

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 470**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 15/68** (2006.01)

**C12N 15/69** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/EP2013/003362**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13792854 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2917350**

54 Título: **Método para la expresión de ARN en células**

30 Prioridad:

**09.11.2012 WO PCT/EP2012/004673**  
**29.07.2013 WO PCT/EP2013/002234**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2018**

73 Titular/es:

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

**An der Goldgrube 12**  
**55131 Mainz, DE y**  
**TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER**  
**UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES**  
**GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ**  
**GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;**  
**BEISSERT, TIM;**  
**POLEGANOV, MARCO;**  
**HERZ, STEPHANIE y**  
**KOSTE, LARS**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 676 470 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 en células

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a la expresión de ARN en células y, en particular, a la mejora de la viabilidad de las células en las que se debe expresar el ARN. Las células se transfectan preferiblemente con el ARN tal como mediante transfección repetitiva. Específicamente, la presente invención proporciona métodos para expresar ARN en células que comprenden las etapas de evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular e inhibir la señalización intracelular de IFN en las células. La prevención de la participación del receptor de IFN por IFN extracelular y la inhibición de la señalización intracelular de IFN en las células permite la expresión estable de ARN en las células, en particular, si las células se transfectan repetitivamente con ARN. Alternativa o adicionalmente, evitar el enganche del receptor de IFN por IFN extracelular e inhibir la señalización intracelular de IFN aumenta la supervivencia de las células, en particular, si las células se transfectan repetitivamente con ARN. Por lo tanto, evitar la participación del receptor de IFN por IFN extracelular e inhibir la señalización intracelular de IFN en las células permite la transferencia repetitiva de ARN en las células.

15 Antecedentes de la invención

Las ventajas de usar ARN como un tipo de terapia génica reversible incluyen la expresión transitoria y un carácter no transformante. El ARN no necesita ingresar al núcleo para poder expresarse y, además, no puede integrarse en el genoma del huésped, eliminando así el riesgo de oncogénesis. Las tasas 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. Además, las cantidades de proteína alcanzadas corresponden a las de la expresión fisiológica.

20 Se ha descrito que el ARN es útil para desdiferenciar las células somáticas en células de tipo madre sin generar embriones o fetos. La desdiferenciación de células somáticas a células que tienen características de células madre, en particular la pluripotencia, puede efectuarse introduciendo factores codificadores de ARN que induzcan la diferenciación de las células somáticas en las células somáticas (también denominados factores de transcripción de reprogramación (rTF)) y el cultivo de células somáticas que permite a las células desdiferenciarse. Después de ser desdiferenciadas, las células podrían ser inducidas a volver a diferenciarse en el mismo o diferente tipo de célula somática tal como neuronal, hematopoyética, muscular, epitelial y otros tipos de células. Por lo tanto, tales células del tipo madre tienen aplicaciones médicas para el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante "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 a las células también puede inducir tanto la respuesta inmune celular como la humoral *in vivo*. En particular, se han llevado a cabo dos estrategias diferentes para la inmunoterapia con ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT), que se han probado con éxito en diversos modelos animales. O el ARN se inyecta directamente en el paciente por diferentes rutas de inmunización o las células se transfectan con IVT ARN usando métodos de transfección convencionales *in vitro* y luego las células transfectadas se administran al paciente. El ARN puede, por ejemplo, traducirse y la proteína expresada puede presentarse en las moléculas del MHC en la superficie de las células para provocar una respuesta inmune.

40 Se ha intentado estabilizar el IVT ARN mediante diversas modificaciones con el fin de lograr una expresión más alta y prolongada del IVT ARN transferido. Por ejemplo, Warren et al. 2010 (Cell Stem Cell 2010, 7: 618-630) describe el uso de ARN sintético químicamente modificado para estabilizar el ARN en un método para inducir células madre pluripotentes. Sin embargo, a pesar del éxito de las estrategias basadas en la transfección de ARN para expresar péptidos y proteínas en las células, persisten problemas relacionados con la estabilidad del ARN, la expresión sostenida del péptido o proteína codificada y la citotoxicidad del ARN. Por ejemplo, se sabe que el ARN de cadena sencilla exógeno activa mecanismos de defensa en células de mamífero. Este problema se ha abordado en la técnica anterior añadiendo, por ejemplo, B18R al medio de cultivo celular, con el objetivo de evitar el acoplamiento extracelular del receptor de IFN por las células transfectadas (Angel & Yanik, 2010, PLOS ONE, vol. 5, no. 7, e11756). Además, la reprogramación de células somáticas en células madre pluripotentes inducidas (iPS) requiere la expresión continua de factores de transcripción de reprogramación (rTF) y, por lo tanto, la administración debe realizarse repetitivamente para asegurar la expresión constante de la rTF. Sin embargo, como se demuestra en este documento, la transferencia génica repetitiva basada en ARN se acompaña con una inducción de la respuesta de IFN que dificulta la expresión continua de rTF cuando se administra como ARNm y, por lo tanto, la reprogramación exitosa basada en ARN.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un método *in vitro* para expresar ARN en una célula que comprende las etapas de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular proporcionando virus vaccinia B18R a la célula en forma de ARN que codifica B18R, y (ii) inhibir la señalización intracelular de IFN proporcionando virus vaccinia E3 a la célula en forma de ARN que codifica E3 y proporcionando virus vaccinia K3 a la célula en forma de ARN que codifica K3. La presente invención está definida por las reivindicaciones. En un aspecto, el ARN es o ha sido introducido en la célula tal como por electroporación o lipofección. En una realización, el ARN es o ha sido introducido en la célula repetitivamente. En una realización, el ARN es ARN transcrito *in vitro*.

De acuerdo con la presente enseñanza, la prevención del acoplamiento del receptor de IFN por el IFN extracelular inhibe las funciones de IFN autocrinas y/o paracrinas. Como se describe en este documento, evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular comprende proporcionar un agente de unión para IFN extracelular tal como un agente de unión viral para IFN extracelular. De acuerdo con la presente enseñanza, el agente de unión viral para IFN extracelular es un receptor de interferón viral. En una realización, el agente de unión viral para IFN extracelular es el virus vaccinia B18R. En una realización, el agente de unión viral para IFN extracelular se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el agente de unión, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en la célula junto con el ARN que debe expresarse en la célula.

Como se describe en el presente documento, si no es inhibida la señalización intracelular de IFN de acuerdo con la invención da como resultado la inhibición de la traducción y/o la degradación del ARN. En una realización, la inhibición de la señalización de IFN intracelular comprende inhibir una o más proteínas efectoras activas antivirales inducibles por IFN. En una realización, la proteína efectora activa antiviralmente inducible por IFN se selecciona del grupo que consiste en proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y RNasaL.

En una realización, la inhibición de la señalización de IFN intracelular comprende inhibir la ruta dependiente de PKR y/o la ruta dependiente de OAS.

En una realización, inhibir la ruta dependiente de PKR comprende inhibir la fosforilación de eIF2-alfa. En una realización, la inhibición de la fosforilación de eIF2-alfa comprende inhibir PKR y/o proporcionar un pseudosustrato que imite eIF2-alfa. En una realización, el pseudosustrato que imita eIF2-alfa es un pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa. En una realización, el pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa es el virus vaccinia K3. En una realización, el pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el pseudosustrato vírico, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en la célula junto con el ARN que debe expresarse en la célula.

En un aspecto, la inhibición de PKR comprende tratar la célula con al menos un inhibidor de PKR.

En una realización, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un inhibidor de PKR dirigido al sitio de unión a ATP. En una realización, el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazol-oxindol.

En un aspecto, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrololo[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un inhibidor viral de PKR. En un aspecto, el inhibidor viral de PKR es el virus vaccinia E3. En un aspecto, el inhibidor viral de PKR se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en la célula junto con el ARN que se va expresar en la célula. En una realización, la inhibición de PKR comprende silenciar la expresión del gen de PKR.

En un aspecto, inhibir la ruta dependiente de OAS comprende inhibir la activación de RNasaL. En un aspecto, la inhibición de la dependiente de la ruta de la OAS comprende la inhibición de la OAS.

En un aspecto, la inhibición de OAS comprende tratar la célula con al menos un inhibidor de OAS. En un aspecto, el inhibidor de la OAS es un inhibidor viral de la OAS. En un aspecto, el inhibidor viral de la OAS es el virus vaccinia E3. En un aspecto, el inhibidor viral de OAS se proporciona a la célula en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en la célula junto con el ARN que se va expresar en la célula.

En una realización, el ARN expresado en la célula no está modificado por pseudouridina y/o 5-metilcitosina.

En un aspecto, las etapas de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular dan como resultado una mejora de la estabilidad y/o un aumento de la expresión del ARN en la célula en comparación con la situación en la que no se evita el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y/o no es inhibida la señalización de IFN intracelular. En un aspecto, 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.

En un aspecto, las etapas de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular dan como resultado una mejora de la viabilidad celular en comparación con la situación en la que el acoplamiento del receptor de IFN extracelular no se evita y/o la señalización intracelular de IFN no es inhibida.

5 En una realización, las etapas de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular comprenden tratar la célula con (i) virus vaccinia B18R y (ii) virus vaccinia E3 o virus vaccinia K3, o ambos. En una realización, el virus vaccinia B18R, el virus vaccinia E3 y/o el virus vaccinia K3 se proporcionan a la célula en forma de ácido nucleico que codifica el virus vaccinia B18R, el virus vaccinia E3 y/o el virus vaccinia K3, ya sea en el mismo o en dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en la célula junto con el ARN que se va a expresar en la célula.  
10

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.

15 La invención también se refiere al uso de (i) medios que son adecuados para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) medios que son adecuados para inhibir la señalización intracelular de IFN, tales como los medios descritos en este documento, para tratar una célula en la que se debe expresar el ARN. Diversas realizaciones de este método y los medios útiles en él se describen anteriormente.

20 La invención también se refiere a un método para proporcionar células que tienen características de células madre que comprende las etapas de (i) proporcionar una población celular que comprende células somáticas, (ii) evitar el acoplamiento del receptor de IFN de las células somáticas por IFN extracelular proporcionando virus vaccinia B18R a las células somáticas en forma de ARN que codifica B18R, (iii) inhibición de la señalización intracelular de IFN en las células somáticas proporcionando virus vaccinia E3 a las células somáticas en forma de ARN que codifica E3 y proporcionando virus vaccinia K3 al somático células en forma de ARN que codifica K3, (iv) introducción de 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 las células somáticas, y (v) permitiendo el desarrollo de células que tienen características de células madre.  
25

En una realización, el método comprende además introducir en las células somáticas miARN que potencia la reprogramación de las células somáticas que tienen características de células madre.

30 En una realización, el uno o más factores comprenden OCT4 y SOX2. El uno o más factores pueden comprender además KLF4 y/o c-MYC y/o NANOG y/o LIN28. En una realización, el uno o más factores comprenden OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC y pueden comprender adicionalmente LIN28 y opcionalmente NANOG. En una realización, uno o más factores comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28.

35 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, donde al menos un inhibidor de la histona desacetilasa comprende preferiblemente ácido valproico, butirato sódico, tricostatina A y/o Scriptaid.

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

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

40 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.

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.

45 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.

En una realización, el ARN se introduce en las células somáticas mediante electroporación o lipofección. En una realización, el ARN se introduce en las células somáticas repetitivamente.

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

- 5 En un aspecto, evitar la participación del receptor de IFN por IFN extracelular inhibe las funciones de IFN autocrinas y/o paracrinas. En una realización, evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular comprende proporcionar un agente de unión para IFN extracelular tal como un agente de unión viral para IFN extracelular. En un aspecto, el agente de unión viral para IFN extracelular es un receptor de interferón viral. En un aspecto, el agente de unión viral para IFN extracelular es el virus vaccinia B18R. En un aspecto, el agente de unión viral para IFN extracelular se proporciona a las células somáticas en forma de un ácido nucleico que codifica el agente de unión, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en las células somáticas junto con el ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre.
- 10 En un aspecto, la señalización intracelular de IFN si no es inhibida de acuerdo con los resultados de la enseñanza en la inhibición de la traducción y/o la degradación del ARN. En un aspecto, la inhibición de la señalización intracelular de IFN comprende la inhibición de una o más proteínas efectoras activas antivirales inducibles por IFN. En un aspecto, la proteína efectora activada antiviralmente inducible por IFN se selecciona del grupo que consiste en proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y RNasaL.
- 15 En un aspecto, la inhibición de la señalización de IFN intracelular comprende inhibir la ruta dependiente de PKR y/o la ruta dependiente de OAS.
- 20 En un aspecto, inhibir la ruta dependiente de PKR comprende inhibir la fosforilación de eIF2-alfa. En un aspecto, la inhibición de la fosforilación de eIF2-alfa comprende inhibir PKR y/o proporcionar un pseudosustrato que imite eIF2-alfa. En un aspecto, el pseudosustrato que imita eIF2-alfa es un pseudosustrato viral que imita eIF2-alfa. En un aspecto, el pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa es el virus vaccinia K3. En un aspecto, el pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa se proporciona a las células somáticas en forma de un ácido nucleico que codifica el pseudosustrato vírico, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en las células somáticas junto con el ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre.
- 25 En un aspecto, la inhibición de PKR comprende tratar la célula con al menos un inhibidor de PKR. En un aspecto, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un inhibidor de PKR dirigido al sitio de unión a ATP. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un compuesto de imidazolo-oxindol. En un aspecto, el inhibidor de PKR es 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrolol[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un inhibidor viral de PKR. En una realización, el inhibidor viral de PKR es virus vaccinia E3. En un aspecto, el inhibidor viral de PKR se proporciona a las células somáticas en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en las células somáticas junto con el ARN capaz de que expresa uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre. En una realización, la inhibición de PKR comprende silenciar la expresión del gen de PKR.
- 30 En un aspecto, inhibir la ruta dependiente de OAS comprende inhibir la activación de RNasaL. En una realización, inhibir la ruta dependiente de OAS comprende inhibir OAS.
- 35 En un aspecto, la inhibición de OAS comprende tratar las células somáticas con al menos un inhibidor de OAS. En un aspecto, el inhibidor de la OEA es un inhibidor viral de la OAS. En una realización, el inhibidor viral de OAS es virus vaccinia E3. En un aspecto, el inhibidor viral de OAS se proporciona a las células somáticas en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente está o ha sido introducido en las células somáticas junto con el ARN capaz de que expresa uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre.
- 40 En una realización, el ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre no está modificado por pseudouridina y/o 5-metilcitosina.
- 45 En un aspecto, las etapas de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización intracelular de IFN dan como resultado una mejora de la estabilidad y/o una potenciación de la expresión del ARN capaz de expresar una o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre en las células somáticas en comparación con la situación en la que no se evita el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y/o la señalización intracelular de IFN no es inhibida. En un aspecto, la mejora de la expresión del ARN en las células somáticas comprende preferiblemente un aumento en el nivel de expresión y/o un aumento en la duración de la expresión del ARN en las células somáticas.
- 50 En un aspecto, los pasos de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización intracelular de IFN dan como resultado una mejora de la viabilidad celular en comparación con la situación en la que no se impide el IFN extracelular y/o la señalización intracelular de IFN no está inhibida.

En una realización, las etapas de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular comprenden tratar las células somáticas con (i) virus vaccinia B18R y (ii) virus vaccinia E3 o virus vaccinia K3, o ambos. En una realización, el virus vaccinia B18R, el virus vaccinia E3 y/o el virus vaccinia K3 se proporcionan a las células somáticas en forma de ácido nucleico que codifica el virus vaccinia B18R, el virus vaccinia E3 y/o el virus vaccinia K3, ya sea en el mismo o en dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes, donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN que preferiblemente se introduce o se ha introducido en las células somáticas junto con el ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tengan características de células madre. La presente enseñanza también se refiere a un método para proporcionar tipos celulares diferenciados que comprende los pasos de (i) proporcionar células que tienen características de células madre usando el método para proporcionar células que tienen características de células madre de acuerdo con las enseñanzas, y (ii) cultivar las células que tienen raíces características de las células en condiciones que inducen o dirigen la diferenciación parcial o completa a un tipo de célula diferenciada.

La invención también se refiere a una composición que comprende (i) un agente útil para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular, siendo dicho agente ácido nucleico que codifica el virus de vacuna B18R y (ii) un agente útil para inhibir la señalización intracelular de IFN. agente que es ácido nucleico que codifica E3 y ácido nucleico que codifica K3, en donde el ácido nucleico es ARN. Además, la invención también se refiere a un kit que comprende la composición de la invención. Diversos aspectos de la composición o el kit de la invención se describen anteriormente para los métodos de la invención. En un aspecto, la composición o kit de la invención es útil en los métodos de la invención.

En una realización, la composición o kit de la invención comprende ARN para ser introducido en una célula para expresión, por ejemplo ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de células somáticas a células que tienen características de células madre como se describió anteriormente.

En un aspecto, un agente útil para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular inhibe las funciones de IFN autocrinas y/o paracrinas. En un aspecto, un agente útil para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular comprende un agente de unión para IFN extracelular tal como un agente de unión viral para IFN extracelular. En un aspecto, el agente de unión viral para IFN extracelular es un receptor de interferón viral. En un aspecto, el agente de unión viral para IFN extracelular es el virus vaccinia B18R. En un aspecto, el agente de unión viral para IFN extracelular está presente en forma de un ácido nucleico que codifica el agente de unión, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN.

En un aspecto, un agente útil para inhibir la señalización intracelular de IFN comprende un agente que inhibe una o más proteínas efectoras activas antivirales inducibles por IFN. En un aspecto, la proteína efectora activada antiviralmente inducible por IFN se selecciona del grupo que consiste en proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y RNasaL.

En un aspecto, un agente útil para inhibir la señalización de IFN intracelular comprende un agente útil para inhibir la ruta dependiente de PKR y/o la ruta dependiente de OAS.

En un aspecto, un agente útil para inhibir la ruta dependiente de PKR comprende un agente útil para inhibir la fosforilación de eIF2-alfa. En un aspecto, un agente útil para inhibir la fosforilación de eIF2-alfa comprende un agente útil para inhibir PKR y/o un pseudosustrato que imita eIF2-alfa. En un aspecto, el pseudosustrato que imita eIF2-alfa es un pseudosustrato viral que imita eIF2-alfa. En un aspecto, el pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa es el virus vaccinia K3. En un aspecto, el pseudosustrato vírico que imita eIF2-alfa está presente en forma de un ácido nucleico que codifica el pseudosustrato vírico, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN.

En un aspecto, un agente útil para inhibir PKR comprende al menos un inhibidor de PKR.

En una realización, el inhibidor de PKR inhibe la autofosforilación de PKR inducida por ARN. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un inhibidor de PKR dirigido al sitio de unión a ATP. En un aspecto, 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-pirrolol[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina. En un aspecto, el inhibidor de PKR es un inhibidor viral de PKR.

En un aspecto, el inhibidor viral de PKR es el virus vaccinia E3. En un aspecto, el inhibidor viral de PKR está presente en forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN. En un aspecto, un agente útil para inhibir PKR comprende un agente útil para silenciar la expresión del gen PKR.

En un aspecto, un agente útil para inhibir la ruta dependiente de OAS comprende un agente útil para inhibir la activación de RNasaL. En un aspecto, un agente útil para inhibir la ruta dependiente de OAS comprende un agente útil para inhibir OAS.

En un aspecto, un agente útil para inhibir OAS comprende al menos un inhibidor de OAS. En una realización, el inhibidor de OEA es un inhibidor viral de OAS. En un aspecto, el viral.

El inhibidor de OAS es virus vaccinia E3. En un aspecto, el inhibidor viral de OAS está presente en la forma de un ácido nucleico que codifica el inhibidor, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN.

En una realización, un agente útil para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y un agente útil para inhibir la señalización intracelular de IFN comprende (i) virus vaccinia B18R y (ii) virus vaccinia E3 y virus vaccinia K3. En una realización, el virus vaccinia B18R, el virus vaccinia E3 y el virus vaccinia K3 están presentes en forma de ácido nucleico que codifica el virus vaccinia B18R, el virus vaccinia E3 y el virus vaccinia K3, en el mismo o en dos o más moléculas de ácidos nucleicos diferentes, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARN.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Mecanismo de escape viral

Los virus han desarrollado muchos mecanismos de escape que están mediados por proteínas virales o ácidos nucleicos virales. El ARN que codifica estas proteínas de escape virales se puede cotransferir fácilmente con el ARN que codifica para la rTF. La proteína E3 antagonista (virus Vaccinia) actúa sobre PKR y OAS, K3 (virus Vaccinia) actúa sobre eIF2a y B18R (virus Vaccinia) actúa sobre IFN. Mientras que E3 y K3 actúan intracelularmente, la proteína B18R codificada por IVT-ARN se secreta de la célula donde se une a los IFN tipo I extracelulares y previene la participación de los receptores de IFN.

Fig. 2: Transferencia repetitiva de IVT-ARN (reprogramación-TF)

(A) Fibroblastos CCD1079Sk fueron sometidos a electroporación como se indica en el panel lateral, ya sea con 15 µg o 5 µg de cada (IVT)-ARN transcrito *in vitro* que codifica los factores de transcripción OCT4 (O), SOX2 (S), KLF4 (K) y cMYC (M) y se cultiva en medio de células madre embrionarias humanas (ES). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. En los puntos de tiempo indicados, se eliminó el 10% de las células de los cultivos antes de la electroporación posterior, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de los genes marcadores ES humanos OCT4 (endógeno), TERT, GDF3 y DPPA4 por qRT-PCR. (B) Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación como se indica en el panel lateral con 15 µg de cada ARN IVT que codifica los factores de transcripción OSKM y se cultivaron en medio de células ES humanas. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. En los puntos de tiempo indicados, se contaron las células restantes y se calculó la tasa de supervivencia en relación con las células de partida. (C) Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación con 1 µg de ARN IVT que codifica la luciferasa de luciérnaga (Luc) y 5 µg de ARN IVT que codifica la proteína fluorescente verde (GFP). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 2 mm usando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. A 24 horas después de la electroporación, las células se sedimentaron, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de interferón (IFN)-a y -b mediante qRT-PCR. (D) Los fibroblastos CCD1079Sk fueron sometidos a electroporación con 33.4 µg IVT ARN que codifica la mezcla de reprogramación (29.5 µg rTF (OSKM NANOG (N) LIN28 (L) (1:1:1:1:1)), 1.3 µg de Antígeno SVG largeT (1gT), 1.3 µg HTLV E6 y 1.25 µg de GFP). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. A 48 horas después de la electroporación, las células se sedimentaron, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de los genes de respuesta a IFN OAS1, OAS2, MX1, IFITM1 e IRF9 se cuantificó mediante qRT-PCR. (E) Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación una vez con las cantidades indicadas de IVT ARN que codificaba los genes informadores Luc, GFP o Proteína Kinasa R (PKR) de tipo salvaje. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. Las células se sometieron a lisis 24 horas después de la electroporación y la expresión y el estado de fosforilación del factor 2a de iniciación eucariótico diana de PKR (eIF2a) se controló mediante inmunotransferencia Western usando anticuerpos específicos.

Fig. 3: Uso de E3, K3 y B18R en la transferencia génica basada en ARN

(AB) Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección al día siguiente usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg de GFP con 0.2 µg de cada B18R, E3 o K3 (como se indica). La codificación del IVT-ARN para Luc se usó para llevar las mezclas a 1.4 µg. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las células se recolectaron 48 h después de la transfección. 20% de las células se usaron para el análisis de expresión de GFP por FACS (B), mientras que el resto de las células se sedimentó, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de IFNb y OAS1 se cuantificó por qRT-PCR (A). (C) Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes cuatro días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. La mezcla de IVT-ARN estaba compuesta por 0.8 µg de GFP con 0.2 µg de cada B18R, E3 o K3 (como se indica). La codificación del IVT-ARN para Luc se usó para llevar la mezcla a 1.4 µg de ARN IVT total. Como control, se usaron 1.4 µg de IVT ARN modificado (mod.) que codificaba para Luc (0.6 µg) y GFP (0.8 µg). Estos ARN se componían de 100% de pseudouridina (psi) y 100% de 5-metilcitidina (5mC) en lugar de uridina y citidina que muestran menos características

inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad celular usando Cell Proliferation Kit II (Roche) y se normalizó a las células simuladas transfectadas.

Fig. 4: Uso de E3, K3 y B18R en la transferencia génica basada en ARN para la reprogramación

5 Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (80000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes cuatro días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían entonces de 0.8 µg de GFP no modificada o 0.8 µg de OSKMNL (1:1:1:1:1) sin modificar o modificados y con 0.2 µg de B18R, E3 y K3 no modificados o modificados. Si es necesario, se usó la codificación del IVT-ARN para Luc para sumar la mezcla a 1.4 µg de ARN IVT total. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad celular usando el Cell Proliferation Kit II (Roche) con normalización para simular células transfectadas (A) y mediante microscopía (B). Después de eso, las células se sedimentaron, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de IFNβ y OAS1 se cuantificó mediante qRT-PCR (C).

15 Fig. 5: Traducción de rTF después de lipofección repetitiva en presencia de E3, K3 y B18R

Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes tres días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.2 µg de GFP con 0.6 µg de OCT4 o SOX2 o NANOG sin modificar o modificado y 0.2 µg de cada B18R, E3 y K3 (EKB) sin modificar o modificar. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se controló la expresión intracelular de OSN mediante análisis FACS usando el kit de análisis de factores de transcripción de células madre pluripotentes humanas (BD 560589).

Fig. 6: Reprogramación de HFF usando rTF y microARN en presencia de EKB

25 Los fibroblastos HFF (System Bioscience) se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección 5 veces por semana (de lunes a viernes) durante dos semanas usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT-ARN (A). Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg de GFP no modificada o 0.8 µg de OSKMNL (1:1:1:1:1) sin modificar o modificados con 0.2 µg de cada B18R, E3 y K3 (EKB) ya sea sin modificar o modificado y 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta por miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno]. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones en los medios de células madre (medios Nutristem, Stemgent) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día 6 y el día 13, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm del marcador ES humano TERT, DPPA4, GDF3, LIN28 (endógeno) y REX1 mediante qRT-PCR (B). El crecimiento de la colonia se observó mediante microscopía (C) y para un análisis posterior, las colonias se tiñeron para el marcador de superficie ES TRA-1-60 usando el anticuerpo StainAlive TRA-1-60 (Stemgent) siguiendo las instrucciones del fabricante (D).

Fig. 7: Reprogramación de HFF usando rTF y microARN en presencia de EKB (división 1:8)

40 Los fibroblastos HFF (System Bioscience) se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección 5 veces por semana (de lunes a viernes) durante dos semanas usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT-ARN (A). Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg OSKMNL (1:1:1:1:1) sin modificar o modificados con 0.2 µg de B18R, E3 y K3 (EKB) sin modificar o modificar y 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta por miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno]. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones en los medios de células madre (medios Nutristem, Stemgent) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día 5 y el día 12, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm del marcador ES humano TERT, DPPA4, GDF3, LIN28 (endógeno) y REX1 mediante qRT-PCR (B). El crecimiento de la colonia se observó mediante microscopía y para un análisis posterior, las colonias se tiñeron para el marcador de superficie ES TRA-1-60 usando el anticuerpo StainAlive TRA-1-60 (Stemgent) (C) o para la actividad de la fosfatasa alcalina (tinción de Vector Red kit) siguiendo las instrucciones del fabricante (D).

Fig. 8: Titulación de EKB

50 Los fibroblastos de HFF (System Bioscience) se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes cuatro días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían de este modo de 0.8 µg de OSKMNL sin modificar (1:1:1:1:1) con cantidades variables de B18R, E3 y K3 no modificados, como se indica. La codificación del IVT-ARN para Luc se usó para llevar la mezcla a 1.4 µg de

ARN IVT total. De acuerdo con los experimentos de reprogramación, se añadieron 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta por miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno] a las muestras. Como control, se usaron 1.4 µg de IVT ARN modificado (mod.) que codificaba para Luc (0.6 µg) y OSKMNL (0.8 µg; 1:1:1:1:1:1). Estos ARN se componían de 100% psi y 5 mC en lugar de uridina y citidina que exhiben menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad celular usando Cell Proliferation Kit II (Roche) (A). Después de eso, las células se sedimentaron, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de IFN $\beta$  y OAS1 se cuantificó mediante qRT-PCR (B).

Fig. 9: Efecto E3 y K3 solo

Los fibroblastos CCD1079SK se sometieron a electroporación con IVT ARN que codificaba Luc (1 µg), GFP (5 µg) y 3 µg de E3 o K3 o ambos, como se indica. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 2 mm usando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. (A) 10000 células/pozo se sembraron por duplicado en placas de 96 pozos. La actividad de luciferasa se midió en los puntos de tiempo indicados después de la electroporación usando el sistema de ensayo Bright Glo Luciferase (Promega). Se dan los valores medios de los duplicados. (B) Se sembraron 300000 células/pozo en placas de 6 pozos y 24 horas después de la electroporación, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se analizó la expresión de ARNm de OAS1 e IFN- $\beta$  mediante RT-PCR y en caso de IFN- $\beta$  cuantificado utilizando el kit Quanti Tect SYBR Green PCR.

Fig. 10: La eficiencia de la expresión del replicón muestra una gran variabilidad en diferentes tipos de células

Células de riñón de hámster bebé (BHK21), células RT101 epidérmicas de ratón y fibroblastos de prepucio humano (CCD1079SK) se sometieron a lipofección con una dilución en serie de ARN de replicón que codifica GFP como se indica (ver ejemplo 9.2 para más detalles). Se muestra el porcentaje de células positivas para GFP, que depende de la cantidad de ARN del replicón.

Fig. 11: La expresión de IVT ARN que está cotransfectada con replicón ARN se inhibe en diferentes extensiones en células que son permisivas o no permisivas para replicones.

Células de riñón de hámster bebé (BHK21), células epidérmicas RT101 de ratón y fibroblastos de prepucio humano (CCD1079SK) se lipofectaron con una dilución en serie de ARN de péptido que codificaba GFP (ver ejemplo 9.3 para más detalles). Para controlar la transfección exitosa, se cotransfectó el ARN IVT que codifica la proteína fluorescente infrarroja (iRFP). Se muestra la intensidad fluorescente media (IFM) de iRFP en las diferentes muestras de células que ilustra la eficacia de la traducción en las células. En las células permisivas (BHK21 y RT101), la inhibición de la expresión del ARN IVT se correlaciona con la cantidad de ARN del replicón cotransfectado. En células no permisivas (CCD1079SK), la inhibición es independiente de la cantidad de ARN del replicón. Incluso cantidades muy bajas de ARN del replicón bloquean eficazmente la expresión del ARN IVT, lo que presumiblemente se relaciona con la activación de la proteína quinasa R (PKR) más fuerte y la respuesta al IFN en estas células.

Fig. 12: La expresión del replicón se bloquea eficientemente en células expuestas a IFN. El B18R recombinante libera este bloque

Los fibroblastos humanos se expusieron a sobrenadantes de fibroblastos humanos sometidos a electroporación y luego se sometieron a lipofección con un replicón que codifica luciferasa (para más detalles, véase el ejemplo 9.4). Para generar los sobrenadantes, las células se sometieron a electroporación sin ARN (SN EP "sin ARN"), replicón ARN (SN EP "replicón") o replicón ARN más B18R que codifica ARN IVT (EP SN "replicón ARN +B18R"). Se muestra la actividad de la luciferasa después de la lipofección.

Fig. 13: La electroporación de ARN bloquea la lipofección del replicón subsecuente

Se sometieron fibroblastos humanos a electroporación (EP) sin ARN (EP1: sin ARN), luciferasa que codifica IVT ARN (ARN de EP2: luc) o IVT ARN que codifica E3, K3 y B18R (ARN de EP3: EKB). Al día siguiente, las células se sometieron a lipofección con un replicón que codifica GFP junto con luciferasa que codifica IVT ARN o EKB que codifica IVT ARN (ver ejemplo 9.5 para más detalles). La electroporación con luciferasa que codifica el ARN IVT bloquea la expresión del replicón subsecuente. Este bloque no puede ser liberado por colipofección de EBK RNA. La electroporación de ARN que codifica EKB no inhibe la expresión del replicón.

Fig. 14: Las proteínas VacV codificadas en el IVT ARN evitan la respuesta de IFN al ARN, pero tienen una acción limitada sobre una respuesta de IFN establecida

El mismo experimento que en la figura 13. Se muestran las cantidades de transcrito de IFN- $\beta$  y OAS1 medidas por qPCR un día después de la electroporación (A, C) y un día después de la lipofección (B, D). En general, OAS1 está regulado positivamente en las muestras que bloquearon la expresión del replicón (en comparación con la figura 13).

Fig. 15: La respuesta de IFN al IVT ARN se reduce por las proteínas de VacV, pero solo la combinación de las proteínas de VacV E3L, K3L y B18R anula la respuesta de IFN.

5 Los fibroblastos humanos se cotransfectaron con IVT ARN que codifica GFP más IVT ARN que codifica las proteínas del virus Vaccinia (A) o replicón RN que codifica GFP más IVT ARN que codifica las proteínas del virus Vaccinia (B) en las combinaciones indicadas (ver tabla 2 y ejemplo 9.7 para más detalles). Se muestran las cantidades de transcrito de IFN-beta, OAS1 y OAS2 medidas por qPCR un día después de la electroporación normalizada para transcribir cantidades de células transfectadas sin proteínas VacV.

Fig. 16: La coelectroporación de las proteínas VacV aumenta el IVT ARN y la expresión del replicón en diferentes tipos de células humanas y de ratón

10 Los fibroblastos humanos (CCD1079SK), fibroblastos de ratón (3T3-L1), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y mioblastos de ratón (C2C12) se sometieron a coelectroporación con IVT ARN que codificaba proteínas VacV y con GFP que codificaba IVT ARN (A) o ARN de replicón (B) (ver tabla 2 y ejemplo 9.8 para más detalles). Se muestran los cambios en multiplicación de la fluorescencia media de GFP normalizada a la MFI de muestras sin proteínas VacV. En células humanas, el impulso de la expresión del replicón fue aproximadamente 3 veces más fuerte que en los fibroblastos de ratón. E3 tuvo mayores efectos en fibroblastos humanos que K3.

Fig. 17: La colipofección de las proteínas VacV aumenta el IVT ARN y la expresión del replicón en fibroblastos y mioblastos de ratón y humanos.

20 Los resultados de la Fig. 16 se confirmaron por lipofección (ver tabla 3 y ejemplo 9.9 para detalles con respecto a las mezclas de ARN lipofectado). Se muestran los cambios en la multiplicación de la fluorescencia media de GFP normalizada a la MFI de muestras sin proteínas VacV. Las proteínas VacV son más eficaces en fibroblastos humanos y mioblastos que en sus homólogos de ratón. E3L fue el jugador más importante en las células humanas.

Fig. 18: Las proteínas VacV aumentan la expresión en miotubos maduros de ratón, con la excepción de B18R

25 Experimento similar al de la fig. 17. Después de la diferenciación de las células C2C12 a miotubos, se coliformizaron las mismas mezclas de ARN que antes (tabla 3). Las imágenes de fluorescencia GFP se tomaron un día después de lipofecton. El brillo de las señales de GFP indica la expresión de GFP en los miotubos.

Fig. 19: una relación 1:1 (p:p) del ARN del replicón y el ARN de EBK es suficiente para lograr la máxima expresión del replicón

30 Una cantidad creciente de EBK ARN o E3 ARN se sometió a coelectroporación con una luciferasa que codifica replicón en mioblastos de ratón (C2C12) (ver ejemplo 9.11 para más detalles). Se muestran los cambios en la multiplicación de la actividad de luciferasa normalizada a muestras sin proteínas VacV. Un exceso no aumenta más la expresión.

Fig. 20: La proteína VacV E3L y K3L inhiben la autofosforilación de PKR inducida por replicón. B18R no tiene efecto

35 Los fibroblastos CCD1079SK humanos se sometieron a coelectroporación con replicón ARN que codifica GFP, junto con ARN IVT que codifica iRFP y la proteína VacV indicada. Las células simuladas de electroporación (no transformadas) y el replicón de ARN sin tapón (sin tapón) sirvieron como controles negativos (ver ejemplo 9.12 para más detalles). Se muestran la autofosforilación de PKR con un anticuerpo fosfo-PKR específico (P-PKR) y la expresión total de PKR usando un anticuerpo PKR (PKR).

Fig. 21: Las proteínas VacV permiten la replicación eficiente de replicones mutantes no citotóxicos e inhiben la citotoxicidad residual de estos vectores.

40 Los replicones de DP parental y no citotóxicos que codifican luciferasa se sometieron a electroporación en fibroblastos humanos junto con IVT NA que codifica E3, B18R y K3 (EBK) o no (ver ejemplo 9.13 para más detalles). Sembradas son expresión de luciferasa a lo largo del tiempo (A) y viabilidad de las células normalizadas para muestras no transfectadas (B).

Fig. 22: Las proteínas VacV potenciaron la expresión del replicón desnudo en el músculo de los ratones. La mejor relación *in vivo* es un exceso de 6 veces de EBK que codifica ARN IVT

45 2 µg de ARN de replicón que codifica luciferasa se coinyectaron con IVT ARN que codifica E3, K3 y B18R (EBK) en diferentes relaciones p/p tal como se indica (1 a 6 veces más EKB que el replicón ARN) en el tibialis anterior de ratones Balb/C (ver ejemplo 9.14 para más detalles). Se muestra la señal de luciferasa *in vivo*.

Fig. 23: Las proteínas VacV potenciaron la expresión del ARN IVT en el bazo de ratones con administración i.v. liposómica

Se empaquetaron 10 µg de ARN IVT que codificaba luciferasa con 30 µg de ARN GFP o 30 µg de ARN EBK en liposomas que direccionados al bazo. La expresión de luciferasa se controló durante 4 días.

Fig. 24: NS34A e ICP34.5 mejoran la expresión del replicón

5 Los fibroblastos humanos se cotransfectaron con 1.5 µg de replicón ARN que codifica una fusión luciferasa-GFP y 1 µg de ARNm que codifica inhibidores de interferón, o iRFP como control. Al día siguiente, la expresión transgénica se midió mediante FACS. (A) Porcentaje de células transfectadas determinadas por expresión de GFP. NS34A aumenta las tasas de transfección en la misma medida que EBK, mientras que ICP34.5 aumenta más potentemente las tasas de transfección. (B) Los mismos datos que en A, expresados como veces mayores tasas de transfección en comparación con la muestra sin inhibidores. (C) Cambio de traducción de GFP, expresado como intensidad media de fluorescencia (MFI). NS34A no aumenta la traducción, mientras que ICP34.4 sí lo hace.

Fig. 25: NS34A inhibe e ICP34.5 reduce la respuesta de IFN al ARNm sintético

15 Se transfectaron fibroblastos humanos con 5 µg de mezclas sintéticas de ARNm para inducir o prevenir la respuesta de IFN. Todas las mezclas contenían 2 µg de ARNm sintético que codificaba proteína fluorescente infrarroja (iRFP) y 3 µg de inhibidores de IFN (como se indica) o luciferasa como control. Al día siguiente, las células se recolectaron y se sometieron a lisis para extraer ARN para qRT-PCR. La inducción de IFNβ y OAS1/2 se normalizaron a la expresión de la línea base en células no transfectadas. (A) Inducción transcripcional de IFNβ. Las proteínas del virus vaccinia EKB inhibieron IFNβ y E3 redujeron la inducción de IFNβ como hemos observado anteriormente. NS34A también anuló la inducción de IFNβ similar a EBK, e ICP34.5 redujo la inducción de IFNβ similar a E3. (B, C) Inducción transcripcional de genes diana de IFNβ OAS 1/2. EBK bloqueó la inducción OAS 1/2, mientras que E3 solo podría evitar parcialmente la sobrerregulación OAS1/2. Similar a E3, ICP34.5 no puede prevenir la inducción OAS 1/2, pero NS34A redujo en gran medida la inducción de ambos marcadores.

Fig. 26: Lipofección mínima necesaria para la generación de Ribo-iPS

25 Se sembraron fibroblastos HFF (System Bioscience) en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección de 1 a 6 veces como se describieron en el esquema utilizando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT-ARN (A). Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg de OSKMNL sin modificar (1:1:1:1:1) con 0.2 µg de cada B18R, E3 y K3 (EKB) y 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta de miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno]. Las lipofecciones en los medios de células madre (medios Nutristem, Stemgent) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Desde el día 9 en adelante, se observó la formación de colonias y se tomaron imágenes representativas en d11 mediante microscopía (B). Para un análisis posterior, las colonias se tiñeron para el marcador de superficie ES TRA-1-60 usando el anticuerpo StainAlive TRA-1-60 (Stemgent) (C) y las células se sedimentaron después, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de la ES humana. el marcador OCT4 (endógeno), NANOG (endógeno), LIN28 (endógeno), TERT y REX1 se cuantificó mediante qRT-PCR (D). (B) Se hizo obvio que se requerían 3 transfecciones diarias para obtener algunas colonias, pero 4 transfecciones diarias fueron suficientes para la inducción robusta de la formación de colonias. Las colonias se hicieron visibles desde d9 en adelante y crecieron completamente en d11, donde se pudieron teñir positivas para TRA-1-60 (C). El análisis de los niveles de expresión de varios marcadores de pluripotencia reveló que, en consonancia con la formación de colonias, la inducción de genes marcadores ES se puede lograr con 3 o más lipofecciones. No obstante, se logró una inducción robusta de la expresión del marcador ES con 4 o más lipofecciones. Debe mencionarse que la expresión de los genes del marcador ES no fue potenciada por más de cuatro lipofecciones (D).

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe en detalle a continuación: sin embargo, las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en este documento pueden variar. La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares. El alcance de la presente invención está limitado solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos tienen los mismos significados entendidos comúnmente por una persona de habilidad normal en la técnica.

50 A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Puede entenderse que esta descripción admite y abarca realizaciones que combinan las realizaciones explícitamente descritas con cualquier cantidad de elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualesquiera permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud se pueden considerar reveladas por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, si en un aspecto el ARN comprende una cola de poli(A) que consiste en 120 nucleótidos y en otro aspecto la molécula de ARN comprende un análogo de protección 5', entonces en una realización preferida, el ARN comprende la poli(A)-cola que consta de 120 nucleótidos y el análogo de protección 5'.

Preferiblemente, los términos usados en este documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

5 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica y técnicas de ADN recombinante que se explican en la bibliografía en este campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edición, J. Sambrook et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

10 A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un miembro, entero o paso o grupo establecido de miembros, enteros o pasos pero no la exclusión de ningún otro miembro, entero o paso o grupo de miembros, enteros o pasos, aunque en algunas realizaciones dicho otro miembro, entero o paso o grupo de miembros, enteros o pasos pueden ser excluidos, es decir el tema consiste en la inclusión de un miembro, entero o paso o grupo de miembros, enteros o pasos establecidos. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referencias similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para abarcar tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o claramente contradicho por el contexto. La recitación de los rangos de valores de el presente documento está simplemente destinada a servir como un método de taquigrafía para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se debe considerar como si se recitara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o un ejemplo de lenguaje (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en el presente documento tiene la intención meramente de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como indicador de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

25 Términos tales como "evitar", "reducir" o "inhibir" se refieren a la capacidad de causar una disminución global, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o mayor, y más preferiblemente de 75% o más, en el nivel. Esto también incluye una disminución completa o esencialmente completa, es decir, una disminución a cero o esencialmente a cero.

30 Términos tales como "aumentar", "potenciar" o "prolongar" se refieren preferiblemente a un aumento, potenciación o prolongación en al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 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 relacionarse con 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 es mensurable o detectable.

35 El término "recombinante" en el contexto de la presente invención significa "hecho a través de ingeniería genética". Preferiblemente, una "entidad recombinante" tal como una proteína recombinante en el contexto de la presente invención no se produce de forma natural, y preferiblemente es el resultado de una combinación de entidades tales como secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos 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 juntas, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos.

