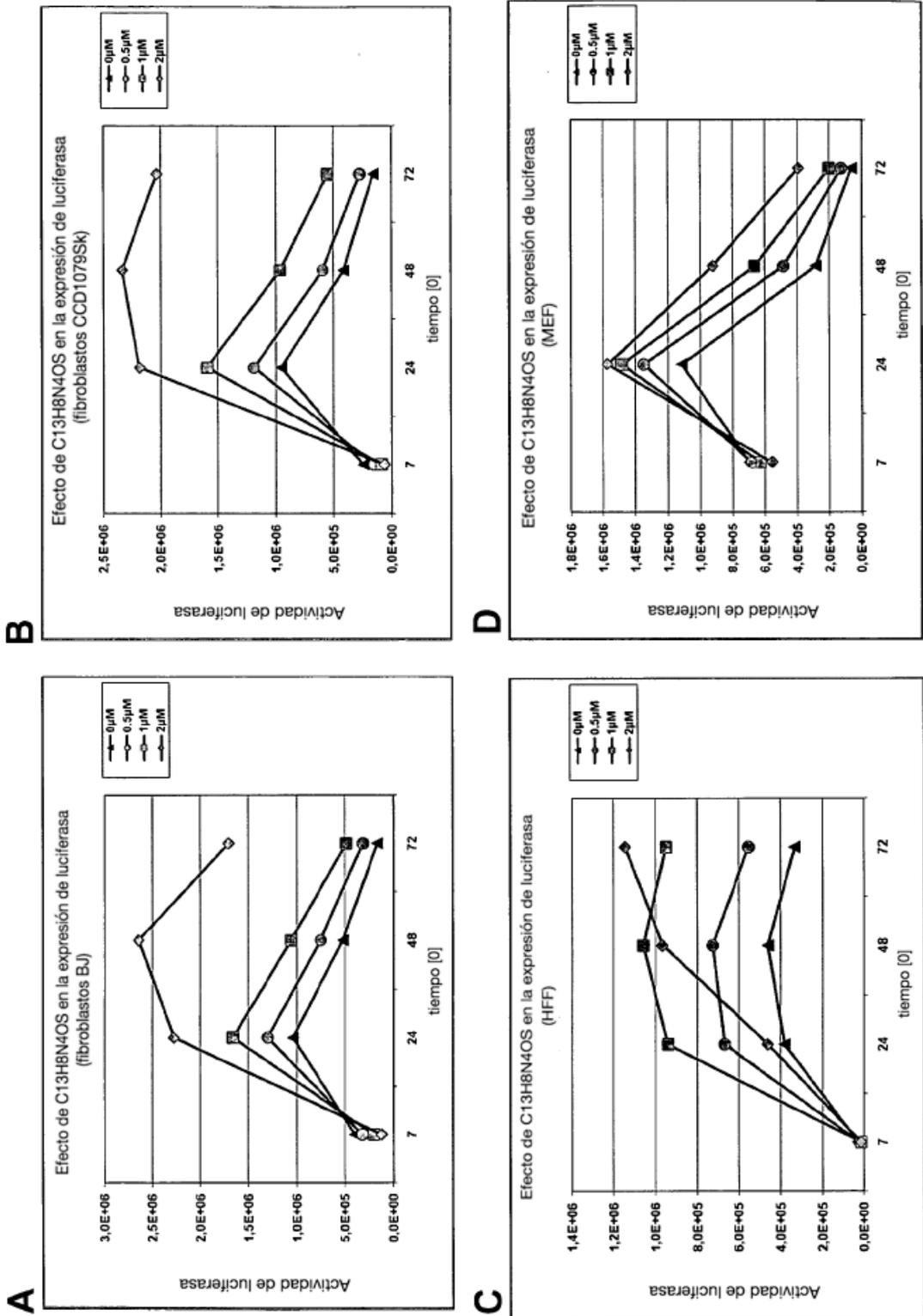


Figura 3

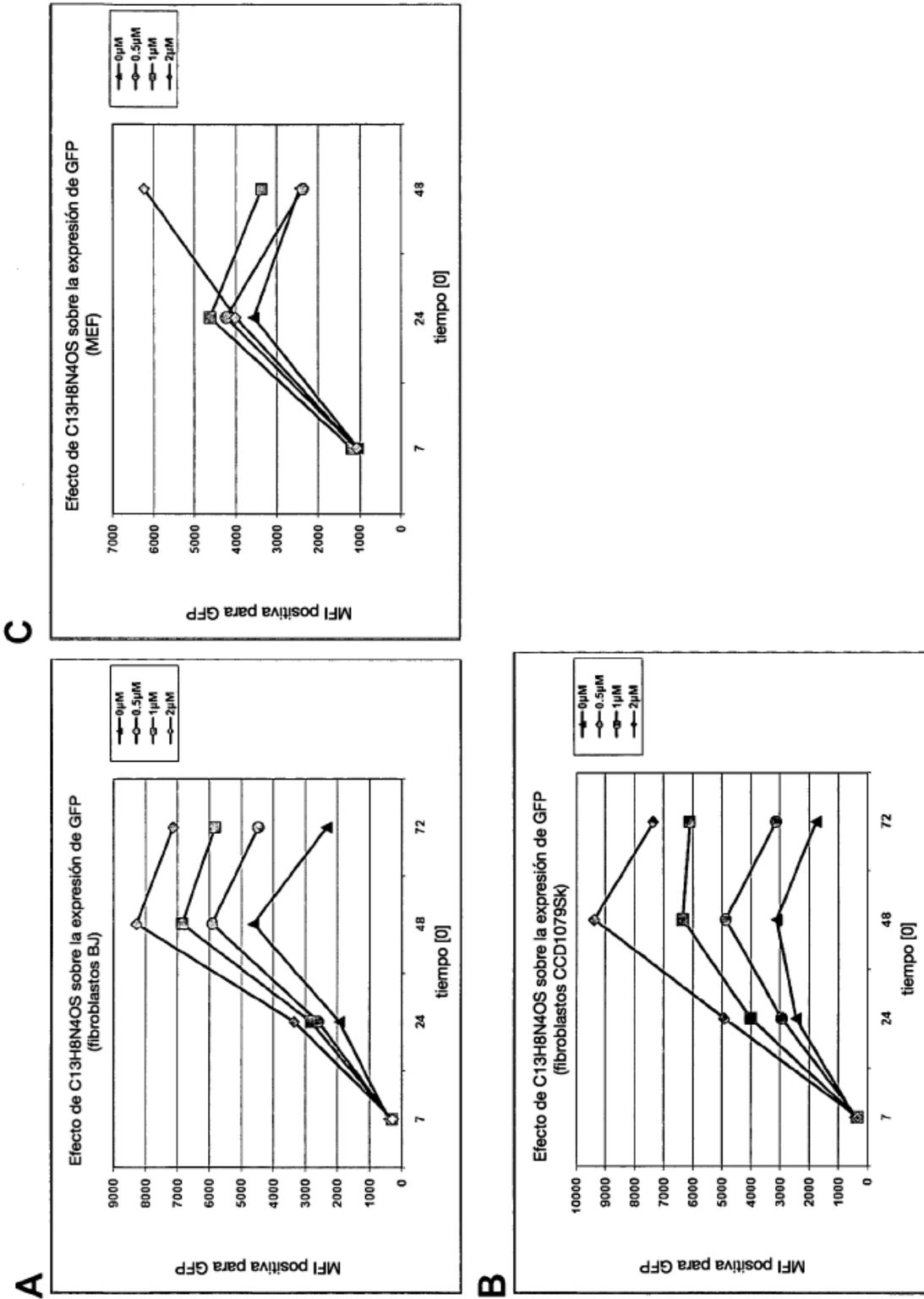