El término "natural" tal como se usa en el presente documento se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio es natural.

45 Un ácido nucleico de acuerdo con la enseñanza es preferiblemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), más preferiblemente ARN, lo más preferiblemente ARN transcrito *in vitro* (IVT ARN). Los ácidos nucleicos incluyen según el ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas recombinantemente y químicamente sintetizadas. De acuerdo con las enseñanzas, un ácido nucleico puede estar presente como una molécula de cadena sencilla o de cadena doble y lineal o covalentemente circularmente cerrada. Un ácido nucleico puede, según la enseñanza, ser aislado. El término "ácido nucleico aislado" significa, de acuerdo con las enseñanzas, que el ácido nucleico (i) se amplificó *in vitro*, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se produjo recombinantemente por clonación, (iii) se purificó, por ejemplo, mediante escisión y separación mediante electroforesis en gel, o (iv) se sintetizó, por ejemplo, mediante síntesis química. Se puede emplear un nucleico para la introducción en, es decir, transfección de, células, en particular, en forma de ARN que se puede preparar mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. El ARN puede además modificarse antes de la aplicación mediante secuencias estabilizadoras, protección y poliadenilación.

Como un ácido nucleico, en particular se puede usar ARN, para la expresión de más de un péptido o proteína, ya sea de un tipo de ácido nucleico en donde los diferentes péptidos o proteínas están presentes en diferentes moléculas de ácido nucleico o un tipo de ácido nucleico en donde péptidos o proteínas están presentes en la misma molécula de ácido nucleico.

5 En el contexto de la presente enseñanza, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende restos de ribonucleótidos y que preferiblemente está total o sustancialmente compuesta de residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo  $\beta$ -D-ribofuranosilo. El término "ARN" comprende ARN de cadena doble, ARN de cadena sencilla, ARN aislado tal como ARN parcial o completamente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético y ARN generado recombinantemente tal como ARN modificado que difiere del ARN natural por adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al(los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo a 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 se pueden denominar análogos o análogos del ARN natural. En una realización de la enseñanza, el ARN no se modifica químicamente. En una realización de la enseñanza, el ARN solo comprende nucleótidos estándar, tales como nucleótidos naturales.

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 codifica un péptido o proteína. Típicamente, un ARNm comprende un 5'-UTR, una región de codificación de proteína y un 3'-UTR. El ARNm solo posee una semivida limitada en las células *in vitro*. En el contexto de la presente enseñanza, el ARNm puede generarse por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. La metodología de transcripción *in vitro* es conocida por la persona experta. Por ejemplo, existe una variedad de kits de transcripción *in vitro* disponibles comercialmente.

En una realización de la presente enseñanza, el ARN, en particular el ARN que se va a expresar en una célula, es ARN autorreplicante, tal como ARN autorreplicante de cadena sencilla. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN de cadena sencilla de sentido positivo. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN vírico o ARN derivado de ARN viral. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN genómico alfaviral o se deriva de ARN genómico alfaviral. En una realización, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En una realización, el virus es virus Semliki forest. En una realización, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes que en una realización, si el ARN es ARN viral, pueden reemplazar parcial o completamente secuencias virales tales como secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En una realización, el ARN autorreplicante se introduce en una célula en forma de ARN transcrito *in vitro*.

De acuerdo con las enseñanzas, la estabilidad y la eficacia de traducción del ARN pueden modificarse según se requiera. Por ejemplo, el ARN puede estabilizarse y su traducción aumentarse mediante una o más modificaciones que tengan un efecto estabilizador y/o aumenten la eficacia de traducción del ARN. Tales modificaciones se describen, por ejemplo, en PCT/EP2006/009448. Para aumentar la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, puede modificarse dentro de la región codificante, es decir, la secuencia que codifica el péptido o proteína expresado, preferiblemente sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresado, para aumentar el contenido de GC para aumentar la estabilidad del ARNm y para realizar una optimización del codón y, por lo tanto, mejorar la traducción en las células.

El término "modificación" en el contexto del ARN utilizado en la presente enseñanza incluye cualquier modificación de un ARN que no está presente de forma natural en dicho ARN.

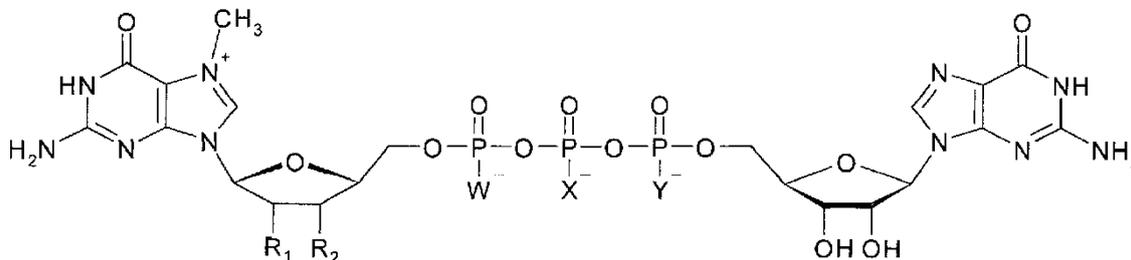
En una realización de la enseñanza, el ARN utilizado de acuerdo con las enseñanzas no tiene 5'-trifosfatos desprotegidos. La eliminación de tales 5'-trifosfatos desprotegidos se puede lograr tratando el ARN con una fosfatasa.

45 El ARN de acuerdo con las enseñanzas 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 las enseñanzas, 5-metilcitidina se sustituye parcial o completamente, preferiblemente completamente, por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una realización, en el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza, la pseudouridina se sustituye parcial o completamente, preferiblemente por completo, por uridina.

50 En una realización, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con un análogo de 5' o protección en 5'. El término "protección en 5'" se refiere a una estructura de protección que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de un inusual enlace 5' a 5' trifosfato. En una realización, esta guanosina está metilada en la posición 7. El término "protección en 5' convencional" se refiere a una protección en 5' de ARN natural, preferiblemente a la protección en 5' 7-metilguanosina (m<sup>7</sup>G). En el contexto de la presente enseñanza, el término "protección en 5'" incluye un análogo de protección en 5' que se asemeja a la

estructura de protección de ARN y se modifica para que tenga la capacidad de estabilizar ARN y/o mejorar la traducción de ARN si está unido a él, preferiblemente *in vivo* y/o en una célula.

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



- 5 en donde  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente hidroxilo o metoxi y  $W^-$ ,  $X^-$  y  $Y^-$  son independientemente oxígeno, azufre, selenio o  $BH_3$ . En una realización preferida,  $R_1$  y  $R_2$  son hidroxilo y  $W^-$ ,  $X^-$  e  $Y^-$  son oxígeno. En una realización preferida adicional, uno de  $R_1$  y  $R_2$ , preferiblemente  $R_1$  es hidroxilo y el otro es metoxi y  $W^-$ ,  $X^-$  e  $Y^-$  son oxígeno. En una realización preferida adicional,  $R_1$  y  $R_2$  son hidroxilo y uno de  $W^-$ ,  $X^-$  e  $Y^-$ , preferiblemente  $X^-$  es azufre, selenio o  $BH_3$ , preferiblemente azufre, mientras que el otro es oxígeno. En una realización preferida adicional, uno de  $R_1$  y  $R_2$ , preferiblemente  $R_2$  es hidroxilo y el otro es metoxi y uno de  $W^-$ ,  $X^-$  e  $Y^-$ , preferiblemente  $X^-$  es azufre, selenio o  $BH_3$ , 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'.

- 15 Esas estructuras de protección en las que al menos uno de  $W^-$ ,  $X^-$  e  $Y^-$  es azufre, es decir que tienen un resto fosforotioato, existen en diferentes formas diastereoisoméricas, todas las cuales están abarcadas en este documento. Además, la presente enseñanza abarca todos los tautómeros y estereoisómeros de la fórmula anterior.

Por ejemplo, la estructura de protección que tiene la estructura anterior en la que  $R_1$  es metoxi,  $R_2$  es hidroxilo,  $X^-$  es azufre y  $W^-$  e  $Y^-$  son oxígeno en dos formas diastereoisoméricas ( $R_p$  y  $S_p$ ). Estos pueden resolverse mediante HPLC de fase inversa y se denominan D1 y D2 de acuerdo con su orden de elución de la columna HPLC de fase inversa. De acuerdo con las enseñanzas, el isómero D1 de  $m_2^{7,2'-O}GppspG$  es particularmente preferido.

- 20 Proporcionar un ARN con un análogo de 5' o protección en 5' puede lograrse mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN en presencia de dicho análogo de 5' o protección en 5', en donde dicha protección en 5' es incorporada transcripcionalmente en la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, mediante transcripción *in vitro*, y la protección en 5' puede unirse al ARN postranscripcionalmente usando enzimas de terminación, por ejemplo, capsulando enzimas del virus vaccinia.
- 25 El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente enseñanza puede ser una extensión o truncamiento de la cola de poli(A) natural o una alteración de las regiones 5' o 3' no traducidas (UTR) tales como la introducción de una UTR que no está relacionada con la región codificante 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, beta-globina, preferiblemente beta-globina, más preferiblemente beta-globina humana.

- 35 El ARN que tiene una secuencia de poli-A desenmascarada se traduce de manera más eficaz 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 desenmascarada" significa que la secuencia poli-A en el extremo 3' de una molécula de ARN termina con una A de la secuencia de poli-A y no está seguida por nucleótidos distintos de A situados en el extremo 3', es decir, cadena abajo, de la secuencia poli-A. Además, una secuencia larga de poli-A de aproximadamente 120 pares de bases da como resultado una estabilidad óptima del transcrito y una eficacia de traducción del ARN.

- 40 Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, puede modificarse para estar 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 poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Para aumentar aún más la estabilidad y/o expresión del ARN utilizado de acuerdo con las enseñanzas, la secuencia poli-A puede desenmascararse.

- 45 Además, la incorporación de una región 3' no traducida (UTR) en la región 3' no traducida de una molécula de ARN puede dar como resultado una mejora en la eficacia de la traducción. Se puede lograr 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 donde se introducen. En una realización particular, la región 3' no traducida se deriva del gen de la  $\beta$ -globina humana.

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

El término "estabilidad" de ARN se refiere a la "vida media" de ARN. La "vida media" 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 enseñanza, la semivida de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La vida media 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 enseñanza se desea disminuir la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN, es posible modificar el ARN para interferir con la función de los elementos tal como se describió anteriormente, aumentando la estabilidad y/o eficiencia de traducción del ARN.

El término "expresión" se usa de acuerdo con las enseñanzas 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.

De acuerdo con la enseñanza, los términos tales como "expresión de ARN", "ARN que expresa" o "expresión de 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.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en donde el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. Según la presente enseñanza, el término "transcripción" comprende "transcripción *in vitro*", en donde el término "transcripción *in vitro*" se refiere a un proceso en donde ARN, en particular ARNm, se sintetiza *in vitro* en un sistema libre de células, preferiblemente usando extractos de células apropiados. Preferiblemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcripciones. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de transcripción y están de acuerdo con la presente enseñanza abarcada por el término "vector". De acuerdo con la presente enseñanza, el ARN utilizado en la presente enseñanza preferiblemente es ARN transcrito *in vitro* (IVT ARN) y se puede obtener mediante transcripción *in vitro* de un molde de ADN apropiado. 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 las enseñanzas está controlada por un promotor T7 o SP6. Se puede obtener una plantilla de ADN para la transcripción *in vitro* clonando un ácido nucleico, en particular ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para la transcripción *in vitro*. El ADNc puede obtenerse por transcripción inversa de ARN.

La plantilla de vector que contiene ADNc puede comprender vectores que llevan 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 solo una especie de inserto de ADNc que después de la transcripción solo resulta en una población de una especie de ARN capaz de expresar solo un péptido o proteína. Por lo tanto, es posible producir ARN capaz de expresar un único péptido o proteína solo o para producir composiciones de diferentes ARN tales como bibliotecas de ARN y ARN de células enteras 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 los ARN en las células.

El término "traducción" de acuerdo con las enseñanzas se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

Las secuencias de control de expresión o las secuencias reguladoras, que según las enseñanzas pueden estar unidas funcionalmente a un ácido nucleico, pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificante y una secuencia reguladora se unen juntas "funcionalmente" si están unidas covalentemente, 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 codificante debe traducirse en una proteína funcional, con un 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 causar un cambio en el marco de lectura en la secuencia codificante o incapacidad de la secuencia codificante para traducirse 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 a 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 enseñanza, las secuencias reguladoras pueden controlarse. 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 5' y 3'- no traducidas, que están involucradas en el inicio de la transcripción o traducción, tales como TATA-box, secuencia de protección, 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 potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba.

Términos como "mejora de 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 expresado por el mismo número de moléculas de ARN, donde la expresión de las moléculas de ARN se realiza en las mismas condiciones excepto la condición que da como resultado la expresión mejorada o aumentada del ARN, como evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular e inhibir el IFN intracelular señalización en una célula frente a la no prevención del acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y no inhibición de la señalización intracelular de IFN 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 en las mismas condiciones (excepto la condición que da como resultado expresión aumentada o mejorada) y la cantidad de péptido o proteína se mide por el mismo medio. La cantidad de péptido o proteína se puede dar en moles, o en peso, por ejemplo, en gramos, o en masa o por actividad polipeptídica, por ejemplo si el péptido o la proteína es una enzima, puede administrarse como actividad catalítica o si el péptido o proteína es un anticuerpo o antígeno o un receptor, se puede dar como afinidad de unión. En una realización, 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 y dentro de un período determinado 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 punto de tiempo particular puede ser mayor que el 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 promedio de péptido o proteína expresada por el número dado de moléculas de ARN dentro de un período de tiempo dado puede ser mayor que la cantidad promedio de péptido o proteína expresada por el mismo número de moléculas de ARN. Los últimos casos se denominan en el presente documento "nivel de expresión más alto" o "nivel de expresión aumentado" y se refieren a valores máximos más altos de expresión y/o valores promedio de expresión más altos. Alternativa o adicionalmente, términos tales como "potenciación de la expresión", "expresión mejorada" o "expresión aumentada" significan en el contexto de la presente enseñanza también que el tiempo en donde las moléculas de ARN expresan péptido o proteína puede ser más largo que el tiempo en donde el péptido o la proteína se expresa mediante las mismas moléculas de ARN. Por lo tanto, en una realización, términos tales como "mejora de 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 ya que el período de tiempo en donde el ARN está presente y se expresa establemente es más largo que el período de tiempo en donde está presente y se expresa el mismo número de moléculas de ARN. Estos casos se denominan aquí también como "duración aumentada de la expresión". Preferiblemente, tales períodos de tiempo más largos se refieren a 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 de ARN o después de la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN en una célula.

El nivel de expresión y/o duración de la expresión de 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 codificado por el ARN, por ejemplo, usando un procedimiento de ELISA, un procedimiento de inmunohistoquímica, un procedimiento de análisis de imagen cuantitativo, una inmunoprecipitación Western, espectrometría de masas, un procedimiento de inmunohistoquímica cuantitativa o un ensayo enzimático.

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 codifica opcionalmente péptidos y/o proteínas diferentes, ARN de células enteras, una biblioteca de ARN, o una porción de los mismos, por ejemplo una biblioteca de moléculas de ARN expresadas en un tipo celular particular, como células indiferenciadas, en particular células madre tales como células madre embrionarias, o una fracción de la biblioteca de moléculas de ARN tales como ARN con expresión enriquecida en células indiferenciadas, en particular células madre como las células madre embrionarias en relación con las células diferenciadas. Por lo tanto, de acuerdo con las enseñanzas, el término "ARN" puede incluir una mezcla de

moléculas de ARN, ARN de células enteras o una fracción de las mismas, que se puede obtener mediante un proceso que comprende el aislamiento de ARN de células y/o medios recombinantes, en particular por transcripción *in vitro*.

5 Preferiblemente, de acuerdo con las enseñanzas, el ARN a expresar en una célula se introduce en dicha célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. El ARN se puede introducir en una célula antes, después y/o simultáneamente con la prevención del acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y/o la inhibición de la señalización intracelular de IFN en la célula. Preferiblemente, se evita el acoplamiento del receptor de IFN por el IFN extracelular y se inhibe la señalización intracelular de IFN siempre que se desee la expresión del ARN en la célula. En una realización de los métodos según las enseñanzas, el ARN que se va a introducir en una célula se obtiene por transcripción *in vitro* de un molde de ADN apropiado.

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

15 De acuerdo con la enseñanza, los términos "ARN capaz de expresar" y "ARN que codifica" se usan indistintamente en este documento 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.

20 De acuerdo con las enseñanzas, el ARN se puede introducir en las células *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. Las células en las que se ha introducido el ARN *in vitro* pueden, preferiblemente después de la expresión del ARN *in vitro* por los métodos de la enseñanza, administrarse a un paciente.

25 Los términos tales como "transferir", "introducir" o "transfectar" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos exógenos o heterólogos, en particular ARN, en una célula. Dichos términos también incluyen la introducción repetitiva de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula, donde la media repetitiva es más de una vez, por ejemplo dos veces o más, tres veces o más, cuatro veces o más, cinco veces o más, seis veces o más, siete veces o más, ocho veces o más. El intervalo de tiempo entre dichas introducciones repetitivas de ácidos nucleicos puede ser de 3 días o menos, 2 días o menos, 24 horas o menos o incluso menos. Aquellos aspectos de la presente enseñanza relacionados con la provisión de células que tienen características de células madre pueden implicar la introducción repetitiva en células de ácidos nucleicos, en particular ARN, durante al menos 3 días consecutivos, al menos 4 días consecutivos, al menos 5 días consecutivos, o al menos 6 días consecutivos. Los ácidos nucleicos pueden comprender ARN capaz de expresar uno o más factores que permiten la reprogramación de células somáticas a células que tienen características de células madre. Sin embargo, los ácidos nucleicos también pueden comprender ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifica una o más proteínas o péptidos que previenen el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular, tales como proteínas o péptidos descritos aquí, y/o ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifica una o más proteínas o péptidos que inhiben la señalización de IFN intracelular, tales como proteínas o péptidos descritos en este documento. Por lo tanto, los ácidos nucleicos también pueden comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifica B18R y uno o ambos de E3 y K3. Además, los ácidos nucleicos pueden comprender miARN que potencia la reprogramación de células somáticas a células que tienen características de células madre. Preferiblemente, la introducción repetitiva en células de ácidos nucleicos, en particular ARN, no se realiza durante más de 10 días consecutivos, 8 días consecutivos o 6 días consecutivos. Preferiblemente, la introducción repetitiva en células de ácidos nucleicos, en particular ARN, se realiza durante 3, 4, 5 o 6 días consecutivos. Preferiblemente, los ácidos nucleicos, en particular el ARN, se introducen en las células una, dos o tres veces al día, preferiblemente una vez al día.

45 De acuerdo con la presente enseñanza, una célula puede ser una célula aislada o puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo. De acuerdo con la presente enseñanza, puede usarse cualquier técnica que sea adecuada para introducir ARN en las células. Preferiblemente, el ARN se introduce en las células mediante técnicas estándar. Dichas 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 estabilizantes 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 periodos de tiempo prolongados.

55 Las células se pueden transfectar, por ejemplo, usando kits de transfección basados en liposomas comercialmente disponibles tales como Lipofectamine™ (Invitrogen) y se pueden transfectar con cualquier vehículo con el que se pueda

asociar ARN, por ejemplo, formando complejos con el ARN o formando vesículas en las que el ARN está encerrado o encapsulado, dando como resultado una mayor estabilidad del ARN en comparación con el ARN desnudo. Los vehículos útiles de acuerdo con las enseñanzas 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. Cualquier lípido catiónico puede usarse de acuerdo con la enseñanza.

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 en la célula diana o un ligando para un receptor en la célula diana se puede incorporar en el vehículo de ácido nucleico o se puede unir a la misma. En el caso de que el ácido nucleico sea administrado por liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana superficial que está asociada con endocitosis pueden incorporarse en la formulación de liposomas para permitir la dirección y/o captación. Dichas proteínas abarcan proteínas de la cápside de fragmentos de las mismas que son específicas para un tipo de célula particular, anticuerpos contra proteínas que se internalizan, proteínas que se dirigen a una ubicación intracelular, etc.

La electroporación o electropermeabilización se refiere a un aumento significativo en la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana de plasma celular causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Generalmente se usa en biología molecular como una forma de introducir alguna sustancia en una célula. La electroporación generalmente se realiza con sometido a electroporaciones, dispositivos que crean un campo electromagnético en la solución de células. La suspensión celular se pipetea en una cubeta de vidrio o plástico que tiene dos electrodos de aluminio en sus lados. Para la electroporación, típicamente se usa una suspensión celular de alrededor de 50 microlitros. Antes de la electroporación, se mezcla con el ácido nucleico a transfectar. La mezcla se pipetea en la cubeta, el voltaje y la capacitancia se ajustan y la cubeta se inserta en el sometido a electroporación. Preferiblemente, el medio líquido se agrega 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 antibióticos.

De acuerdo con las enseñanzas, se prefiere que un ácido nucleico tal como ARN que codifica un péptido o proteína una vez absorbido o introducido en una célula cuya célula puede estar presente *in vitro* o en un sujeto, dé como resultado la expresión de dicho péptido o proteína. La célula puede expresar el péptido o la proteína codificada intracelularmente (por ejemplo, en el citoplasma y/o en el núcleo), puede secretar el péptido o proteína codificada, o puede expresarlo en la superficie. Si un péptido o proteína (por ejemplo, B18R) es para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular, se prefiere la secreción del péptido o proteína. Si un péptido o proteína (por ejemplo, E3, K3) inhibe la señalización intracelular de IFN, se prefiere la expresión intracelular del péptido o proteína.

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 dé como resultado 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 como se describe aquí 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 lograr dicha expresión a largo plazo, el ARN se introduce preferiblemente de forma periódica (es decir, repetitivamente) 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 período 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 prolongado de tiempo. Preferiblemente, los periodos 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 periodos 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, las células pueden recuperarse de la electroporación anterior. En esta realización, los periodos de tiempo que transcurren entre las introducciones repetidas del ARN son al menos 72 horas, preferiblemente al menos 96 horas, más preferiblemente al menos 120 horas. En cualquier caso, las condiciones deben seleccionarse de modo que los factores se expresen en las células en cantidades y durante períodos de tiempo que respalden el proceso de reprogramación.

Preferiblemente, se usa al menos 1 µg, preferiblemente al menos 1.25 µg, más preferiblemente al menos 1.5 µg y preferiblemente de hasta 20 µg, más preferiblemente hasta 15 µg, más preferiblemente hasta 10 µg, más preferiblemente

de hasta 5 µg, preferiblemente 1 a 10 µg, incluso más preferiblemente de 1 a 5 µg, o de 1 a 2.5 µg de ARN para cada péptido, proteína o factor por electroporación.

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

Términos tales como "mejora de la viabilidad celular", "viabilidad celular mejorada" o "viabilidad aumentada de las células" significan en el contexto de la presente enseñanza que la cantidad de células vivas o viables bajo ciertas condiciones es mayor que la cantidad de células viables o células bajo otras condiciones, en donde el cultivo se realiza bajo las mismas condiciones excepto la condición que resulta en la viabilidad celular mejorada o aumentada, tales como impedir el acoplamiento del receptor de IFN por extracelular IFN y la inhibición de la señalización de IFN intracelular en una célula frente a no impedir el acoplamiento de estar del receptor de IFN por IFN extracelular y no inhibe la señalización intracelular de IFN en una célula. En este contexto, "las mismas condiciones" se refieren a una situación en la que se usan las mismas células, las células se cultivan en las mismas condiciones (excepto la condición que da como resultado una mayor viabilidad celular) y la viabilidad celular se mide por el mismo medio. Las "mismas condiciones" también abarcan la introducción o la introducción repetitiva de ARN en las células.

El ARN de cadena doble (ARNds) producido durante la infección viral activa varias respuestas antivirales celulares. El ARN de cadena doble (ARNds) no solo constituye el material genético de los virus ARNds, sino que también se produce en las células infectadas por virus de ARN de cadena positiva y algunos virus de ADN. Entre las respuestas antivirales celulares mejor caracterizadas está el cierre de la síntesis de proteínas mediada por la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) y los sistemas de oligoadenilato sintetasa (OAS)/RNasa L. El receptor 3 tipo Toll (TLR3) y las ARN helicasas RIG-I y MDA5 sirven como sensores para ARNds; cf. Fig. 1. Tras la activación, inducen cascadas de señalización que culminan en la expresión de los interferones tipo I (IFN). La inducción de los IFN de tipo I se controla predominantemente al nivel de transcripción por una familia de factores de transcripción denominados factores reguladores del interferón (IRF).

Los interferones son citoquinas importantes que se caracterizan por actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Los interferones son proteínas que alteran y regulan la transcripción de genes dentro de una célula mediante la unión a receptores de interferón en la superficie de la célula regulada, evitando así la replicación viral dentro de las células. De acuerdo con las enseñanzas, la expresión "acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular" se refiere a la unión de IFN, en particular IFN tipo I, a receptores de interferón en la superficie celular.

Los interferones se pueden agrupar en dos tipos. IFN-gamma es el único interferón tipo II; todos los demás son interferones tipo I. Los interferones tipo I y tipo II difieren en la estructura de los genes (los genes del interferón tipo II tienen tres exones; los tipo I, uno), la ubicación cromosómica (en los humanos, el tipo II está ubicado en el cromosoma 12; los genes del interferón tipo I están conectados y en el cromosoma -9), y los tipos de tejidos donde se producen (los interferones de tipo I se sintetizan de forma ubicua, tipo II mediante linfocitos). Los interferones de tipo I inhiben competitivamente a los demás que se unen a los receptores celulares, mientras que el interferón de tipo II tiene un receptor distinto. Según las enseñanzas, el término "interferón" o "IFN" se refiere preferentemente a interferones de tipo I, en particular IFN-alfa e IFN-beta.

Los IFN-alfa humanos están codificados por una familia de múltiples genes que consiste en aproximadamente 20 genes; cada gen codifica un único subtipo del IFN-alfa humano. Los polipéptidos IFN-alfa humanos se producen mediante varias líneas celulares humanas y células de leucocitos humanos después de la exposición a virus o ARN de cadena doble, o en líneas celulares de leucocitos transformadas (por ejemplo, líneas linfoblastoides). Los IFN-alfa interactúan con los receptores de la superficie celular e inducen la expresión, principalmente a nivel transcripcional, de un conjunto amplio pero específico de genes celulares.

El IFN-beta humano es un polipéptido regulador con un peso molecular de 22 kDa que consiste en 166 residuos de aminoácidos. Puede ser producido por la mayoría de las células del cuerpo, en particular fibroblastos, en respuesta a una infección viral o exposición a otros productos biológicos. Se une a un receptor de superficie celular multimérico, y la unión productiva del receptor da como resultado una cascada de eventos intracelulares que conducen a la expresión de genes inducibles por IFN-beta que, a su vez, producen efectos que pueden clasificarse como antivirales, antiproliferativos o inmunomoduladores.

Los IFN inducen la expresión de una plétora de genes antivirales, que pueden interferir con el ciclo de replicación viral. De acuerdo con las enseñanzas, el término "proteína efectora antiviralmente activa" se refiere a un grupo de proteínas codificadas por genes estimulados con IFN (ISG) cuya transcripción está señalizada por IFN de tipo I. Estas proteínas se

dirigen a distintos componentes virales y distintas etapas del ciclo de vida viral, con el objetivo de eliminar los virus invasores. Las "proteínas efectoras activas antivirales" están implicadas en diferentes vías efectoras que bloquean individualmente la transcripción viral, degradan el ARN viral, inhiben la traducción y modifican la función de la proteína para controlar todas las etapas de la replicación viral. Dichas proteínas incluyen 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), en particular 2',5'-oligoadenilato sintetasa 1 (OAS1), ARN dependiente de la proteína quinasa R (PKR) y RNasaL. Tanto PKR como OAS se activan directamente por ARNs. Por lo tanto, ARNs induce la expresión de estas proteínas efectoras antivirales activas y también es necesario para su activación.

La PKR se expresa constitutivamente, y es inducida por IFN de tipo I. Tras la unión a ARNs, la PKR se dimeriza y se somete a autofosforilación para obtener una actividad catalítica completa. Una vez activado, la PKR fosforila el factor de iniciación de la traducción eucariota eIF2-alfa. En su estado fosforilado, eIF2-alfa forma un complejo estable con el factor de intercambio de nucleótidos eIF2-beta, que luego ya no se recicla para el inicio de la traducción de proteínas mediante el intercambio GDP/GTP. En consecuencia, la activación de PKR conduce a un bloqueo global de la síntesis de proteínas en la célula infectada, lo que puede obstaculizar la producción de progenie de virus. De esta forma, la PKR en combinación con eIF2-alfa constituye una vía antiviral (dependiente de la ruta de PKR).

El término "proteína-quinasa dependiente de ARN" (proteína-quinasa activada por ARN; PKR) se refiere a una proteína de unión a ARN que es una proteína-quinasa de serina/treonina inducida por interferón identificada inicialmente en respuesta viral en virtud de su unión a y activación por la extensa estructura secundaria formada por secuencias de ARN viral. La PKR humana es de 68 kDa con un dominio de unión a ARNs N-terminal de aproximadamente 20 kDa y un dominio de proteína quinasa C-terminal. La PKR *in vitro* se activa al unirse a moléculas de ARN con una extensa estructura secundaria dúplex. *In vivo*, se cree que la enzima se activa mediante ARN virales de doble cadena (ARNds) o intermedios replicativos virales que comprenden ARNs. La unión a ARN de cadena doble para 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 en toda la secuencia de PKR. La autofosforilación estimulada por ARN aumenta la sensibilidad celular a los estímulos apoptóticos y proinflamatorios a través de varias rutas putativas, incluida la fosforilación de su sustrato 2 conocido como factor de iniciación eucariótico (eIF2-alfa).

El término "PKR" se refiere preferiblemente a PKR humana, y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 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 según la SEQ ID NO: 13. El término "PKR" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia a menudo no está clara. La secuenciación completa de genes a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada. Un experto en la técnica entenderá que la secuencia de ADNc de PKR como se describió anteriormente sería equivalente al ARNm de PKR, y puede usarse para la generación de ácidos nucleicos inhibidores contra PKR.

La actividad de proteína quinasa que incluye la autofosforilación de proteína quinasa se puede medir mediante una variedad de técnicas conocidas por la persona experta. Un método implica la separación de ATP sin reaccionar del sustrato de quinasa fosforilada por ejemplo precipitación de fosfoproteína sobre tiras de celulosa mediante ácido tricloroacético seguido de lavado o adsorción de fosfoproteína sobre tiras de fosfocelulosa. Por ejemplo, la desfosfo-PKR puede activarse mediante incubación con poli[I:C] y puede permitirse que la autofosforilación se desarrolle en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. Se puede probar la capacidad de los compuestos para bloquear esta autofosforilación de PKR inducida por ARN. 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 inmunotransferencia Western con anticuerpos específicos para PKR de fosfo o PKR de longitud completa. Otro método implica la detección y cuantificación del sustrato fosforilado de PKR, por ejemplo fosfo-eIF2-alfa en relación con la cantidad total de eIF2-alfa en el mismo lisado de células mediante inmunotransferencia Western con anticuerpos específicos para fosfo-eIF2-alfa o eIF2-alfa de longitud completa.

El término "eIF2-alfa" se refiere preferiblemente a eIF2-alfa humana y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 16 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "eIF2-alfa" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 15. El término "eIF2-alfa" incluye cualquier variante, en particular mutantes, empalmes variantes, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.

La OAS se expresa en bajos niveles constitutivos y es inducido por IFN de tipo I. La proteína se acumula en el citoplasma de la célula como monómeros inactivos. Tras la activación por ARNs vírico, la enzima oligomeriza (en el caso de OAS

1) forma un tetrámero que puede condensar moléculas de ATP mediante enlaces inusuales 2',5'-fosfodiéster y sintetiza 2', 5'-oligoadenilatos que, a su vez, active la RNasaL inactiva constitutivamente expresada. La unión de 2',5'-oligoadenilatos a RNasaL desencadena la dimerización de los monómeros enzimáticos, a través de sus dominios de tipo quinasa, que a continuación escinden los ARN celulares (y virales). Como resultado, se inhibe la síntesis de proteínas virales, y los genomas de ARN vírico se destruyen directamente. De esta forma, la OAS en combinación con RNasaL constituye una vía de desintegración de ARN antiviral (ruta antiviral OAS-RNasaL o dependiente de la ruta de la OAS).

Los cuatro genes de la OAS identificados en humanos, denominados OAS1, OAS2, OAS3 y OASL (similar a la OEA), se han mapeado en el cromosoma 12 (cromosoma 5 en ratones). OAS1 tiene dos formas empalmadas en humanos (ocho en ratones) que producen dos, 40 y 46 kDa, proteínas que difieren en sus extremos C por 18 y 54 aminoácidos, respectivamente. OAS2 produce cuatro transcritos alternativamente empalmados que codifican dos proteínas de 69 y 71 kDa. OAS3 codifica una sola transcripción que produce una proteína de 100 kDa. Estas proteínas tienen una considerable homología entre sí, con OAS1, OAS2 y OAS3 que codifican uno, dos y tres, respectivamente, dominios "OAS". La proteína más distintiva de la OAS es OASL. Dos transcripciones de OASL se expresan produciendo dos proteínas de 30 y 59 kDa. El OASL de mayor peso molecular contiene una señal putativa de localización nucleolar en su extremo C que, probablemente, explica su distribución única (de las otras isoformas OAS) en la célula. La proteína OASL también tiene un dominio de la OEA, sin embargo, las mutaciones en los residuos clave desactivan la función catalítica de esta proteína humana. Curiosamente, uno de los dos homólogos de ratón conserva su actividad 2',5'-polimerasa. Además del dominio de la OAS, OASL tiene un único C-terminal de 160 aminoácidos que codifica un dominio de tipo ubiquitina que es homólogo a ISG15. Por consiguiente, OASL se conjuga (ISGilación) a proteínas celulares después del tratamiento de células con IFN de tipo I. Parece haber expresión diferencial e inducción de cada forma de las proteínas OAS humanas. Además, cada una de las tres proteínas OAS funcionales tiene funciones biológicas únicas. Un motivo tripéptido (CFK) dentro de los dominios de la OAS de OAS1 y OAS2 media la oligomerización, por lo que la forma catalíticamente activa de estas enzimas es un tetrámero y un dímero, para OAS1 y OAS2, respectivamente. Este motivo tripéptido no se conserva en los dominios OAS3 y OASL de la OEA y, por lo tanto, estas proteínas funcionan como monómeros. La polimerización de los monómeros de la OEA influye en su factibilidad de procesamiento, con OAS3 sintetizando moléculas dimericas de oligómeros ligados en 2',5', mientras que OAS1 y OAS2 son capaces de sintetizar oligómeros triméricos y tetrámeros. Los oligómeros dimericos 2',5' ligados no son activadores eficaces de RNasaL y, en consecuencia, se cree que regulan procesos alternativos, con un informe que sugiere un papel en la expresión génica mediante la regulación de la topoisomerasa I de ADN. Según la enseñanza, el término "2',5'-oligoadenilato sintetasa" u "OAS" preferiblemente se refiere a moléculas que son activadores de RNasaL y preferiblemente a OAS1 y OAS2.

El término "OAS" se refiere preferiblemente a OAS humana, y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 18 o 20 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "OAS" 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: 17 o 19. El término "OAS" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.

La RNasaL dependiente de 2',5' se expresa como una proteína de 80 kDa con dos dominios de tipo quinasa (PUG y STYKc) y ocho repeticiones de anquirina. La enzima se expresa constitutivamente como un monómero inactivo. La autoinhibición de la enzima se alivia con la unión de 2',5'-oligómeros (generados por las proteínas de OAS) a las repeticiones de anquirina y posterior homodimerización. La enzima dimerica activa luego degrada ARNss.

El término "RNasaL" se refiere preferiblemente a RNasaL humana, y, en particular, a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 22 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "RNasaL" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 21. El término "RNasaL" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.

Según las enseñanzas, el término "evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular" se refiere a una inhibición, es decir, bloqueo o reducción de la interacción de IFN, en particular IFN de tipo I, con sus receptores específicos inhibiendo o reduciendo la función de IFN. El acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular se puede evitar, por ejemplo, mediante la provisión de un agente de unión para IFN extracelular. Aquellos aspectos de la presente invención que implican una o más proteínas o péptidos para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular, tales como proteínas o péptidos descritos en el presente documento, por ejemplo, uno o más agentes de unión para IFN extracelular, pueden implicar la provisión de ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifica estas una o más proteínas o péptidos para las células, por ejemplo, introduciendo los ácidos nucleicos en las células.

Por ejemplo, la proteína B18R es un receptor de interferón tipo I codificado por virus vaccinia con especificidad para interferones de tipo I de ratón, ser humano, conejo, rata y vaca que tiene una potente actividad neutralizante. La proteína

- B18R codificada por el gen B18R de la cepa de virus vaccinia Western Reserve. La glucoproteína de 60-65 kD está relacionada con los receptores de interleuquina-1 y es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, a diferencia de otros receptores de IFN de tipo I, que pertenecen a la familia de receptores de citoquinas de clase II. La proteína B18R tiene una alta afinidad (KD, 174 pM) para IFN alfa humano. Entre los modificadores de la respuesta del huésped viral, la proteína B18R es única porque existe como una proteína extracelular soluble, así como una proteína de la superficie celular, lo que permite el bloqueo de las funciones de IFN tanto autocrinas como paracrinas. Se ha demostrado que la proteína B18R inhibe la potencia antiviral de IFN-alfa1, IFN-alfa2, IFN-alfa-8/1/8 e IFN-omega en células humanas. La proteína B18R soluble es altamente potente para neutralizar los interferones de tipo I, que incluyen IFN-alfa, beta, delta, kappa.
- El término "B18R" se refiere preferiblemente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 24 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "B18R" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 23. El término "B18R" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.
- El acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular puede evitarse adicionalmente, por ejemplo, reduciendo el nivel de IFN, en particular IFN extracelular. En una realización, se impide el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular al interferir con la expresión del gen de IFN. Por ejemplo, el complejo de proteína de serina proteasa de virus de la hepatitis C NS3/4A es capaz de interferir y reducir la actividad del promotor de IFN y es un inhibidor específico de la expresión del gen de IFN. El término "NS3/4A" se refiere preferiblemente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 29 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. El término "NS3/4A" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.
- Según la enseñanza, el término "señalización intracelular de IFN" se refiere a los eventos de señalización intracelular y funciones efectoras, en particular funciones antivirales, activadas por IFN que interactúan con sus receptores específicos e incluye las funciones de proteínas que son inducidas por IFN, en particular proteínas efectoras antivirales activas. En particular, el término "señalización intracelular de IFN" incluye la propagación de señal y las funciones efectoras, en particular funciones antivirales, ejercidas por proteínas que son parte de la dependiente de la ruta de PKR, en particular PKR y eIF2-alfa, y/o la OAS dependiente de la ruta, en particular OAS y RNasaL.
- El término "inhibir la señalización intracelular de IFN" se refiere a una inhibición o reducción de la señalización de IFN intracelular y puede lograrse inhibiendo la expresión, actividad o activación de proteínas que están implicadas en la señalización intracelular de IFN, en particular proteínas que son parte de la vía PKR-dependiente y/o la dependiente de la ruta de la OAS. Por ejemplo, muchos virus han desarrollado mecanismos para contrarrestar las rutas PKR y OAS/RNasa L. Estos mecanismos pueden usarse de acuerdo con la invención para inhibir la señalización intracelular de IFN. Aquellos aspectos de la presente invención que implican una o más proteínas o péptidos en la inhibición de la señalización intracelular de IFN, tales como proteínas o péptidos descritos en este documento, por ejemplo una o más proteínas o péptidos que inhiben la ruta dependiente de PKR y/o la ruta dependiente de OAS, pueden implicar la provisión de ácidos nucleicos, en particular ARN, que codifica estas una o más proteínas o péptidos para las células, por ejemplo introduciendo los ácidos nucleicos en las células.
- Según la enseñanza, la ruta dependiente de PKR puede inhibirse por un agente que inhibe o reduce la actividad o activación de PKR o por un agente que desfosforila eIF2-alfa o impide su fosforilación, terminando así la señal inducida por PKR. Por ejemplo, la señalización de IFN intracelular puede inhibirse de acuerdo con la invención utilizando cualquiera de los mecanismos de defensa virales contra la cascada de señalización de PKR. A este respecto, la invención puede implicar el uso de señuelo ARNds (por ejemplo, adenovirus VAI RNA, Epstein-Barr virus EBER, HIV TAR), compuestos que efectúan la degradación de PKR (por ejemplo, poliovirus 2A<sup>pro</sup>), compuestos que inhiben la activación de PKR, por ejemplo mediante la ocultación de ARNds vírico (por ejemplo, virus vaccinia E3/E3L, reovirus sigma3, virus de la gripe NS1, virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) US11), compuestos que bloquean la dimerización (por ejemplo, virus de la gripe p58<sup>IPK</sup>; virus de la hepatitis C NS5A), pseudosubstratos (por ejemplo virus vaccinia K3/K3L; Tat VIH) o desfosforilación del sustrato (por ejemplo virus del herpes simple ICP34.5). El virus Vaccinia E3 es una proteína de unión a ARNds de 25 kDa (codificada por el gen E3L) que se une y secuestra el ARNds para evitar la activación de PKR y OAS. E3 se puede unir directamente a PKR e inhibe su actividad, dando como resultado una fosforilación reducida de eIF2-alfa. El gen K3L del virus vaccinia codifica un homólogo de 10.5 kDa de la subunidad alfa-eIF2 que actúa como un pseudosustrato no fosforilable de PKR e inhibe competitivamente la fosforilación de eIF2-alfa. El virus Vaccinia C7/C7L inhibe la fosforilación de eIF2-alfa. La proteína ICP34.5 de HSV-1 funciona como una subunidad reguladora de la fosfatasa PP1 celular, que la dirige a desfosforilar eIF2-alfa, terminando así la señal inducida por PKR. Las proteínas m142 y m143

de citomegalovirus murino (MCMV) se han caracterizado como proteínas de unión a ARNds que inhiben la activación de PKR, la fosforilación del factor de iniciación de traducción eIF2 y un cierre de síntesis de proteína posterior.

5 Un señuelo de ARN es pseudosustrato de ARN 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.

10 El término "E3" se refiere preferiblemente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 26 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "E3" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 25. El término "E3" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.

15 El término "K3" preferiblemente se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 28 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el término "K3" se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 27. El término "K3" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.

20 El término "ICP34.5" se refiere preferiblemente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 30 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. El término "ICP34.5" incluye cualquier variante, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de manera natural.

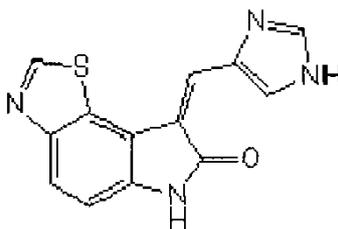
25 Según la presente enseñanza, el término "reducir la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR)" se refiere a medidas que dan como resultado un menor grado de homodimerización de PKR, en un grado menor de autofosforilación de PKR y/o en un grado menor de fosforilación de dianas que son sustratos de quinasa de PKR tales como eIF2-alfa 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. Preferiblemente, dicho término incluye todas las medidas que dan como resultado un grado inferior de autofosforilación de PKR y/o en un grado inferior de fosforilación de dianas que son sustratos de quinasa de PKR.

30 En un aspecto, la reducción de la actividad de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) en una célula comprende tratar la célula con un inhibidor de expresión y/o actividad de PKR. De acuerdo con la invención, la expresión "inhibir la 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.