Figura 4

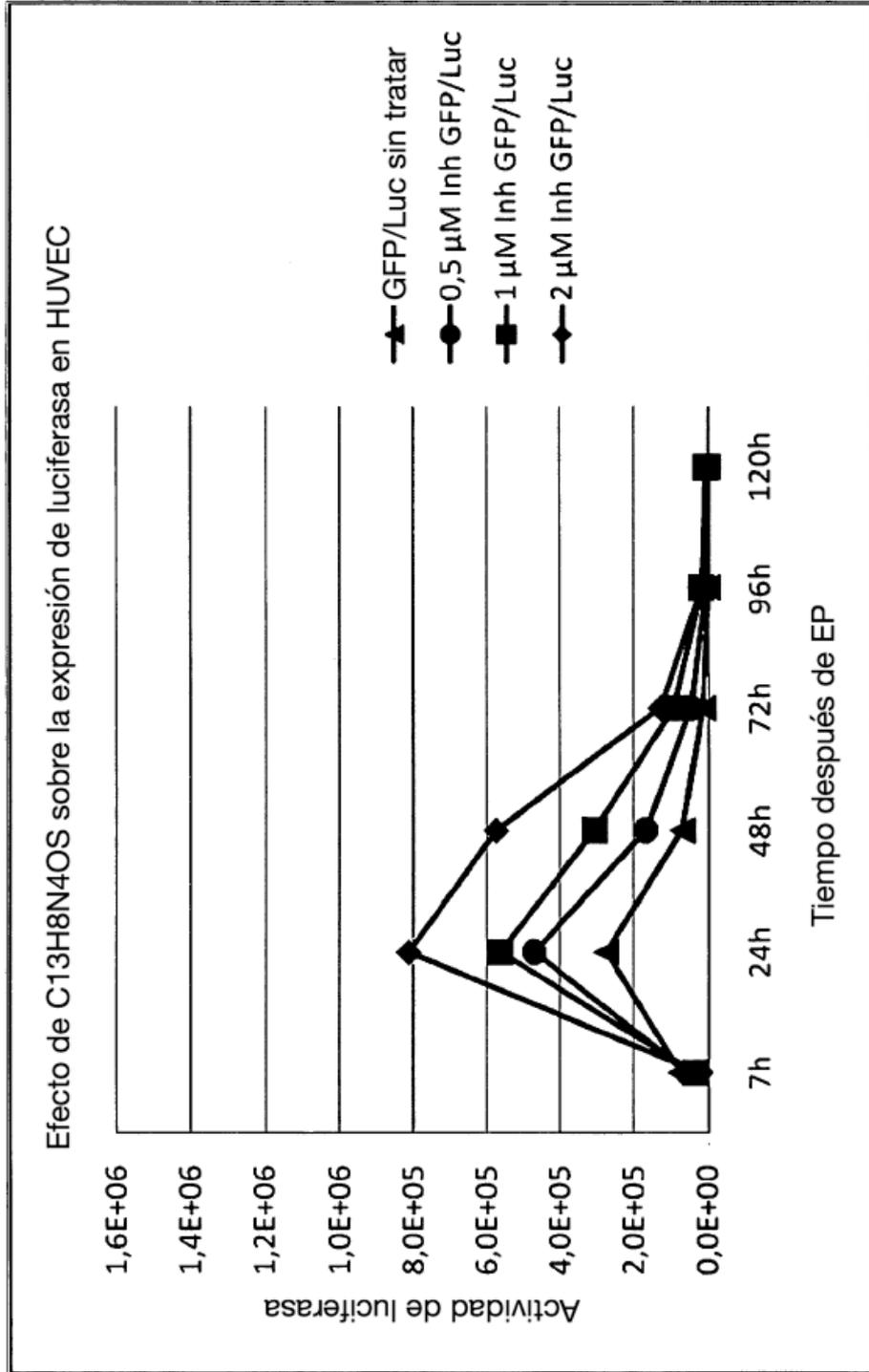


Figura 5

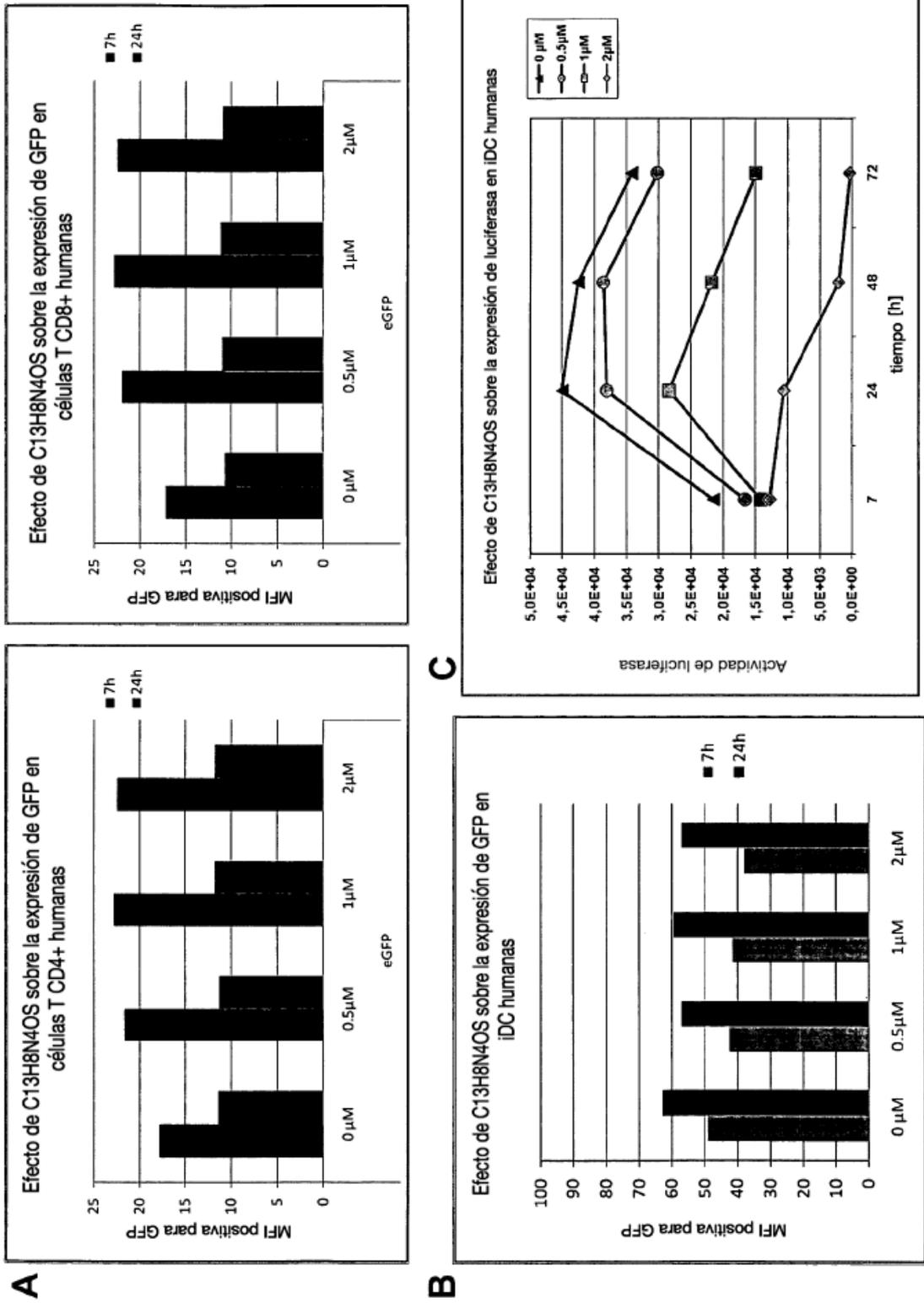