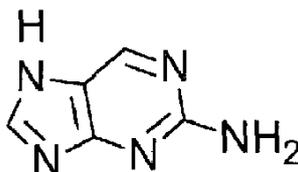
35 En un aspecto, dicho inhibidor de PKR se dirige a la proteína PKR y preferiblemente es específico para PKR. PKR puede inhibirse de varias maneras, por ejemplo mediante la inhibición de la autofosforilación y/o dimerización de PKR, proporcionando un pseudoactivador de PKR, o proporcionando un pseudo-sustrato de PKR. El inhibidor de PKR puede ser un agente que está implicado en un mecanismo de defensa viral como se discutió anteriormente. Por ejemplo, el virus vaccinia E3L codifica una proteína de unión a ARNds que inhibe PKR en células infectadas por virus, presumiblemente secuestrando activadores de ARNds. K3, también codificado por virus vaccinia, funciona como un inhibidor de pseudosustrato al unirse a PKR. Por lo tanto, proporcionar virus vaccinia E3L puede dar como resultado la inhibición de la PKR. Al proporcionar ARN VAI de adenovirus, virus Tat de VIH o virus EMBER1 de Epstein-Barr, puede dar lugar a la pseudoactivación de PKR. De este modo, por ejemplo, todos los factores virales, es decir, inhibidores derivados de virus, que bloquean la actividad de PKR tales como los descritos en este documento, pueden usarse para reducir la actividad de PKR.

45 En un aspecto, 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 de PKR dirigido al sitio de unión a ATP.

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



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



5 Preferiblemente, se usa un inhibidor como se describió 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 un aspecto adicional, el inhibidor de la 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.

10 En un aspecto, se prevé reducir la actividad de PKR en una célula tratando la célula con uno o más inhibidores derivados de virus tales como el virus vaccinia E3 y/o K3, así como tratar la célula con uno o más compuestos químicos. Inhibidores de PKR tales como 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetileno)-7H-pirrolo[2,3-g]benzotiazol-7-ona y/o 2-aminopurina.

15 De acuerdo con las enseñanzas, la ruta dependiente de OEA puede ser inhibida por un agente que inhibe o reduce la actividad o activación de OAS y/o RNasaL. Por ejemplo, el virus vaccinia E3 es una proteína de unión a ARNs de 25 kDa (codificada por el gen E3L) que se une y secuestra el ARNs para evitar la activación de OAS.

De acuerdo con la presente enseñanza, los términos "reducir la actividad de OAS" se refieren preferiblemente a medidas que dan como resultado un menor grado de producción de 2',5'-oligoadenilatos y, por tanto, la activación de RNasaL.

20 En un aspecto, la reducción de la actividad de OAS y/o RNasaL en una célula comprende tratar la célula con un inhibidor de expresión y/o actividad de OAS y/o RNasaL. De acuerdo con la invención, la expresión "inhibir la 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.

25 En un aspecto, la inhibición de la expresión de PKR, OAS o RNasaL, en lo sucesivo denominada "proteína diana", puede tener lugar inhibiendo la producción o la reducción del nivel de transcripción, es decir, ARNm, que codifica el objetivo proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción o induciendo la degradación del transcrito, y/o inhibiendo la producción de la proteína diana, por ejemplo inhibiendo la traducción de la transcripción que codifica la proteína diana. En un aspecto, dicho inhibidor es específico para un ácido nucleico que codifica la proteína diana. En un aspecto particular, el inhibidor de la expresión de la proteína diana es un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, molécula antisentido, ribozima, ARNi, ARNsí o un ADN que codifica el mismo) que se hibrida selectivamente y es específico para el ácido nucleico que codifica la proteína diana, inhibiendo de ese modo (por ejemplo, reduciendo) la transcripción y/o traducción de los mismos.

30 Los ácidos nucleicos inhibidores de esta enseñanza incluyen oligonucleótidos que tienen secuencias en la orientación antisentido con respecto a los ácidos nucleicos diana. 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, *in vitro* o *in vivo*, como ácidos nucleicos libres (desnudos) o en formas protegidas, por ejemplo, encapsulados en liposomas. El uso de formas protegidas liposómicas u otras puede ser ventajoso ya que puede potenciar la estabilidad *in vivo* y de este modo facilitar la administración a sitios diana.

35 Además, el ácido nucleico diana puede usarse para diseñar ribozimas que se direccionen a la escisión de los ARNm correspondientes en las células. De forma similar, estas ribozimas pueden administrarse en forma libre (desnuda) o mediante el uso de sistemas de suministro que potencian la estabilidad y/o la dirección, por ejemplo, liposomas.

Además, el ácido nucleico diana se puede usar para diseñar ARNsi que pueden inhibir (por ejemplo, reducir) la expresión del ácido nucleico. Los ARNsi pueden administrarse en forma libre (desnuda) o mediante el uso de sistemas de administración que mejoran la estabilidad y/o el direccionamiento, por ejemplo, liposomas. También pueden administrarse en forma de sus precursores o ADN de codificación.

5 ARNsi comprende preferiblemente una cadena de ARN sentido y una cadena de ARN complementario, donde las cadenas de ARN sentido y antisentido forman un dúplex de ARN, y en donde 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 diana, preferiblemente ARNm que codifica PKR.

10 Debe entenderse que, según la enseñanza, en lugar de los péptidos o proteínas mencionados anteriormente para (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhibir la señalización intracelular de IFN, pueden proporcionarse ácidos nucleicos que codifican los péptidos o proteínas. La expresión "proporcionada en forma de un ácido nucleico" como se usa en el presente documento descriptiva es para dar cuenta de esta posibilidad. Por ejemplo, las células pueden transfectarse con ácido nucleico, en particular ARN, que codifica los péptidos o proteínas y el ácido nucleico puede expresarse en las células para producir los péptidos o proteínas.

15 En un aspecto, las células se tratan para (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular antes, simultáneamente y/o después de la introducción del ARN que codifica el péptido o proteína para ser expresado, por ejemplo uno o más factores que permiten la reprogramación de las células somáticas a células que tienen características de células madre, o la primera introducción (por ejemplo, en el caso de transfecciones repetidas) de ARN. En un aspecto, las células se tratan para (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN  
20 extracelular y/o (ii) inhibir la señalización intracelular de IFN siguiente, preferiblemente inmediatamente después de la introducción de ARN o la primera introducción (por ejemplo, en caso de transfecciones repetidas) de ARN.

En un aspecto, las células se tratan para (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular y/o (ii) inhibir la señalización intracelular de IFN durante al menos 24 h, al menos 48 h, al menos 72 h, al menos 96 h, al menos 120 h o incluso más. Lo más preferiblemente, las células se tratan para (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN  
25 extracelular y/o (ii) inhibir la señalización de IFN intracelular durante todo el período de tiempo en donde se desea la expresión de RNA, como permanentemente, opcionalmente con transfección repetida de ARN.

De acuerdo con las enseñanzas, se prevé que (i) evite la participación del receptor de IFN por IFN extracelular y (ii) inhiba la señalización intracelular de IFN en una célula *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*. Por lo tanto, según la presente enseñanza, la célula puede ser una célula aislada o puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo.

30 Las "moléculas antisentido" o "ácidos nucleicos antisentido" pueden usarse para regular, en particular reducir, 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, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado u oligodesoxirribonucleótido modificado y que se hibrida en condiciones fisiológicas con ADN que comprende un gen particular o con ARNm de dicho gen, inhibiendo de ese modo la transcripción de dicho gen y/o la traducción de dicho  
35 ARNm. De acuerdo con la invención, una "molécula antisentido" también comprende una construcción que contiene un ácido nucleico o una parte del mismo en orientación inversa con respecto a su promotor natural. Una transcripción antisentido de un ácido nucleico o de una parte de la misma puede formar un dúplex con ARNm de origen natural y así evitar la acumulación o la traducción del ARNm. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para inactivar un ácido nucleico.

En un aspecto preferido, el oligonucleótido antisentido se hibrida con un sitio N-terminal o 5' cadena arriba tal como un  
40 sitio de iniciación de la traducción, un sitio de iniciación de la transcripción o un sitio promotor. En aspectos adicionales, el oligonucleótido antisentido se hibrida con una región 3' no traducida o un sitio de corte y empalme de ARNm.

Por "ARN interferente pequeño" o "ARNsi" como se usa en el presente documento se entiende una molécula de ARN, preferiblemente mayor que 10 nucleótidos de longitud, más preferiblemente mayor que 15 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud que se usa para identificar  
45 un gen diana o ARNm que se va a degradar. Un rango de 19-25 nucleótidos es el tamaño más preferido para los ARNsi.

Una o ambas cadenas del ARNsi también pueden comprender un saliente 3'. Como se usa en el presente documento, un "saliente 3'" se refiere a al menos un nucleótido no apareado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN. Por tanto, en un aspecto, el ARNsi comprende al menos un saliente en 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxinucleótidos) de longitud, preferiblemente de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de  
50 longitud, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, y particularmente preferible de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En la realización en la que ambas cadenas de la molécula de ARNsi comprenden un saliente 3', la longitud de los salientes puede ser la misma o diferente para cada cadena. En una realización más preferida, el saliente 3' está presente en ambas cadenas del ARNsi, y tiene una longitud

de 2 nucleótidos. Por ejemplo, cada cadena del ARNsi de la invención puede comprender 3' salientes de ácido didesoxitimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

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

10 Las cadenas en sentido y antisentido del ARNsi pueden comprender dos moléculas de ARN de cadena sencillas complementarias o pueden comprender una única molécula en la que dos porciones complementarias están emparejadas por bases y están unidas covalentemente por un área de "horquilla" de cadena sencilla. Es decir, la región de sentido y la región antisentido pueden estar conectadas covalentemente mediante una molécula de enlace. La molécula enlazadora puede ser un polinucleótido o un enlazador no nucleotídico. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que el área de horquilla del último tipo de molécula de ARNsi se escinde intracelularmente por la proteína "recortadora" (o su equivalente) para formar un ARNsi de dos moléculas de ARN emparejadas por bases individuales.

Como se usa en el presente documento, "ARNm diana" se refiere a una molécula de ARN que es un objetivo para la subregulación. El ARNsi puede expresarse a partir de vectores de expresión pol III sin un cambio en el sitio de selección, ya que la expresión de ARN de promotores pol III solo se cree que es eficaz cuando el primer nucleótido transcrito es una purina.

20 El ARNsi de acuerdo con las enseñanzas puede dirigirse a cualquier extensión de aproximadamente 19-25 nucleótidos contiguos en cualquiera de las secuencias de ARNm diana (la "secuencia diana"). Técnicas para seleccionar secuencias diana para ARNsi se dan, por ejemplo, en Tuschl T. et al., "The ARNsi User Guide", revisado el 11 de octubre de 2002. La "The ARNsi User Guide" está disponible en la red mundial en una sitio web mantenido por el Dr. Thomas Tuschl, Laboratory of ARN Molecular Biology, Rockefeller University, Nueva York, Estados Unidos, y se puede encontrar accediendo al sitio web de la Universidad Rockefeller y buscando con la palabra clave "ARNsi". De este modo, la cadena de sentido del presente ARNsi comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a cualquier extensión contigua de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos en el ARNm diana.

30 Generalmente, una secuencia diana en el ARNm diana se puede seleccionar a partir de una secuencia de ADNc dada correspondiente al ARNm diana, preferiblemente comenzando de 50 a 100 nt corriente abajo (es decir, en la dirección 3') desde el codón de inicio. Sin embargo, la secuencia diana puede estar localizada en las regiones 5' o 3' no traducidas, o en la región cercana al codón de inicio.

Se puede obtener ARNsi utilizando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ARNsi puede sintetizarse químicamente o producirse de forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica, tales como el sistema *in vitro* de *Drosophila* descrito en la solicitud publicada de Estados Unidos. 2002/0086356 de Tuschl et al.

35 Preferiblemente, el ARNsi se sintetiza químicamente usando ribonucleósidos fosforamiditas apropiadamente protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional. El ARNsi se puede sintetizar como dos moléculas de ARN complementarias separadas o como una molécula de ARN única con dos regiones complementarias.

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

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

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

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

El término "célula" o "célula huésped" preferiblemente se refiere a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta preferiblemente es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente, dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "célula" incluye, de acuerdo con la invención, células procariotas (por ejemplo, E. coli) o células eucariotas. Las células de mamífero son particularmente preferidas, tales como las células de humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. En un aspecto, la célula es una célula somática como se describe en este documento. 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 el presente documento, 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.

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 mediante la secreción continua de 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 ubicación y actividad.

Los queratinocitos son el tipo de célula predominante en la epidermis, la capa más externa de la piel humana. La función principal de los queratinocitos es la formación de la capa de queratina que protege la piel y el tejido subyacente del daño ambiental como el calor, la radiación UV y la pérdida de agua.

El epitelio es un tejido compuesto de células que recubren las cavidades y las superficies de las estructuras en todo el cuerpo. Muchas glándulas también se forman a partir del tejido epitelial. Se encuentra sobre el tejido conectivo y las dos capas están separadas por una membrana basal. En los humanos, el epitelio se clasifica como un tejido corporal primario, siendo los otros 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 sensación.

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

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "péptido" comprende oligo- 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 hasta preferiblemente 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 indistintamente en este documento.

La presente enseñanza también incluye "variantes" de los péptidos, proteínas o secuencias de aminoácidos descritas en este documento.

Para los fines de la presente enseñanza, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de eliminación de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

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 selección apropiada del producto resultante.

Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones amino y/o carboxi-terminales de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos.

Las variantes de eliminación de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, como por eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las eliminaciones pueden estar en cualquier posición de la proteína. Las variantes de eliminación de aminoácidos que comprenden la eliminación en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína también se denominan variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan porque se elimina al menos un residuo en la secuencia y se inserta otro residuo en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que están en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no están conservadas entre proteínas o péptidos homólogos y/o a la sustitución de aminoácidos por otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína son

5 cambios de aminoácidos conservativos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de forma similar. 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 generalmente se dividen en cuatro familias: ácida (aspartato, glutamato), básica (lisina, arginina, histidina), no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

10 Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente 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 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 la longitud completa 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, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al 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. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extender 0.5.

25 La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o 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.

30 El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenidas después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias. al azar 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 alineado de manera óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith and Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Neddleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas de computadora que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

40 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 muestran según la invención al menos 40%, en particular al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y preferiblemente al menos 95%, al menos 98 o al menos 99% de identidad de los residuos de aminoácidos.

45 Las variantes de secuencia de aminoácidos descritas en este documento pueden prepararse fácilmente por la persona experta, por ejemplo, mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para preparar péptidos o proteínas que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o eliminaciones, se describe en detalle en Sambrook et al. (1989), por ejemplo. Además, las variantes de péptidos y aminoácidos descritas en este documento se pueden preparar fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida y métodos similares. La enseñanza también se refiere a derivados de los péptidos o proteínas descritos en este documento que están comprendidos por los términos "péptido" y "proteína". "Derivados" de proteínas y péptidos son formas modificadas de proteínas y péptidos. Tales modificaciones incluyen cualquier modificación química y comprenden sustituciones, eliminaciones y/o adiciones únicas o múltiples de cualquier molécula asociada con la proteína o péptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. En una realización, los "derivados" de proteínas o péptidos incluyen aquellos análogos modificados que resultan de la glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivación, introducción de grupos protectores/bloqueantes, 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 estabilidad aumentada y/o inmunogenicidad aumentada.

5 De acuerdo con las enseñanzas, una variante de un péptido o proteína preferiblemente tiene una propiedad funcional del péptido o proteína del que se ha derivado. Dichas propiedades funcionales se describen en el presente documento 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 animal diferenciada que el péptido o proteína del que se ha derivado. Preferiblemente, la variante induce o mejora la reprogramación de una célula diferenciada animal.

10 En un aspecto, 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 un aspecto, 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.

15 Una "célula madre" es una célula con la capacidad de autorrenovarse, permanecer indiferenciada y diferenciarse. Una célula madre puede dividirse sin límite, por lo menos durante la vida del animal en donde reside naturalmente. Una célula madre no está diferenciada terminalmente; no está en la etapa final de una vía de diferenciación. Cuando una célula madre se divide, cada célula hija puede seguir siendo una célula madre o emprender un curso que conduce a la diferenciación terminal.

20 Las células madre totipotentes son células que tienen propiedades de diferenciación totipotenciales y que son capaces de convertirse en un organismo completo. Esta propiedad es poseída por las células hasta la etapa de 8 células después de la fertilización del ovocito por los espermatozoides. Cuando estas células se aíslan y se trasplantan al 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, que se generan entre 4 y 5 días después de la fecundación, se denominan "células madre embrionarias" y pueden diferenciarse en otras células tisulares pero no pueden formar nuevos organismos vivos.

25 Las células madre multipotentes son células madre que se diferencian normalmente en tipos celulares específicos de su tejido y órgano de origen. Las células madre multipotentes están involucradas no solo en el crecimiento y desarrollo de varios tejidos y órganos durante los periodos fetal, neonatal y adulto, sino también en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto y la función de inducir la regeneración tras el daño tisular. Las células multipotentes específicas de tejido se denominan colectivamente "células madre adultas".

30 Una "célula madre embrionaria" o "ESC" es una célula madre que está presente o aislada de un embrión. Puede ser pluripotente, tener la capacidad de diferenciarse en cada célula presente en el organismo, o multipotente, con la capacidad de diferenciarse en más de un tipo de célula.

35 Como se usa en este documento, "embrión" se refiere a un animal en las primeras etapas de su desarrollo. Estas etapas se caracterizan por la implantación y la gastrulación, donde se definen y establecen las tres capas germinales y por la diferenciación de las capas de gérmenes en los respectivos órganos y sistemas orgánicos. Las tres capas germinales son endodermo, ectodermo y mesodermo.

40 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 el ICM es el precursor del embrión.

Una célula madre adulta, también llamada célula madre somática, es una célula madre que se encuentra en un adulto. Una célula madre adulta se encuentra en un tejido diferenciado, puede renovarse y puede diferenciar, con algunas limitaciones, los tipos celulares especializados de su tejido de origen. Ejemplos incluyen células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y células madre neurales.

45 Una "célula diferenciada" es una célula madura que ha experimentado cambios evolutivos progresivos a una forma o función más especializada. La diferenciación celular es el proceso al que se somete una célula a medida que madura a un tipo de célula abiertamente especializado. Las células diferenciadas tienen características distintas, realizan funciones específicas y tienen menos probabilidades de dividirse que sus contrapartes menos diferenciadas.

50 Una célula "indiferenciada", por ejemplo, una célula inmadura, embrionaria o primitiva, típicamente tiene una apariencia inespecífica, puede realizar actividades múltiples, no específicas, y puede funcionar mal, si es que lo hace, en funciones típicamente realizadas por células diferenciadas.

"Célula somática" se refiere a cualquier y todas las células diferenciadas y no incluye células madre, células germinales o gametos. Preferiblemente, "célula somática" como se usa en el presente documento se refiere a una célula diferenciada terminalmente.

5 Tal como se usa en el presente documento, "comprometido" se refiere a células que se consideran comprometidas permanentemente con una función específica. Las células comprometidas también se denominan "células diferenciadas terminalmente".

Como se usa en el presente documento, "diferenciación" se refiere a la adaptación de células para una forma o función particular. En las células, la diferenciación conduce a una célula más comprometida.

10 Como se usa en el presente documento, "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 el presente documento, la "reprogramación" se refiere al reinicio del programa genético de una célula. Una célula reprogramada exhibe preferiblemente pluripotencia.

15 Los términos "desdiferenciado" y "reprogramado" o términos similares se usan indistintamente en el presente documento para denotar células derivadas de células somáticas que tienen características de células madre. Sin embargo, dichos términos no pretenden limitar la materia aquí descrita por consideraciones mecánicas o funcionales.

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 a células que tienen características de células madre" se refiere a ARN que cuando se introduce en una célula somática induce la célula a desdiferenciarse.

20 Como se usa en este documento, "célula germinal" se refiere a una célula reproductiva tal como un espermatozoido o un ovocito, o una célula que se desarrollará en una célula reproductora.

Como se usa en el presente documento, "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.

25 Los términos tales como "célula que tiene características de células madre", "célula que tiene propiedades de células madre" o "célula similar a madre" se usan en el presente documento 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 las células madre embrionarias. Dichas características incluyen una morfología embrionaria de células madre como colonias compactas, alto cociente de núcleo a citoplasma y nucléolos prominentes, cariotipos normales, expresión de la actividad de la telomerasa, expresión de marcadores de superficie celular que son característicos de las 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 antígeno-3 embrionario específico de estadio (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con 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, del grupo que consiste en OCT4 endógeno, NANOG endógeno, crecimiento y factor de diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), el gen embrionario específico de células 1 (ESG1), el desarrollo de pluripotencia asociada a 2 (DPPA2), DPPA4 y la transcriptasa inversa de telomerasa (TERT). En una realización, la una o más características típicas de las células madre incluyen pluripotencia.

30

35

En una realización del método de la enseñanza, las características de células madre comprenden una morfología de células madre embrionarias, donde dicha morfología de células madre embrionarias comprende preferiblemente criterios morfológicos seleccionados del grupo que consiste en colonias compactas, relación de alto núcleo a citoplasma y nucleolos 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 se pueden seleccionar del grupo que consiste en antígeno embrionario-3 específico de etapa (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con tumor (TRA-1-60), TRA-1-81, y TRA-2-49/6E y los genes que son característicos de las células madre embrionarias se pueden seleccionar del grupo que consiste en OCT4 endógeno, NANOG endógeno, crecimiento y factor de diferenciación 3 (GDF3), reducido expresión 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen embrionario específico de células 1 (ESG1), desarrollo de pluripotencia asociada a 2 (DPPA2), DPPA4 y transcriptasa inversa de telomerasa (TERT).

40

45

50 Preferiblemente, las células que tienen características de células madre son células somáticas desdiferenciadas y/o reprogramadas. Preferiblemente, las células que tienen características de células madre exhiben las características esenciales de las células madre embrionarias tales como un estado pluripotente. Preferiblemente, 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, la capa germinal primaria es endodermo y la derivada avanzada es tejido

epitelial similar a intestino. En una realización adicional, la capa germinal primaria es mesodermo y la derivada avanzada es músculo y/o cartilago estriado. En una realización adicional, la capa germinal primaria es ectodermo y la derivada avanzada es tejido neural y/o tejido epidérmico. En una realización preferida, las células que tienen características de células madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células neuronales y/o células cardíacas.

5 En un aspecto, las células somáticas son células somáticas derivadas de células madre embrionarias con un fenotipo mesenquimal. En un aspecto preferido, las células somáticas son fibroblastos tales como fibroblastos fetales o fibroblastos o queratinocitos postnatales, preferiblemente queratinocitos derivados de folículos pilosos. En realizaciones adicionales, los fibroblastos son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos. En un aspecto particular, los fibroblastos son fibroblastos depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de catálogo CCL-186, depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de catálogo CRL-2097 o depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de catálogo CRL-2522, o distribuido por System Biosciences bajo el catálogo no. PC501A-HFF. En un aspecto, los fibroblastos son fibroblastos dérmicos humanos adultos. Preferiblemente, las células somáticas son células humanas. Las células somáticas pueden estar genéticamente modificadas.

15 El término "factor" de acuerdo con las enseñanzas cuando se usa junto con la expresión del mismo por 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. 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, mandriles, monos cynomolgus y cualquier otro mono del Nuevo o del Viejo Mundo. Los roedores incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejillo de indias, hámster y jerbo.

20 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 que pueden expresarse mediante el ARN comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 o 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 indiferenciado.

30 La OCT4 es un factor de transcripción de los factores de transcripción POU eucarióticos y un indicador de pluripotencia de células madre embrionarias. Es una proteína de unión octomérica expresada por la madre. Se ha observado que está presente en los ovocitos, la masa celular interna de los blastocitos y también en la célula germinal primordial. El gen POU5F1 codifica la proteína OCT4. 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 indiferenciadas.

35 Preferiblemente, "proteína OCT4" o simplemente "OCT4" se refiere a OCT4 humana y preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico según 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 puede usarse para la generación de ARN capaz de expresar OCT4.

40 Sox2 es un miembro de la familia de genes Sox (caja de HMG relacionada con SRY) que codifica factores de transcripción con un único dominio de unión a ADN de HMG. Se ha descubierto que SOX2 controla las células progenitoras neuronales al inhibir su capacidad de diferenciación. La represión del factor da como resultado 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 los marcadores de diferenciación neuronal temprana.

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

50 El 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 al regular la expresión de genes críticos para la renovación y diferenciación de células madre embrionarias. El NANOG se comporta como un activador de la transcripción con dos dominios de activación inusualmente fuertes incrustados en su extremo C. La reducción de la expresión de NANOG induce la diferenciación de las células madre embrionarias.

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

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 indiferenciadas. En células de mamífero pluripotentes, se observa LIN28 en complejos sensibles a RNasa con proteína de unión poli(A) y en fracciones polisomales de gradientes de sacarosa, lo que sugiere que está asociado con la traducción de ARNm.

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

El factor similar a Krueppel (KLF4) es un factor de transcripción con dedos de zinc, que se expresa fuertemente en células epiteliales postmitóticas de diferentes tejidos, por ejemplo el colon, el estómago y la piel. KLF4 es esencial para la diferenciación terminal de estas células y participa en la regulación del ciclo celular.

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

MYC (cMYC) es un protooncogen, que se sobreexpresa en una amplia gama de cánceres humanos. Cuando se muta específicamente, o se sobreexpresa, aumenta la proliferación celular y funciona como un oncogen. El gen MYC codifica un factor de transcripción que regula la expresión del 15% de todos los genes a través de la unión a las secuencias Enhancer Box (cajas E) y al reclutamiento de histonas acetiltransferasas (HAT). MYC pertenece a la familia de factores de transcripción MYC, que también incluye genes N-MYC y L-MYC. Los factores de transcripción de la familia MYC contienen el dominio bHLH/LZ (cremallera hélice-bucle-hélice leucina básica).

Preferiblemente, "proteína cMYC" o simplemente "cMYC" se refiere a cMYC humano y comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico según la SEQ ID NO: 11, preferiblemente la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 12. Un experto en la técnica entendería que la secuencia de ADNc de cMYC como se describió anteriormente sería equivalente a cMYC ARNm, y puede usarse para la generación de ARN capaz de expresar cMYC.

Una referencia en el presente documento a factores específicos tales como OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 o c-MYC o a secuencias específicas de los mismos debe entenderse para incluir también todas las variantes de estos factores específicos o las secuencias específicas de los mismos como se describe aquí. En particular, debe entenderse para incluir también todas las variantes de empalme, variantes postraducción, conformaciones, isoformas y homólogos de especies postraducción modificados de estos factores/secuencias específicos que son expresados naturalmente por las células.

El término "miARN" (microARN) se refiere a ARNs no codificantes de 21-23 nucleótidos que se encuentran en células eucariotas que, al inducir la degradación y/o evitar la traducción de ARNm diana, modulan una plétora de funciones celulares, incluidas las relacionadas con la ESC -renovación/diferenciación y progresión del ciclo celular. Los miARN son reguladores postranscripcionales que se unen a secuencias complementarias en transcritos de ARN mensajero objetivo (ARNm), lo que generalmente da como resultado la represión de traducción o la degradación del objetivo y el silenciamiento génico. Se ha encontrado que los miARN en la combinación correcta son capaces de inducir la reprogramación celular directa de células somáticas a células que tienen características de células madre *in vitro*. Por ejemplo, se ha observado que el conjunto miARN 302-367 potencia la reprogramación de células somáticas.

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 las células somáticas bajo condiciones de cultivo de células madre embrionarias, preferiblemente condiciones adecuadas para mantener células madre pluripotentes en un estado indiferenciado.

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

5 compuestos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en 5'-azacitidina (5'-azaC), ácido suberoilánida hidroxámico (SAHA), dexametasona, tricostatina A (TSA), butirato sódico (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.

10 Los métodos de la presente enseñanza pueden usarse para efectuar la desdiferenciación de cualquier tipo de célula somática. Las células que pueden usarse incluyen células que pueden desdiferenciarse o reprogramarse mediante los métodos de la presente invención, en particular células que están total o parcialmente diferenciadas, más preferiblemente diferenciadas terminalmente. Preferiblemente, la célula somática es una célula diploide derivada de organismos multicelulares preembrionarios, embrionarios, fetales y postnatales. Ejemplos de células que se pueden usar 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 neuronales, células gliales, astrocitos, células cardíacas, células esofágicas, células musculares, melanocitos, células hematopoyéticas, osteocitos, macrófagos, monocitos y células mononucleares.

15 Las células con las que pueden usarse los métodos de enseñanza pueden ser de cualquier especie animal; por ejemplo, mamíferos y roedores. Ejemplos de células de mamífero que pueden desdiferenciarse y rediferenciarse mediante la presente enseñanza incluyen, pero no se limitan a, células de primate humano y no humano. Las células de primates con las que se puede realizar la enseñanza incluyen, pero no se limitan a, células de humanos, chimpancés, mandriles, monos cynomolgus y cualquier otro mono del Nuevo o del Viejo Mundo. Las células de roedor con las que se puede realizar la invención incluyen, pero no se limitan a, células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo.

20 Se espera que las células desdiferenciadas preparadas según la presente enseñanza muestren muchos de los mismos requisitos que las células madre pluripotentes y puedan expandirse y mantenerse en las condiciones usadas para las células madre embrionarias, por ejemplo, medio de células ES o cualquier medio que soporte el crecimiento de las células embrionarias. Las células madre embrionarias retienen su pluripotencia *in vitro* cuando se mantienen en fibroblastos fetales inactivados tales como fibroblastos embrionarios de ratón irradiados o fibroblastos humanos (por ejemplo, fibroblastos de prepucio humano, fibroblastos de piel humana, fibroblastos endometriales humanos, fibroblastos oviductales humanos) en cultivo. En un aspecto, las células alimentadoras humanas pueden ser células alimentadoras autólogas derivadas del mismo cultivo de células reprogramadas por diferenciación directa.

25 Además, las células madre embrionarias humanas pueden propagarse con éxito en Matrigel en un medio acondicionado por fibroblastos fetales de ratón. Las células madre humanas pueden hacerse crecer en cultivo durante un período de tiempo prolongado y permanecer indiferenciadas en condiciones de cultivo específicas.

30 En ciertas realizaciones, las condiciones de cultivo celular pueden incluir poner en contacto 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, trofectodermo u otros tipos de células.

35 Las células desdiferenciadas preparadas de acuerdo con la presente invención se pueden evaluar mediante métodos que incluyen monitorizar cambios en el fenotipo de las células y caracterizar su expresión de genes y proteínas. La expresión génica se puede determinar mediante RT-PCR, y los productos de traducción se pueden determinar mediante inmunocitoquímica e inmunotransferencia Western. En particular, las células desdiferenciadas pueden caracterizarse para determinar el patrón de expresión génica y si las células reprogramadas muestran un patrón de expresión génica similar al patrón de expresión esperado de células de control pluripotentes e indiferenciadas tales como células madre embrionarias usando técnicas bien conocidas en el arte incluye transcriptómica.

40 La expresión de los siguientes genes de células desdiferenciadas puede evaluarse a este respecto: OCT4, NANOG, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4 gen 1 embrionarios específico de células (ESG1), 2 asociado al desarrollo de pluripotencia (DPPA2), DPPA4, transcriptasa inversa de telomerasa (TERT), antígeno-3 embrionario (SSEA-3), SSEA-4, antígeno-1-60 relacionado con tumores (TRA-1-60), TRA-1-81 y TRA-2-49/6E.

45 Las células madre indiferenciadas o embrionarias a las que pueden compararse las células reprogramadas pueden ser de la misma especie que las células somáticas diferenciadas. Alternativamente, las células madre indiferenciadas o embrionarias a las que se pueden comparar las células reprogramadas pueden ser de una especie diferente a las células somáticas diferenciadas.

50 En algunos aspectos, existe una similitud en el patrón de expresión génica entre una célula reprogramada y una célula indiferenciada, por ejemplo, células madre embrionarias, si ciertos genes expresados específicamente en una célula indiferenciada también se expresan en la célula reprogramada. Por ejemplo, ciertos genes, por ejemplo, telomerasa, que

son típicamente indetectables en células somáticas diferenciadas pueden usarse para controlar el grado de reprogramación. Del mismo modo, para ciertos genes, la ausencia de expresión se puede usar para evaluar el grado de reprogramación.

5 La capacidad de autorrenovación, marcada por la inducción de la actividad de la telomerasa, es otra característica de las células madre que se puede controlar en células desdiferenciadas.

El análisis cariotípico se puede realizar por medio de extensiones cromosómicas de células mitóticas, cariotipo espectral, ensayos de la longitud de los telómeros, hibridación genómica total u otras técnicas bien conocidas en la técnica.

10 Usando la presente enseñanza, el ARN que codifica factores apropiados se incorpora en una o más células somáticas, por ejemplo, por electroporación. Después de la incorporación, las células se cultivan preferiblemente usando condiciones que soportan el mantenimiento de células desdiferenciadas (es decir, condiciones de cultivo de células madre). Las células desdiferenciadas se pueden expandir e inducir a volver a diferenciar en diferentes tipos de células somáticas que se necesitan para la terapia celular. Las células desdiferenciadas obtenidas según la presente invención pueden inducirse para diferenciarse en uno o más tipos de células somáticas deseadas *in vitro* o *in vivo*.

15 Preferiblemente, las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente enseñanza 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  
20 de la cabeza, epidermis, cabello, glándulas mamarias (ectodermo). Las células desdiferenciadas obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden volver a diferenciar *in vitro* o *in vivo* usando técnicas conocidas en la técnica.

25 En una realización de la presente enseñanza, las células reprogramadas que resultan de los métodos de esta invención se usan para producir una 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 invención; y (ii) inducir la diferenciación de las células reprogramadas para producir células diferenciadas. El paso (ii) puede realizarse *in vivo* o *in vitro*. Además, la diferenciación puede inducirse mediante la presencia de factores de diferenciación apropiados que pueden añadirse o están presentes *in situ*, por ejemplo, en un cuerpo, órgano o tejido en donde se han introducido las células reprogramadas. Las células diferenciadas pueden usarse para derivar células, tejidos y/u órganos que se utilizan ventajosamente en el área de trasplante de células, tejidos y/u órganos. Si se desea, pueden  
30 introducirse modificaciones genéticas, por ejemplo, en células somáticas antes de la reprogramación. Las células diferenciadas de la presente descripción preferiblemente no poseen la pluripotencia de una célula madre embrionaria, o una célula germinal embrionaria, y son, en esencia, células específicas o parcial o totalmente diferenciadas de tejido.

35 Una ventaja de los métodos de la presente enseñanza es que las células reprogramadas obtenidas mediante la presente enseñanza pueden diferenciarse sin selección previa o 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 de célula deseado. En una realización, una mezcla de células obtenidas a partir de los métodos de la presente enseñanza se expone a uno o más factores de diferenciación y se cultivan *in vitro*.

40 Los métodos para diferenciar las células reprogramadas obtenidas por los métodos descritos en el presente documento pueden comprender una etapa de permeabilización de la célula reprogramada. Por ejemplo, las células generadas mediante las técnicas de reprogramación descritas aquí, o alternativamente una mezcla heterogénea de células que comprenden células reprogramadas, pueden permeabilizarse antes de la exposición a uno o más factores de diferenciación o extracto celular u otra preparación que comprenda factores de diferenciación.

45 Por ejemplo, las células diferenciadas pueden obtenerse cultivando células reprogramadas indiferenciadas 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 de realizar una o más funciones de un tipo celular particular diferenciado).

En otro aspecto, las células reprogramadas según la presente enseñanza se modifican genéticamente a través de la adición, eliminación o modificación de su(s) secuencia(s) de ADN.

50 Las células reprogramadas o desdiferenciadas preparadas según la presente enseñanza o las 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 que incluyen, sin limitación, piel, cartílago,

músculo esquelético óseo, músculo cardíaco, renal, hepático, sanguíneo y hematopoyético, precursor vascular y endotelial vascular, beta pancreático, neuronas, glía, retina, células neuronales, intestinales, pulmonares y hepáticas.

Las células reprogramadas son útiles para la terapia regenerativa/reparadora y pueden trasplantarse a un paciente que lo necesite. En una realización, las células son autólogas con el paciente.

- 5 Las células reprogramadas proporcionadas de acuerdo con la presente enseñanza se pueden usar, por ejemplo, en estrategias terapéuticas en el tratamiento de trastornos cardíacos, neurológicos, endocrinológicos, vasculares, retinianos, dermatológicos, musculoesqueléticos y otras enfermedades.

Por ejemplo, las células reprogramadas de la presente enseñanza se pueden usar para reponer las células en animales cuyas células naturales se han agotado debido a la edad o la terapia de ablación, como la radioterapia y la quimioterapia contra el cáncer. En otro ejemplo no limitante, las células reprogramadas de la presente enseñanza son útiles en la regeneración de órganos y la reparación de tejidos. En una realización de la presente enseñanza, las células reprogramadas se pueden usar para revitalizar el tejido muscular dañado, incluidos los músculos distróficos y los músculos dañados por eventos isquémicos, tales como infartos de miocardio. En otra realización de la presente enseñanza, las células reprogramadas descritas en este documento pueden usarse para mejorar la cicatrización en animales, incluyendo humanos, después de una lesión traumática o cirugía. En este aspecto, las células reprogramadas de la presente enseñanza se administran sistémicamente, tal como intravenosamente, y migran al sitio del tejido recién traumatizado reclutado por las citoquinas circulantes secretadas por las células dañadas. En otra realización de la presente enseñanza, las células reprogramadas pueden administrarse localmente a un sitio de tratamiento en necesidad de reparación o regeneración.

- 20 En aspectos adicionales, el ARN utilizado en la presente enseñanza codifica un péptido o proteína que tiene un valor terapéutico. Las células que contienen el ARN pueden, por ejemplo, manipularse *in vitro* para expresar el ARN y, por lo tanto, el péptido o la proteína, usando los métodos de la enseñanza. Las células que expresan el péptido o la proteína se pueden introducir posteriormente en un paciente.

25 En un aspecto particularmente preferido, el ARN utilizado en la presente enseñanza codifica un péptido o proteína que comprende un inmunógeno, antígeno o péptido antígeno. En un aspecto, el péptido o proteína se procesa después de la expresión para proporcionar dicho inmunógeno, antígeno o péptido antígeno. En otro aspecto, el péptido o proteína en sí es el inmunógeno, antígeno o péptido antígeno. Pueden usarse células que expresan dicho péptido o proteína que comprende un inmunógeno, antígeno o péptido antigénico, por ejemplo, en inmunoterapia para provocar una respuesta inmune contra el inmunógeno, antígeno o péptido antígeno en un paciente.

30 Un "antígeno" según la enseñanza cubre cualquier sustancia que provoque una respuesta inmune. En particular, un "antígeno" se refiere a cualquier sustancia que reacciona 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 enseñanza es una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, induce una reacción inmune, que es preferiblemente específica para el antígeno. De acuerdo con la presente enseñanza, puede usarse 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 se presenta preferiblemente mediante una célula, preferiblemente mediante 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 o se deriva de un antígeno de origen natural. Tales antígenos naturales pueden incluir o pueden derivar 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 enseñanza, un antígeno puede corresponder a un producto natural, por ejemplo, una proteína viral, o una parte de la misma.

45 En un aspecto preferido, el antígeno es un antígeno tumoral, es decir, una parte de una célula tumoral que puede derivarse del citoplasma, la superficie celular o el núcleo celular, en particular los que se presentan principalmente intracelularmente o como antígenos de superficie de células tumorales. Por ejemplo, los antígenos tumorales incluyen el antígeno carcinoembrionario, la  $\alpha$ 1-fetoproteína, la isoformina y la sulfopropilcoproteína fetal, la  $\alpha$ 2-H-ferroproteína y la  $\gamma$ -fetoproteína, así como diversos antígenos tumorales del virus. De acuerdo con la presente enseñanza, un antígeno tumoral preferiblemente comprende cualquier antígeno que sea característico de tumores o cánceres, así como para 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 debería presentarse por moléculas MHC que da como resultado la modulación, en particular la activación de células del sistema inmune, 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.

En aspectos preferidos, el antígeno es un antígeno tumoral y la presente enseñanza implica la estimulación de una respuesta CTL antitumoral contra células tumorales que expresan dicho antígeno tumoral y que presenta preferentemente 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.

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

- 10 Ejemplos de antígenos que pueden usarse en la presente enseñanza son p53, ART-4, BAGE, ss-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferiblemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 BCR-abL menor, Plac-1, Pm1/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, 15 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, preferentemente WT-1.

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

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

- 25 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 presentación del antígeno. Preferiblemente, un péptido antígeno 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 que responde a antígeno. Preferiblemente, los péptidos antigénicos de acuerdo con la enseñanza son péptidos presentados de MHC clase I y/o clase II o pueden procesarse para producir péptidos presentados de MHC de clase I y/o 30 clase II. Preferiblemente, los péptidos antigénicos comprenden una secuencia de aminoácidos que se corresponde sustancialmente con la secuencia de aminoácidos de un fragmento de un antígeno. Preferiblemente, dicho fragmento de un antígeno es un péptido presentado de MHC clase I y/o clase II. Preferiblemente, un péptido antigénico según las enseñanzas comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos de tal fragmento y se procesa para producir dicho fragmento, es decir, un péptido presentado MHC clase I y/o clase II 35 derivado de un antígeno.

- Si un péptido antígeno debe presentarse directamente, es decir, sin procesamiento, en particular sin escisión, tiene una longitud que es adecuada para unirse 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 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 8-11 aminoácidos de longitud, en particular 9 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia de un péptido antígeno 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.

- 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 unirse a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente es 7- 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 8-11 aminoácidos de longitud, en particular 9 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia del péptido que se presentará 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. Por lo tanto, un péptido antigénico de acuerdo con las enseñanzas de una realización 45 comprende una secuencia de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 8-11 aminoácidos de longitud, en particular 9 o 10 aminoácidos. ácidos de longitud que corresponde sustancialmente y es preferiblemente completamente idéntico a un fragmento de un antígeno y el siguiente procesamiento del péptido antigénico constituye el péptido presentado. Sin embargo, el péptido antigénico también puede comprender 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 la secuencia completa de un antígeno.

5 Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden sustancialmente a una secuencia de un péptido que presenta MHC de clase I pueden diferir en uno o más residuos que no son esenciales para el reconocimiento de TCR del péptido presentado por el MHC de clase I o para unión de péptido a MHC. Dichos péptidos sustancialmente correspondientes también son capaces de estimular un CTL que responde a antígeno. Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de un péptido presentado en residuos que no afectan el reconocimiento de TCR, pero mejoran la estabilidad de unión a MHC pueden mejorar la inmunogenicidad del péptido antigénico, y pueden denominarse aquí "péptido optimizado". Usando el conocimiento existente sobre cuál de estos residuos puede ser más probable que afecte la unión al MHC o al TCR, se puede emplear un enfoque racional para el diseño de péptidos sustancialmente correspondientes. Los péptidos resultantes que son funcionales se contemplan como péptidos antigénicos.

El "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 antígeno" a células T específicas.

15 "Células presentadoras de antígeno" (APC) son células que presentan fragmentos peptídicos de antígenos proteicos en asociación con moléculas MHC en su superficie celular. Algunas APC pueden activar células T específicas de antígeno.

El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que implica la activación de una reacción inmune específica.

El término "*in vivo*" se refiere a la situación en un sujeto.

20 Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente y se relacionan con mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente enseñanza son humanos, primates no humanos, animales domesticados tales como perros, gatos, ovejas, ganado, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, etc., así como animales en cautiverio, como animales de zoológicos. El término "animal" como se usa en el presente documento también incluye a seres humanos. El término "sujeto" también puede incluir un paciente, es decir, un animal, preferiblemente un ser humano que tiene una enfermedad.

25 Si de acuerdo con de 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 interacciona con la acción del componente activo de la composición farmacéutica. Las preparaciones de este tipo pueden contener usualmente sales, sustancias reguladoras, conservantes, excipientes y vehículos y se administran de una manera conocida por la persona experta.