Figura 6

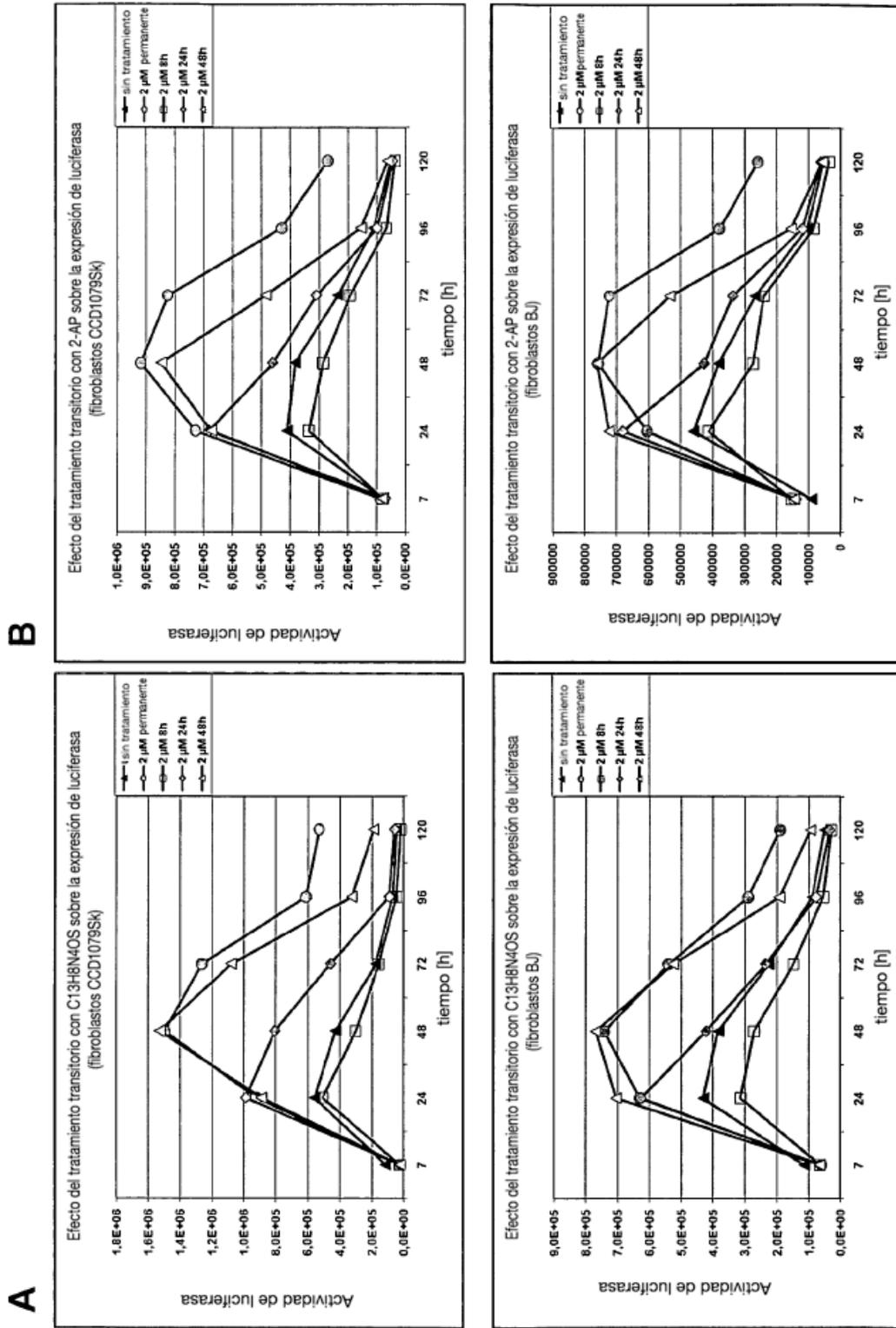


Figura 7

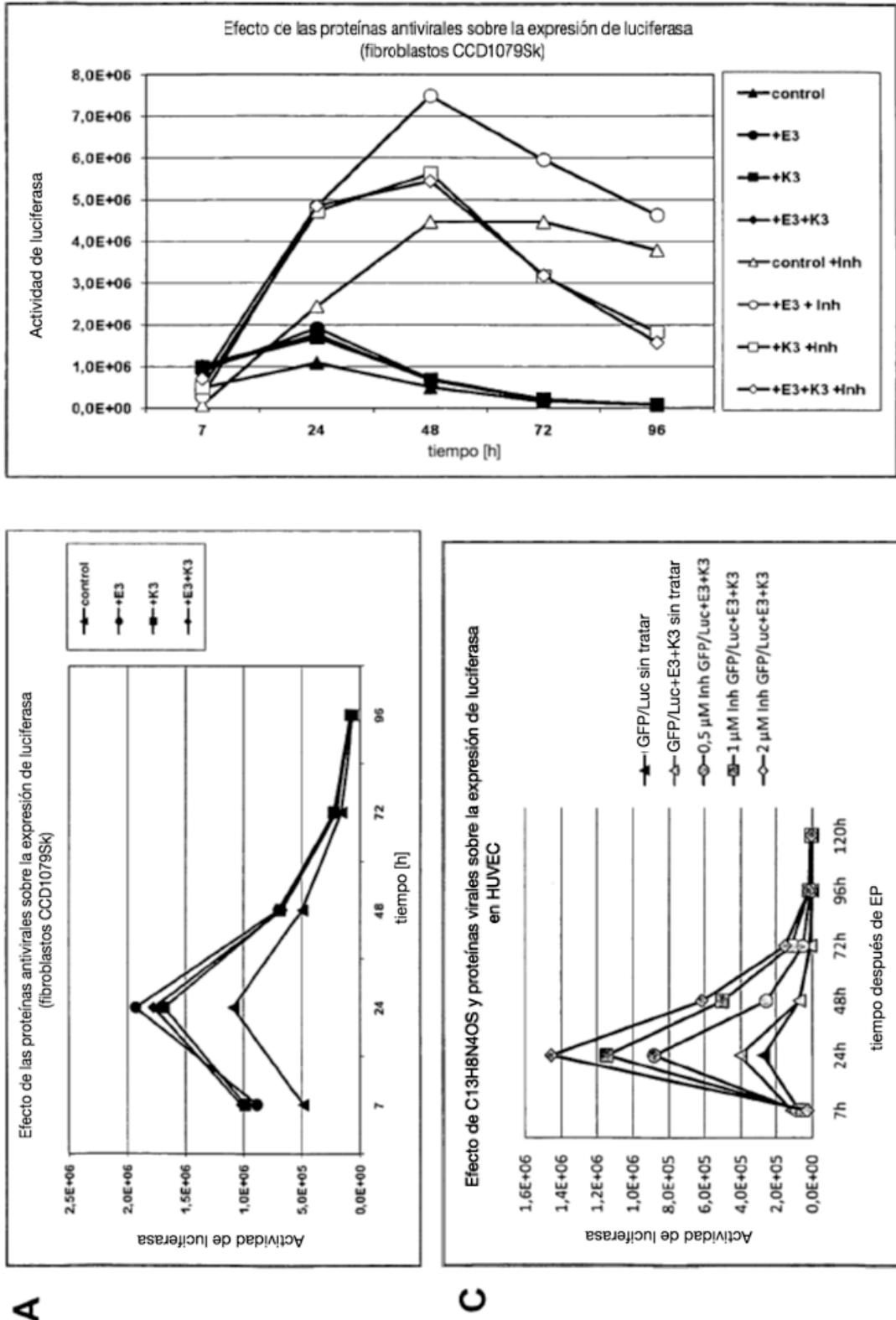


Figura 8

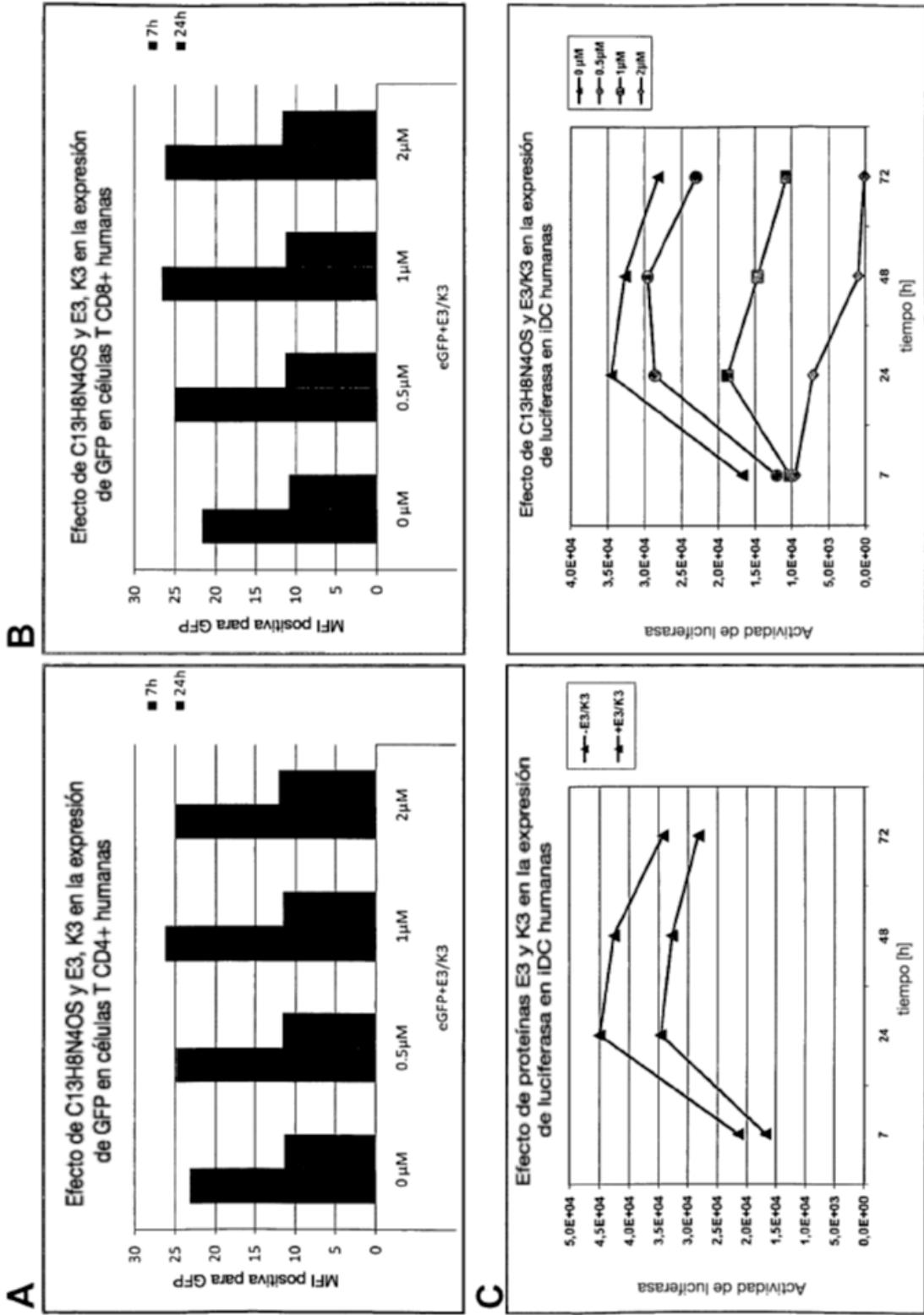