La presente enseñanza se describe en detalle mediante las figuras y ejemplos a continuación, que se usan con fines ilustrativos. Obedeciendo a la descripción y los ejemplos, las realizaciones adicionales que también están incluidas en la enseñanza son accesibles para el experto en la materia.

Ejemplos

35 Ejemplo 1: Transferencia repetitiva de IVT-ARN (reprogramación-TF)

La reprogramación de células somáticas en células madre pluripotentes inducidas (iPS) requiere la expresión continua de factores de transcripción de reprogramación (rTF). Para evitar el riesgo de integración genómica que surge cuando el rTF se administra viralmente a la célula, el rTF puede administrarse eficazmente como ARNm por electroporación o lipofección sin modificaciones acompañadas del genoma del huésped. Sin embargo, la administración debe realizarse repetitivamente para asegurar la expresión constante del rTF.

45 Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación como se indica en el panel lateral de la Fig. 2A con 15 µg o 5 µg de cada ARN transcrito *in vitro* (IVT) que codifica los factores de transcripción OCT4 (O), SOX2 (S), KLF4 (K) y cMYC (M) y cultivadas en medio de células madre embrionarias humanas (ES). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. En los puntos de tiempo indicados, se eliminó el 10% de las células de los cultivos antes de la electroporación posterior, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de los genes marcadores ES humanos OCT4 (endógeno), TERT, GDF3 y DPPA4 por qRT8-PCR. La electroporación repetitiva de IVT-ARN que codifica 4 rTF (OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC) da como resultado la inducción rápida de algunos marcadores de pluripotencia tales como GFD3, DPPA4 y TERT. Otros marcadores tales como OCT4 endógeno no fueron inducidos o fueron ligeramente inducidos.

50 Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación como se indica en el panel lateral de la Fig. 2B con 15 µg de cada IVT ARN que codifica los factores de transcripción OSKM y se cultivaron en medio de células ES humanas. Las

electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. En los puntos de tiempo indicados, se contaron las células restantes y se calculó la tasa de supervivencia en relación con las células de partida. La transferencia repetitiva de IVT-ARN se acompaña de una muerte celular masiva y, por lo tanto, no es posible realizar una reprogramación exitosa.

5 Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación con 1 µg de ARN IVT que codifica la luciferasa de luciérnaga (Luc) y 5 µg de ARN IVT que codifica la proteína fluorescente verde (GFP). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 2 mm usando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. A 24 horas después de la electroporación, las células se sedimentaron, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de interferón (IFN)-a y -b mediante qRT-PCR. Se observó que la electroporación de IVT-ARN es seguida por una inducción de IFNa y  
10 b 24h después de eso; cf. Fig. 2C.

Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación con 33.4 µg de mezcla de reprogramación de ARN IVT ARN (29.5 µg rTF (OSKM NANOG (N) LIN28 (L) (1:1:1:1:1:1)), 1.3 µg Antígeno SV40 largeT (1gT), 1.3 µg HTLV E6 y 1.25 µg de GFP). Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. 48 horas después de la electroporación, las células se sedimentaron, se  
15 aisló el ARN total y la expresión de ARNm de los genes de respuesta a IFN OAS1, OAS2, MX1, IFITM1 e IRF9 se cuantificó mediante qRT-PCR. Los 5 genes investigados de IFN-respuesta son inducidos 48 h después de la electroporación de IVT-ARN; cf. Fig. 2D. La respuesta al IFN ha evolucionado originalmente como parte de la respuesta inmune innata del huésped a las infecciones virales. Los ácidos nucleicos víricos son reconocidos de manera eficiente por las moléculas de los sensores, lo que conduce a actividades antivirales que incluyen la apoptosis, la remodelación del citoesqueleto, la  
20 degradación del ARN y la interrupción de la traducción de proteínas. Obviamente, estos mecanismos dificultan la transferencia génica basada en ARN.

Los fibroblastos CCD1079Sk se sometieron a electroporación una vez con las cantidades de IVT ARN que codifica los genes informadores Luc, GFP o el tipo salvaje de Proteína Quinasa R (PKR) indicado en la Fig. 2E. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 4 mm utilizando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk.  
25 Las células se sometieron a lisis 24 horas después de la electroporación y la expresión y el estado de fosforilación del factor 2a de iniciación eucariótico diana de PKR (eIF2a) se controló mediante inmunotransferencia Western usando anticuerpos específicos. Uno de los principales actores en la respuesta de IFN es la PKR que, tras la activación, fosforila su objetivo eIF2a, lo que conduce a una inhibición de la traducción. Podríamos demostrar que eIF2a se fosforila 24 horas después de la electroporación de IVT-ARN, lo que identifica la activación de PKR como uno de los obstáculos más  
30 importantes en la reprogramación basada en ARN.

La transferencia génica basada en ARN repetitiva se acompaña con una inducción de la respuesta de IFN que dificulta la expresión continua de rTF y, por lo tanto, la reprogramación exitosa basada en ARN.

#### Ejemplo 2: Uso de E3, K3 y B18R en transferencia de genes basada en ARN

35 Como una prueba de concepto, IVT-ARNs no modificados que codifican las proteínas virales de escape E3, K3 y B18R (virus vaccinia) se añadieron a una mezcla de IVT-ARN no modificado (Luciferase/GFP), lipofectado en fibroblastos de prepucio humanos (HFF) y traducción del gen reportero GFP e IFN-respuesta al ARN fue analizado. Además, la supervivencia de las células después de las lipofecciones repetitivas se evaluó mediante un Cell Proliferation Kit II (Roche).

Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección al día siguiente usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg de GFP con 0.2 µg de cada B18R, E3 o K3 (como se indica en la Fig. 3A, B). La codificación del IVT-ARN para Luc se usó para llevar las mezclas a 1.4 µg. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las células se recolectaron 48 h después de la transfección. El 20% de las células se usaron para el análisis de la expresión de GFP por FACS (figura 3B), mientras que el resto de las células se sedimentó, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de IFNβ y OAS1 por qRT-PCR (Fig. 3A). Como se muestra en la Fig. 3A, IFNβ y el gen de respuesta a IFN OAS 1  
45 se inducen claramente por lipofección de IVT-ARN (Luc/GFP). Esta inducción puede reducirse en el caso de IFNβ con E3/K3 solo, pero solo la combinación de las 3 proteínas de escape vírico puede reducir significativamente la inducción de IFNβ y OAS1 por IVT-ARN 48 h después de la lipofección. Como se muestra en la Fig. 3B, la expresión del gen informador GFP se potencia mediante la adición de E3 y K3. B18R no tiene ningún efecto en la traducción de GFP.

Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes cuatro días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. La mezcla de IVT-ARN estaba compuesta por 0.8 µg de GFP con 0.2 µg de cada B18R, E3 o K3 (como se indica). La codificación del IVT-ARN para Luc se usó para llevar la mezcla a 1.4 µg de ARN IVT total. Como control, se usaron 1.4 µg de IVT ARN modificado (mod.) que codificaba para Luc (0.6 µg) y GFP (0.8 µg). Estos ARN se componían de 100% de pseudouridina (psi) y 100% de 5-metilcitosina (5mC) en lugar de uridina y citidina que muestran menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se  
55 realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad

celular usando Cell Proliferation Kit II (Roche) y se normalizó a las células simuladas transfectadas. Como se muestra en la Fig. 3C, lipofección diaria de IVT-ARN no modificado (Luc/GFP, 4 veces) se acompaña de una pérdida masiva en la viabilidad celular. La combinación de las 3 proteínas de escape viral es capaz de superar este obstáculo y mejora la supervivencia de las células incluso más que el uso de IVT-ARN modificado (100% psi y 5mC).

- 5 Se concluye que la transferencia génica repetitiva basada en ARN es posible cuando se agrega la combinación de E3, K3 y B18R codificada por IVT-ARN. Se logró prueba de concepto.

Ejemplo 3: Uso de E3, K3 y B18R en transferencia génica basada en ARN para la reprogramación

- 10 Después de llegar a la prueba del concepto de que la adición de IVT-ARN que codifica E3, K3 y B 18R permite la transferencia génica repetitiva basada en ARN, investigamos si esto también es válido para la transferencia de una mezcla de reprogramación. Para este objetivo se mezclaron 6 rTF (OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG, LIN28, corto: OSKMNL) en una relación molar de 1:1:1:1:1 y se transfirieron mediante lipofección a HFF. Nuevamente, se analizó la supervivencia de las células y la inducción de respuesta a IFN después de 4 lipofecciones diarias repetitivas.

- 15 Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (80000 células/pozo) y se sometieron a lipofección durante los siguientes cuatro días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían entonces de 0.8 µg de GFP no modificada u 0.8 µg de OSKMNL (1:1:1:1:1) sin modificar o modificados y con 0.2 µg de B18R, E3 y K3 no modificados o modificados. Si es necesario, se usó la codificación del IVT-ARN para Luc para sumar la mezcla a 1.4 µg de ARN IVT total. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad celular usando el Cell Proliferation Kit II (Roche) con normalización para simular células transfectadas (Fig. 4A) y mediante microscopía (Fig. 4B). Después de eso, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm de IFNβ y OAS1 mediante qRT-PCR (figura 4C). Como se espera, la viabilidad de las células transfectadas con IVT-ARN no modificado (Luc/GFP u OSKMNL) se pierde cuando E3/K3/B18R (EKB) no están presentes. En este conjunto de experimentos, la viabilidad es comparable a la simulación de células transfectadas cuando están presentes EKB. Como se observó con el gen informador IVT-ARN (véase la Fig. 3), la supervivencia es incluso mayor en presencia de EKB que con IVT-ARN modificado solo. Los efectos observados en la Fig. 4A se visualizan en la Fig. 4B mediante imágenes representativas tomadas con un microscopio. Dado que las células transfectadas con IVT-ARN no modificado no sobrevivieron a 4 lipofecciones diarias repetitivas en este conjunto de experimentos, la respuesta a IFN solo pudo analizarse en las muestras restantes mediante qRT-PCR. Como se puede ver en la Fig. 4C, la respuesta a IFN medida por la inducción de IFNβ y OAS1 está casi disminuida en las muestras con EKB. La reducción en la respuesta de IFN es incluso menor que con el uso de IVT-ARN modificado.
- 20
- 25
- 30

Se concluye que la transferencia génica repetitiva basada en ARN con la reprogramación de rTF es posible cuando se agrega la combinación de E3, K3 y B18R codificada por IVT-ARN. La supervivencia de las células y la reducción de la respuesta de IFN es aún más pronunciada que con el IVT-ARN modificado.

- 35 Ejemplo 4: Traducción de rTF después de lipofección repetitiva en presencia de E3, K3 y B18R

Además de la supervivencia de las células y la reducción de la respuesta de IFN, también se abordó cómo se traducen las rTF después de 3 lipofecciones diarias en presencia de E3, K3 y B18R. Los niveles de expresión de rTF OCT4, SOX2 y NANOG transferidos se analizaron mediante tinción FACS intracelular.

- 40 Los fibroblastos CCD1079Sk se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes tres días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.2 µg de GFP con 0.6 µg de OCT4 o SOX2 o NANOG sin modificar o modificado y 0.2 µg de cada B18R, E3 y K3 (EKB) sin modificar o modificar. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se controló la expresión intracelular de OSN mediante análisis FACS usando el kit de análisis de factores de transcripción de células madre pluripotentes humanas (BD 560589). Los niveles de expresión de NANOG, OCT4 y SOX2 fueron mayores en presencia de EKB cuando se aplicaron sin modificaciones; cf. Fig. 5.
- 45

Se concluye que en presencia de EKB, el IVT-ARN no modificado conduce a expresiones más altas de rTF que pueden dar como resultado una reprogramación más eficiente.

- 50 Ejemplo 5: Reprogramación de HFF usando rTF y microARN en presencia de EKB

La lipofección repetitiva de la mezcla de rTF se logró mediante la adición de EKB a la mezcla de reprogramación, lo que condujo a una mejor supervivencia y una mayor reducción de la respuesta de IFN después de lipofecciones diarias. Además, se lograron niveles de expresión más altos de rTF en presencia de EKB. En los siguientes experimentos, esta

mezcla se usó para lipofecciones prolongadas para lograr la reprogramación de los HFF. Para mejorar aún más la reprogramación, también se añadieron microARNs del grupo 302/367 a la mezcla de reprogramación. Se cree que estos miARN están principalmente involucrados en el mantenimiento celular de la autorrenovación y la pluripotencia, y podrían llevar a la reprogramación cuando se expresen mediante vectores lentivirales (Anokye-Danso et al., 2011).

5 Los fibroblastos HFF (System Bioscience) se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección 5 veces a la semana (de lunes a viernes) durante dos semanas usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT-ARN (Fig. 6A). Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg de GFP no modificada o 0.8 µg de OSKMNL (1:1:1:1:1:1) sin modificar o modificados con 0.2 µg de cada B18R, E3 y K3 (EKB) sin modificar, o modificado y 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta por miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno]. Los ARN modificados se componían de 100% psi y  
10 100% 5mC en lugar de uridina y citidina que presentan menores características inmunoestimulantes. Las lipofecciones en los medios de células madre (medios Nutristem, Stemgent) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día 6 y el día 13, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm del marcador ES humano TERT, DPPA4, GDF3, LIN28 (endógeno) y REX1 mediante qRT-PCR. El crecimiento de la colonia se observó mediante microscopía y para un análisis posterior, las colonias se tiñeron para el marcador de superficie ES TRA-1-60 usando el anticuerpo StainAlive TRA-1-60 (Stemgent) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la Fig. 6B, el análisis de los niveles de expresión de varios marcadores de pluripotencia reveló que en la muestra con OSKMNL no modificada, EKB no modificada y mezcla de miARN, todos los marcadores de pluripotencia analizados se expresaron altamente en comparación con OSMNL modificado, EKB modificado y miARN mezcla o mezcla de miARN con EKB no modificado solo. El IVT-ARN no modificado destaca la modificación con 5mC y Psi. A partir de  
20 d10, se observó formación de colonias en la muestra con OSKMNL no modificada, EKB no modificada y mezcla de miARN; cf. Fig. 6C. En otras muestras, como miARN solo, no se observó formación de colonias. En la combinación de OSKMNL modificado con EKB modificado y aparecieron las colonias de miARN 1-3, que estaba muy por detrás de la combinación de OSKMNL no modificada y mezcla de miARN en presencia de EKB. Como se muestra en la Fig. 6D, el Ribo-iPS logrado mediante transfección repetitiva con OSMNL no modificado, EKB no modificado y mezcla de miARN podría teñirse positivamente para TRA-1-60, un marcador de superficie para células madre embrionarias humanas.

Se concluye que la transferencia génica repetitiva basada en ARN con rTF codificada por IVT-ARN no modificado en combinación con EKB no modificada y una mezcla de miARN maduros del clúster 302/367 conduce a una generación altamente eficiente y robusta de células Ribo-iPS caracterizado por alta expresión de marcadores de pluripotencia y marcador de superficie de células madre. El uso de IVT-ARN no modificado por lo tanto destaca el uso de  
30 IVT-ARN modificado.

Ejemplo 6: Reprogramación de HFF usando rTF y microARN en presencia de EKB (división 1:8)

En el primer conjunto de experimentos para la reprogramación con rTF codificado por la mezcla de IVT-ARN no modificado, EKB y de miARN, se dividieron 1:4 las células 302/367. En los siguientes experimentos las células se dividieron 1:8 para evitar un crecimiento denso de las células.

35 Los fibroblastos HFF (System Bioscience) se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección 5 veces a la semana (de lunes a viernes) durante dos semanas usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT-ARN (Fig. 7A). Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg OSKMNL (1:1:1:1:1:1) sin modificar o modificados con 0.2 µg de cada uno de B 18R, E3 y K3 (EKB) sin modificar o modificados y 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta de miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno]. Los ARN modificados se componían de 100% psi y 100% 5mC en lugar de  
40 uridina y citidina que presentan menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones en los medios de células madre (medio Nutristem, Stemgent) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día 5 y el día 12, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm del marcador ES humano TERT, DPPA4, GDF3, LIN28 (endógeno) y REX1 mediante qRT-PCR. El crecimiento de colonias se observó mediante microscopía y para un análisis posterior, las colonias se tiñeron para el marcador de superficie ES TRA-1-60 usando el anticuerpo StainAlive TRA-1-60 (Stemgent) o para la actividad de fosfatasa alcalina (kit de tinción Vector Red) siguiendo las instrucciones del fabricante

Como se muestra en la figura 7B, el análisis de los niveles de expresión de varios marcadores de pluripotencia reveló que en la muestra con mezcla de OSKMNL no modificada, EKB no modificada y miARN, todos los marcadores de pluripotencia analizados se expresaron altamente en comparación con OSMNL modificado, EKB modificado y mezcla de miARN. De  
50 nuevo, el IVT-ARN no modificado destaca la modificación con 5mC y Psi. Además, desde d10 en la formación de colonias se observó en ambas muestras (OSKMNL no modificado o modificado). Estas colonias podrían teñirse positivamente para TRA-1-60, un marcador de superficie para células madre embrionarias humanas; cf. Fig. 7C. Como se muestra en la figura 7D, las colonias también mostraron alta actividad de fosfatasa alcalina, otro marcador de células madre. La eficacia obviamente mayor de OSKMNL no modificado en comparación con OSKMNL modificado se puede ver claramente en el panel superior de la Fig. 7D.

Se concluye que la transferencia génica repetitiva basada en ARN con la reprogramación de rTF codificada por IVT-ARN no modificado en combinación con EKB no modificada y una mezcla de miARN de miARN maduros del conjunto 302/367 conduce a una generación altamente eficiente y robusta de células Ribo-iPS caracterizadas por alta expresión de marcadores de pluripotencia y marcador de superficie de células madre. El uso de IVT-ARN no modificado por lo tanto destaca el uso de IVT-ARN modificado.

#### Ejemplo 7: Titulación de EKB

Una posibilidad para mejorar aún más la eficacia de la reprogramación sería la adición de más rTF-IVT-ARN u otros factores potenciadores codificados por IVT-ARN. Dado que el protocolo de lipofección se limita a una cierta cantidad de IVT-ARN, investigamos si la cantidad de EKB puede reducirse cuando se agrega al cóctel de reprogramación. HFFs, por lo tanto, se lipofecta con el 6 rTF y miARN combinados con diferentes cantidades de EKB que van desde 0.0001 µg a 0.2 µg (cantidad utilizada en experimentos de reprogramación) cada uno. La supervivencia de las células y la inducción de respuesta a IFN se analizaron después de 4 lipofecciones repetitivas diarias.

Los fibroblastos HFF (System Bioscience) se sembraron en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección los siguientes cuatro días consecutivos usando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT. Las mezclas de IVT-ARN se componían, por lo tanto, de 0.8 µg de OSKMNL sin modificar (1:1:1:1:1) con cantidades variables de B18R, E3 y K3 no modificados, como se indica. La codificación del IVT-ARN para Luc se usó para llevar la mezcla a 1.4 µg de ARN IVT total. De acuerdo con los experimentos de reprogramación, se añadieron 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta por miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno] a las muestras. Como control, se usaron 1.4 µg de IVT ARN modificado (mod.) que codificaba para Luc (0.6 µg) y OSKMNL (0.8 µg; 1:1:1:1:1). Estos ARN se componían de 100% psi y 5mC en lugar de uridina y citidina que exhiben menos características inmunoestimulantes. Las lipofecciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A 24 h después de la última lipofección, se analizó la viabilidad celular usando Cell Proliferation Kit II (Roche). Después de eso, las células se sedimentaron, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de IFN $\beta$  y OAS1 se cuantificó mediante qRT-PCR.

Como se muestra en la Fig. 8A, la viabilidad de los HFF después de lipofecciones repetitivas se mantuvo hasta una reducción de EKB a 0.025 µg de IVT-ARN de cada factor. El análisis de la respuesta de IFN midiendo los niveles de expresión de IFN $\beta$  y OAS1 reveló que nuevamente la respuesta de IFN a IVT-ARN se reduce claramente hasta una cantidad de 0.025 µg de EKB; cf. Fig. 8B. Sin embargo, con la inducción residual de respuesta a IFN, recomendamos el uso de 0.05 µg de EKB.

Se concluye que la cantidad de EKB se puede reducir a 0.025-0.05 µg de cada IVT-ARN.

#### Ejemplo 8: Efecto E3 y K3 solo

Hasta el momento, solo se usó la combinación de E3 y K3. En este conjunto de experimentos, se analizó el efecto de E3 y K3 solo en la traducción del gen informador Luc y en la respuesta a IFN.

Los fibroblastos CCD1079SK se sometieron a electroporación con IVT ARN que codifica Luc (1 µg), GFP (5 µg) y 3 µg de E3 o K3 o ambos, como se indica. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de separación de 2 mm usando parámetros optimizados para los fibroblastos CCD1079Sk. 100.00 células/pozo se sembraron por duplicado en placas de 96 pozos. La actividad de la luciferasa se midió en los puntos de tiempo indicados en la Fig. 9A después de la electroporación usando el sistema de ensayo Bright Glo Luciferase (Promega). Se dan los valores medios de los duplicados. Además, se sembraron 300000 células/pozo en placas de 6 pozos y 24 horas después de la electroporación, se sedimentaron las células, se aisló el ARN total y se analizó la expresión de ARNm de OAS1 e IFN- $\beta$  mediante RT-PCR y en caso de IFN- $\beta$  cuantificado utilizando el kit Quanti Tect SYBR Green PCR.

Como se muestra en la Fig. 9A, la traducción de Luc se mejoró con E3 o K3 solo tanto como con los dos juntos. Como se ve para la lipofección de IVT-ARN, IFN $\beta$  y el gen de respuesta IFN OAS1 son claramente inducidos por la electroporación de IVT-ARN (Luc/GFP). Estas inducciones no se pueden reducir ni con E3 ni con K3 ni con la combinación de ambas 24 horas después de la electroporación; cf. Fig. 9B.

Estos experimentos indican que una proteína de escape viral intracelular (E3 o K3) codificada por IVT-ARN puede ser suficiente para permitir la transferencia génica basada en ARN repetitiva como se ve con la combinación EKB.

#### Ejemplo 9: Uso de inhibidores de interferón virales para mejorar la expresión de ARN autorreplicante

El genoma de los alfavirus es un ARN de cadena sencilla de sentido positivo (ARNss(+)) que codifica dos marcos de lectura abiertos (ORF) para poliproteínas grandes. El ORF en el extremo 5' del genoma codifica las proteínas no estructurales nsP1 a nsP4 (nsP1-4), que se traducen y procesan a una ARN-polimerasa dependiente de ARN (replicasa); el ORF en el extremo 3' codifica las proteínas estructurales -cápsides y glicoproteínas-. Ambos ORF están separados por el llamado promotor subgenómico (SGP), que gobierna la transcripción del ORF estructural (Strauss and Strauss, 1994,

Microbiol. Rev. 58:491-562). Cuando explotan como vectores de genes, las proteínas estructurales detrás del SGP se reemplazan por transgenes. Para empaquetar tales vectores en partículas virales, las proteínas estructurales deben expresarse en trans desde construcciones auxiliares (Smerdou and Liljestrom, 1999, J. Virol. 73, 1092-1098; Ehrenguber and Lundstrom, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 96, 7041-7046).

5 Los alfavirus se replican en el citoplasma de células infectadas exclusivamente a nivel de ARN (para la revisión del ciclo de vida alfaviral (Jose et al., 2009, Future. Microbiol. 4, 837-856). Después de la infección, el genoma ARNss(+) actúa como ARNm para la traducción del precursor de poliproteína nsP1234 que está en etapas tempranas del ciclo de vida viral procesado autoproteolíticamente a los fragmentos nsP123 y nsP4. Los fragmentos nsP123 y nsP4 forman el complejo de replicasa de cadena (-) que transcribe (-) ARN trenzado a partir de la plantilla de ARN genómico. En etapas posteriores, la poliproteína nsP1234 se escinde completamente en las proteínas individuales (Shirako and Strauss, 1994, J. Virol. 68, 1874-1885) que se unen al complejo de replicasa de cadena (+) que sintetiza nuevos genomas (+) trenzados, así como transcripciones subgenómicas que codifican las proteínas estructurales o transgenes (Kim et al., 2004, Virology 323, 153-163; Vasiljeva et al., 2003, J. Biol. Chem. 278, 41636-41645). El ARN subgenómico así como el nuevo ARN genómico tienen un límite (Cross and Gomatos, 1981, Virology 114, 542-554; Pettersson et al., 1980, Eur. J. Biochem. 105, 435-443) y poliadeniladas (Sawicki and Gomatos, 1976, J. Virol. 20, 446-464) y por lo tanto reconocidas como ARNm después de la infección de las células diana. Solo el nuevo ARN genómico contiene una señal de empaquetamiento que asegura el empaquetamiento exclusivo del ARN genómico en viriones en gemación.

La belleza de los replicones alfaviral para vectorología se fundamenta en la orientación positiva del genoma de ARN capsulado y poliadenilado. El replicón de ARN traducible se puede sintetizar fácilmente *in vitro*, mediante lo cual se consigue el encapsulado con análogo de protección añadido a la reacción de transcripción *in vitro* y las colas de poli-A se codifican como pistas de poli-T en las plantillas de plásmido (Ehrenguber and Lundstrom, 2007, Curr. Protoc. Neurosci. Capítulo 4, Unit.). Los replicones transcritos *in vitro* (IVT) se transfectan mediante técnicas de transfección convencionales e incluso cantidades bajas de replicones de IVT iniciales se multiplican rápidamente. En unas pocas horas después de la transferencia (Bruton and Kennedy, 1975, J. Gen. Virol. 28, 111-127), los transgenes que se colocan cadena abajo del SGP se transcriben a números de copia muy altos de aproximadamente 40000 a 200000 copias de ARN subgenómico por célula (Tuomi et al., 1975, Nucleic Acids Res. 2, 555-565), por lo tanto, no es sorprendente que las proteínas recombinantes se expresen fuertemente.

Dependiendo del propósito específico, los replicones de IVT pueden transfectarse directamente en células diana, o envasarse en partículas alfavirales con vectores auxiliares que proporcionan genes estructurales en trans (Smerdou and Liljestrom, 1999, J. Virol. 73, 1092-1098; Berglund et al., 1993, Biotechnology (N.Y.) 11, 916-920). La transferencia a la piel o los músculos conduce a una expresión local alta y sostenida, paralela a una fuerte inducción de la respuesta inmune humoral y celular (Johansson et al., 2012, PLoS. One. 7, e29732; Geall et al., 2012, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 109, 14604-14609). Considerados juntos, la facilidad de producción y transferencia de replicón *in vitro*, altos niveles de expresión y respuestas inmunes por replicones son ideales para la vacunación contra enfermedades infecciosas o cáncer (discutido recientemente por (Ulmer et al., 2012, Vaccine 30, 4414-4418)).

A pesar de estos aspectos positivos generales, la transferencia génica basada en el replicón se enfrenta a las limitaciones impuestas por un bloque efectivo de traducción en las células huésped que causa la muerte celular. El bloqueo de la traducción es provocado por dos mecanismos: primero, la proteína replicasa nsP2 interrumpe activamente la traducción del huésped degradando la ARN-polimerasa-II (Akhrymuk et al., 2012, J. Virol. 86, 7180-7191) y el segundo, la respuesta al interferón (IFN) media un cierre de la traducción por activación de proteína quinasa R (PKR) (Gorchakov et al., 2004, J. Virol. 78, 8455-8467). La citotoxicidad relacionada con nsP2 se resolvió seleccionando mutantes no citotóxicos capaces de replicación persistente y expresión génica en células (Casales et al., 2008, Virology 376, 242-251; Lundstrom et al., 2003, Mol. Ther. 7, 202-209). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizaron en células BHK21 que son altamente permisivas para la expresión de replicones que muy probablemente se relaciona con defectos en la respuesta de IFN (Chinsangaram et al., 1999, J. Virol. 73, 9891-9898). En las células competentes de IFN, todavía se puede esperar la activación de PKR y la respuesta de IFN y esto limitaría la expresión estable de vectores no citotóxicos.

Además de inhibir la traducción, la respuesta a IFN también es un obstáculo para la replicación de los alfavirus (Deuber and Pavlovic, 2007, J. Gen. Virol. 88, 1952-1959). Especialmente PKR, que se activa mediante ARNds, bloquea la replicación (Barry et al., 2009, J. Gen. Virol. 90, 1382-1391). La PKR activada fosforila el factor de iniciación eucariótico 2alfa (eIF2alfa) que a partir de entonces ya no puede iniciar la traducción del ARNm protegido (Pindel and Sadler, 2011, J. Interferon Cytokine Res. 31, 59-70). De ese modo, las células inhiben la expresión de proteínas de muchos virus, y como una consecuencia de la coevolución del virus-huésped, muchos virus a cambio expresan proteínas inhibitoras de PKR (Garcia et al., 2006, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 1032-1060). Los alfavirus, sin embargo, logran su ciclo de vida sin inhibir la PKR, aunque activan fuertemente la PKR. Sus transcritos subgenómicos se traducen eficazmente a proteínas estructurales en presencia de PKR activada, que depende de un motivo de ARN subgenómico 5'-terminal denominado potenciador de la traducción (TE) (Gorchakov et al., 2004, J. Virol. 78, 8455- 8467). La replicación de los virus mutantes

desprovistos del TE está severamente afectada, pero se puede rescatar en trans mediante la expresión de E3L, un inhibidor de PKR del virus Vaccinia (VacV) (Domingo-Gil et al., 2011, PLoS. One. 6, e16711)

Los vectores de replicones generalmente carecen del TE, porque el TE se extiende a la región codificante de la cápside y, por lo tanto, se elimina cuando las proteínas estructurales se reemplazan con transgenes. Por lo tanto, la expresión transgénica se reprime mediante la activación de PKR. La coexpresión de PKR dominante-negativa puede desreprimir la expresión (Gorchakov et al., 2004, J. Virol. 78, 8455-8467), similar al rescate antes mencionado de la replicación de virus deficiente en TE por E3L. Por otro lado, la fusión de las secuencias TE a la parte N-terminal del transgén ORF permite la expresión transgénica, con la desventaja de que un TE funcional comprende no solo el UTR subgenómico, sino también los aminoácidos N-terminales de la proteína de la cápside (34 Aa en SFV) (Sjoberg et al., 1994, Biotechnology (N.Y.) 12, 1127-1131). Siempre que las fusiones de cápside-transgén sean aceptables, se puede usar dicho diseño de vector, de lo contrario el TE debería preceder a una autoescisión 2A, realizada por ejemplo en pSFV-Helper-S del sistema de ARN de dos auxiliares (Smerdou and Liljestrom, 1999, J. Virol. 73, 1092-1098).

Aquí demostramos que los replicones de expresión desprovistos de TE- pueden mejorarse inhibiendo la respuesta del interferón (IFN) de las células transfectadas. Mejoramos la expresión del replicón mediante la coexpresión de proteínas del virus Vaccinia (VacV), concretamente E3L, B18R y K3L (EKB). Mostramos por primera vez que EBK puede codificarse en ARNm sintético y mejorar la expresión del replicón en trans mediante cotransfección simple. Encontramos que las proteínas VacV cotransfectadas inhiben la respuesta a IFN y previenen la activación de PKR y de ese modo aumentan la traducción de proteínas codificadas por replicón. La expresión se incrementó en diferentes tipos de células de humanos y ratones, pero en general, el aumento fue más pronunciado en las células humanas que en las de ratón. Hemos confirmado el aumento de la expresión de ARN EBK *in vivo* por administración en el músculo y el bazo. Cuando evaluamos la contribución de las diferentes proteínas individuales, encontramos que E3 actúa como el principal potenciador de la expresión, mientras que B18R es indispensable para bloquear completamente la respuesta de IFN.

Concluimos que la cotransferencia de inhibidores de IFN es una herramienta prometedora para mejorar la eficacia de los vectores basados en replicones para la administración de genes terapéuticos o la vacunación. De este modo, se puede reducir la cantidad total de ARN necesaria para tratar a los pacientes, lo que aumentaría la efectividad y la rentabilidad de las vacunas de ARN.

#### 9.1 Material y métodos:

Vectores y transcripción *in vitro* de ARN: K. Lundström (Lundstrom et al., 2001, Histochem.) Proporcionó amablemente vectores replicones del virus del bosque Semliki (pSFV-gen-GFP) y los vectores mutantes no citotóxicos (pSFV4 (PD)). Cell Biol. 115, 83-91; Ehrenguber et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 96, 7041-7046). Las colas de poli-A codificadas con pSFV se alargaron desde 62 residuos de adenosina en el vector original a 120 residuos de adenosina, y se colocó un sitio de restricción SapI inmediatamente a la baja del poli-A. Este diseño de poli-A se copió de vectores de ARNm sintéticos optimizados y se describió para mejorar la traducción (Holtkamp et al., 2006, Blood 108, 4009-4017). Se clonaron los genes indicadores luciferasa y verde fluorescente proteína (GFP) 3' para el promotor subgenómico. Se clonaron pST1- vectores que codifican la proteína fluorescente de infrarrojos (iRFP), luciferasa, E3L, B18R o K3L (EBK). La transcripción *in vitro* de vectores pSt1 y la purificación de ARN se describieron previamente (Holtkamp et al., 2006, Blood 108, 4009-4017; Kuhn et al., 2010, Gene Ther. 17, 961-971). Los vectores pSFV se transcribieron *in vitro* utilizando la ARN polimerasa SP6 (Megascript Kit, Ambion). La calidad del ARN purificado se evaluó mediante espectrofotometría y análisis en el 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, EE. UU.).

Transferencia de ARN: el ARN se sometió a electroporación en las diferentes células diana a temperatura ambiente con un dispositivo de electroporación de onda cuadrada (BTX ECM 830, Harvard Apparatus, Holliston, MA, Estados Unidos) usando los siguientes ajustes: fibroblastos humanos CCD1079SK (550 V/cm; 3 pulsos de 12 ms); fibroblastos de prepucio humano (HFF, 625 V/cm, 1 pulso de 24 ms); BJ fibroblastos (550 V/cm, 3 pulsos de 12 ms); RT101 (750 V/cm, 1 pulso de 12 ms); C2C12 (600 V/cm; 5 pulsos de 5 ms); BHK21 (750 V/cm, 1 pulso de 16 ms); 3T3-L1 (625 V/cm; 5 pulsos de 5 ms); célula del músculo esquelético humano (hSKMC, 700 V/cm, 1 pulso de 10 ms). Para la electroporación, el ARN se resuspendió en un volumen final de 62,5  $\mu$ l/mm de tamaño de hueco de cubeta. Las interacciones entre pulsos consecutivos fueron de 400 ms en todos los entornos. Las lipofecciones de ARN se realizaron usando Lipofectamine RNAiMAX siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Darmstadt, Alemania). Las células se sembraron a aproximadamente 20000 células/cm<sup>2</sup> de área de crecimiento y se transfectaron con una cantidad total de 260 ng/cm<sup>2</sup> de ARN y 1  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> de RNAiMAX. Se prepararon mezclas de diferentes especies de ARN (enumeradas en la tabla 2 y tabla 3) en tubos Eppendorf libres de ARNasa y se mantuvieron en hielo hasta las transfecciones. Con la excepción de las células 3T3-L1, las células transfectadas se recogieron 24 h después de la transfección para medir las eficacias de transfección (indicadas por expresión de iRFP) y la expresión de replicón o ARNm sintético (indicado por GFP) por FACS. Las células 3T3-L1 se destruyeron rápidamente por expresión del replicón después de la electroporación, por lo tanto, se recogieron 8 h después de la electroporación, pero 24 h después de la lipofección.

Células: Las células usadas en el estudio se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1. Líneas celulares y tipos de células utilizados en el estudio.

Línea celular	Tejido de origen	Especies	Comentarios
RT101	epidermis	Ratón (Balb/C)	ATCC #CRL-2002, transformado químicamente
3T3-L1	Fibroblastos embrionarios	Ratón	ATCC #CL-173
C2C12	Mioblasto del músculo esquelético	Ratón (C3H)	ATCC #1772, tal vez diferenciado a miotubos maduros
CCD1079SK	Fibroblastos de prepucio	humano	ATCC #CRL-2097, alcanzar la senescencia después de 56 duplicaciones de población
BJ	Fibroblastos de prepucio	humano	ATCC #CRL-2522, alcanzar la senescencia después de 72 duplicaciones de población
HFF	Fibroblastos de prepucio neonatal	humano	System Biosciences # PC501A-1, más de 30 duplicaciones de población
hSkMC	Músculo	humano	PromoCell # C12530; se diferencia en sincitia multinucleada
BHK-21	Riñón	hámster	ATCC # CCL-10, línea celular productora de alfavirus estándar
HUVEC	Vena umbilical endotelial	humano	PromoCell

5 Transferencia de ARN *in vivo*: Los replicones que codifican luciferasa se resuspendieron en PBS y se inyectaron en el tibialis anterior de ratones. Se transfirió IVT ARN que codificaba EBK como se indica en la leyenda de las figuras. La expresión de luciferasa *in vivo* se midió como se describe (Kuhn et al., 2010, Gene Ther. 17, 961-971).

Citometría de flujo: La expresión del ARN IVT que codifica iRFP o GFP se midió mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania) y los datos adquiridos se analizaron mediante el correspondiente software Diva o el software FlowJo (Árbol Star Inc., Ashland, OR, Estados Unidos).

10 Ensayos de luciferasa: Para evaluar la expresión de la luciferasa de luciérnaga, se sembraron células sometidas a electroporación 1E4 en microplacas blancas de 96 pozos (Nunc, Langensfeld, Alemania). La lisis directa de las células y la detección de la luciferasa se realizó con el sistema Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. La bioluminiscencia se midió usando un lector de luminiscencia para microplacas Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Suiza). Los datos se representaron en unidades relativas de luciferasa [RLU], se usaron células negativas en luciferasa para sustraer la señal de fondo.

15 Inmunotransferencia Western: La expresión de PKR y la fosforilación se detectaron mediante inmunotransferencia Western de lisados celulares. Anticuerpos utilizados: Fosfo-PKR (ab32036, Abcam, Cambridge, Reino Unido), PKR (ab45427; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Anticuerpo secundario anti-conejo de cabra (sc-2004; Santa Cruz, Dallas, TX, Estados Unidos).

9.2 La eficiencia de la expresión del replicón depende de la línea celular

20 Las células BHK21, RT101 y CCD1079Sk se sometieron a lipofección con una dilución en serie de ARN de replicón que codifica para GFP (2 µg a 0.02 µg como se indica en la Fig. 10). Una cantidad fija de 0.5 µg IVT ARN que codifica iRFP

se cotransfectó para controlar el éxito de la lipofección. Para ajustar las cantidades de ARN total a 2.5 µg en todas las muestras, se cotransfectaron cantidades variables de ARN codificante de luciferasa.

5 Mientras que las células BHK21 y las células RT101 son altamente permisivas y muestran altos niveles de expresión de replicón en un amplio rango de cantidades de ARN del replicón transfectadas, la expresión del replicón está gravemente alterada en los fibroblastos humanos (CCD1079SK); cf. Fig. 10.

9.3. La expresión del IVT ARN cotransfectado se altera en células no permisivas

El mismo experimento que en la Fig. 10, que se muestra en la Fig. 11, son los niveles de expresión de iRFP en muestras seleccionadas de la dilución del replicón en serie.

10 La coexpresión de iRFP en células BHK21 y RT101 aumenta en correlación inversa con la cantidad de replicón. Por el contrario, la expresión de iRFP se ve afectada en células CCD1079Sk independientemente de la cantidad de replicón, lo que indica una fuerte activación de PKR incluso por cantidades muy bajas de replicón.

9.4 El IFN secretado bloquea el IVT ARN y la expresión del replicón y B18R libera este bloqueo

15 Se sometieron fibroblastos de prepucio humano (HFF) a electroporación (EP) de la siguiente manera: sin ARN; 40 µg/ml de ARN de replicón que codifica luciferasa o 40 µg/ml de ARN replicón que codifica GFP y 40 µg/ml de IVT ARN que codifica el virus Vaccinia soluble (VacV) receptor IFN - señuelo B18R. Después de la electroporación, las células se sembraron a 3.3E04 células/cm<sup>2</sup> y se suplementaron con 120 µl/cm<sup>2</sup> de medio. El día siguiente, el sobrenadante (SN) de las células se recogió y se transfirió a células HFF cultivadas en placas de 96 pozos el día anterior (5000 células/pozo). El sobrenadante de células sometidas a electroporación con replicón se suplementó adicionalmente con 200 ng/ml de B18R recombinante (rec. B18R). Las células se incubaron 6 h con el sobrenadante. A continuación, las células se  
20 sometieron a lipofección con (A) 0.25 µg de ARN IVT o (B) 0.25 µg de ARN replicón que codifica luciferasa por pozo formulado con 1 µl de ARNiMAX por pozo. El medio no se modificó antes de la lipofección. Al día siguiente, se midió la expresión de luciferasa; cf. Fig. 12.

25 Los sobrenadantes de las células transfectadas con replicón inhibieron la expresión de luciferasa que codifica IVT ARN y replicones. El B18R recombinante así como el B18R secretado sobre la coelectroporación contrarrestan esta inhibición, lo que demuestra que los IFN son el agente inhibidor en los sobrenadantes.

9.5 La electroporación del IVT ARN bloquea la expresión del ARN del replicón transfectado posteriormente. Las proteínas VacV liberan el bloque de expresión

30 Los fibroblastos de prepucio humanos (CCD1079SK) se sometieron a electroporación (EP) como sigue: sin ARN (EP1); 80 µg/ml de luciferasa que codifica IVT ARN (EP2) o 80 µg/ml de IVT ARN que codifica las proteínas del virus Vaccinia (VacV) E3, K3, B18R (EBK) (EP3). Después de la electroporación, las células se sembraron a 2E05 células por pozo en placas de 6 pozos. Al día siguiente, las células se lipofectaron con una cantidad total de ARN de 2.5 µg: se cotransfectaron 0.75 µg de ARN replicón que codifica GFP con 1.25 µg de luciferasa o ARN que codifica EBK como se indica. La expresión de GFP se midió mediante FACS 24 h después; cf. Fig. 13.

35 En células que se sometieron a electroporación sin ARN, el nivel basal bajo de la expresión del replicón se reforzó mediante EBK colipofectado. Las células que se sometieron a electroporación con luciferasa que codifica IVT ARN bloquearon la expresión del replicón, y la EBK colipofetada no pudo liberar este bloqueo. En células que se sometieron a electroporación con EBT que codifica IVT ARN, la expresión del replicón no se inhibió.

Estos datos muestran que la expresión del replicón está alterada en las células que se encuentran en un estado antiviral activo antes de que el ARN del replicón se transfecte.

40 9.6 Las proteínas VacV codificadas en el IVT ARN evitan la respuesta de IFN al ARN, pero tienen una acción limitada sobre una respuesta de IFN establecida

45 Se sometieron fibroblastos de prepucio humano (CCD1079SK) a electroporación primero y luego se sometieron a lipofección como en la Fig. 13. Se aisló ARN de estas células y se analizó por qRT-PCR para marcadores de respuesta a IFN; cf. Fig. 14. Los paneles (A) y (C) muestran la inducción de transcripción de OAS1 e IFNβ el día después de la electroporación, lo que significa inmediatamente antes de la lipofección. Los paneles (B) y (D) muestran la inducción de OAS1 e IFNβ después de la electroporación y la posterior lipofección.