Figura 9

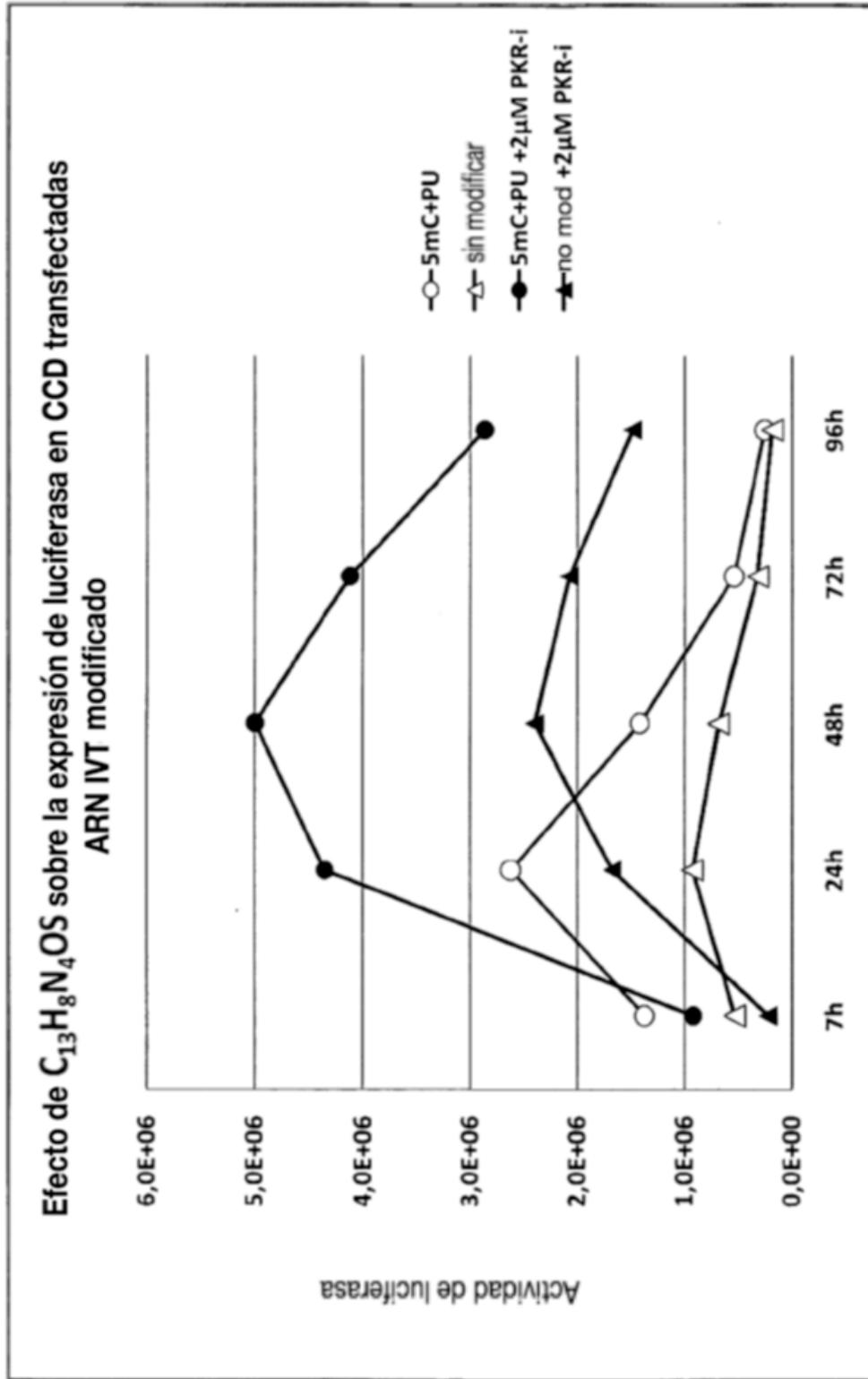
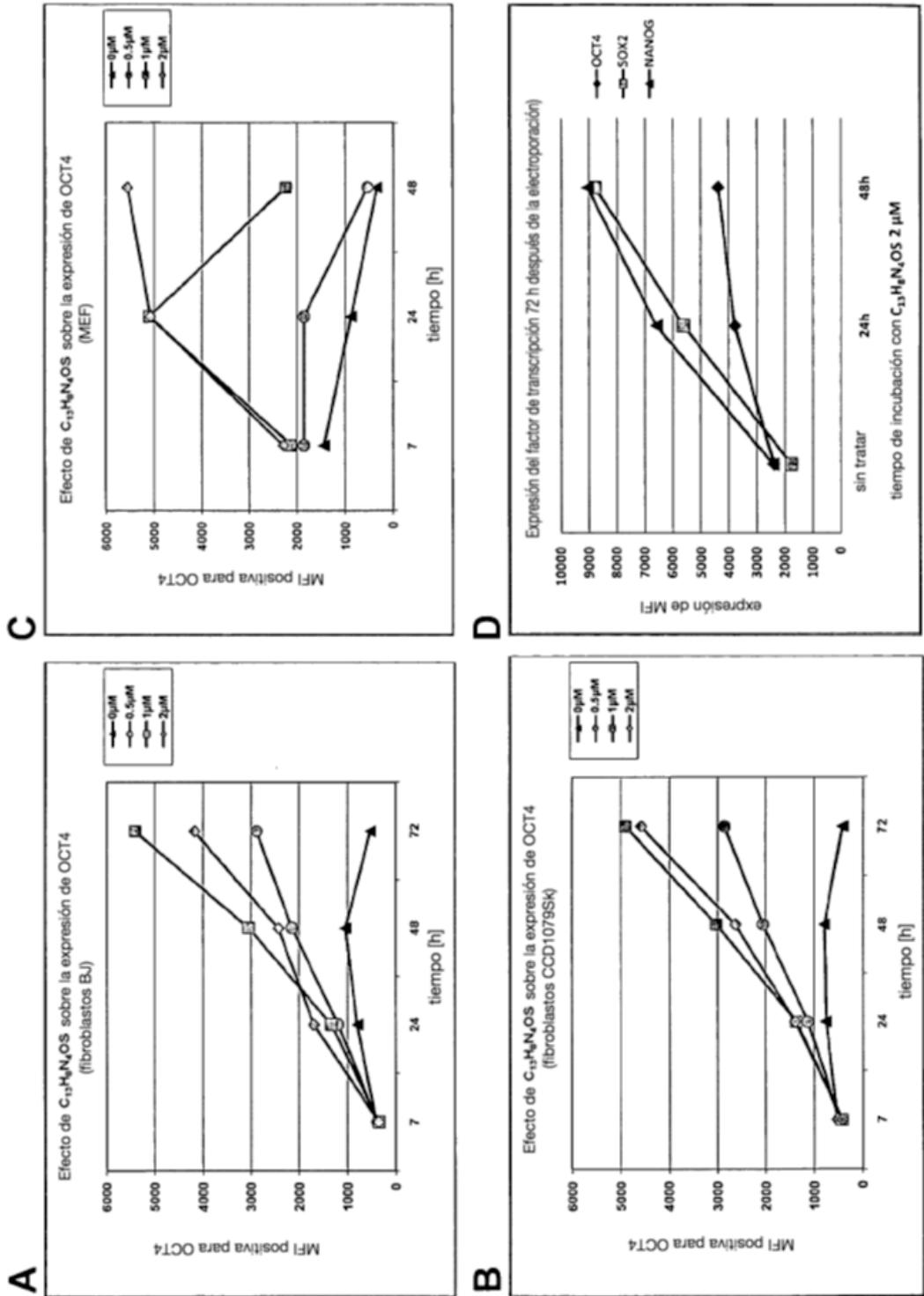


Figura 10



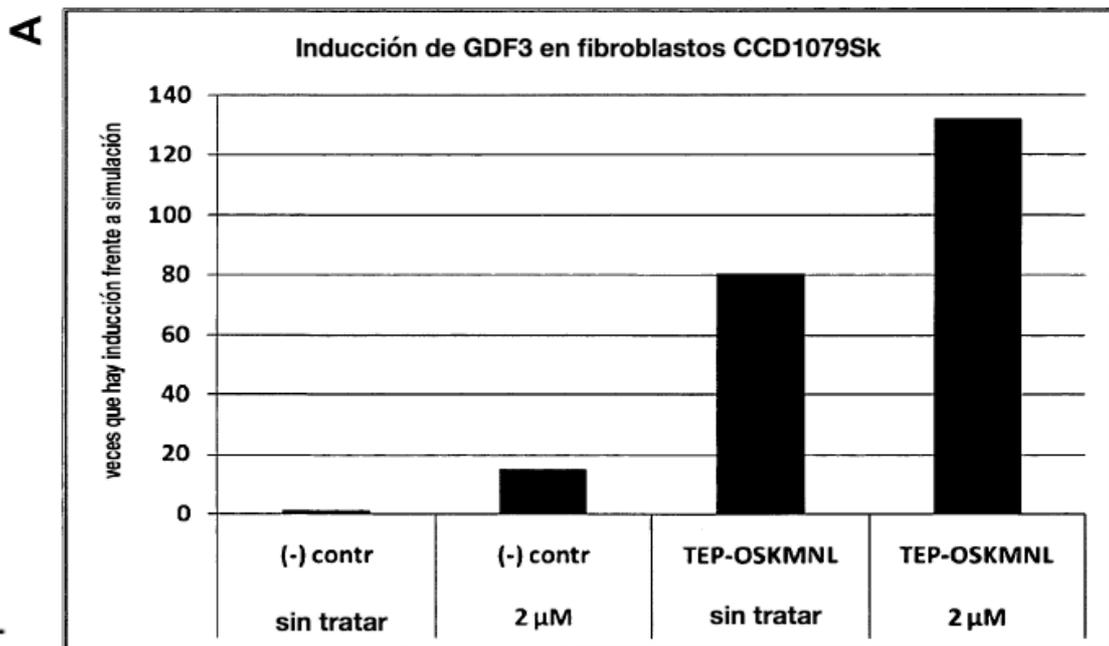
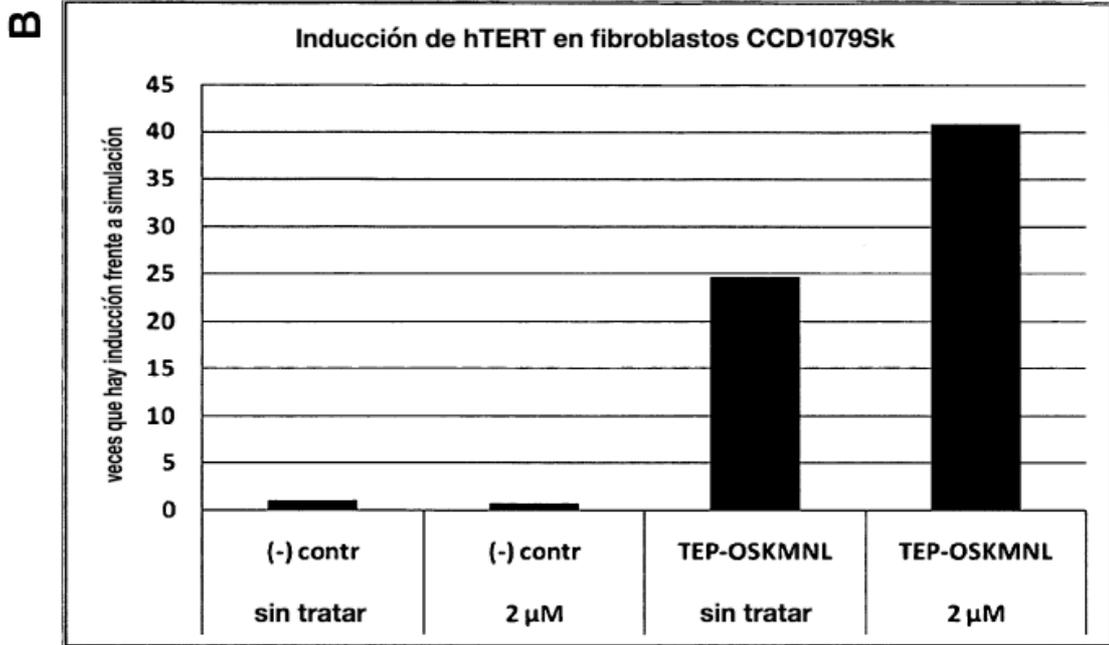