50 (A) En el momento de la lipofección, OAS1 se induce solo en células sometidas a electroporación con ARN que codifica luciferasa. (B) EBK colipofectado inhibe la sobrerregulación OAS1 inducida por replicón en células previamente no sometidas a electroporación (primer grupo de 3 columnas). Sin embargo, la colipofección de EBK no revierte la inducción de OAS1 por la electroporación previa de la luciferasa que codifica IVT ARN (segundo grupo de 3 columnas). Las células

que fueron sometidas a electroporación con replicón y EBK son resistentes a la inducción de la respuesta de IFN por lipofección. En general, la sobreexpresión de las transcripciones OAS1 se correlaciona muy bien con el bloqueo de la expresión del replicón. (C) Los transcritos de IFN $\beta$  se regulan positivamente en ambas muestras de ARN sometido a electroporación, aunque B18R redujo el nivel de inducción. (D) Las células que no fueron lipofectadas perdieron transcritos de IFN $\beta$  a partir de la electroporación (columna 4). Las células ingenuas de IFN que se sometieron a electroporación sin ARN regulan al alza las transcripciones de IFN $\beta$  cuando se lipofectan con ARN, a menos que el ARN codifique EBK. La lipofección EBK no revierte la inducción de transcripciones de IFN $\beta$  de la electroporación previa (columna 6). Por el contrario, la electroporación de EBK evita la sobreexpresión de IFN $\beta$  por lipofección, muy probablemente gracias a B18R secretado.

5

10 9.7 Las proteínas VacV reducen la respuesta de IFN al IVT ARN y replicones en células humanas

Se transfectaron fibroblastos de prepucio humano (HFF) y fibroblastos CCD1079SK (CCD) con (A) 0.75  $\mu$ g de ARN IVT o (B) 0.75  $\mu$ g de replicón ARN que codifica GFP, junto con 0.5  $\mu$ g de ARN IVT que codifica iRFP. Se cotransfectaron 1.25  $\mu$ g de proteínas de VacV que codifican el IVT ARN como se indica (véase la tabla 2), las mezclas de las proteínas de VacV estaban en proporciones de 1:1. El ARN IVT que codifica la luciferasa (Luc) sirvió como control positivo para la inducción de respuesta a IFN y se usó para normalizar los datos; cf. Fig. 15.

15

La inducción de IFN $\beta$  en respuesta al IVT ARN fue inhibida por la combinación EKB así como por E3L y K3L, pero no por B18R solo. El IFN $\beta$  en respuesta al replicón ARN fue inhibido por todas las proteínas VacV, sin embargo, la combinación de las tres fue la mejor. La EKB anuló la inducción de OAS1 y OAS2 en respuesta al IVT ARN así como al replicón. B18R solo inhibió la inducción de OAS 1/2 en respuesta al ARN del replicón, pero no al IVT ARN. K3L y E3L fueron menos efectivos.

20

B18R es indispensable para inhibir por completo la respuesta de IFN. Solo la combinación de EBK bloqueó efectivamente todos los genes de respuesta a IFN.

9.8 Las proteínas VacV potencian la expresión del ARN IVT y replicón ARN sometido a electroporación en líneas celulares de ratón y humano.

Los fibroblastos 3T3-L1 de ratón, fibroblastos CCD1079SK humanos, mioblastos C2C12 de ratón y células HUVEC humanas primarias se sometieron a electroporación con (A) IVT ARN o (B) replicón ARN que codifica GFP, junto con IVT ARN que codifica las proteínas VacV como se indica. iRFP que codifica el IVT ARN se cotransfectó a todas las muestras para controlar el éxito de la electroporación (consulte la tabla 2 para obtener detalles de las mezclas de transfección); cf. Fig. 16.

30 Tabla 2. Mezclas de ARN IVT utilizadas para electroporaciones en los ejemplos 9.7, 9.8 y 9.12. Las mezclas de ARN se ajustaron para igualar los volúmenes finales con agua libre de ARNasa.

Muestra No.	iRFP [ $\mu$ g]	E3L [ $\mu$ g]	K3L [ $\mu$ g]	B18R [ $\mu$ g]	eGFP [ $\mu$ g]	GFP replicón [ $\mu$ g]
1	2,5				2,5	-
2	2,5	0,67	0,67	0,67	2,5	-
3	2,5	2			2,5	-
4	2,5		2		2,5	-
5	2,5	1	1		2,5	-
6	2,5			2	2,5	-
7	2,5				-	2,5
8	2,5	0,67	0,67	0,67	-	2,5
9	2,5	2			-	2,5

ES 2 676 470 T3

Muestra No.	iRFP [μg]	E3L [μg]	K3L [μg]	B18R [μg]	eGFP [μg]	GFP replicón [μg]
10	2,5		2		-	2,5
11	2,5	1	1		-	2,5
12	2,5			2	-	2,5

(A) Se encontró un aumento moderado de la expresión de GFP basada en IVT ARN en fibroblastos de ratón y humanos con EKB o E3 y/o K3, mientras que no hubo ningún efecto en células musculares de ratón y HUVEC humano.

5 (B) La expresión del replicón se incrementó en un grado más alto que el IVT ARN en las 4 células probadas. La cotransferencia de las proteínas VacV da como resultado un impulso de la expresión del replicón, especialmente en fibroblastos humanos, donde encontramos un aumento aproximadamente 3 veces mayor que en los fibroblastos de ratón. E3 fue el factor principal en fibroblastos humanos, K3 aumenta la expresión con menos fuerza.

9.9 Las proteínas VacV potencian la expresión del IVT ARN y el ARN del replicón lipofectado en células de ratón y humanas.

10 Los fibroblastos de ratón (3T3-L1) y humanos (CCD1079SK) y mioblastos de ratón (C2C12) y humano (hSkMC) se sometieron a lipofección con (A) IVT ARN o (B) replicón ARN que codifica GFP, junto con IVT ARN que codifica VacV proteína como se indica (consulte la tabla 3 para más detalles). Se cotransfectó iRFP que codifica IVT ARN a todas las muestras para controlar el éxito de la lipofección (consulte la tabla 3 para obtener detalles de las mezclas de transfección); cf. Fig. 17.

15 Tabla 3: Mezclas de IVT ARN usadas para transfecciones con liposomas (RNAiMAX) en los ejemplos 9.9 y 9.10. Con el fin de mantener la relación óptima de ARN a ARNmMAX, se usó el ARN de codificación de la luciferasa para igualar las cantidades totales de ARN.

Muestra No.	iRFP [μg]	E3L [μg]	K3L [μg]	B18R [μg]	eGFP [μg]	GFP replicón [μg]	Luciferasa [μg]
1	0,5				0,75	-	1,25
2	0,5	0,417	0,417	0,417	0,75	-	-
3	0,5	1,25			0,75	-	-
4	0,5		1,25		0,75	-	-
5	0,5	0,625	0,625		0,75	-	-
6	0,5			1,25	0,75	-	-
7	0,5				-	0,75	1,25
8	0,5	0,417	0,417	0,417	-	0,75	-
9	0,5	1,25			-	0,75	-
10	0,5		1,25		-	0,75	-
11	0,5	0,625	0,625		-	0,75	-

Muestra No.	iRFP [µg]	E3L [µg]	K3L [µg]	B18R [µg]	eGFP [µg]	GFP replicón [µg]	Luciferasa [µg]
12	0,5			1,25	-	0,75	-

(A) Se detectó un aumento de la expresión del ARN IVT en todas las células, la GFP aumentó hasta 5 veces en presencia de E3L cotransfectado solo o E3L en combinación con K3L y B18R. K3L solo fue menos eficaz en células CCD1079Sk humanas, pero aún aumentó la expresión de ARN IVT más de 2 veces. B18R solo no tuvo ningún efecto.

5 (B) La expresión del replicón se reforzó en fibroblastos humanos y mioblastos humanos mediante el ARN E3 IVT, K3L tuvo pocos efectos. En las células de ratón, la expresión también se incrementó, pero mucho menos que en las células humanas. Los resultados obtenidos con células CCD1079SK se confirmaron con otros fibroblastos humanos (células HFF y BJ).

10 En general, los resultados de las Fig. 16 y 17 indican que la proteína VacV podría ayudar a superar la barrera de especies entre las células humanas y de ratón.

#### 9.10 Las proteínas VacV potencian la expresión de la expresión del replicón en miotubos de ratón

15 Los miotubos derivados de C2C12 de ratón se lipofectaron con replicón que codificaba GFP. Las proteínas iRFP o VacV que codifican ARN IVT se cotransfectaron como se indica (ver la tabla 3 para más detalles); cf. Fig. 18. En comparación con el replicón de GFP solo, las proteínas VacV aumentaron la expresión de GFP, con la excepción de B18R en miotubos maduros.

#### 9.11 El exceso de VacV IVT ARN no mejora aún más la expresión del replicón

20 Los mioblastos C2C12 de ratón se sometieron a electroporación con 3 µg de ARN de replicón que codifica luciferasa. Las proteínas VacV que codifican IVT ARN se sometieron a coelectroporación en diferentes relaciones p/p tal como se indica; cf. Fig. 19. En el primer grupo de muestras E3, B18R y K3 (EBK) se mezclaron 1:1:1, en el segundo grupo se colipofectó la misma cantidad de E3 que en el primer grupo, pero se omitieron K3 y B18R. La expresión de luciferasa se midió 6 h después de la electroporación y se normalizó a la expresión obtenida sin proteínas VacV (primera columna; "1:0").

La mezcla EBK y E3 solo aumentó la expresión del replicón de luciferasa, pero no hubo beneficio de usar un exceso elevado de ARN EBK o E3.

#### 25 9.12 Las proteínas VacV reducen la autofosforilación de PKR y la fosforilación del sustrato tras la transferencia del replicón de ARN

30 Los fibroblastos CCD1079SK humanos se sometieron a coelectroporación con replicón ARN que codificaba GFP, junto con IVT ARN que codifica iRFP y la proteína VacV indicada (véase la tabla 2); cf. Fig. 20. Las células falsas sometidas a electroporación sirvieron como control negativo. IVT ARN solo y IVT ARN cosometido a electroporación con EBK ARN sirvieron como muestras de referencia para comparar la activación de PKR mediada por ARN IVT a la activación de PKR mediada por replicón. Se utilizó un replicón no protegido como control para mostrar la contribución de la replicación a la activación de PKR.

La fosforilación de PKR provocada por los replicones es mucho más fuerte que por el IVT ARN. El replicón de ARN no bloqueado conduce a una fuerza similar de autofosforilación de PKR como ARN IVT no replicante. E3 y K3 reducen la autofosforilación de PKR, B18R no afecta la fosforilación de PKR.

#### 35 9.13 Las proteínas VacV permiten la replicación eficiente de replicones mutantes no citotóxicos

Los vectores de PD parental y no citotóxicos (Lundstrom et al., 2003, Histochem. Cell Biol. 115, 83-91) se sometieron a electroporación en fibroblastos humanos junto con IVT NA que codifica E3, B18R y K3 (EBK) o no; cf. Fig. 21. (A) Se midió la expresión de luciferasa en los puntos temporales indicados (B). La viabilidad de las células se evaluó 24 h después de la electroporación usando tinción de viabilidad XTT. La viabilidad se normalizó a muestras no transfectadas.

40 (A) La expresión de vectores PD no citotóxicos está alterada en fibroblastos humanos a menos que se agregue EBK. La adición de EBK induce un aumento lento de la expresión de vectores PD, que alcanza después de 72 h un nivel, que es comparable a la expresión del vector parental después de 24 h. (B) En presencia de EBK, las células transfectadas mostraron puntuaciones de viabilidad muy altas.

#### 9.14 Las proteínas VacV potencian la expresión del replicón *in vivo*

Se coinyectaron 2 µg de ARN de replicón que codificaba luciferasa con IVT ARN que codificaba E3, K3 y B18R (EBK) en diferentes relaciones p/p tal como se indica (de 1 a 6 veces más EKB que el ARN replicón) en el tibialis anterior de ratones Balb/C; cf. Fig. 22. El ARN se resuspendió en PBS.

5 Un exceso de 3 veces y 6 veces de ARN de EBK aumenta la expresión del replicón *in vivo* de una manera dependiente de la dosis.

9.15 Las proteínas VacV aumentan la expresión del ARN IVT en el bazo

Se empaquetó 10 µg de ARN IVT que codifica la luciferasa con 30 µg de ARN GFP o 30 µg de ARN EBK en liposomas que se dirigen al bazo. La expresión de luciferasa se controló durante 4 días; cf. Fig. 23.

EBK mejoró la expresión durante todo el curso del tiempo.

10 Ejemplo 10: NS34A e ICP34.5 potencian la expresión del replicón

Hemos demostrado que las proteínas del virus Vaccinia E3, B18R y K3 (EBK) aumentan la expresión del replicón, especialmente la traducción de transcritos subgenómicos. Probamos otros inhibidores de IFN: el virus de la hepatitis C NS34A, que contrarresta la activación de RIG-I y MDA5, virus del herpes simple ICP34.5, que desfosforila activamente eIF2a.

15 Se cotransfectaron fibroblastos humanos con 1.5 µg de replicón ARN que codifica una fusión luciferasa-GFP y 1 µg de ARNm que codifica inhibidores de interferón, o iRFP como control. Al día siguiente, la expresión transgénica se midió mediante FACS; cf. Fig. 24.

20 (A) Porcentaje de células transfectadas determinadas por expresión de GFP. NS34A aumenta las tasas de transfección en la misma medida que EBK, mientras que ICP34.5 aumenta más potentemente las tasas de transfección. (B) Los mismos datos que en A, expresados como las tasas de transfección multiplicadas en comparación con la muestra sin inhibidores. (C) Cambio de traducción de GFP, expresado como intensidad media de fluorescencia (MFI). NS34A no aumenta la traducción, mientras que ICP34.4 sí lo hace. Esto es más probable debido al hecho de que NS34A no inhibe la PKR.

Ejemplo 11: NS34A inhibe e ICP34.5 reduce la respuesta de IFN al ARNm sintético

25 Hemos demostrado que las proteínas E3, B18R y K3 (EBK) del virus vaccinia inhiben por completo la respuesta a IFN cuando se usan como una mezcla. E3 solo fue capaz de reducir la respuesta de IFN. Con respecto a la inducción de los genes diana del IFNβ (OAS1/2), hemos encontrado que se requiere B18R, y que E3 o K3 solo pueden prevenir parcialmente la sobreexpresión. Aquí, probamos otros inhibidores de IFN: el virus de la hepatitis C NS34A, que contrarresta la activación de RIG-I y MDA5, el virus del herpes simple ICP34.5, que desfosforila activamente eIF2a.

30 Los fibroblastos humanos se transfectaron con 5 µg de mezclas sintéticas de ARNm para inducir o prevenir la respuesta de IFN. Todas las mezclas contenían 2 µg de ARNm sintético que codificaba proteína fluorescente de infrarrojo (iRFP) y 3 µg de inhibidores de IFN (como se indica en la Fig. 25) o luciferasa como control. Al día siguiente, las células se recolectaron y se sometieron a lisis para extraer ARN para qRT-PCR. La inducción de IFNβ y OAS 1/2 se normalizó a la expresión de la línea base en células no transfectadas; cf. Fig. 25.

35 (A) Inducción transcripcional de IFNβ. Las proteínas del virus vaccinia EKB inhibieron IFNβ y E3 redujeron la inducción de IFNβ como hemos observado anteriormente. NS34A también anuló la inducción de IFNβ similar a EBK, e ICP34.5 redujo la inducción de IFNβ similar a E3. (B, C). La inducción transcripcional de genes diana de IFNβ OAS 1/2. EBK bloqueó la inducción OAS 1/2, mientras que E3 solo podría evitar parcialmente la sobreexpresión OAS1/2. Esto fue observado antes. Similar a E3, ICP34.5 no puede prevenir la inducción OAS 1/2, pero NS34A redujo en gran medida la inducción de  
40 ambos marcadores.

Por lo tanto, NS34A es un potente inhibidor de IFN, y ICP34.5 es un potente inhibidor de PKR cuando está codificado en ARNm sintético. Ambos son capaces de mejorar la expresión y transferencia del gen de ARNm sintético o replicón.

Ejemplo 12: Lipofección mínima requerida para la generación de Ribo-iPS

45 Una alta eficiencia del protocolo de reprogramación con IVT-ARN no modificado en combinación con EKB no modificado y una mezcla de miARN de miARN maduros del clúster 302/367 conduce a la pregunta de cuántas lipofecciones diarias son mínimamente necesarias para la reprogramación exitosa.

Se sembraron fibroblastos de HFF (System Bioscience) en 6 pozos (100000 células/pozo) y se sometieron a lipofección de 1 a 6 veces como se describieron en el esquema utilizando 6 µl de RNAiMAX (Invitrogen) y 1.4 µg de IVT-ARN; cf. Fig. 26 (A). Las mezclas de IVT-ARN se componían de 0.8 µg de OSKMNL sin modificar (1:1:1:1:1) con 0.2 µg de cada

5 B18R, E3 y K3 (EKB) y 0.4 µg de una mezcla de miARN compuesta de miARN 302a-d y 367 [0.4 µM cada uno]. Las lipofecciones en los medios de células madre (medios Nutristem, Stemgent) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Desde el día 9 en adelante, se observó la formación de colonias y se tomaron imágenes representativas en d11 mediante microscopía (B). Para un análisis posterior, las colonias se tiñeron para el marcador de superficie ES TRA-1-60 usando el anticuerpo StainAlive TRA-1-60 (Stemgent) (C) y las células se sedimentaron después, se aisló el ARN total y la expresión de ARNm de la ES humana. el marcador OCT4 (endógeno), NANOG (endógeno), LIN28 (endógeno), TERT y REX1 se cuantificó mediante qRT-PCR (D).

10 (B) Se hizo obvio que se requerían 3 transfecciones diarias para obtener algunas colonias, pero eran suficientes 4 transfecciones diarias para la inducción robusta de la formación de colonias. Las colonias se hicieron visibles desde d9 en adelante y crecieron completamente en d11, donde se pudieron teñir como positivas para TRA-1-60 (C). El análisis de los niveles de expresión de varios marcadores de pluripotencia reveló que, en consonancia con la formación de colonias, la inducción de genes marcadores ES se puede lograr con 3 o más lipofecciones. No obstante, se logró una inducción robusta de la expresión del marcador ES con 4 o más lipofecciones. Debe mencionarse que la expresión de los genes del marcador ES no fue potenciada por más de cuatro lipofecciones (D).

15 El protocolo de reprogramación que usa IVT-ARN no modificado en combinación con EKB no modificado y una mezcla de miARN de miARNs maduros del conglomerado 302/367 se puede acortar a cuatro lipofecciones diarias que conducen a una inducción robusta de generación de Ribo-iPS con inducciones altas de genes ES-marcadores humanos y del marcador de superficie ES TRA-1-60. La cantidad mínima de lipofecciones diarias requeridas para la formación de colonias Ribo-iPS podría determinarse a 3.

20 Listado de secuencias

<110> BioNTech AG et al.

<120> MÉTODO PARA LA EXPRESIÓN DE ARN EN CÉLULAS

<130> 674-90 PCT

<150> PCT/EP2012/004673

25 <151> 2012-11-09

<150> PCT/EP2013/002234

<151> 2013-07-29

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1

<211> 1411

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 676 470 T3

ccttcgcaag ccctcatttc accaggcccc cggcttgggg cgccttcctt ccccatggcg 60  
 ggacacctgg cttcggattt cgccttctcg cccccctcag gtggtggagg tgatggcca 120  
 ggggggcccg agccgggctg ggttgatcct cggacctggc taagcttcca aggccctcct 180  
 ggagggccag gaatcgggccc gggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattccccca 240  
 tgccccccgc cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgtact gtgggccccca ggttgagtg 300  
 gggctagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtcggg 360  
 gtggagagca actccgatgg ggctccccg gagccctgca ccgtcacccc tggtgccgtg 420  
 aagctggaga aggagaagct ggagcaaac ccggaggagt 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  
 gcagaaacc tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga 780  
 ggcaacctgg agaatttgtt cctgcagtgc ccgaaaccca cactgcagca gatcagccac 840  
 atcggccagc agcttgggct cgagaaggat gtggtccgag tgggttctg taaccggcgc 900  
 cagaagggca agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggatattga ggctgctggg 960  
 tctcctttct cagggggacc agtgccttt cctctggccc cagggccccca ttttgggtacc 1020  
 ccaggctatg ggagccctca cttcactgca ctgtactcct cggtccttt ccctgagggg 1080  
 gaagcctttc cccctgtctc cgtcaccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt 1140  
 gcctgccctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg 1200  
 agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt cttcattcac taaggaagga attgggaaca 1260  
 caaaggtgg gggcagggga gtttggggca actggttggg ggggaaggtga agttcaatga 1320  
 tgctcttgat tttaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga 1380  
 cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a 1411

<210> 2

<211> 360

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 676 470 T3

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 2 676 470 T3

Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr  
 245 250 255

Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp  
 260 265 270

Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser  
 275 280 285

Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro  
 290 295 300

Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe  
 305 310 315 320

Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser  
 325 330 335

Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr  
 340 345 350

Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn  
 355 360

<210> 3

<211> 1085

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 676 470 T3

```

cacagcggcc gcatgtacaa catgatggag acggagctga agccgcccgg cccgcagcaa      60
acttcggggg gcggcggcgg caactccacc gcggcggcgg ccggcggcaa ccagaaaaac      120
agcccggacc gcgtaagcg gcccatgaat gccttcatgg tgtggtcccg cgggcagcgg      180
cgcaagatgg cccaggagaa cccaagatg cacaactcgg agatcagcaa gcgcctgggc      240
gccgagtgga aacttttgtc ggagacggag aagcggccgt tcatcgacga ggctaagcgg      300
ctgcgagcgc tgcacatgaa ggagcaccg gattataaat accggccccg gcggaaaacc      360
aagacgctca tgaagaagga taagtacacg ctgcccggcg ggctgctggc cccggcggc      420
aatagcatgg cgagcggggg cggggtgggc gccggcctgg gcgcggggcg gaaccagcgc      480
atggacagtt acgcgacat gaacggctgg agcaacggca gctacagcat gatgcaggac      540
cagctgggct acccgcagca cccgggcctc aatgcgcacg gcgcagcgca gatgcagccc      600
atgcaccgct acgacgtgag cgccctgcag tacaactcca tgaccagctc gcagacctac      660
atgaacggct cgcccaccta cagcatgtcc tactcgcagc agggcacccc tggcatggct      720
cttggtcca tgggttcggg ggtcaagtcc gaggccagct ccagcccccc tgtggttacc      780
tcttctccc actccagggc gccctgccag gccggggacc tccgggacat gatcagcatg      840
tatctccccg gcgccgaggt gccggaacct gccgccccca gcgacttca catgtcccag      900
cactaccaga gcggcccggg gcccgccacg gccattaacg gcacactgcc cctctcacac      960
atgtgagggc cggacagcga actggagggg ggagaaattt tcaaagaaa acgagggaaa     1020
tgggaggggt gcaaaagagg agagtaagaa acagcatgga gaaaaccggg tacgctcaaa     1080
aaaaa                                             1085

```

<210> 4

<211> 317

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 676 470 T3

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 Gly 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

ES 2 676 470 T3

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 2 676 470 T3

attataaatc tagagactcc aggattttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60  
gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggaggtcc 120  
tatttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtccac 180  
ctcttaaatt ttttctctct ctctctctat actaacatga gtgtggatcc agcttgctcc 240  
caaagcttgc cttgctttga agcatccgac tgtaaagaat cttcacctat gcctgtgatt 300  
tgtgggcctg aagaaaacta tccatccttg caaatgtctt ctgctgagat gcctcacacg 360  
gagactgtct ctctcttcc ttctccatg gatctgctta ttcaggacag ccctgattct 420  
tccaccagtc ccaaaggcaa acaaccctt tctgcagaga agagtgtcgc aaaaaaggaa 480  
gacaagggtcc cggcaagaa acagaagacc agaactgtgt tctctccac ccagctgtgt 540  
gtactcaatg atagatttca gagacagaaa tacctcagcc tccagcagat gcaagaactc 600  
tccaacatcc tgaacctcag ctacaaacag gtgaagacct gggtccagaa ccagagaatg 660  
aatctaaga ggtggcagaa aaacaactgg ccgaagaata gcaatgggtg gacgcagaag 720  
gcctcagcac ctacctacc cagcctttac tcttctacc accagggatg cctgggtgac 780  
ccgactggga accttccaat gtggagcaac cagacctgga acaattcaac ctggagcaac 840  
cagaccaga acatccagtc ctggagcaac cactcctgga aactcagac ctgggtgcacc 900  
caatcctgga acaatcaggc ctggaacagt ccttctata actgtggaga ggaatctctg 960  
cagtctgca tgcagttcca gccaaattct cctgccagtg acttggaggc tgccttggaa 1020  
gctgctgggg aaggccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtattttag tactccacaa 1080  
accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga 1140  
gtgaaactga tattactcaa tttcagtctg gacactggct gaatccttcc tctcccctcc 1200  
tccatccct cataggattt ttcttgttg gaaaccacgt gttctggttt ccatgatgcc 1260  
catccagtca atctcatgga ggggtggagta tggttggagc ctaatcagcg aggtttcttt 1320  
ttttttttt ttctattgg atcttctg agaaaatact ttttttttt tttttttga 1380  
aacggagtct tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg cgcggtcttg gctcactgca 1440  
agctccgtct cccgggttca cgccattctc ctgcctcagc ctcccagca gctgggacta 1500  
caggcggccg ccacctcgcc cggctaatat tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac 1560  
tgtgttagcc aggatggtct cgatctctg accttgatgat ccaccgcct cggcctcct 1620  
aacagctggg atttacaggc gtgagccacc gcgccctgcc tagaaaagac attttaataa 1680  
ccttggctgc cgtctctggc tatagataag tagatctaact actagtttg atatctttag 1740  
ggtttagaat ctaacctcaa gaataagaaa tacaagtaca aattgggtgat gaagatgtat 1800  
tcgtattgtt tgggattggg aggctttgct tttttttaa aaactattga ggtaaaggg 1860  
taagctgtaa catacttaat tgatttctta ccgtttttgg ctctgttttg ctatatcccc 1920  
taatttggtg gttgtgctaa tctttgtaga aagaggctc gtatttgctg catcgtaatg 1980  
acatgagtac tgctttagtt ggtttaagtt caaatgaatg aaacaactat tttccttta 2040  
gttgatttta ccctgatttc accgagtgtt tcaatgagta aatatacagc ttaaacad 2098

<210> 6

<211> 305

ES 2 676 470 T3

<212> PRT

<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

ES 2 676 470 T3

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

<211> 780

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 676 470 T3

gtgCGGGGga agatgtagca gcttcttctc cgaaccaacc ctttgccttc ggactttctcc 60  
ggggccagca gccgcccgac caggggcccg gggccacggg ctcagccgac gaccatgggc 120  
tccgtgtcca accagcagtt tgcaggtggc tgcgccaagg cggcagaaga ggCGCCGag 180  
gaggCGCCgg aggacCGgc ccgggcggcg gacgagcctc agctgctgca cggTgcgggC 240  
atctgtaagt ggttcaacgt gcgcatgggg ttcggcttcc tgtccatgac cgcccgcgcc 300  
ggggtcgcgc tcgaccccc agtggatgtc tttgtgcacc agagtaagct gcacatggaa 360  
gggttccgga gcttgaagga gggTgaggca gtggagttca cctttaagaa gtcagccaag 420  
ggtctggaat ccatccgtgt caccggacct ggtggagtat tctgtattgg gagtGagagg 480  
cgccaaaag gaaagagcat gcagaagcgc agatcaaaag gagacaggtg ctacaactgt 540  
ggaggTctag atcatcatgc caaggaatgc aagctgccac cccagcccaa gaagtgccac 600  
ttctgccaga gcatcagcca tatggtagcc tcatgtccgc tgaaggcca gcagggccct 660  
agtgcacagg gaaagccaac ctactttcga gaggaagaag aagaaatcca cagccctacc 720  
ctgctcccgg aggcacagaa ttgagccaca atgggtgggg gctattcttt tgctatcagg 780

<210> 8

<211> 209

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 676 470 T3

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

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 676 470 T3

tcgaggcgac cgcgacagtg gtgggggacg ctgctgagtg gaagagagcg cagcccggcc 60  
 accggacctt cttactcgcc ttgctgattg tctatTTTTG cgTTTacaac ttttctaaga 120  
 acttttGTat acaaaggaac tttttaaaaa agacgcttcc aagttatatt taatccaaag 180  
 aagaaggatc tcggccaatt tggggTTTTg ggttttggct tcgTTtcttc tcttcgTTga 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 gtgcttcccc 480  
 gccgccccta tgacctggcg gcggcgaccg tggccacaga cctggagagc ggcgagaccg 540  
 gtgCGgcttg cggcggtagc aacctggcgc ccctacctcg gagagagacc gaggagttca 600  
 acgatctcct ggacctggac tttattctct ccaattcgct gacctatcct c'cgaggtcag 660  
 tggccgccac cgtgtcctcg tcagcgtcag cctcctcttc gtcgtcgccg tcgagcagcg 720  
 gccctgccag cgcgcccctc acctgcagct tcacctatcc gatccgggcc gggAACgacc 780  
 cggcggtggc gccgggCGgc acgggcggag gcctcctcta tggcagggag tccgctcccc 840  
 ctccgacggc tcccttcaac ctggcggaca tcaacgacgt gagcccctcg ggCGgcttcg 900  
 tggccgagct cctgCGgcca gaattggacc cgggtgtacat tccgCCgCag cagccgcagc 960  
 cgccaggtgg cgggctgatg ggcaagtctg tgctgaagge gtcgctgagc gcccctggca 1020  
 gcgagtacgg cagcccgtcg gtcacagcg tcagcaaagg cagccctgac ggcagccacc 1080  
 cggtggtggt ggcgcccctac aacggcgggc cgcCGcgcac gtgccccaaag atcaagcagg 1140  
 aggcggtctc ttcgtgcacc cacttgggCG ctggaccccc tctcagcaat ggccaccggc 1200  
 cggctgcaca cgacttcccc ctggggCGgc agctccccag caggactacc ccgaccctgg 1260  
 gtcttgagga agtgctgagc agcagggact gtcaccctgc cctgCCgctt cctcccggct 1320  
 tccatcccca cccggggccc aattaccat ccttctgCC cgatcagatg cagccgcaag 1380  
 tcccGCCgct ccattaccaa gagctcatgc caccCGgttc ctgcatgcca gaggagccca 1440  
 agccaaagag gggaaGacga tcgtggcccc ggaaaaggac cgccaccac acttGTgatt 1500  
 acgCGggctg cggcaaaacc tacacaaga gttcccatct caaggcacac ctgCGaaccc 1560

ES 2 676 470 T3

acacaggga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttcgcccgc 1620  
cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca cgcgccgttc cagtgc meta 1680  
aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctcgcctt acacatgaag aggcattttt 1740  
aaatcccaga cagtggatat gaccacact gccagaagag aattcagtat tttttacttt 1800  
tcacactgtc ttcccgatga ggaaggagc ccagccagaa agcactacaa tcatgggtaa 1860  
gttcccaact gagtcatctt gtgagtggat aatcaggaaa aatgaggaat ccaaaagaca 1920  
aaaatcaaag aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcattccaat tctaaatccg 1980  
acttgaatat tcttgactt acaaaatgcc aaggggggtga ctggaagttg tggatatcag 2040  
ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattcccttg aattgtgtat 2100  
tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtatttctct taccttctaa aagccattat 2160  
tatgatgta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttaa atagcctaaa 2220  
tgatggtgct tggtagtct tggttctaaa ggtaccaaac aaggaagcca aagttttcaa 2280  
actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttgtctt ccgatcaaca tttatgacct 2340  
aagtcaggta atatacctgg tttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc 2400  
actgtggttt cagatgtgca ataatttga caatggttta ttccaagta tgccttaagc 2460  
agaacaaatg tgttttcta tatagttcct tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa 2520  
gcaaactct attttgata tttgtaaact acaaagtaaa atgaacattt tgtggagttt 2580  
gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaataa acctataata ttttatctg 2639

<210> 10

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

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  
65 70 75 80  
Pro Leu Pro Arg Arg Glu Thr Glu Glu Phe Asn Asp Leu Leu Asp Leu  
85 90 95

ES 2 676 470 T3

Asp Phe Ile Leu Ser Asn Ser Leu Thr His Pro Pro Glu Ser Val Ala  
 100 105 110  
 Ala Thr Val Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Ser Ser Gly Pro Ala Ser Ala Pro Ser Thr Cys Ser Phe Thr Tyr Pro  
 130 135 140  
 Ile Arg Ala Gly Asn Asp Pro Gly Val Ala Pro Gly Gly Thr Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Leu Tyr Gly Arg Glu Ser Ala Pro Pro Pro Thr Ala Pro Phe  
 165 170 175  
 Asn Leu Ala Asp Ile Asn Asp Val Ser Pro Ser Gly Gly Phe Val Ala  
 180 185 190  
 Glu Leu Leu Arg Pro Glu Leu Asp Pro Val Tyr Ile Pro Pro Gln Gln  
 195 200 205  
 Pro Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Met Gly Lys Phe Val Leu Lys Ala  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Ala Pro Gly Ser Glu Tyr Gly Ser Pro Ser Val Ile Ser  
 225 230 235 240  
 Val Ser Lys Gly Ser Pro Asp Gly Ser His Pro Val Val Val Ala Pro  
 245 250 255  
 Tyr Asn Gly Gly Pro Pro Arg Thr Cys Pro Lys Ile Lys Gln Glu Ala  
 260 265 270  
 Val Ser Ser Cys Thr His Leu Gly Ala Gly Pro Pro Leu Ser Asn Gly  
 275 280 285  
 His Arg Pro Ala Ala His Asp Phe Pro Leu Gly Arg Gln Leu Pro Ser  
 290 295 300  
 Arg Thr Thr Pro Thr Leu Gly Leu Glu Glu Val Leu Ser Ser Arg Asp  
 305 310 315 320  
 Cys His Pro Ala Leu Pro Leu Pro Pro Gly Phe His Pro His Pro Gly  
 325 330 335  
 Pro Asn Tyr Pro Ser Phe Leu Pro Asp Gln Met Gln Pro Gln Val Pro  
 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

ES 2 676 470 T3

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 2 676 470 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	ggcccgcaac	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	tgcccctcaa	cgtagcttc	accaacagga	600
actatgacct	cgactacgac	tcggtgcagc	cgtatttcta	ctgcgacgag	gaggagaact	660
tctaccagca	gcagcagcag	agcgagctgc	agccccggc	gccagcgag	gatatctgga	720
agaaattcga	gctgctgccc	accccggccc	tgtcccctag	ccgccgtcc	gggctctgct	780
cgccctccta	cgttgcggtc	acacccttct	cccttcgggg	agacaacgac	ggcgggtggcg	840
ggagcttctc	cacggccgac	cagctggaga	tggtgaccga	gctgctggga	ggagacatgg	900
tgaaccagag	tttcatctgc	gaccgggacg	acgagacctt	catcaaaaac	atcatcatcc	960
aggactgtat	gtggagcggc	ttctcggccg	ccgccaagct	cgtctcagag	aagctggcct	1020
cctaccaggc	tgcgcgcaaa	gacagcggca	gcccgaacct	cgcccgcggc	cacagcgtct	1080

ES 2 676 470 T3

gctccacctc cagcttgtac ctgcaggatc tgagcgccgc cgcctcagag tgcacgacc 1140  
cctcggctgg 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 caaaaggtea gagtctggat caccttctgc tggaggccac agcaaacctc 1440  
ctcacagccc actggtcctc aagaggtgcc acgtctccac acatcagcac aactacgag 1500  
cgcctccctc cactcgggaag gactatcctg ctgccaaagag ggtcaagttg gacagtgtca 1560  
gagtcctgag acagatcagc aacaaccgaa aatgcaccag ccccaggtcc tcggacaccg 1620  
aggagaatgt caagaggcga acacacaacg tcttggagcg ccagaggagg aacgagctaa 1680  
aacggagctt ttttgccctg cgtgaccaga tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc 1740  
ccaaggtagt tatccttaaa aaagccacag catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc 1800  
aaaagctcat ttctgaagag gacttgttgc ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac 1860  
ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaag gaaaagtaag gaaaacgatt ccttctaaca 1920  
gaaatgtcct gagcaatcac ctatgaactt gtttcaaagtg catgatcaaa tgcaacctca 1980  
caaccttggc tgagtcttga gactgaaaga tttagccata atgtaaacctg cctcaaattg 2040  
gactttgggc ataaaagaac ttttttatgc ttaccatctt ttttttttct ttaacagatt 2100  
tgtatttaag aattgttttt aaaaaatfff aagatttaca caatgtttct ctgtaaatat 2160  
tgccattaaa tgtaaataac ttttaataaaa cgtttatagc agttacacag aatttcaatc 2220  
ctagtatata gtacctagta ttataggtac tataaacctt aatttttttt atttaagtac 2280  
attttgcttt ttaaagttga tttttttcta ttgttttttag aaaaaataaa ataactggca 2340  
aatatatcat tgagccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2377

<210> 12

<211> 454

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 676 470 T3

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

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



ES 2 676 470 T3

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> 2930

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 676 470 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 tagacccttag	300
tcttcgctgg tatcactcgt ctgtctgaac cagcggttgc attttttaa gccttctttt	360
ttctctttta ccagtttctg gagcaaattc agtttgcctt cctggatttg taaattgtaa	420
tgacctcaaa acttttagcag ttcttccatc tgactcaggt ttgcttctct ggcggctctc	480
agaatcaaca tccacacttc cgtgattatc tgcgtgcatt ttggacaaag ctccaacca	540
ggatacggga agaagaaatg gctggtgatc tttcagcagg tttcttcatg gaggaactta	600
atacataccg tcagaagcag ggagtagtac ttaaatatca agaactgcct aattcaggac	660
ctccacatga taggaggttt acatttcaag ttataataga tggaagagaa 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 tgcacgggcc agaaggattt cattataaat	960
gcaaaatggg acagaaagaa tatagtattg gtacaggttc tactaaacag gaagcaaac	1020

ES 2 676 470 T3

aattggccgc taaacttgca tatcttcaga tattatcaga agaaacctca gtgaaatctg 1080  
actacctgtc ctctggttct tttgctacta cgtgtgagtc ccaaagcaac tctttagtga 1140  
ccagcacact cgcttctgaa tcatcatctg aagggtgactt ctcagcagat acatcagaga 1200  
taaattctaa cagtgcaggt ttaaacagtt ctctggttct tatgaatggt ctcagaaata 1260  
atcaaaggaa ggcaaaaaga tctttggcac ccagatttga ccttcctgac atgaaagaaa 1320  
caaagtatac tgtggacaag aggtttggca tggattttaa agaaatagaa ttaattggct 1380  
caggtggatt tggccaagtt ttcaaagcaa aacacagaat tgacggaaag acttacgtta 1440  
ttaaacgtgt taaatataat aacgagaagg cggagcgtga agtaaaagca ttggcaaac 1500  
ttgatcatgt aaatattggt cactacaatg gctgttggga tggatttgat tatgatcctg 1560  
agaccagtga tgattctctt gagagcagtg attatgatcc tgagaacagc aaaaatagtt 1620  
caaggtcaaa gactaagtgc ctttcatcc aaatggaatt ctgtgataaa gggaccttgg 1680  
aacaatggat tgaaaaaaga agaggcgaga aactagacaa agttttggct ttggaactct 1740  
ttgaacaaat aacaaaaggg gtggattata tacattcaaa aaaattaatt catagagatc 1800  
ttaagccaag taatatatcc ttagtagata caaaacaagt aaagattgga gactttggac 1860  
ttgtaacatc tctgaaaaat gatggaaagc gaacaaggag taagggaaact ttgcgataca 1920  
tgagcccaga acagatttct tcgcaagact atggaaagga agtggacctc tacgctttgg 1980  
ggctaattct tgctgaactt ctctatgtat gtgacactgc ttttgaaca 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 cttttatfff aatgtttcct ttaatttttt actatfttta 2340  
ctaactcttc tgcaaaaaca gaaaggtttt ctcttttttg cttcaaaaac attcttacat 2400  
tttacttttt cctggctcat ctctttatcc tttttttttt tttaaagaca gagtctcgct 2460  
ctgttgccca ggctggagtg caatgacaca gtcttggctc actgcaactt ctgcctcttg 2520  
ggttcaagtg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagctg gattacaggc atgtgccacc 2580  
cacccaacta atttttgtgt ttttaataaa gacagggttt cacatgttg gccaggctgg 2640  
tctcaaactc ctgacctcaa gtaatccacc tgctctggcc tcccaaagtg ctgggattac 2700  
agggatgagc caccgcgccc agcctcatct ctttgttcta aagatggaaa aaccacccc 2760  
aaattttctt tttatactat taatgaatca atcaattcat atctatttat taaatttcta 2820  
ccgcttttag gccaaaaaaa tgtaagatcg ttctctgctt cacatagctt acaagccagc 2880  
tggagaaata tggactcat taaaaaaaaa aaaaaaagtg atgtacaacc 2930

<210> 14

<211> 551

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 676 470 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

Ala Val Ser Pro Leu Leu Leu Thr Thr Thr Asn Ser Ser Glu Gly Leu  
85 90 95

Ser Met Gly Asn Tyr Ile Gly Leu Ile Asn Arg Ile Ala Gln Lys Lys  
100 105 110

Arg Leu Thr Val Asn Tyr Glu Gln Cys Ala Ser Gly Val His Gly Pro  
115 120 125

Glu Gly Phe His Tyr Lys Cys Lys Met Gly Gln Lys Glu Tyr Ser Ile  
130 135 140

Gly Thr Gly Ser Thr Lys Gln Glu Ala Lys Gln Leu Ala Ala Lys Leu  
145 150 155 160

Ala Tyr Leu Gln Ile Leu Ser Glu Glu Thr Ser Val Lys Ser Asp Tyr  
165 170 175

Leu Ser Ser Gly Ser Phe Ala Thr Thr Cys Glu Ser Gln Ser Asn Ser  
180 185 190

Leu Val Thr Ser Thr Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ser Glu Gly Asp Phe  
195 200 205

Ser Ala Asp Thr Ser Glu Ile Asn Ser Asn Ser Asp Ser Leu Asn Ser  
210 215 220

Ser Ser Leu Leu Met Asn Gly Leu Arg Asn Asn Gln Arg Lys Ala Lys  
225 230 235 240

Arg Ser Leu Ala Pro Arg Phe Asp Leu Pro Asp Met Lys Glu Thr Lys  
245 250 255

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

ES 2 676 470 T3

260					265					270					
Ile	Gly	Ser	Gly	Gly	Phe	Gly	Gln	Val	Phe	Lys	Ala	Lys	His	Arg	Ile
		275					280					285			
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Val	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Tyr	Asn	Asn	Glu	Lys
	290					295					300				
Ala	Glu	Arg	Glu	Val	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Asp	His	Val	Asn	Ile
305					310					315					320
Val	His	Tyr	Asn	Gly	Cys	Trp	Asp	Gly	Phe	Asp	Tyr	Asp	Pro	Glu	Thr
				325					330					335	
Ser	Asp	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Asp	Tyr	Asp	Pro	Glu	Asn	Ser	Lys
			340					345					350		
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> 15

<211> 1758

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

atggcgccgt ccacgccgct cttgacagtc cgaggatcag aaggactgta catggtgaat	60
ggaccaccac attttacaga aagcacagtg tttccaaggg aatctgggaa gaattgcaaa	120
gtctgtatct ttagtaagga tgggaccttg tttgcctggg gcaatggaga aaaagtaa	180
attatcagtg tcaactaaca gggactactg cactccttcg acctcctgaa ggcagtttgc	240
cttgaattct cacccaaaaa tactgtcctg gcaacgtggc agccttacac tacttctaaa	300
gatggcacag ctgggatacc caacctaca ctttatgatg tgaaaactgg gacatgtttg	360
aaatctttca tccagaaaaa aatgcaaaat tgggtgtccat cctggtcaga agatgaaact	420
ctttgtgccc gcaatgttaa caatgaagtt cacttctttg aaaacaaca ttttaacaca	480
attgcaaata aattgcattt gcaaaaaatt aatgattttg tattatcacc tggaccccaa	540
ccatacaagg tggctgtcta tgttccagga agtaaaggtg caccttcatt tgttagatta	600
tatcagtacc ccaactttgc tggacctcat gcagctttag ctaataaaaag tttctttaag	660
gcagataaag ttacaatgct gtggaataaa aaagctactg ctgtgttggg aatagctagc	720
acagatgttg acaagacagg agcttcctac tatggagaac aaactctaca ctacattgca	780
acaaatggag aaagtgctgt agtgcaatta ccaaaaaatg gccccattta tgatgtagtt	840
tggaattcta gtttactga gttttgtgct gtatatggtt ttatgcctgc caaagcgaca	900
atthtcaact tgaaatgtga tctgtattht gactttggaa ctggtcctcg taatgcagcc	960
tactatagcc ctcatggaca tatattagta ttagctggat ttggaaatct gaggggacaa	1020
atggaagtgt gggatgtgaa aaactacaaa cttattttcta aaccggtggc ttctgattct	1080
acatattttg cttggtgccc ggatggtgag catattttta cagctacatg tgctcccagg	1140
ttacgggtta ataatggata caaaatttgg cattatactg gctctatctt gcacaagtat	1200
gatgtgccat caaatgcaga attatggcag gtttcttggc agccattttt ggatggaata	1260
tttccagcaa aaacaataac ttaccaagca gttccaagtg aagtacccaa tgaggaacct	1320
aaagttgcaa cagcttatag acccccagct ttaagaaata aaccaatcac caattccaaa	1380
ttgcatgaag aggaaccacc tcagaatatg aaaccacaat caggaaacga taagccatta	1440
tcaaaaacag ctcttaaaaa tcaaaggaag catgaagcta agaaagctgc aaagcaggaa	1500
gcaagaagtg acaagagtcc agatttggca cctactcctg cccacacagag cacaccacga	1560
aacactgtct ctcaagtcaat ttctggggac cctgagatag acaaaaaaat caagaacct	1620
aagaagaaac tgaaagcaat cgaacaactg aaagaacaag cagcaactgg aaaacagcta	1680
gaaaaaaatc agttggagaa aattcagaaa gaaacagccc ttctccagga gctggaagat	1740

ttggaattgg gtatttaa

1758

<210> 16

<211> 585

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 676 470 T3

Met Ala Pro Ser Thr Pro Leu Leu Thr Val Arg Gly Ser Glu Gly Leu  
1 5 10 15

Tyr Met Val Asn Gly Pro Pro His Phe Thr Glu Ser Thr Val Phe Pro  
20 25 30

Arg Glu Ser Gly Lys Asn Cys Lys Val Cys Ile Phe Ser Lys Asp Gly  
35 40 45

Thr Leu Phe Ala Trp Gly Asn Gly Glu Lys Val Asn Ile Ile Ser Val  
50 55 60

Thr Asn Lys Gly Leu Leu His Ser Phe Asp Leu Leu Lys Ala Val Cys  
65 70 75 80

Leu Glu Phe Ser Pro Lys Asn Thr Val Leu Ala Thr Trp Gln Pro Tyr  
85 90 95

Thr Thr Ser Lys Asp Gly Thr Ala Gly Ile Pro Asn Leu Gln Leu Tyr  
100 105 110

Asp Val Lys Thr Gly Thr Cys Leu Lys Ser Phe Ile Gln Lys Lys Met  
115 120 125

Gln Asn Trp Cys Pro Ser Trp Ser Glu Asp Glu Thr Leu Cys Ala Arg  
130 135 140

Asn Val Asn Asn Glu Val His Phe Phe Glu Asn Asn Asn Phe Asn Thr  
145 150 155 160

Ile Ala Asn Lys Leu His Leu Gln Lys Ile Asn Asp Phe Val Leu Ser  
165 170 175

Pro Gly Pro Gln Pro Tyr Lys Val Ala Val Tyr Val Pro Gly Ser Lys  
180 185 190

Gly Ala Pro Ser Phe Val Arg Leu Tyr Gln Tyr Pro Asn Phe Ala Gly  
195 200 205

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

Thr Met Leu Trp Asn Lys Lys Ala Thr Ala Val Leu Val Ile Ala Ser  
225 230 235 240

ES 2 676 470 T3

Thr Asp Val Asp Lys Thr Gly Ala Ser Tyr Tyr Gly Glu Gln Thr Leu  
 245 250 255  
 His Tyr Ile Ala Thr Asn Gly Glu Ser Ala Val Val Gln Leu Pro Lys  
 260 265 270  
 Asn Gly Pro Ile Tyr Asp Val Val Trp Asn Ser Ser Ser Thr Glu Phe  
 275 280 285  
 Cys Ala Val Tyr Gly Phe Met Pro Ala Lys Ala Thr Ile Phe Asn Leu  
 290 295 300  
 Lys Cys Asp Pro Val Phe Asp Phe Gly Thr Gly Pro Arg Asn Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Tyr Ser Pro His Gly His Ile Leu Val Leu Ala Gly Phe Gly Asn  
 325 330 335  
 Leu Arg Gly Gln Met Glu Val Trp Asp Val Lys Asn Tyr Lys Leu Ile  
 340 345 350  
 Ser Lys Pro Val Ala Ser Asp Ser Thr Tyr Phe Ala Trp Cys Pro Asp  
 355 360 365  
 Gly Glu His Ile Leu Thr Ala Thr Cys Ala Pro Arg Leu Arg Val Asn  
 370 375 380  
 Asn Gly Tyr Lys Ile Trp His Tyr Thr Gly Ser Ile Leu His Lys Tyr  
 385 390 395 400  
 Asp Val Pro Ser Asn Ala Glu Leu Trp Gln Val Ser Trp Gln Pro Phe  
 405 410 415  
 Leu Asp Gly Ile Phe Pro Ala Lys Thr Ile Thr Tyr Gln Ala Val Pro  
 420 425 430  
 Ser Glu Val Pro Asn Glu Glu Pro Lys Val Ala Thr Ala Tyr Arg Pro  
 435 440 445  
 Pro Ala Leu Arg Asn Lys Pro Ile Thr Asn Ser Lys Leu His Glu Glu  
 450 455 460  
 Glu Pro Pro Gln Asn Met Lys Pro Gln Ser Gly Asn Asp Lys Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Ser Lys Thr Ala Leu Lys Asn Gln Arg Lys His Glu Ala Lys Lys Ala  
 485 490 495  
 Ala Lys Gln Glu Ala Arg Ser Asp Lys Ser Pro Asp Leu Ala Pro Thr  
 500 505 510

ES 2 676 470 T3

Pro Ala Pro Gln Ser Thr Pro Arg Asn Thr Val Ser Gln Ser Ile Ser  
515 520 525

Gly Asp Pro Glu Ile Asp Lys Lys Ile Lys Asn Leu Lys Lys Lys Leu  
530 535 540

Lys Ala Ile Glu Gln Leu Lys Glu Gln Ala Ala Thr Gly Lys Gln Leu  
545 550 555 560

Glu Lys Asn Gln Leu Glu Lys Ile Gln Lys Glu Thr Ala Leu Leu Gln  
565 570 575

Glu Leu Glu Asp Leu Glu Leu Gly Ile  
580 585

<210> 17

<211> 1203

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 676 470 T3

atgatggatc tcagaaatac cccagccaaa tctctggaca agttcattga agactatctc 60  
 ttgccagaca cgtgtttccg catgcaaadc aaccatgccca ttgacatcat ctgtgggttc 120  
 ctgaaggaaa ggtgcttccg aggtagctcc taccctgtgt gtgtgtccaa ggtggtaaag 180  
 ggtggctcct caggcaaggg caccaccctc agaggccgat ctgacgtga cctggttgtc 240  
 ttcctcagtc ctctcaccac ttttcaggat cagttaaadc gccggggaga gttcatccag 300  
 gaaattagga gacagctgga agcctgtcaa agagagagag cattttccgt gaagtttgag 360  
 gtccaggctc cacgctgggg caacccccgt gcgctcagct tcgtactgag ttcgctccag 420  
 ctcggggagg ggggtggagtt cgatgtgctg cctgcctttg atgccctggg tcagttgact 480  
 ggcggctata aacctaaccc ccaaatctat gtcaagctca tcgaggagtg caccgacctg 540  
 cagaaagagg gcgagttctc cacctgcttc acagaactac agagagactt cctgaagcag 600  
 cgccccacca agctcaagag cctcatccgc ctagtcaagc actggtacca aaattgtaag 660  
 aagaagcttg ggaagctgcc acctcagtat gccctggagc tcctgacggt ctatgcttgg 720  
 gagcgaggga gcatgaaaac acatttcaac acagcccagg gatttcggac ggtcttggaa 780  
 ttagtcataa actaccagca actctgcatc tactggacaa agtattatga ctttaaaaac 840  
 cccattattg aaaagtacct gagaaggcag ctcacgaaac ccaggcctgt gatcctggac 900  
 ccggcggacc ctacaggaaa cttgggtggt ggagacccaa agggttggag gcagctggca 960  
 caagaggctg aggcctggct gaattaccca tgctttaaga attgggatgg gtccccagtg 1020  
 agctcctgga ttctgctggc tgaaagcaac agtgcagacg atgagaccga cgatcccagg 1080  
 aggtatcaga aatatggtta cattggaaca catgagtacc ctcatctc tcatagacc 1140  
 agcacactcc aggcagcatc caccacacag gcagaagagg actggacctg caccatctc 1200  
 tga 1203

<210> 18

<211> 400

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 676 470 T3

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
1 5 10 15

Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
20 25 30

Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
50 55 60

Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
65 70 75 80

Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
85 90 95

Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
100 105 110

Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
115 120 125

Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly  
130 135 140

Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu  
165 170 175

Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
180 185 190

Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
195 200 205

Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
210 215 220

Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
225 230 235 240

Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg

ES 2 676 470 T3

245

250

255

Thr Val Leu Glu<sub>260</sub> Leu Val Ile Asn Tyr<sub>265</sub> Gln Gln Leu Cys Ile<sub>270</sub> Tyr Trp

Thr Lys Tyr<sub>275</sub> Tyr Asp Phe Lys Asn<sub>280</sub> Pro Ile Ile Glu Lys<sub>285</sub> Tyr Leu Arg

Arg Gln<sub>290</sub> Leu Thr Lys Pro Arg<sub>295</sub> Pro Val Ile Leu Asp<sub>300</sub> Pro Ala Asp Pro

Thr Gly Asn Leu Gly Gly<sub>310</sub> Gly Asp Pro Lys Gly<sub>315</sub> Trp Arg Gln Leu Ala<sub>320</sub>

Gln Glu Ala Glu Ala<sub>325</sub> Trp Leu Asn Tyr Pro<sub>330</sub> Cys Phe Lys Asn Trp<sub>335</sub> Asp

Gly Ser Pro Val<sub>340</sub> Ser Ser Trp Ile Leu<sub>345</sub> Leu Ala Glu Ser Asn<sub>350</sub> Ser Ala

Asp Asp Glu<sub>355</sub> Thr Asp Asp Pro Arg<sub>360</sub> Arg Tyr Gln Lys Tyr<sub>365</sub> Gly Tyr Ile

Gly Thr His Glu Tyr Pro His<sub>375</sub> Phe Ser His Arg Pro<sub>380</sub> Ser Thr Leu Gln

Ala Ala Ser Thr Pro Gln<sub>390</sub> Ala Glu Glu Asp Trp<sub>395</sub> Thr Cys Thr Ile Leu<sub>400</sub>

<210> 19

<211> 2160

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 676 470 T3

atgggaaatg gggagtccca gctgtcctcg gtgcctgctc agaagctggg ttggtttatc 60  
caggaatacc tgaagcccta cgaagaatgt cagacactga tcgacgagat ggtgaacacc 120  
atctgtgacg tcctgcagga acccgaacag ttccccctgg tgcagggagt ggccataggt 180  
ggctcctatg gacggaaaac agtcttaaga ggcaactccg atggtaccct tgtcctcttc 240  
ttcagtgact taaaacaatt ccaggatcag aagagaagcc aacgtgacat cctcgataaa 300  
actggggata agctgaagtt ctgtctgttc acgaagtggg tgaaaaaaca tttcgagatc 360  
cagaagtccc ttgatgggtt caccatccag gtgttcacaa aaaatcagag aatctctttc 420  
gagggtgctgg ccgccttcaa cgctctgagc ttaaatgata atcccagccc ctggatctat 480  
cgagagctca aaagatcctt ggataagaca aatgccagtc ctggtgagtt tgcagtctgc 540  
ttcactgaac tccagcagaa gttttttgac aaccgtcctg gaaaactaaa ggatttgatc 600  
ctcttgataa agcactggca tcaacagtgc cagaaaaaaa tcaaggattt accctcgtg 660  
tctccgatg ccctggagct gcttacggtg tatgcctggg aacaggggtg cagaaaagac 720  
aactttgaca ttgctgaagg cgtcagaacc gtactggagc tgatcaaag ccaggagaag 780  
ctgtgtatct attggatggt caactacaac tttgaagatg agaccatcag gaacatcctg 840  
ctgcaccagc tccaatcagc gaggccagta atcttggatc cagttgaccc aaccaataat 900  
gtgagtggag ataaaatag ctggcaatgg ctgaaaaaag aagctcaaac ctggttgact 960  
tctccaacc tggataatga gttacctgca ccatcttggg atgttctgcc tgcaccactc 1020  
ttcacgacc caggccacct tctggataag ttcacaaagg agtttctcca gcccaacaaa 1080  
tgcttcctag agcagattga cagtgtgtt aacatcatcc gtacattcct taaagaaaac 1140  
tgcttccgac aatcaacagc caagatccag attgtccggg gaggatcaac cgccaaaggc 1200  
acagctctga agactggctc tgatgccgat ctgctcgtgt tccataactc acttaaaagc 1260  
tacacctccc aaaaaaacga gcggcacaaa atcgtcaagg aatccatga acagctgaaa 1320  
gccttttggg gggagaagga ggaggagctt gaagtcagct ttgagcctcc caagtggaaag 1380  
gctcccaggg tgctgagctt ctctctgaaa tccaaagtcc tcaacgaaag tgtcagcttt 1440  
gatgtgcttc ctgcctttaa tgactgggt cagctgagtt ctggctccac acccagcccc 1500  
gaggtttatg cagggtcat tgatctgtat aaatcctcgg acctcccggg aggagagttt 1560  
tctacctgtt tcacagtcct gcagcgaac ttcattcgtt cccggcccac caaactaaag 1620  
gattaattc gcctggtgaa gcactggtac aaagagtgtg aaaggaaact gaagccaaag 1680  
gggtctttgc ccccaaagta tgcttggag ctgctcacca tctatgcctg ggagcagggg 1740  
agtggagtgc cggattttga cactgcagaa ggtttccgga cagtcctgga gctggtcaca 1800  
caatatcagc agctctgcat cttctggaag gtcaattaca actttgaaga tgagaccgtg 1860  
aggaagtffc tactgagcca gttgcagaaa accaggcctg tgatcttggg cccagccgaa 1920  
cccacaggtg acgtgggtgg aggggaccgt tgggtttggc atcttctggc aaaagaagca 1980  
aaggaatggt tctcctctcc ctgctcaag gatgggactg gaaaccaat accaccttgg 2040  
aaagtgccga caatgcagac accaggaagt tgtggagcta ggatccatcc tattgtcaat 2100  
gagatgttct catccagaag ccatagaatc ctgaataata attctaaaag aaacttctag 2160

ES 2 676 470 T3

<210> 20

<211> 719

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 20

Met Gly Asn Gly Glu Ser Gln Leu Ser Ser Val Pro Ala Gln Lys Leu  
1 5 10 15

Gly Trp Phe Ile Gln Glu Tyr Leu Lys Pro Tyr Glu Glu Cys Gln Thr  
20 25 30

Leu Ile Asp Glu Met Val Asn Thr Ile Cys Asp Val Leu Gln Glu Pro  
35 40 45

Glu Gln Phe Pro Leu Val Gln Gly Val Ala Ile Gly Gly Ser Tyr Gly



ES 2 676 470 T3

Pro Ala Pro Leu Phe Thr Thr Pro Gly His Leu Leu Asp Lys Phe Ile  
 340 345 350

Lys Glu Phe Leu Gln Pro Asn Lys Cys Phe Leu Glu Gln Ile Asp Ser  
 355 360 365

Ala Val Asn Ile Ile Arg Thr Phe Leu Lys Glu Asn Cys Phe Arg Gln  
 370 375 380

Ser Thr Ala Lys Ile Gln Ile Val Arg Gly Gly Ser Thr Ala Lys Gly  
 385 390 395 400

Thr Ala Leu Lys Thr Gly Ser Asp Ala Asp Leu Val Val Phe His Asn  
 405 410 415

Ser Leu Lys Ser Tyr Thr Ser Gln Lys Asn Glu Arg His Lys Ile Val  
 420 425 430

Lys Glu Ile His Glu Gln Leu Lys Ala Phe Trp Arg Glu Lys Glu Glu  
 435 440 445

Glu Leu Glu Val Ser Phe Glu Pro Pro Lys Trp Lys Ala Pro Arg Val  
 450 455 460

Leu Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Val Leu Asn Glu Ser Val Ser Phe  
 465 470 475 480

Asp Val Leu Pro Ala Phe Asn Ala Leu Gly Gln Leu Ser Ser Gly Ser  
 485 490 495

Thr Pro Ser Pro Glu Val Tyr Ala Gly Leu Ile Asp Leu Tyr Lys Ser  
 500 505 510

Ser Asp Leu Pro Gly Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Val Leu Gln  
 515 520 525

Arg Asn Phe Ile Arg Ser Arg Pro Thr Lys Leu Lys Asp Leu Ile Arg  
 530 535 540

Leu Val Lys His Trp Tyr Lys Glu Cys Glu Arg Lys Leu Lys Pro Lys  
 545 550 555 560

Gly Ser Leu Pro Pro Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Ile Tyr Ala  
 565 570 575

Trp Glu Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp Phe Asp Thr Ala Glu Gly Phe  
 580 585 590

Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Thr Gln Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Phe  
 595 600 605

ES 2 676 470 T3

Trp Lys Val Asn Tyr Asn Phe Glu Asp Glu Thr Val Arg Lys Phe Leu  
610 615 620

Leu Ser Gln Leu Gln Lys Thr Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Glu  
625 630 635 640

Pro Thr Gly Asp Val Gly Gly Gly Asp Arg Trp Cys Trp His Leu Leu  
645 650 655

Ala Lys Glu Ala Lys Glu Trp Leu Ser Ser Pro Cys Phe Lys Asp Gly  
660 665 670

Thr Gly Asn Pro Ile Pro Pro Trp Lys Val Pro Thr Met Gln Thr Pro  
675 680 685

Gly Ser Cys Gly Ala Arg Ile His Pro Ile Val Asn Glu Met Phe Ser  
690 695 700

Ser Arg Ser His Arg Ile Leu Asn Asn Asn Ser Lys Arg Asn Phe  
705 710 715

<210> 21

<211> 2226

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 676 470 T3

atggagagca gggatcataa caacccccag gagggaccca cgtcctccag cggtagaagg	60
gctgcagtgg aagacaatca cttgctgatt aaagctgttc aaaacgaaga tgttgacctg	120
gtccagcaat tgctggaagg tggagccaat gttaatttcc aggaagagga agggggctgg	180
acacctctgc ataacgcagt acaaatgagc agggaggaca ttgtggaact tctgcttctg	240
catggtgctg accctgttct gaggaagaag aatggggcca cgccttttat cctcgcagcg	300
attgcgggga gcgtgaagct gctgaaactt ttcctttcta aaggagcaga tgtcaatgag	360
tgtgattttt atggcttcac agccttcatg gaagccgctg tgtatggtaa ggtcaaagcc	420
ctaaaattcc tttataagag aggagcaaat gtgaatttga ggcgaaagac aaaggaggat	480
caagagcggc tgaggaaagg aggggccaca gctctcatgg acgctgctga aaaaggacac	540
gtagaggctc tgaagattct ccttgatgag atgggggagc atgtaaacgc ctgtgacaat	600
atgggcagaa atgccttgat ccatgctctc ctgagctctg acgatagtga tgtggaggct	660
attacgcatc tgctgctgga ccatggggct gatgtcaatg tgaggggaga aagagggag	720
actccccga tcctggcagt ggagaagaag cacttgggtt tgggtgcagag gcttctggag	780
caagagcaca tagagattaa tgacacagac agtgatggca aacagcact gctgcttgct	840
gttgaactca aactgaagaa aatcgccgag ttgctgtgca aacgtggagc cagtacagat	900
tgtggggatc ttgttatgac agcgaggcgg aattatgacc attcccttgt gaaggttctt	960
ctctctcatg gagccaaaga agattttcac cctcctgctg aagactggaa gcctcagagc	1020

ES 2 676 470 T3

tcacactggg gggcagccct gaaggatctc cacagaatat accgccctat gattggcaaa	1080
ctcaagttct ttattgatga aaaatacaaa attgctgata cttcagaagg aggcattctac	1140
ctggggttct atgagaagca agaagtagct gtgaagacgt tctgtgaggg cagcccacgt	1200
gcacagcggg aagtctcttg tctgcaaagc agccgagaga acagtcactt ggtgacattc	1260
tatgggagtg agagccacag gggccacttg tttgtgtgtg tcaccctctg tgagcagact	1320
ctggaagcgt gtttgatgt gcacagaggg gaagatgtgg aaaatgagga agatgaattt	1380
gcccgaatg tcctgtcatc tatatttaag gctgttcaag aactacactt gtcctgtgga	1440
tacaccacc aggatctgca accacaaaac atcttaatag attctaagaa agctgctcac	1500
ctggcagatt ttgataagag catcaagtgg gctggagatc cacaggaagt caagagagat	1560
ctagaggacc ttggacggct ggtcctctat gtggtaaaga agggaagcat ctcatttgag	1620
gatctgaaag ctcaaagtaa tgaagagtg gttcaacttt ctccagatga ggaaactaag	1680
gacctattc atcgtctctt ccatcctggg gaacatgtga gggactgtct gagtgacctg	1740
ctgggtcatc ctttcttttg gacttgggag agccgctata ggacgcttcg gaatgtggga	1800
aatgaatccg acatcaaac acgaaaatct gaaagtgaga tcctcagact actgcaacct	1860
gggccttctg aacattccaa aagttttgac aagtggacga ctaagattaa tgaatgtggt	1920
atgaaaaaaaa tgaataagtt ttatgaaaa agaggcaatt tctaccagaa cactgtgggt	1980
gatctgctaa agttcatccg gaatttggga gaacacattg atgaagaaaa gcataaaaag	2040
atgaaattaa aaattggaga cccttccctg tattttcaga agacatttcc agatctggtg	2100
atctatgtct acacaaaact acagaacaca gaatatagaa agcatttccc ccaaaccac	2160
agtccaaaca agcctcagtg tgatggagct ggtggggcca gtgggttggc cagccctggg	2220
tgctga	2226

<210> 22

<211> 741

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 676 470 T3

Met Glu Ser Arg Asp His Asn Asn Pro Gln Glu Gly Pro Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Ser Gly Arg Arg Ala Ala Val Glu Asp Asn His Leu Leu Ile Lys Ala  
20 25 30

Val Gln Asn Glu Asp Val Asp Leu Val Gln Gln Leu Leu Glu Gly Gly  
35 40 45

Ala Asn Val Asn Phe Gln Glu Glu Glu Gly Gly Trp Thr Pro Leu His  
50 55 60

Asn Ala Val Gln Met Ser Arg Glu Asp Ile Val Glu Leu Leu Leu Arg  
65 70 75 80

ES 2 676 470 T3

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

ES 2 676 470 T3

Ile Tyr Arg Pro Met Ile Gly Lys Leu Lys Phe Phe Ile Asp Glu Lys  
 355 360 365

Tyr Lys Ile Ala Asp Thr Ser Glu Gly Gly Ile Tyr Leu Gly Phe Tyr  
 370 375 380

Glu Lys Gln Glu Val Ala Val Lys Thr Phe Cys Glu Gly Ser Pro Arg  
 385 390 395 400

Ala Gln Arg Glu Val Ser Cys Leu Gln Ser Ser Arg Glu Asn Ser His  
 405 410 415

Leu Val Thr Phe Tyr Gly Ser Glu Ser His Arg Gly His Leu Phe Val  
 420 425 430

Cys Val Thr Leu Cys Glu Gln Thr Leu Glu Ala Cys Leu Asp Val His  
 435 440 445

Arg Gly Glu Asp Val Glu Asn Glu Glu Asp Glu Phe Ala Arg Asn Val  
 450 455 460

Leu Ser Ser Ile Phe Lys Ala Val Gln Glu Leu His Leu Ser Cys Gly  
 465 470 475 480

Tyr Thr His Gln Asp Leu Gln Pro Gln Asn Ile Leu Ile Asp Ser Lys  
 485 490 495

Lys Ala Ala His Leu Ala Asp Phe Asp Lys Ser Ile Lys Trp Ala Gly  
 500 505 510

Asp Pro Gln Glu Val Lys Arg Asp Leu Glu Asp Leu Gly Arg Leu Val  
 515 520 525

Leu Tyr Val Val Lys Lys Gly Ser Ile Ser Phe Glu Asp Leu Lys Ala  
 530 535 540

Gln Ser Asn Glu Glu Val Val Gln Leu Ser Pro Asp Glu Glu Thr Lys  
 545 550 555 560

Asp Leu Ile His Arg Leu Phe His Pro Gly Glu His Val Arg Asp Cys  
 565 570 575

Leu Ser Asp Leu Leu Gly His Pro Phe Phe Trp Thr Trp Glu Ser Arg  
 580 585 590

Tyr Arg Thr Leu Arg Asn Val Gly Asn Glu Ser Asp Ile Lys Thr Arg  
 595 600 605

Lys Ser Glu Ser Glu Ile Leu Arg Leu Leu Gln Pro Gly Pro Ser Glu  
 610 615 620

His Ser Lys Ser Phe Asp Lys Trp Thr Thr Lys Ile Asn Glu Cys Val

ES 2 676 470 T3

625					630						635					640
Met	Lys	Lys	Met	Asn 645	Lys	Phe	Tyr	Glu	Lys 650	Arg	Gly	Asn	Phe	Tyr 655	Gln	
Asn	Thr	Val	Gly 660	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe 665	Ile	Arg	Asn	Leu	Gly 670	Glu	His	
Ile	Asp	Glu 675	Glu	Lys	His	Lys	Lys 680	Met	Lys	Leu	Lys	Ile 685	Gly	Asp	Pro	
Ser	Leu 690	Tyr	Phe	Gln	Lys	Thr 695	Phe	Pro	Asp	Leu	Val 700	Ile	Tyr	Val	Tyr	
Thr 705	Lys	Leu	Gln	Asn	Thr 710	Glu	Tyr	Arg	Lys	His 715	Phe	Pro	Gln	Thr	His 720	
Ser	Pro	Asn	Lys	Pro 725	Gln	Cys	Asp	Gly	Ala 730	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly 735	Leu	
Ala	Ser	Pro	Gly 740	Cys												

<210> 23

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> virus vaccinia

<400> 23

ES 2 676 470 T3

atgacgatga aaatgatggt acatatatat ttcgtatcat tattgttatt gctattccac 60  
 agttacgcca tagacatcga aaatgaaatc acagaattct tcaataaaat gagagatact 120  
 ctaccagcta aagactctaa atggttgaat ccagcatgta tgttcggagg cacaatgaat 180  
 gatatagccg ctctaggaga gccattcagc gcaaagtgtc ctcttattga agacagtctt 240  
 ttatcgaca gatataaaga ctatgtggtt aaatgggaaa ggctagaaaa aaatagacgg 300  
 cgacaggttt ctaataaacg tgtaaacaat ggtgatttat ggatagccaa ctatacatct 360  
 aaattcagta accgtaggta tttgtgcacc gtaactacaa agaatggtga ctgtgttcag 420  
 ggtatagtta gatctcatat tagaaaacct cttcatgca ttccaaaaac atatgaacta 480  
 ggtactcatg ataagtatgg catagactta tactgtggaa ttctttacgc aaaacattat 540  
 aataatataa cttggtataa agataataag gaaattaata tcgacgacat taagtattca 600  
 caaacgggaa aggaattaat tattcataat ccagagttag aagatagcgg aagatacgac 660  
 tgttacgttc attacgacga cgttagaatc aagaatgata tcgtagtadc aagatgtaaa 720  
 atacttacgg ttataaccgtc acaagaccac aggtttaaac taatactaga tccaaaaatc 780  
 aacgtaacga taggagaacc tgccaatata acatgcactg ctgtgtcaac gtcattattg 840  
 attgacgatg tactgattga atgggaaaat ccatccggat ggcttatagg attcgatttt 900  
 gatgtatact ctgttttaac tagtagaggc ggtattaccg aggcgacctt gtactttgaa 960  
 aatgttactg aagaatatat aggtaataca tataaatgtc gtggacacaa ctattatttt 1020  
 gaaaaaaccc ttacaactac agtagtattg gagtaa 1056

<210> 24

<211> 351

5 <212> PRT

<213> virus vaccinia

<400> 24

ES 2 676 470 T3

Met Thr Met Lys Met Met Val His Ile Tyr Phe Val Ser Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Phe His Ser Tyr Ala Ile Asp Ile Glu Asn Glu Ile Thr Glu  
20 25 30

Phe Phe Asn Lys Met Arg Asp Thr Leu Pro Ala Lys Asp Ser Lys Trp  
35 40 45

Leu Asn Pro Ala Cys Met Phe Gly Gly Thr Met Asn Asp Ile Ala Ala  
50 55 60

Leu Gly Glu Pro Phe Ser Ala Lys Cys Pro Pro Ile Glu Asp Ser Leu  
65 70 75 80

Leu Ser His Arg Tyr Lys Asp Tyr Val Val Lys Trp Glu Arg Leu Glu  
85 90 95

Lys Asn Arg Arg Arg Gln Val Ser Asn Lys Arg Val Lys His Gly Asp  
100 105 110

Leu Trp Ile Ala Asn Tyr Thr Ser Lys Phe Ser Asn Arg Arg Tyr Leu  
115 120 125

Cys Thr Val Thr Thr Lys Asn Gly Asp Cys Val Gln Gly Ile Val Arg  
130 135 140

Ser His Ile Arg Lys Pro Pro Ser Cys Ile Pro Lys Thr Tyr Glu Leu  
145 150 155 160

Gly Thr His Asp Lys Tyr Gly Ile Asp Leu Tyr Cys Gly Ile Leu Tyr  
165 170 175

Ala Lys His Tyr Asn Asn Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asn Lys Glu Ile  
180 185 190

Asn Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Gln Thr Gly Lys Glu Leu Ile Ile  
195 200 205

His Asn Pro Glu Leu Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Asp Cys Tyr Val His  
210 215 220

Tyr Asp Asp Val Arg Ile Lys Asn Asp Ile Val Val Ser Arg Cys Lys



ES 2 676 470 T3

<400> 26

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

<210> 27

5 <211> 267

<212> ADN

<213> virus vaccinia

<400> 27

ES 2 676 470 T3

atgcttgcac tttgttattc gttgcccaat gcgggtgatg taataaaggg cagagtatac 60  
 gagaaggatt atgctctata tatttatctt tttgactatc ctcactttga agctatcttg 120  
 gcagagagtg ttaagatgca tatggataga tatgttgaat atagggataa actggtaggg 180  
 aaaactgtaa aagttaaagt gattagagtt gattatacaa aaggatatat agatgtcaat 240  
 tacaaaagga tgtgtagaca tcaataa 267

<210> 28

<211> 88

<212> PRT

5 <213> virus vaccinia

<400> 28

Met Leu Ala Phe Cys Tyr Ser Leu Pro Asn Ala Gly Asp Val Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Val Tyr Glu Lys Asp Tyr Ala Leu Tyr Ile Tyr Leu Phe Asp  
 20 25 30  
 Tyr Pro His Phe Glu Ala Ile Leu Ala Glu Ser Val Lys Met His Met  
 35 40 45  
 Asp Arg Tyr Val Glu Tyr Arg Asp Lys Leu Val Gly Lys Thr Val Lys  
 50 55 60  
 Val Lys Val Ile Arg Val Asp Tyr Thr Lys Gly Tyr Ile Asp Val Asn  
 65 70 75 80  
 Tyr Lys Arg Met Cys Arg His Gln  
 85

<210> 29

10 <211> 685

<212> PRT

<213> virus hepatitis C

<400> 29

ES 2 676 470 T3

Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys  
1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu  
20 25 30

Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile  
35 40 45

Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile  
50 55 60

Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln  
65 70 75 80

Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro  
85 90 95

Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp  
100 105 110

Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser  
115 120 125

Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu  
130 135 140

Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr  
145 150 155 160

ES 2 676 470 T3

Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu  
 165 170 175  
 Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala  
 180 185 190  
 Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser  
 195 200 205  
 Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys  
 210 215 220  
 Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Val Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val  
 245 250 255  
 Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys  
 260 265 270  
 Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile  
 275 280 285  
 Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly  
 290 295 300  
 Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Ser His Pro Asn Ile  
 325 330 335  
 Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys  
 340 345 350  
 Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys  
 355 360 365  
 His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu  
 370 375 380  
 Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile  
 385 390 395 400  
 Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ser Thr Asp Ala Leu Met Thr  
 405 410 415  
 Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val  
 420 425 430

ES 2 676 470 T3

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr  
 435 440 445  
 Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg  
 450 455 460  
 Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp  
 485 490 495  
 Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg  
 500 505  
 Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His  
 515 520 525  
 Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala  
 530 535 540  
 His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu  
 545 550 555 560  
 Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro  
 565 570 575  
 Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu  
 580 585 590  
 His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu  
 595 600 605  
 Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser  
 610 615 620  
 Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val  
 625 630 635 640  
 Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile  
 645 650 655  
 Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg  
 660 665 670  
 Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys  
 675 680 685

<210> 30

<211> 263

<212> PRT

<213> virus herpes simplex

5 <400> 30

ES 2 676 470 T3

Met Ala Arg Arg Arg Arg His Arg Gly Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro  
1 5 10 15

Gly Pro Thr Gly Ala Val Pro Thr Ala Gln Ser Gln Val Thr Ser Thr  
20 25 30

Pro Asn Ser Glu Pro Ala Val Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Pro Pro  
35 40 45

Pro Pro Pro Ala Ser Gly Pro Pro Pro Ser Cys Ser Leu Leu Leu Arg  
50 55 60

Gln Trp Leu His Val Pro Glu Ser Ala Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
65 70 75 80

Asp Trp Pro Asp Ser Pro Pro Pro Glu Pro Ala Pro Glu Ala Arg Pro  
85 90 95

Thr Ala Ala Ala Pro Arg Pro Arg Ser Pro Pro Pro Gly Ala Gly Pro  
100 105 110

Gly Gly Gly Ala Asn Pro Ser His Pro Pro Ser Arg Pro Phe Arg Leu  
115 120 125

Pro Pro Arg Leu Ala Leu Arg Leu Arg Val Thr Ala Glu His Leu Ala  
130 135 140

Arg Leu Arg Leu Arg Arg Ala Gly Gly Glu Gly Ala Pro Glu Pro Pro  
145 150 155 160

Ala Thr Pro Ala  
165 170 175

Thr Pro Ala Arg  
180 185 190

Val Arg Phe Ser Pro His Val Arg Val Arg His Leu Val Val Trp Ala  
195 200 205

Ser Ala Ala Arg Leu Ala Arg Arg Gly Ser Trp Ala Arg Glu Arg Ala  
210 215 220

Asp Arg Ala Arg Phe Arg Arg Arg Val Ala Glu Ala Glu Ala Val Ile  
225 230 235 240

Gly Pro Cys Leu Gly Pro Glu Ala Arg Ala Arg Ala Leu Ala Arg Gly  
245 250 255

Ala Gly Pro Ala Asn Ser Val  
260

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para expresar ARN en una célula, que comprende los pasos de (i) evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular proporcionando virus vaccinia B18R a la célula en forma de ARN que codifica B18R, y (ii) inhibir señalización de IFN intracelular proporcionando virus vaccinia E3 a la célula en la forma o ARN que codifica E3 y proporcionando virus vaccinia K3 a la célula en forma de ARN que codifica K3.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el ARN que se va a expresar en la célula se ha introducido en la célula.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el ARN que se va a expresar en la célula ha sido introducido repetidamente en la célula.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el ARN que se va a expresar en la célula ha sido introducido en la célula mediante electroporación o lipofección.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ARN que se va a expresar en la célula es ARN transcrito *in vitro*.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ARN expresado en la célula no está modificado por pseudouridina y/o 5-metilcitosina.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula es una célula que tiene una función de barrera, preferiblemente un fibroblasto, un queratinocito, una célula epitelial o una célula endotelial.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la célula endotelial es una célula endotelial del corazón, una célula endotelial del pulmón o una célula endotelial de la vena umbilical.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula es una célula humana.
10. Un método para proporcionar células que tienen características de células madre que comprende las etapas de (i) proporcionar una población celular que comprende células somáticas, (ii) evitar el acoplamiento del receptor de IFN de las células somáticas por IFN extracelular proporcionando virus vaccinia B18R a las células somáticas en forma de ARN que codifica B18R, (iii) inhibir la señalización intracelular de IFN en las células somáticas proporcionando virus vaccinia E3 a las células somáticas en forma de ARN que codifica E3 y proporcionando virus vaccinia K3 a las células somáticas en forma de ARN que codifica K3, (iv) 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 las células somáticas, y (v) permitir el desarrollo de células que tienen características de células madre.
11. El método de la reivindicación 10, que comprende además introducir en las células somáticas miARN que potencia la reprogramación de las células somáticas que tienen características de células madre.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde uno o más factores comprenden OCT4 y SOX2.
13. El método de la reivindicación 12, en donde uno o más factores comprenden además KLF4 y/o c-MYC.
14. El método de la reivindicación 12 o 13, donde el uno o más factores comprenden además NANOG y/o LIN28.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde uno o más factores comprenden OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC.
16. El método de la reivindicación 15, en donde uno o más factores comprenden además LIN28 y opcionalmente NANOG.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde uno o más factores comprenden OCT4, SOX2, NANOG y LIN28.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, que comprende además la etapa de cultivar las células somáticas en presencia de al menos un inhibidor de la histona de acetilasa, preferiblemente ácido valproico.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en donde la etapa (v) comprende cultivar las células somáticas en condiciones de cultivo de células madre embrionarias.
20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, en donde las características de células madre comprenden una morfología de células madre embrionarias, en donde las células que tienen características de células madre tienen preferiblemente 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 las células madre embrionarias.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20, en donde las células que tienen características de células madre exhiben un estado pluripotente.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21, en donde las células que tienen características de células madre tienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en derivados avanzados de las tres capas germinales primarias.
- 5 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 22, en donde las células somáticas son fibroblastos, preferiblemente fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio o fibroblastos dérmicos.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 23, en donde las células somáticas son células humanas.
25. 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 una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 24, y (ii) cultivar  
10 las células que tienen características de células madre en condiciones que inducen diferenciación parcial o completa directa a un tipo de célula diferenciada.
26. Una composición que comprende (i) un agente útil para evitar el acoplamiento del receptor de IFN por IFN extracelular, siendo dicho agente ácido nucleico que codifica el virus de vacuna B18R y (ii) un agente útil para inhibir la señalización de IFN intracelular, siendo dicho agente ácido nucleico que codifica E3 y un ácido nucleico que codifica K3, en donde el  
15 ácido nucleico es ARN.
27. Un kit que comprende la composición de la reivindicación 26.