Figura 11

Figura 12

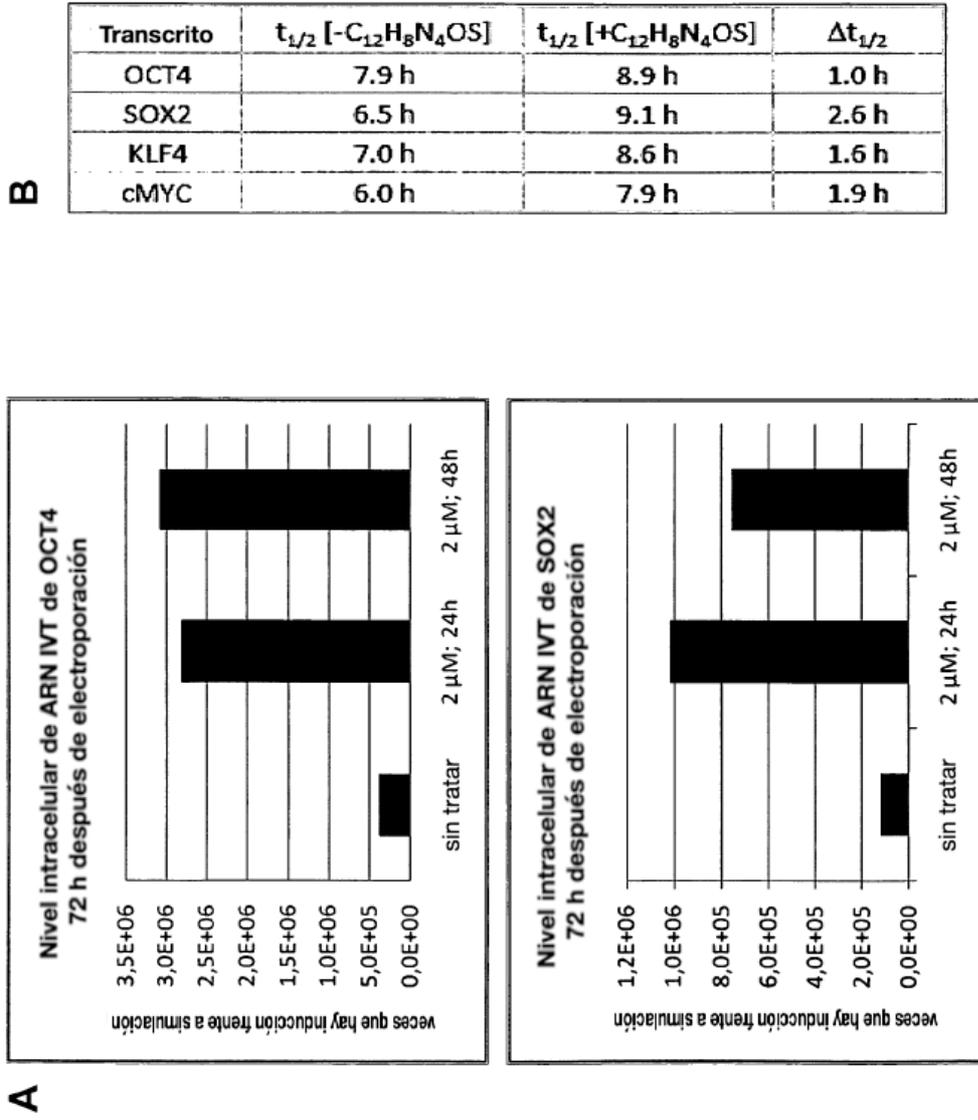


Figura 13

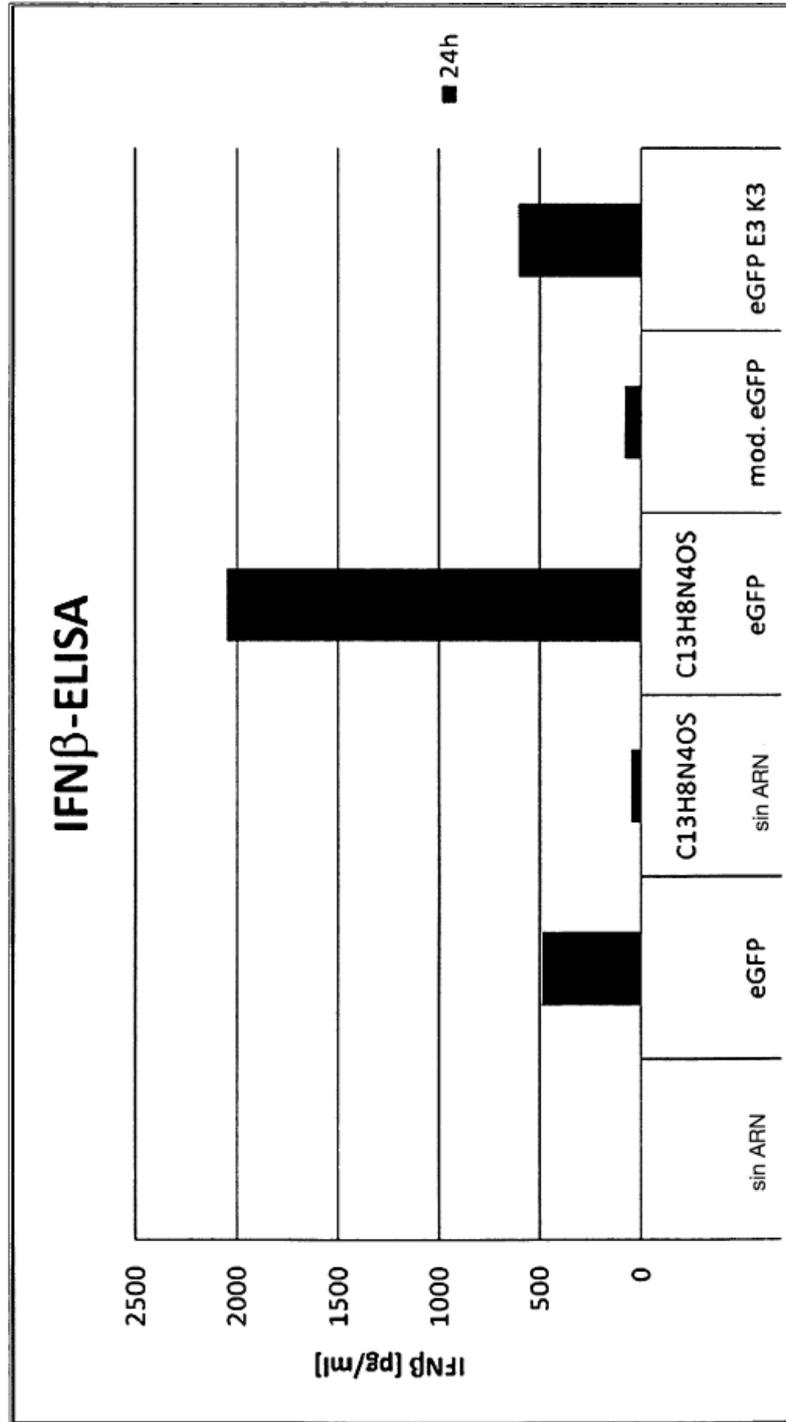