Figura 1

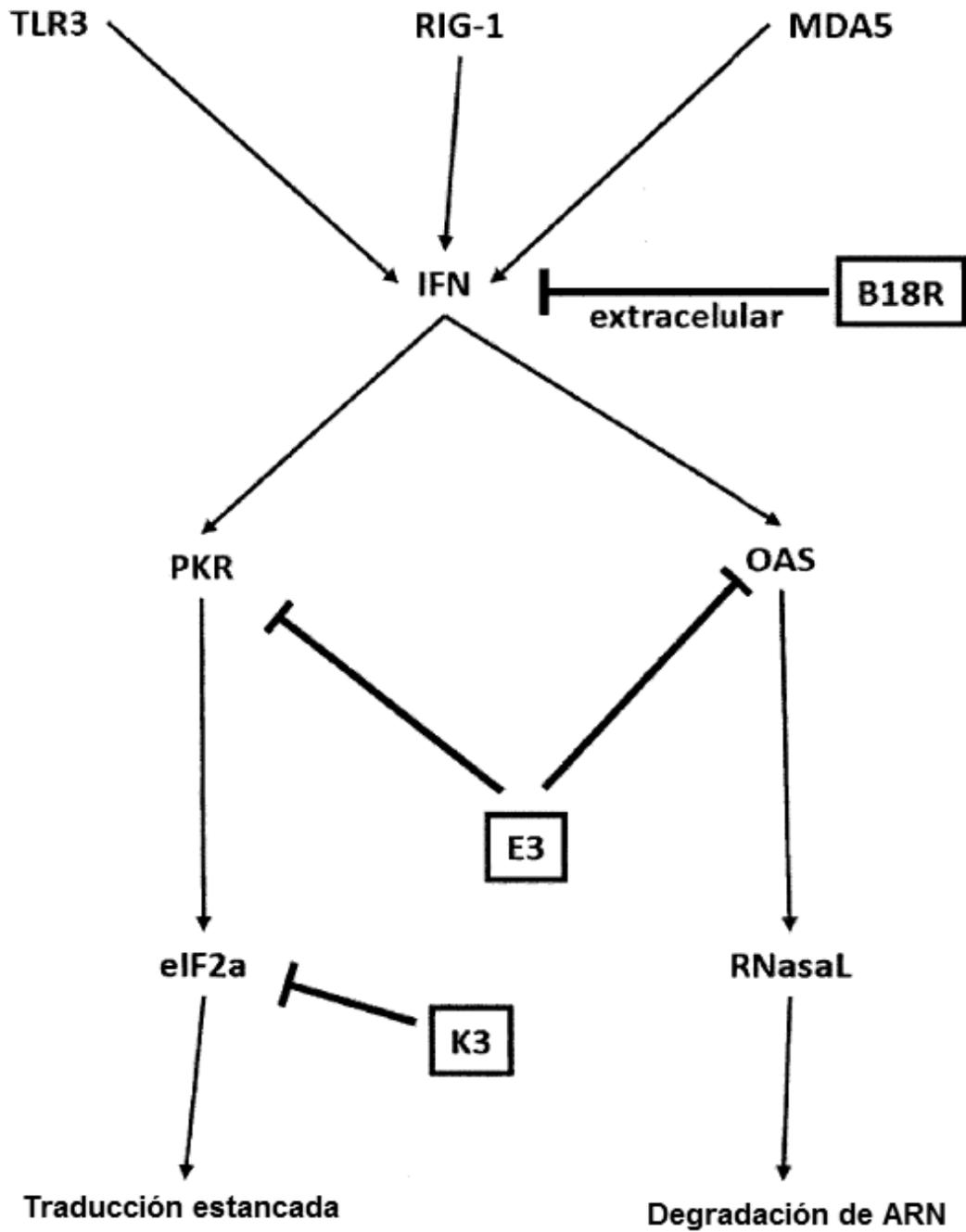


Figura 2

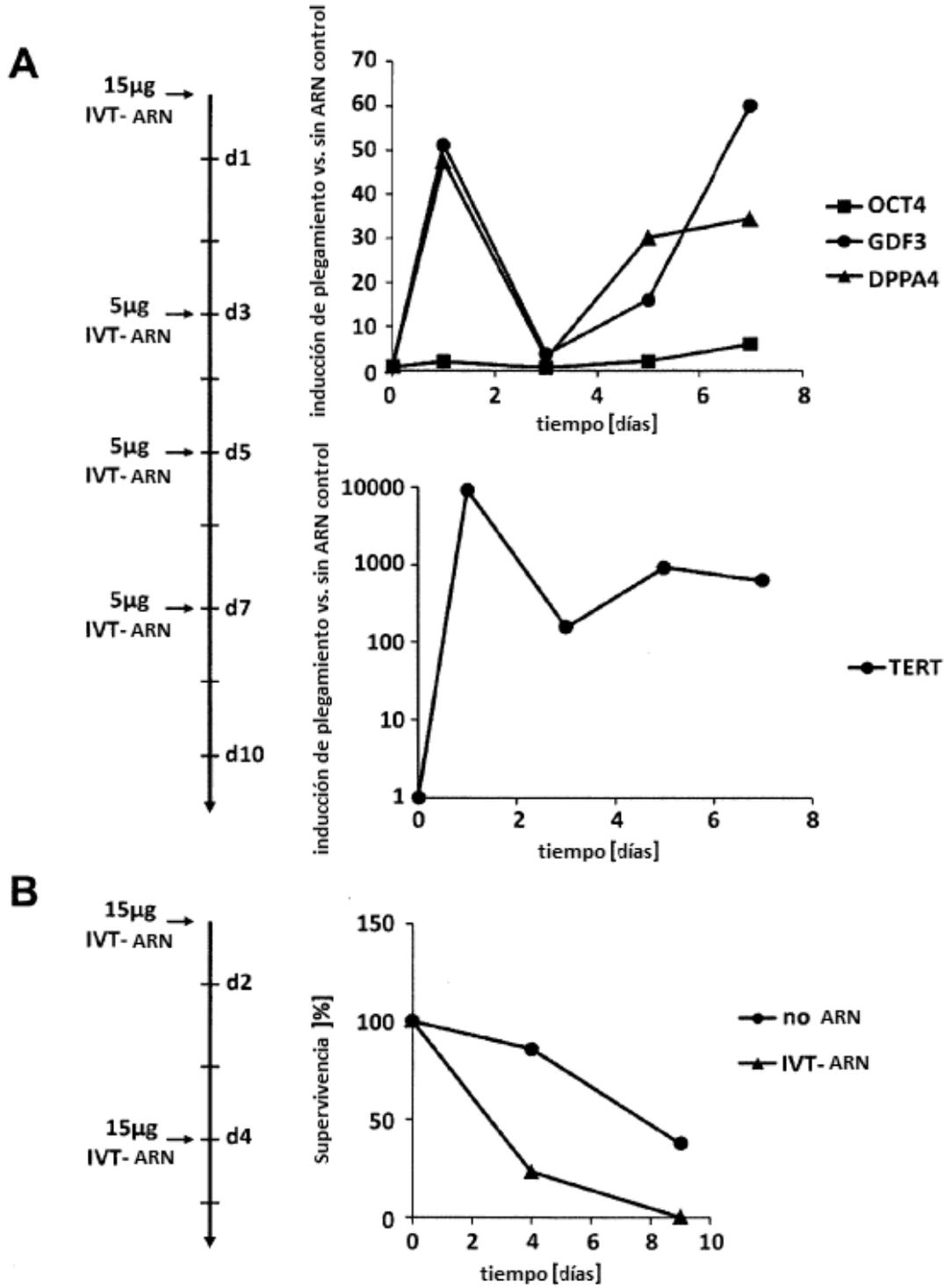


Figura 2

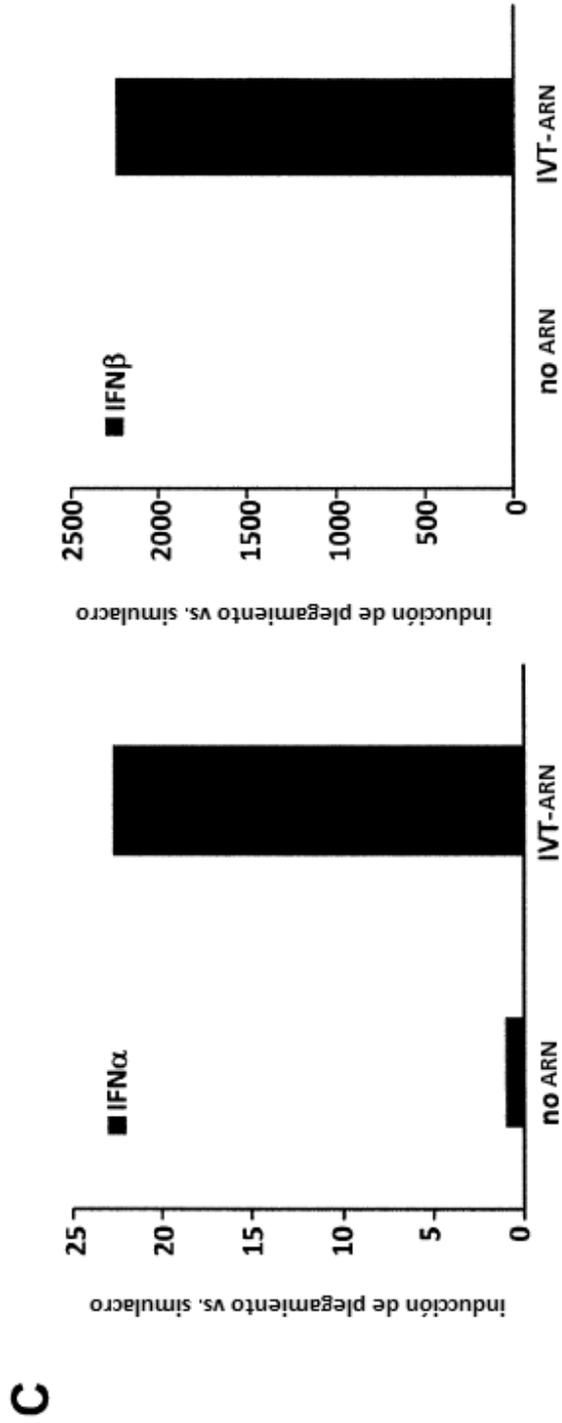




Figura 3

**A**

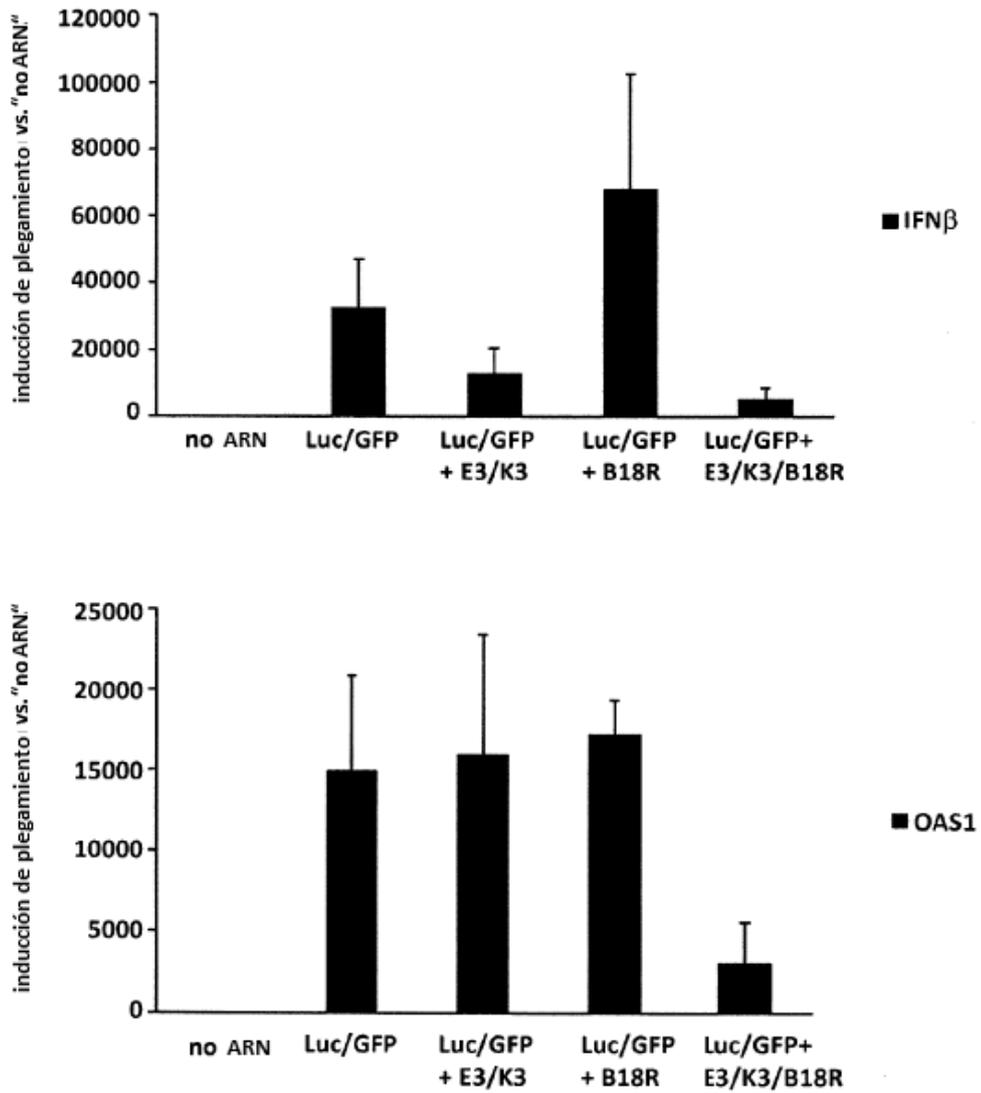
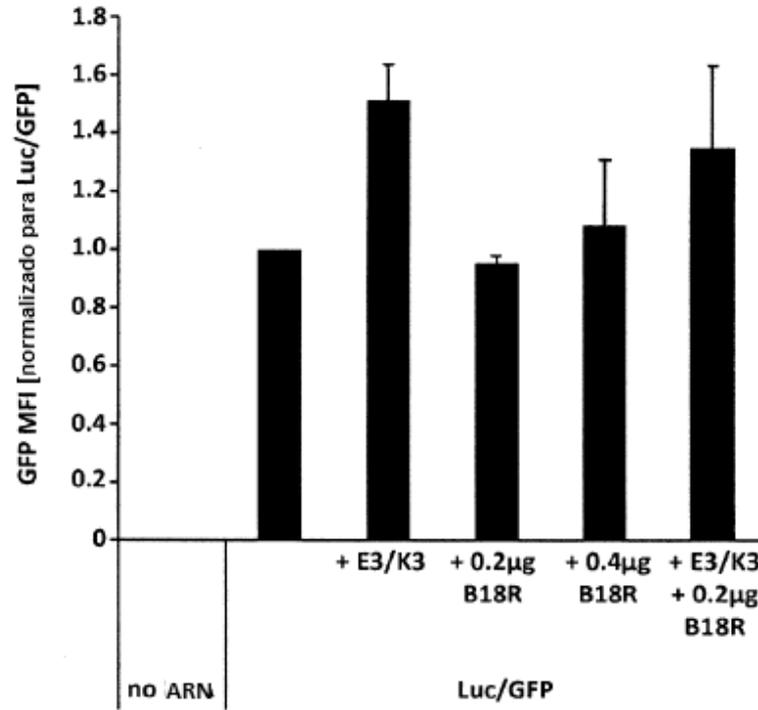


Figura 3

**B**



**C**

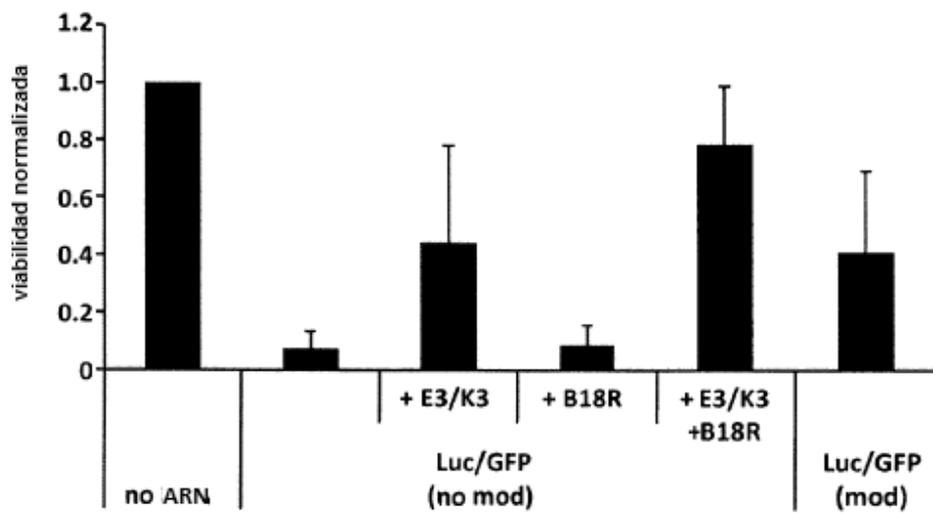


Figura 4

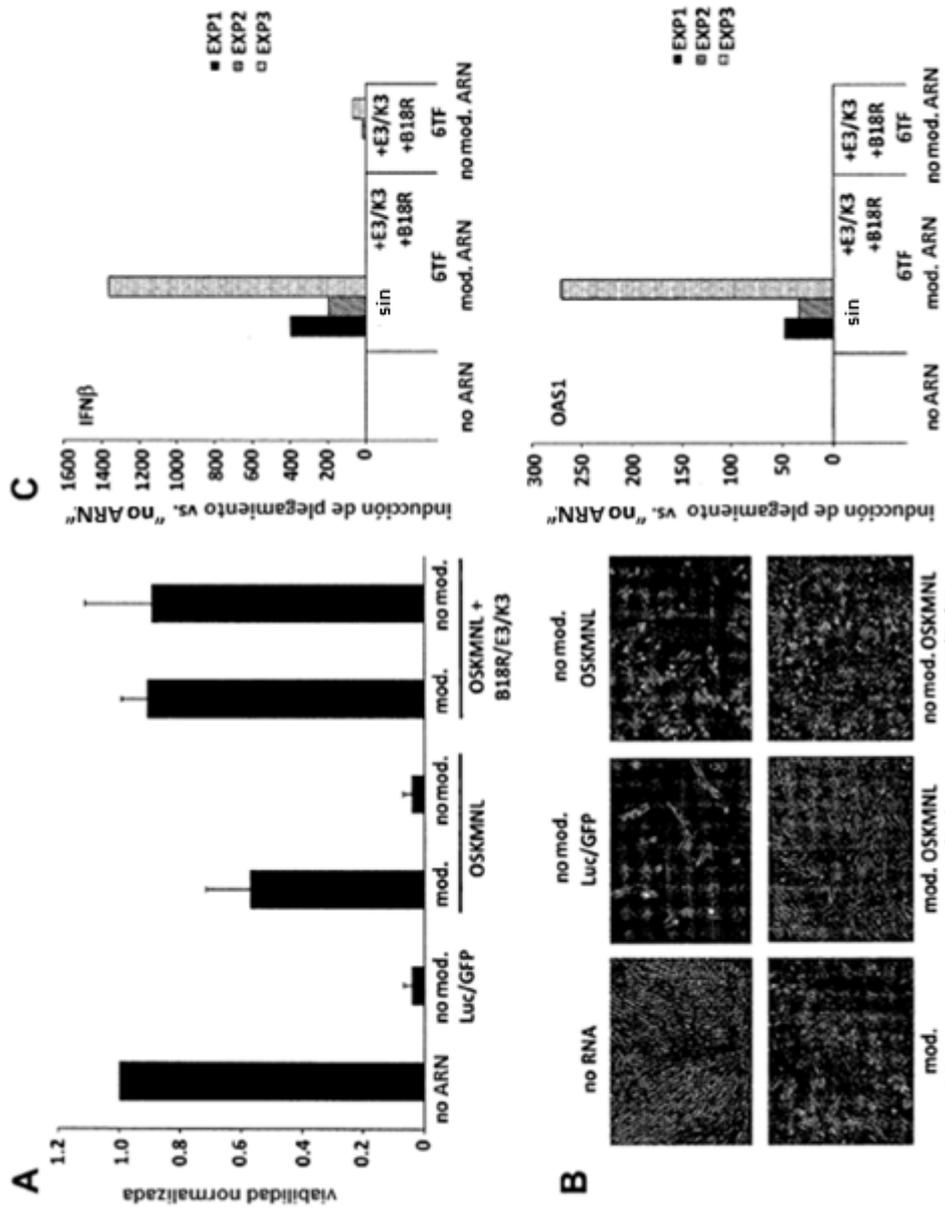


Figura 5

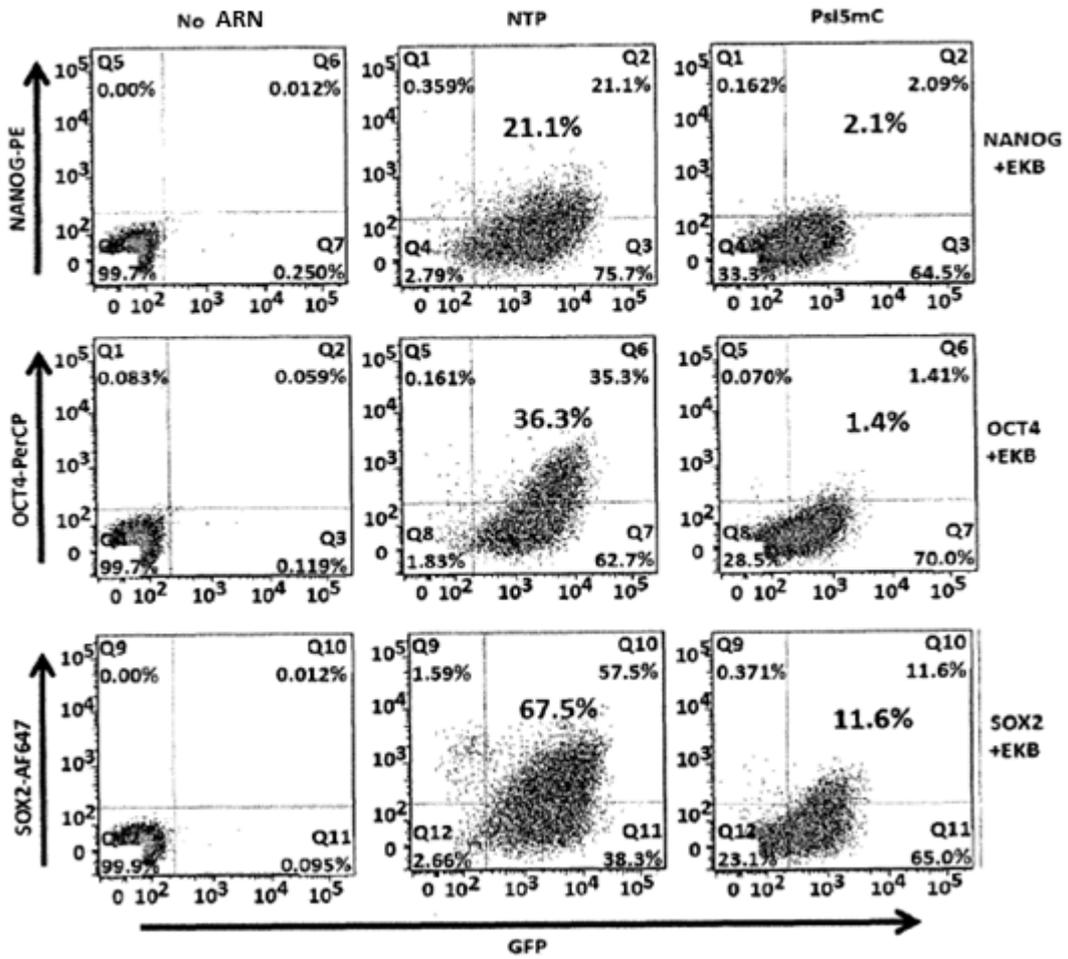


Figura 6

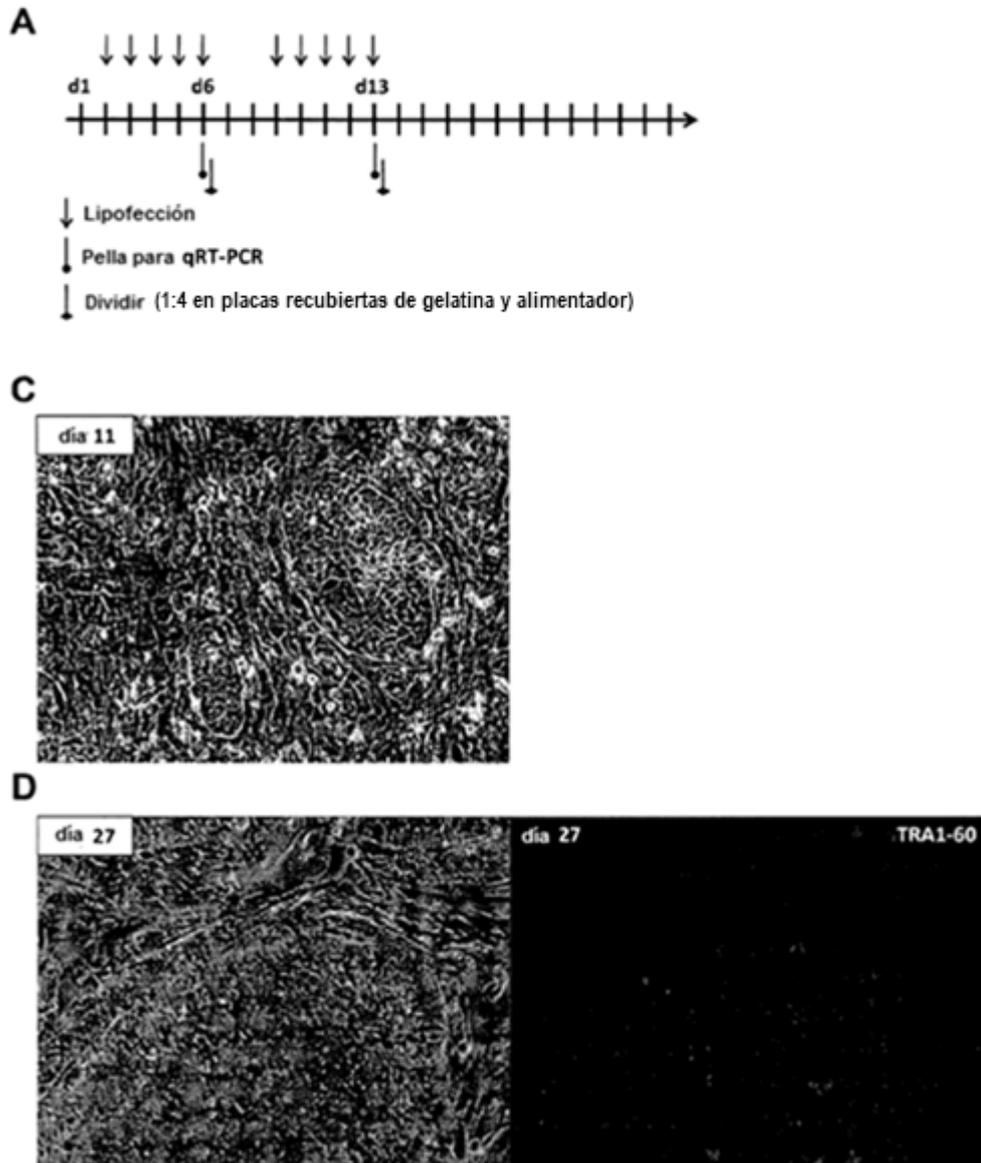






Figura 7

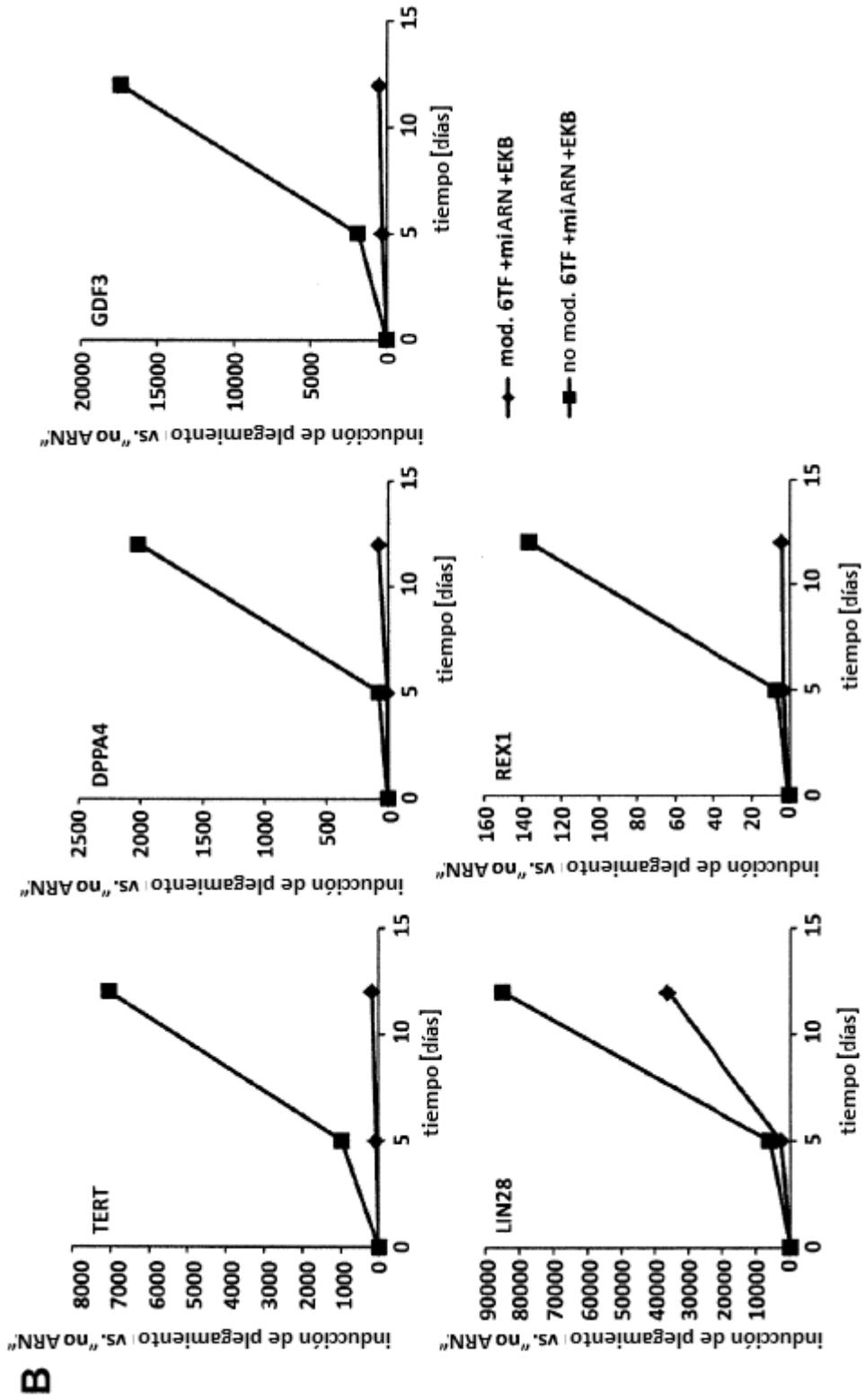


Figura 8

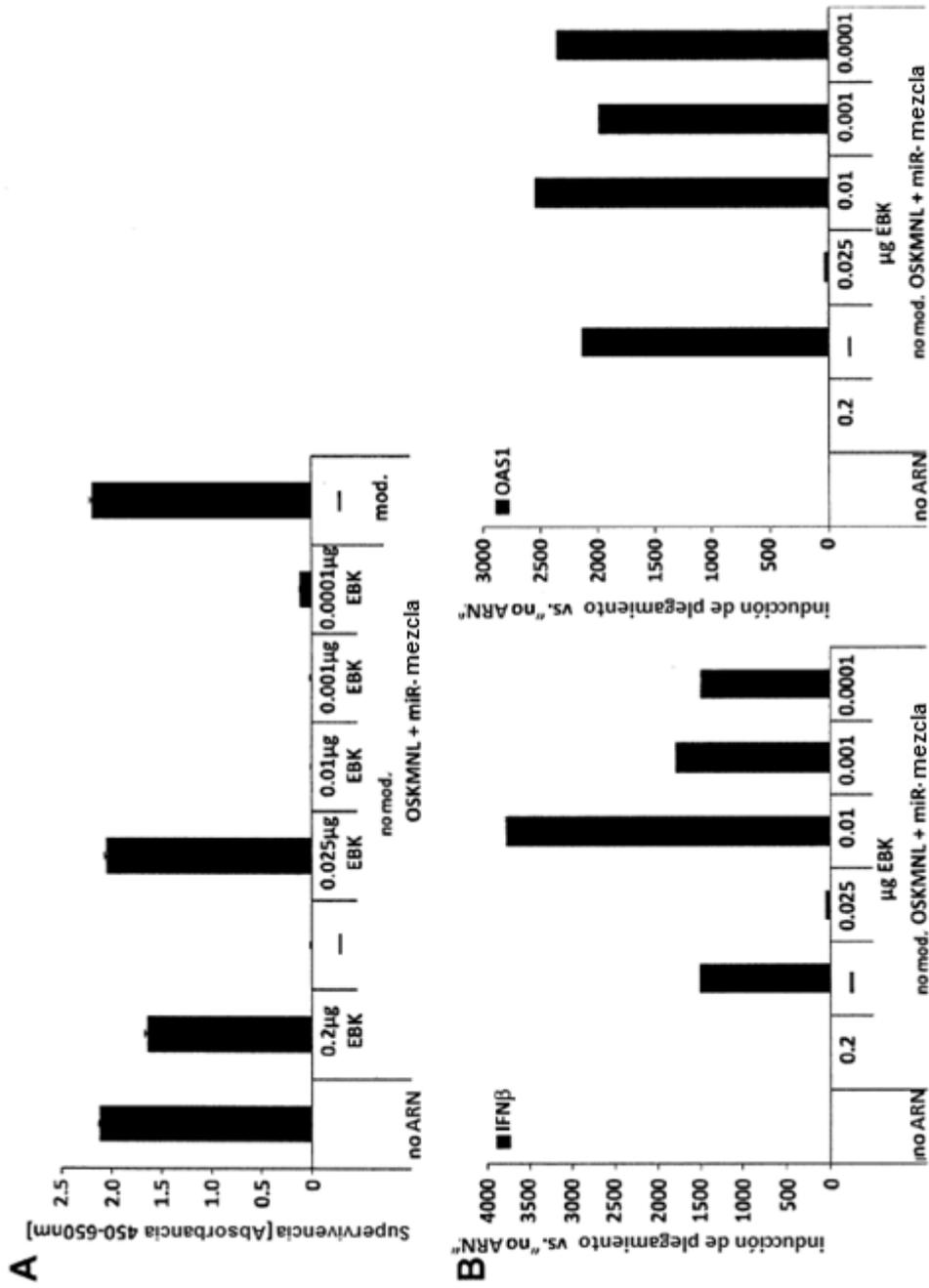


Figura 9

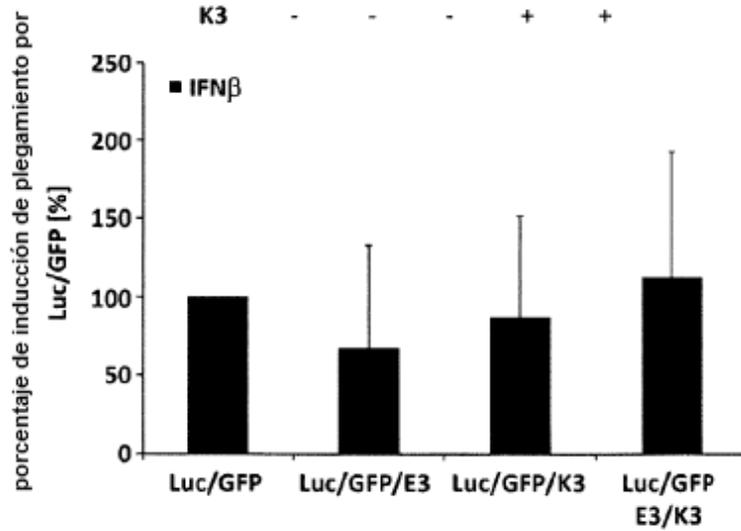
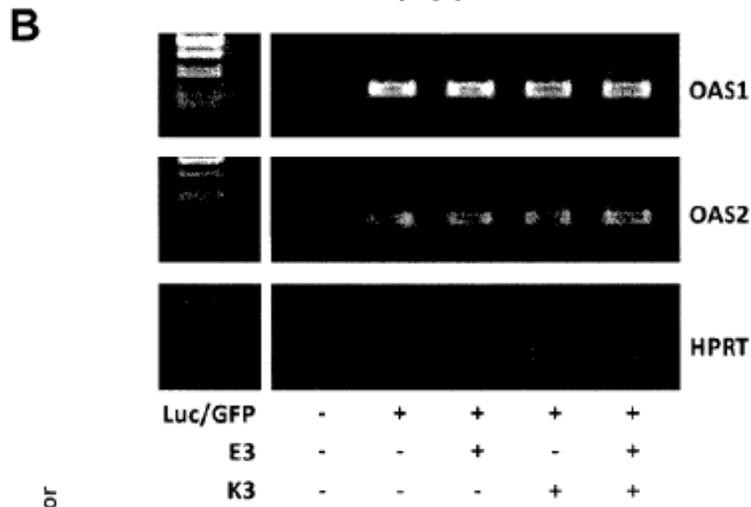
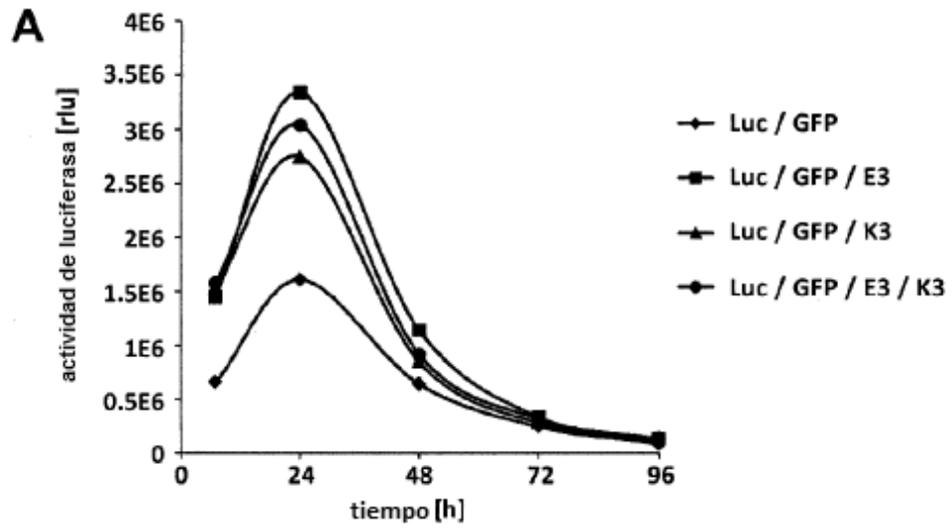