Figura 14

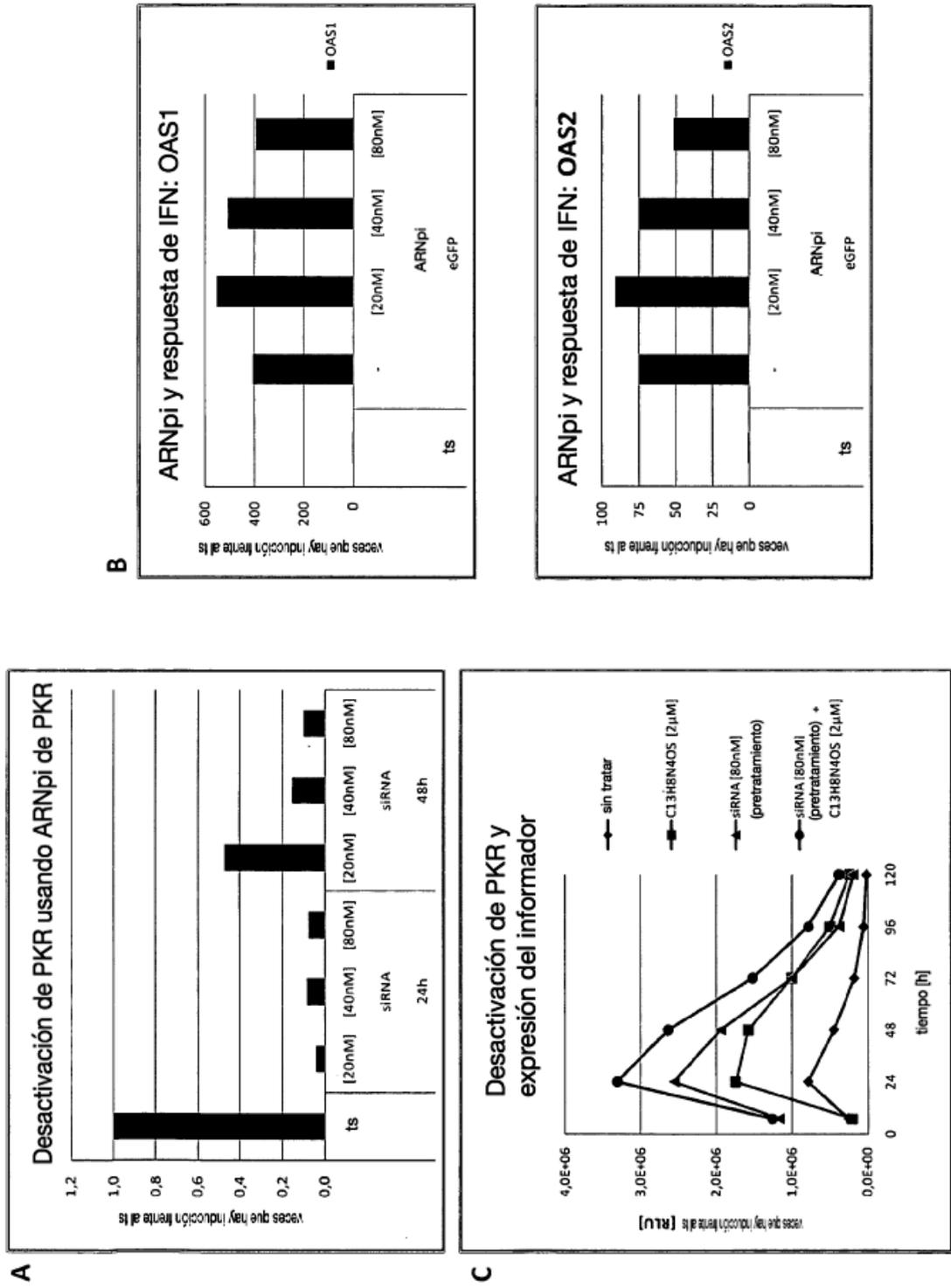


Figura 15

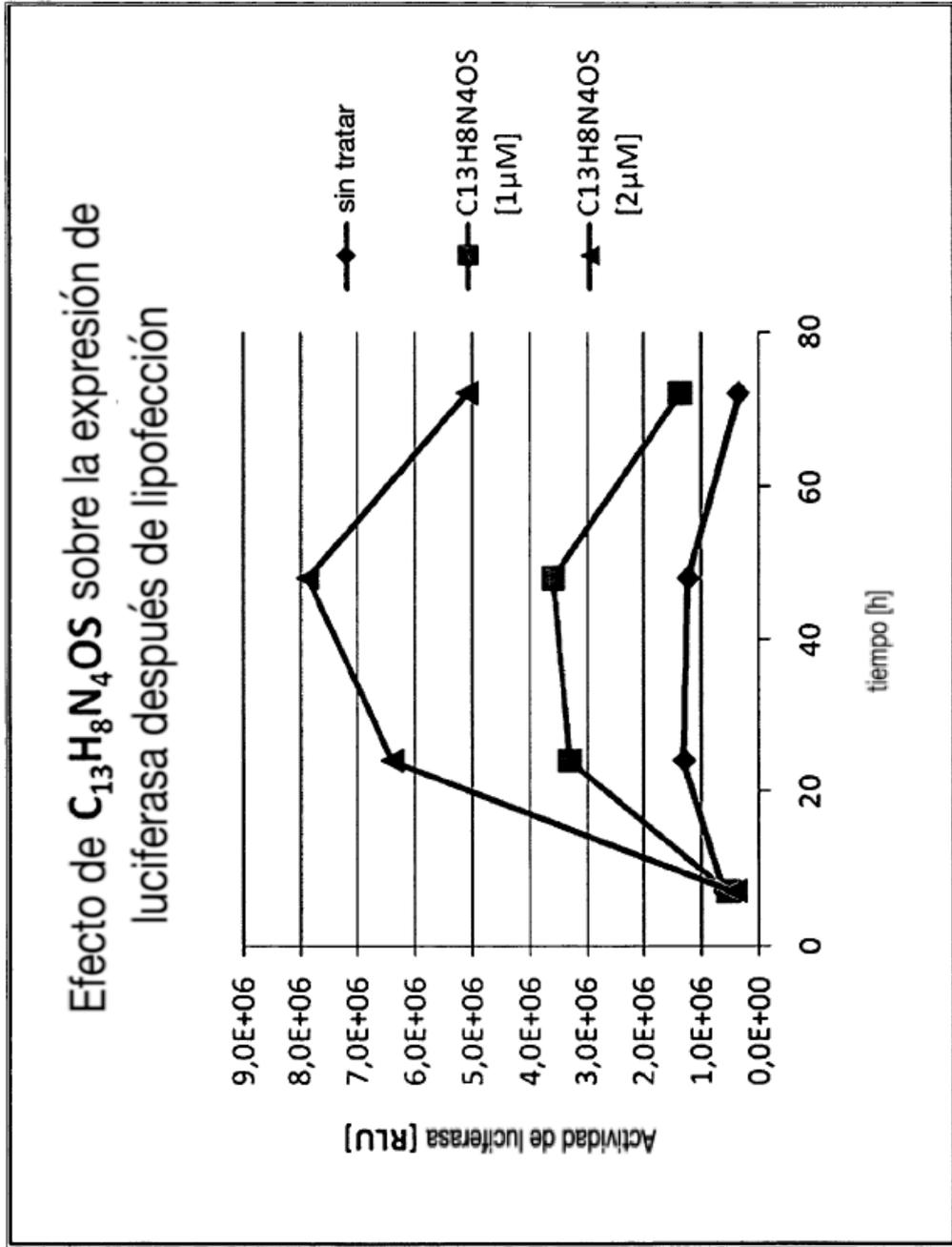


Figura 16