Figura 10

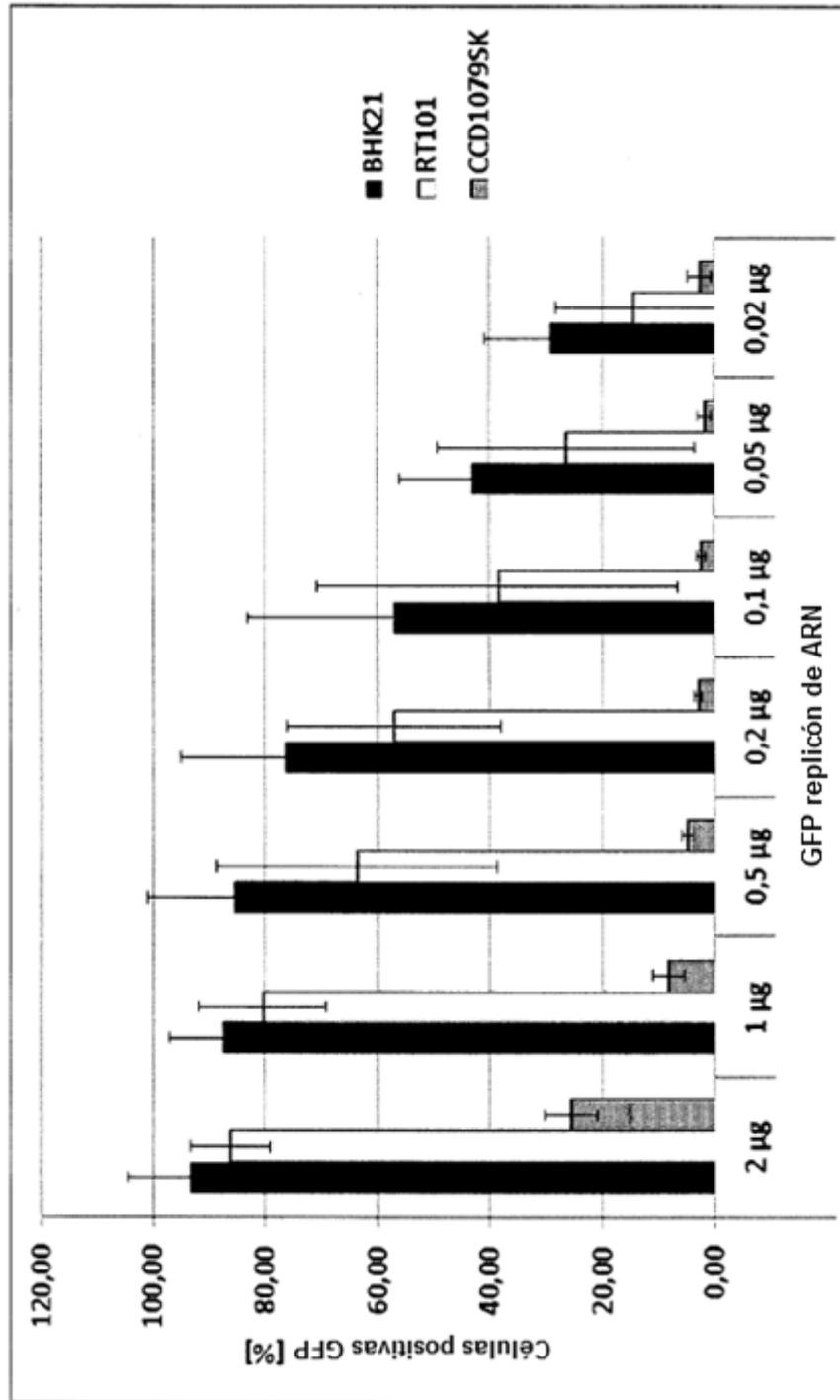


Figura 11

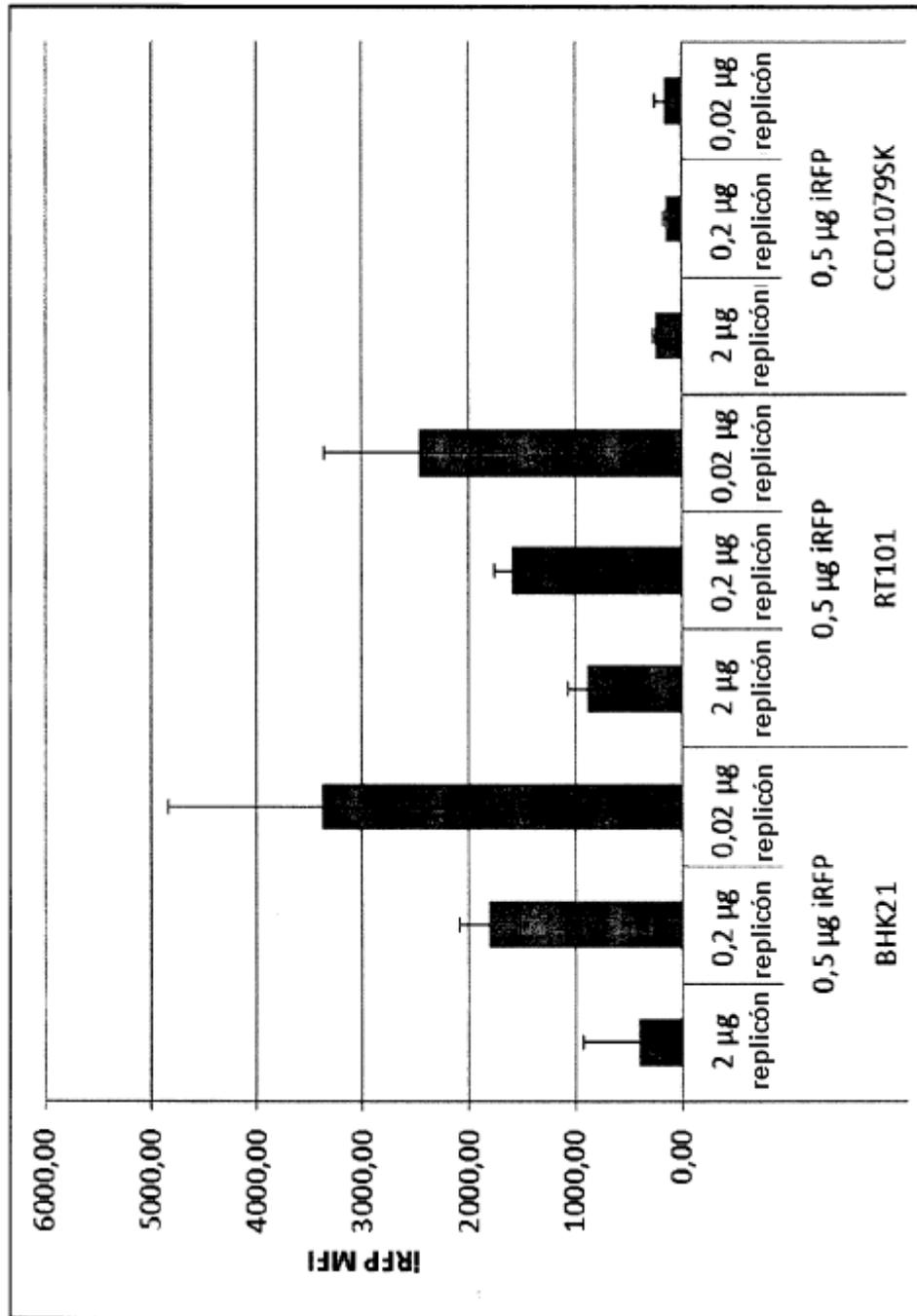


Figura 12

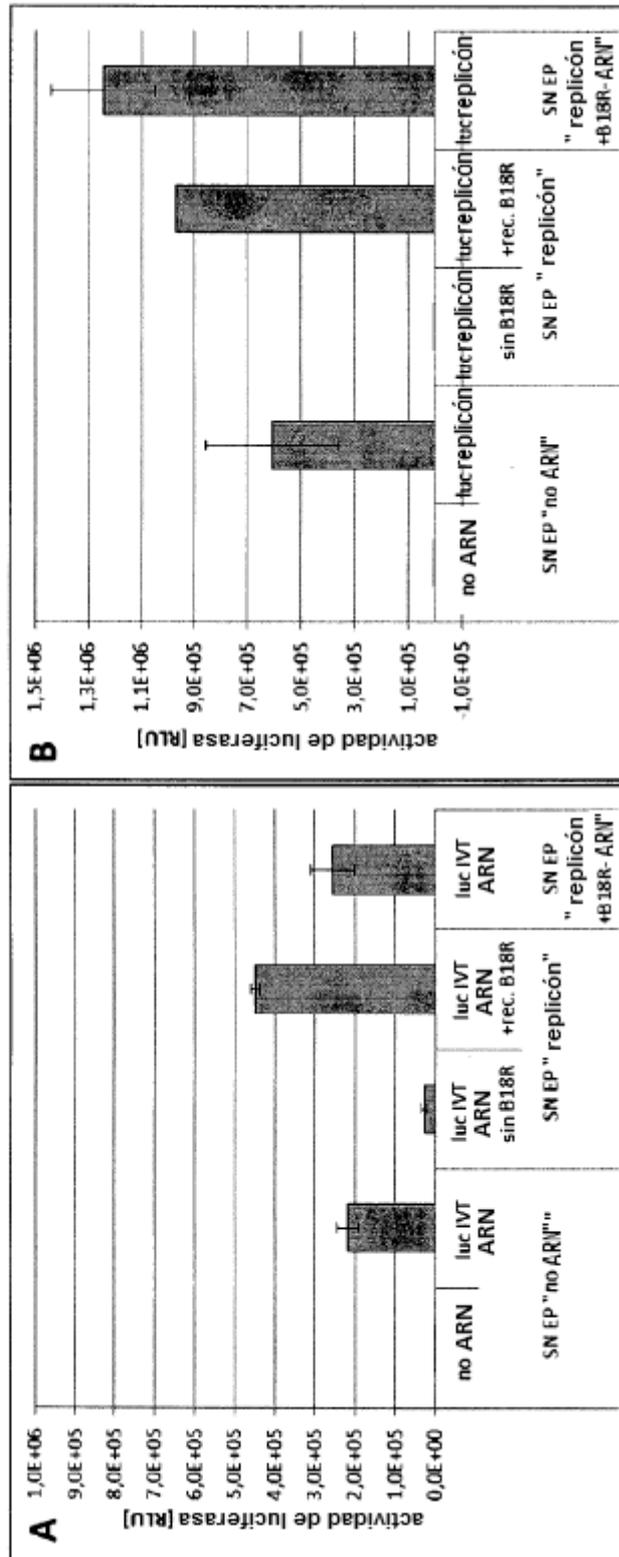


Figura 13

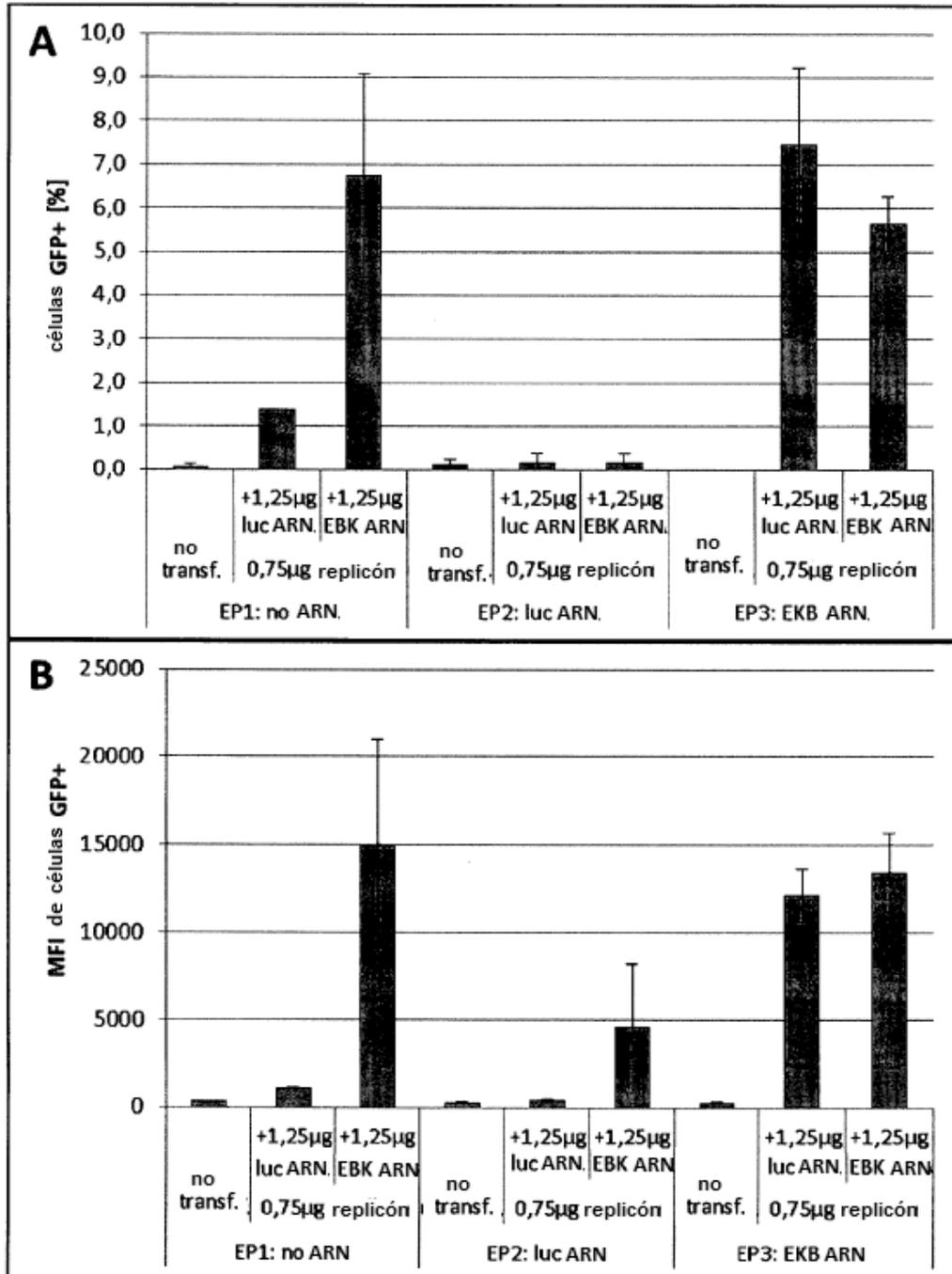




Figura 15

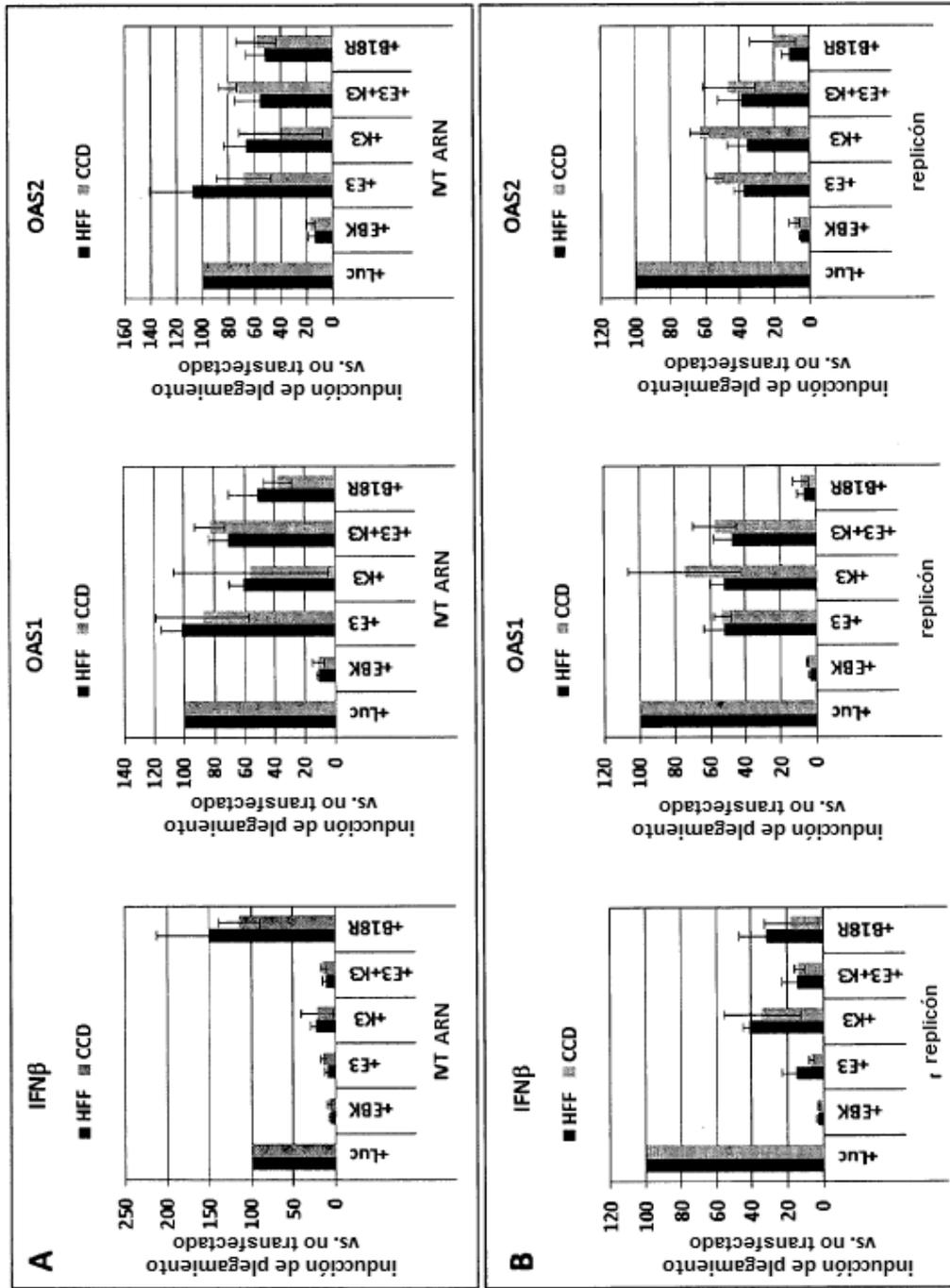


Figura 16

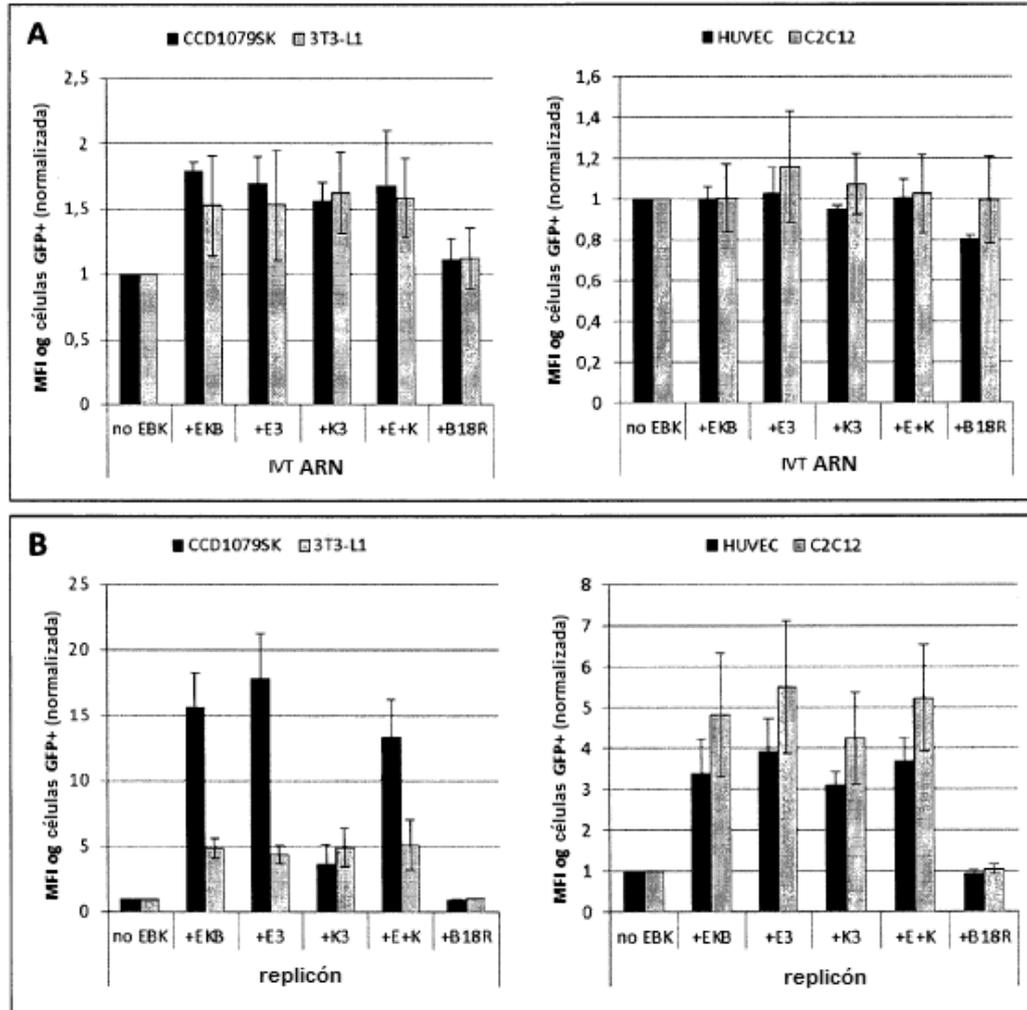


Figura 17

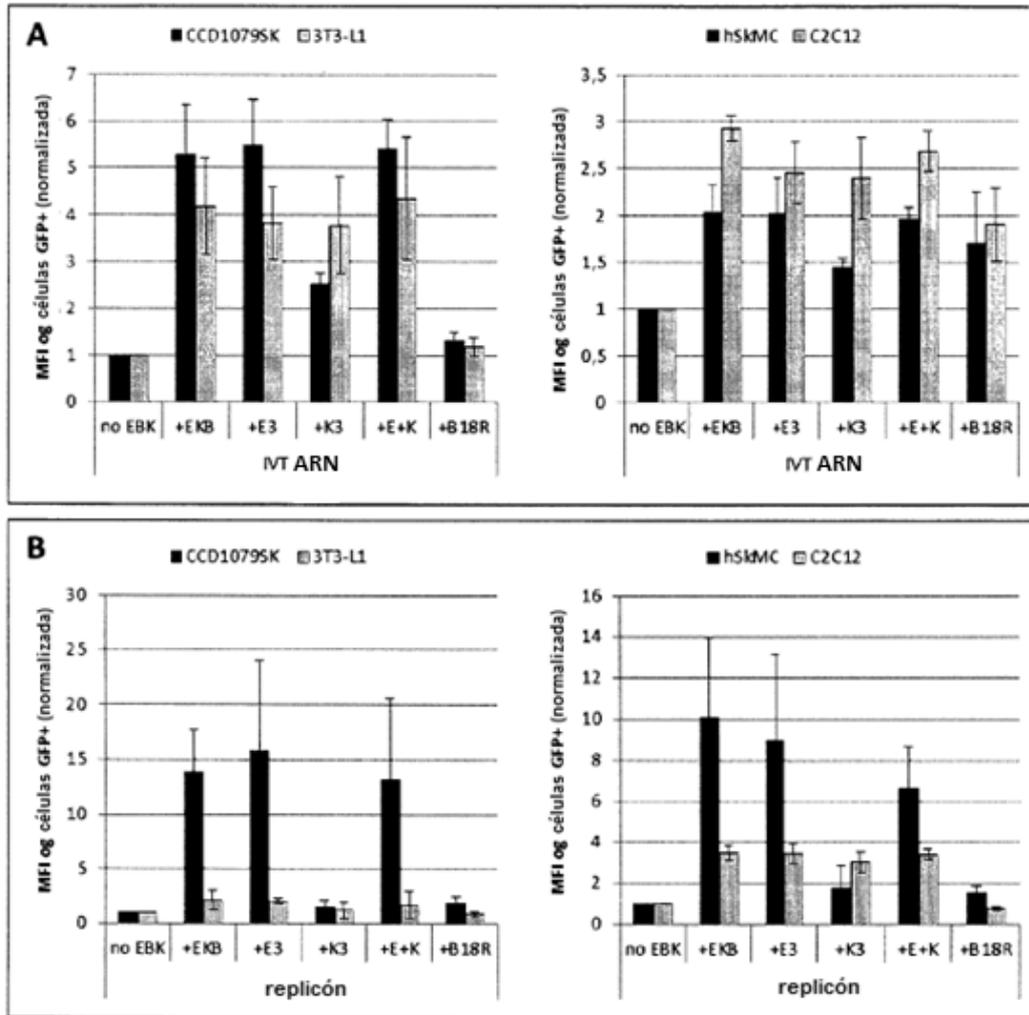


Figura 18

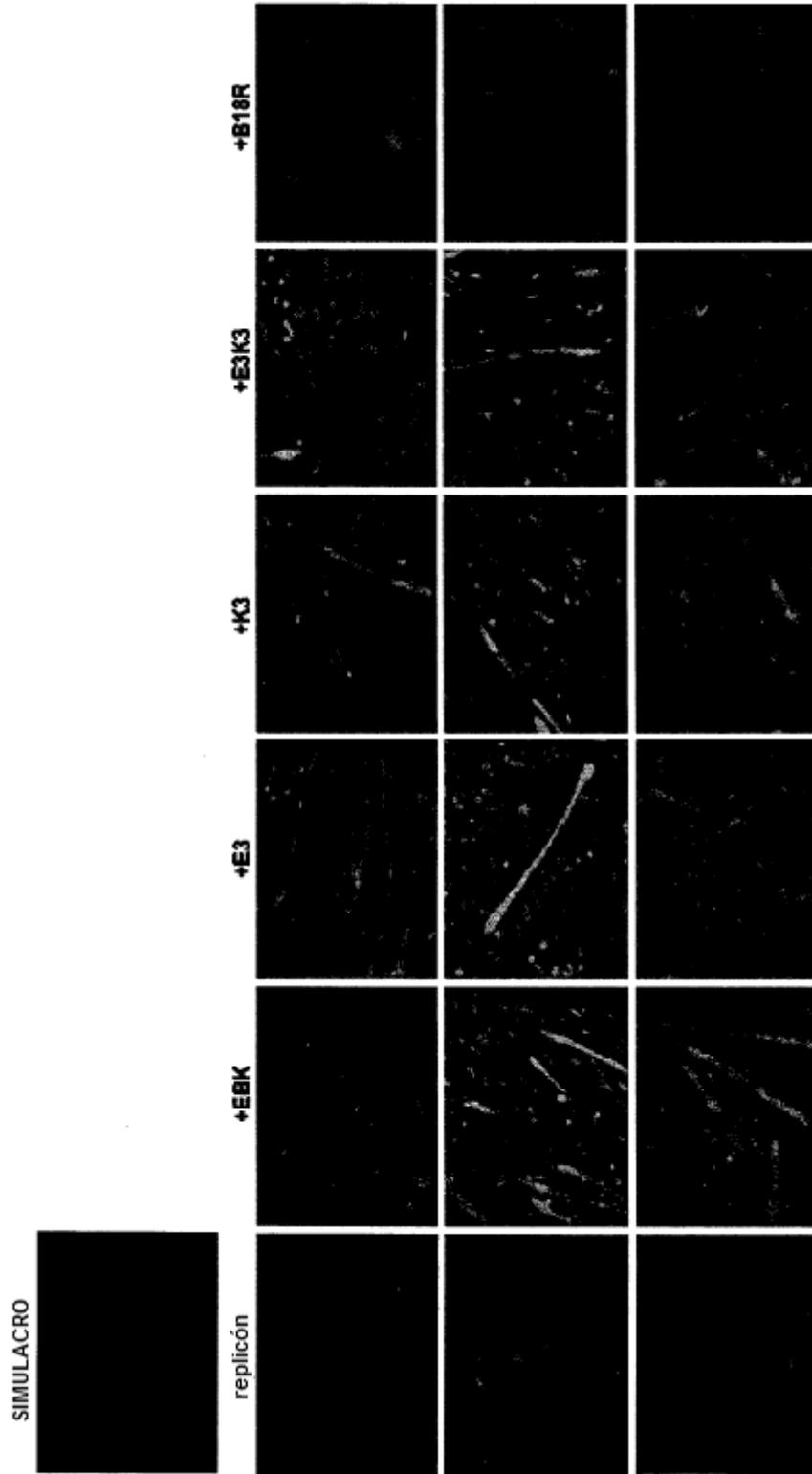


Figura 19

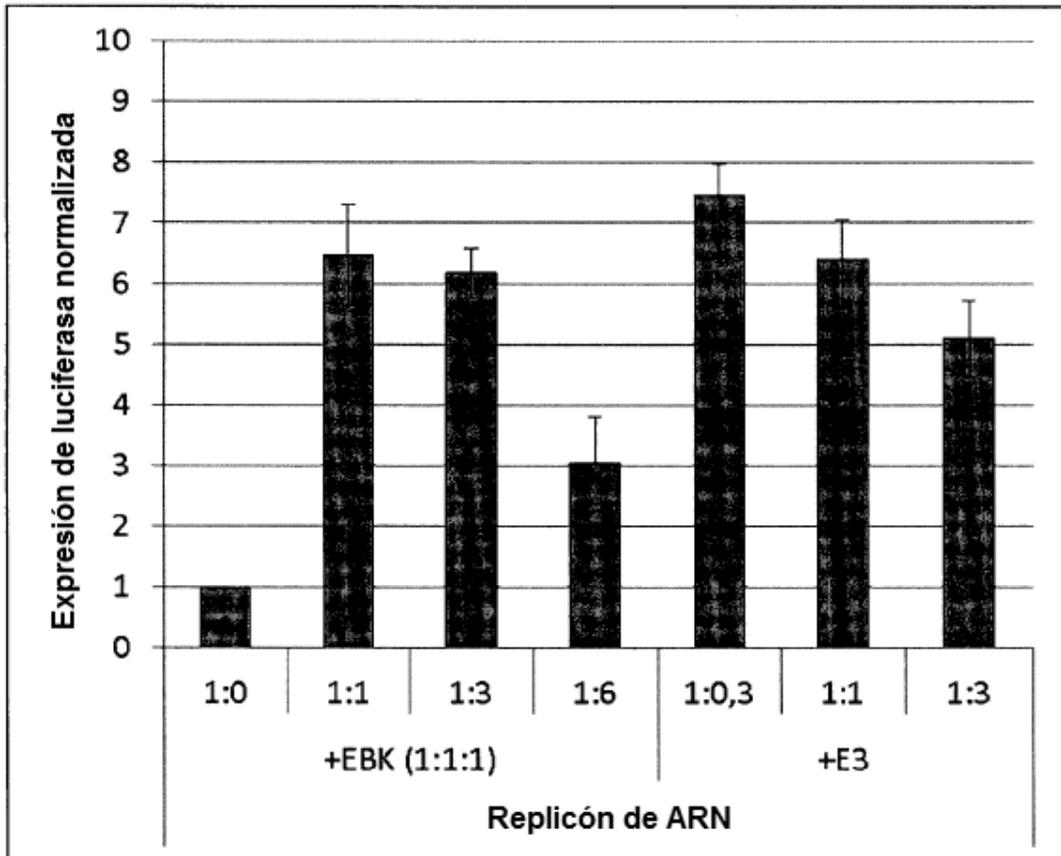


Figura 20

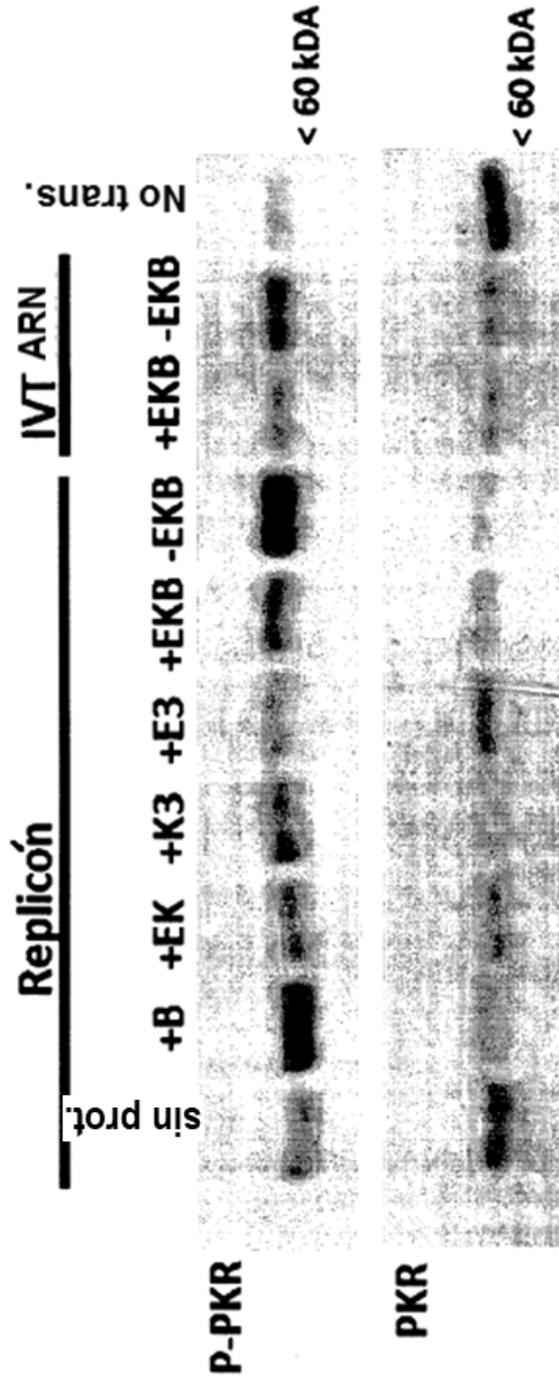


Figura 21

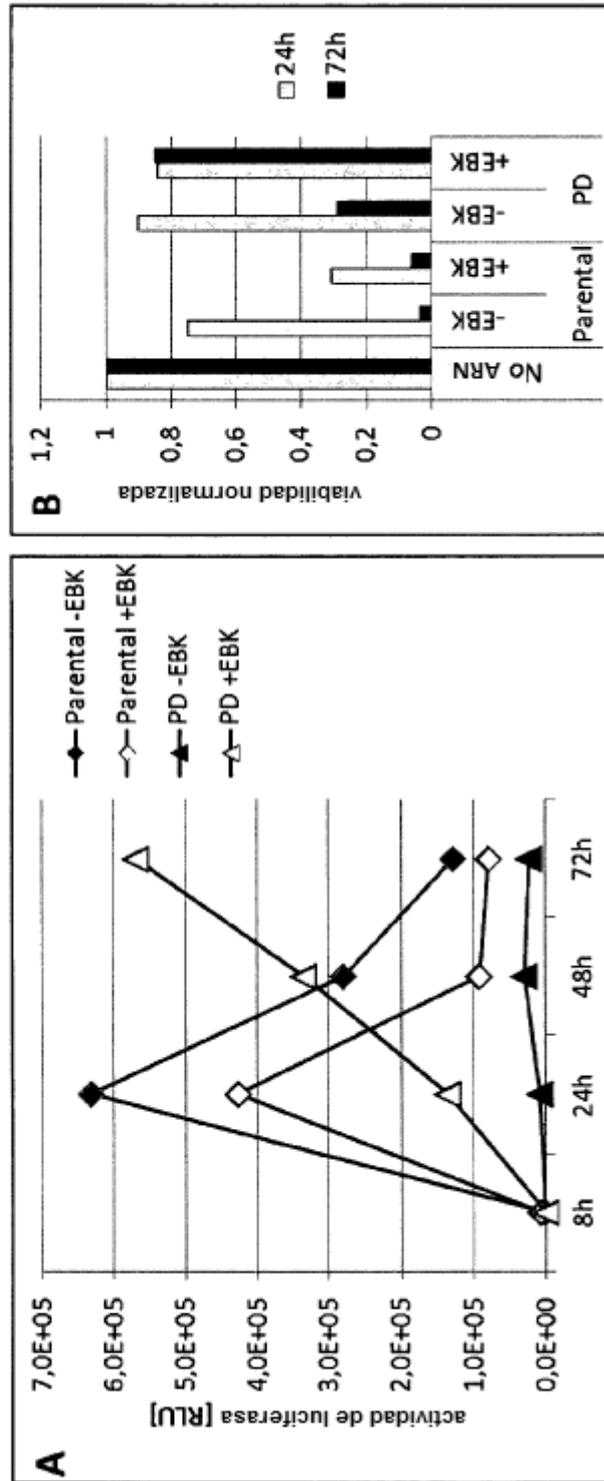


Figura 22

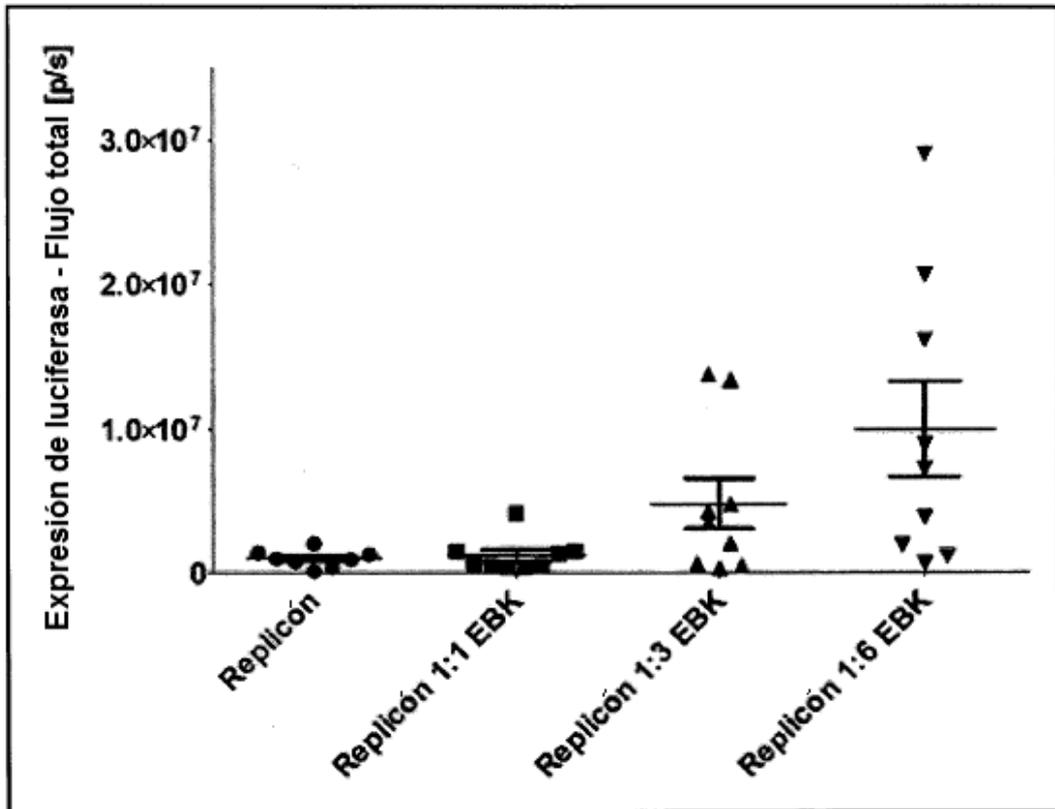


Figura 23

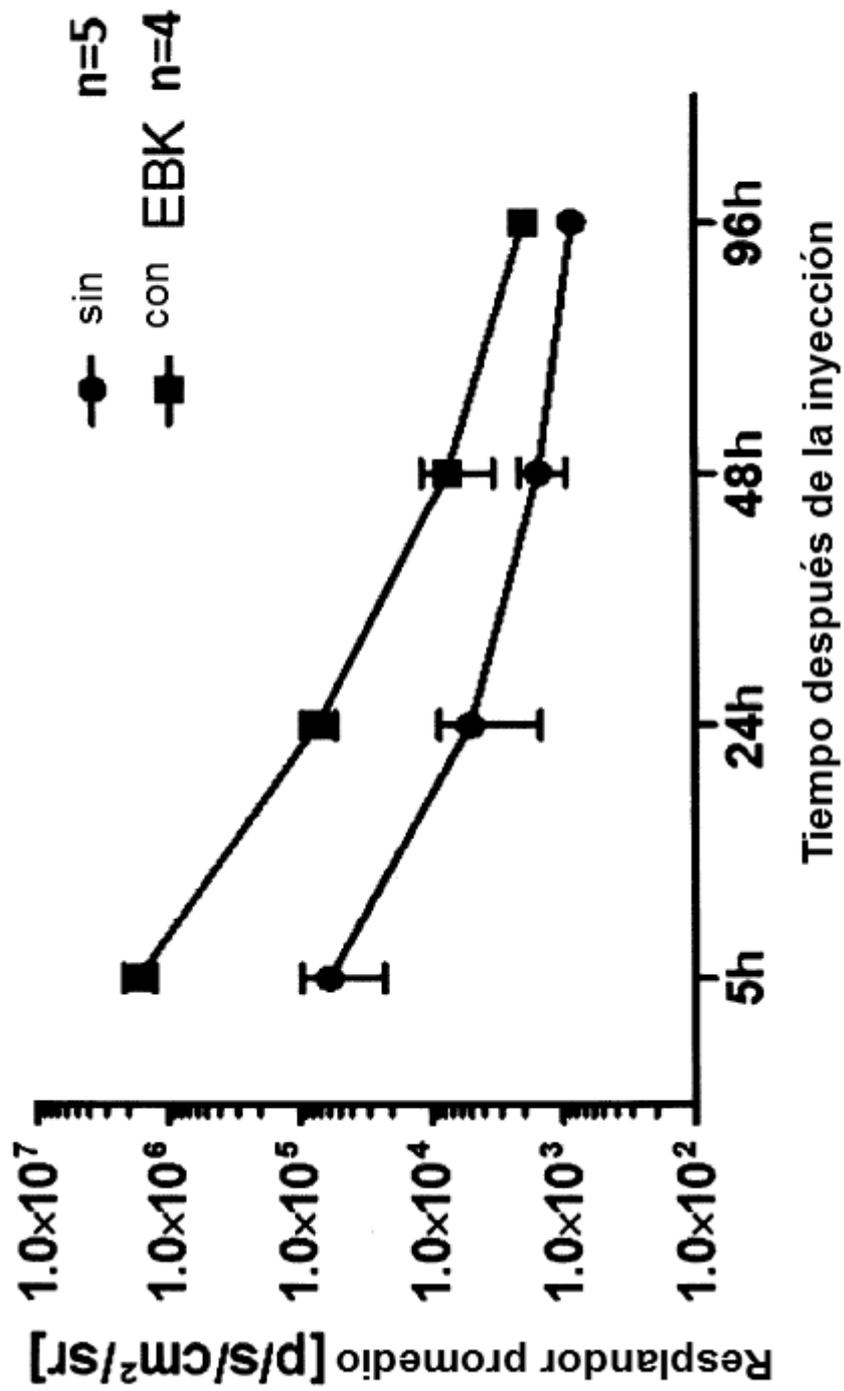


Figura 24

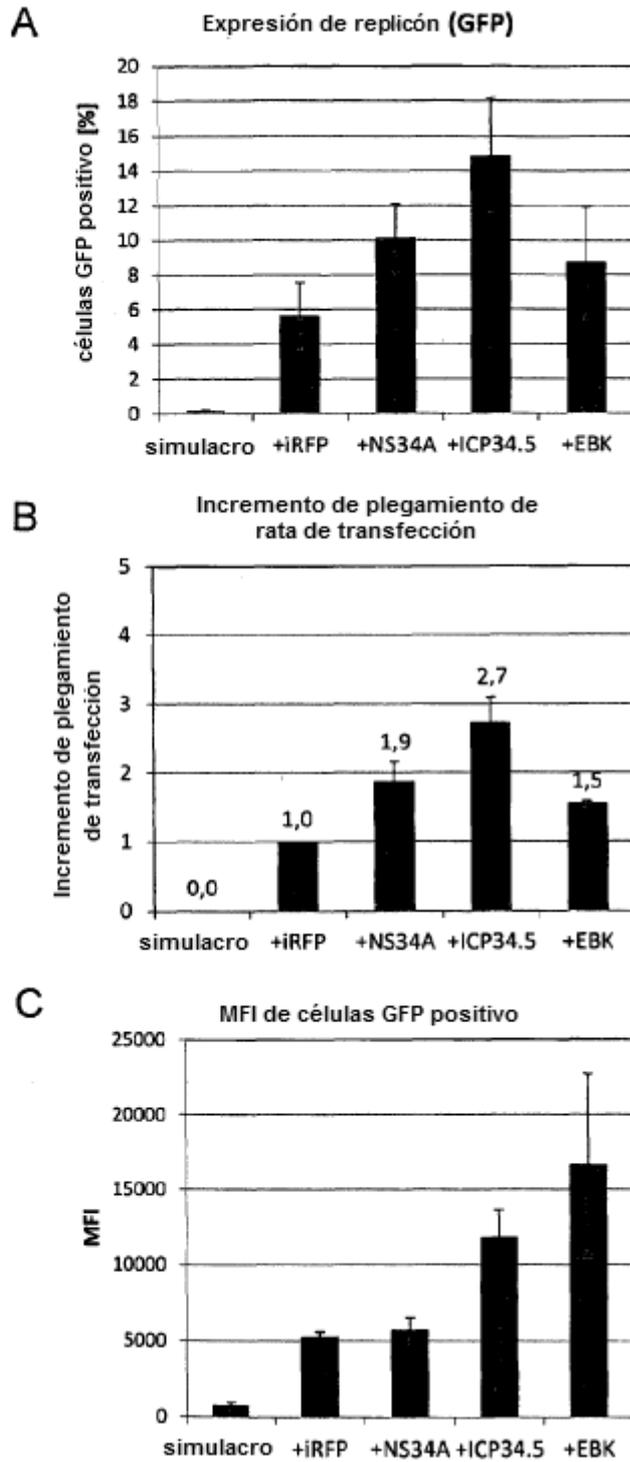


Figura 25

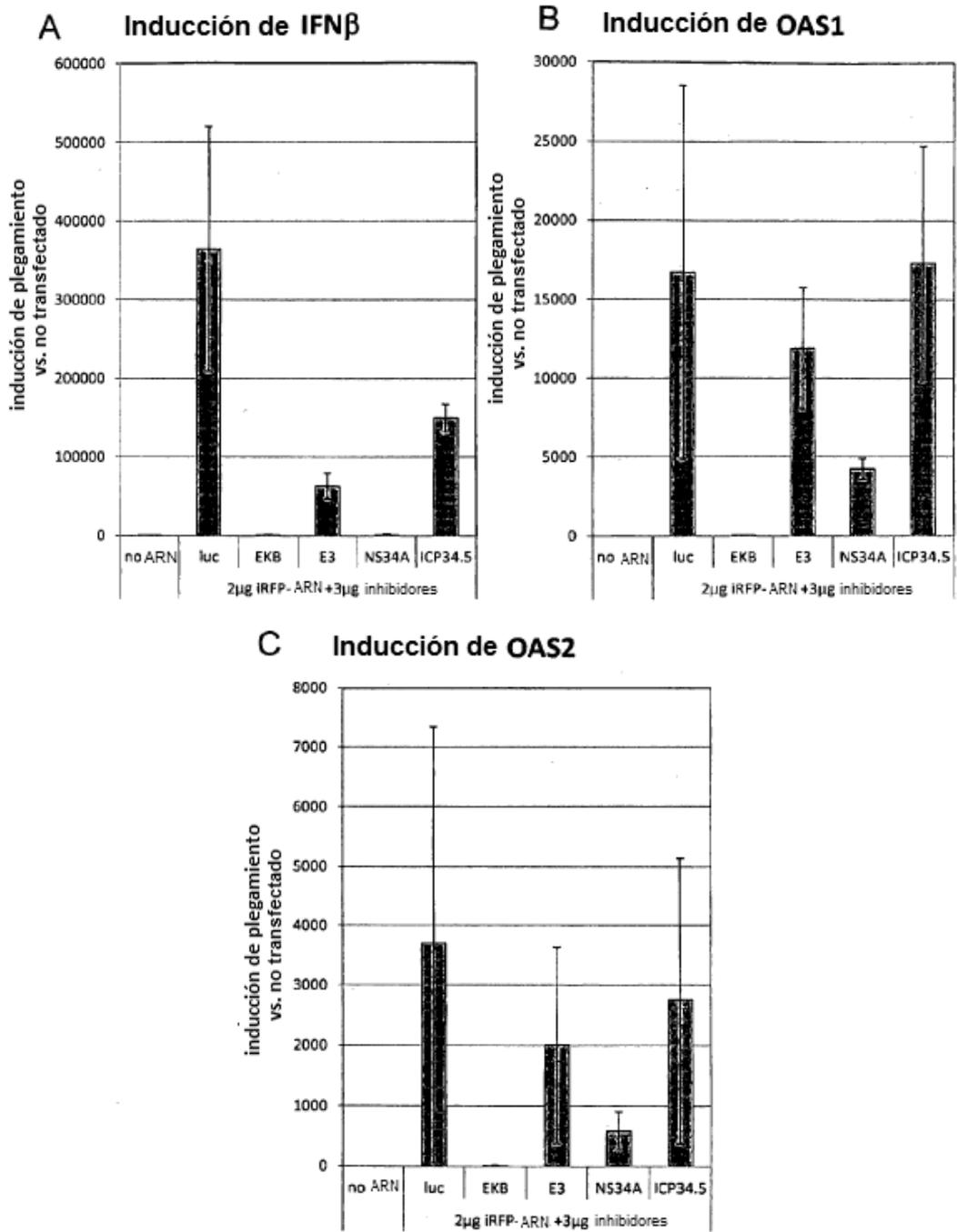




Figura 26

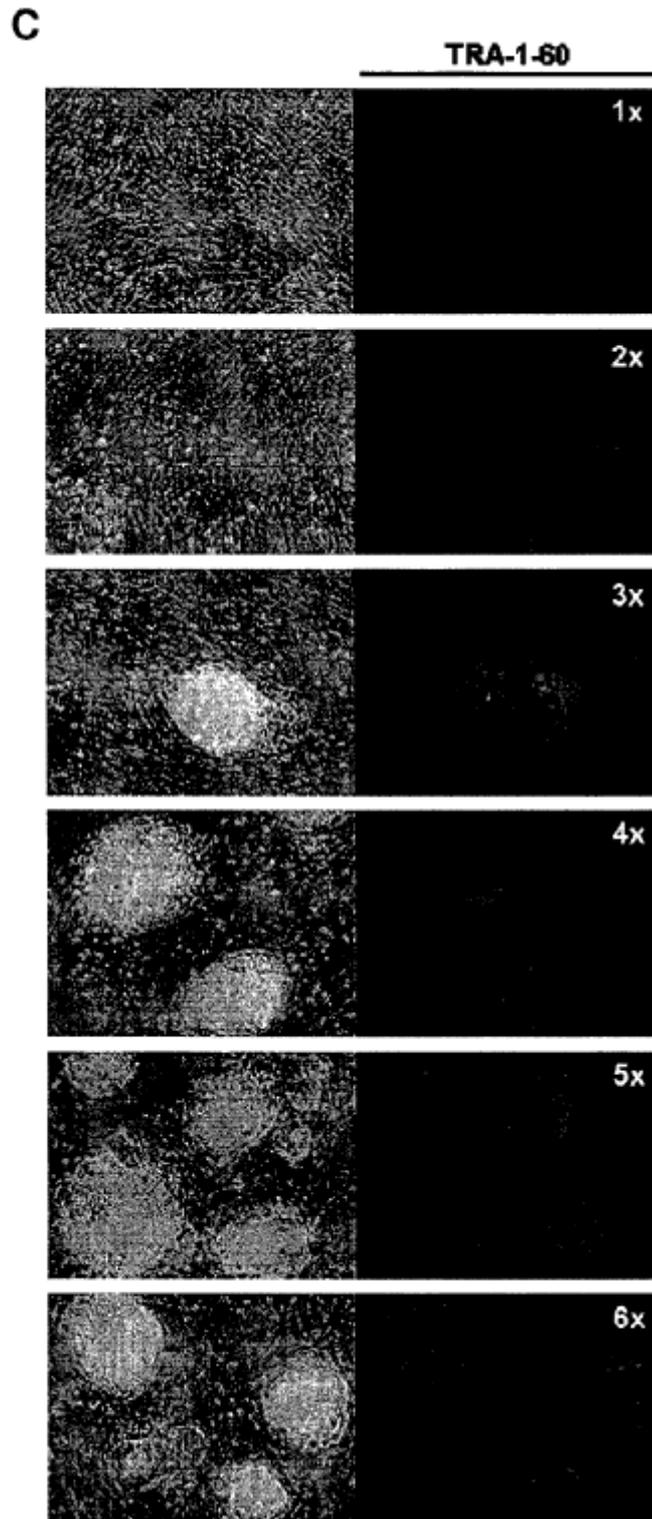


Figura 26

