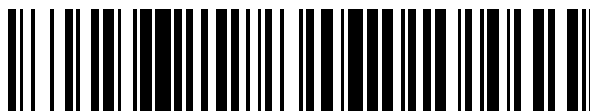


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 129**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 5/071 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010** **E 17195966 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3287525**

54 Título: **Preparaciones de ARN que comprenden ARN modificado purificado para reprogramar células**

30 Prioridad:

07.12.2009 US 267312 P

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

24.06.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**DAHL, GARY;
MEIS, JUDITH;
PERSON, ANTHONY;
JENDRISAK, JEROME;
KARIKÁ³, KATALIN y
WEISSMAN, DREW**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 769 129 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

Preparaciones de ARN que comprenden ARN modificado purificado para reprogramar células

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Número de serie 61/267.312 presentada el 7 de diciembre de 2009. La presente solicitud reivindica también la prioridad de la Solicitud de Estados Unidos Número de serie 11/990.646, presentada el 27 de marzo de 2009, que es una entrada Nacional de Estados Unidos del documento PCT/US06/32372 presentada el 21 de agosto de 2006, que reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos 60/710.164, presentada el 23 de agosto de 2005.

Campo de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para cambiar o reprogramar el estado de diferenciación de células eucariotas, incluidas células humanas u otras células animales, poniendo en contacto las células con preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en una o más moléculas de ARNm monocatenario diferentes que codifican cada una un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS). Las moléculas de ARNm monocatenario purificadas comprenden, preferentemente, al menos un nucleósido modificado (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en una pseudouridina (abreviada por la letra griega "psi" o "Ψ"), 5-metilcitosina (m⁵C), 5-metiluridina (m⁵U), 2'-O-metiluridina (Um o m^{2'-O}U), 2-tiouridina (s²U), y N⁶-metiladenosina (m⁶A)) en lugar de, al menos, una porción del nucleósido canónico no modificado correspondiente (por ejemplo, en lugar de sustancialmente todos los nucleósidos canónicos correspondientes A, C, G, o T no modificados). Además, las moléculas de ARNm monocatenario se purifican preferentemente para estar sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que activarían una respuesta involuntaria, disminuirían la expresión del ARNm monocatenario y/o activarían los sensores de ARN en las células. En ciertos ejemplos, las preparaciones de ARN purificado están sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que son: más cortas o más largas que las moléculas de ARNm monocatenario de longitud completa, ARN bicatenario y/o no protegido con caperuza.

Antecedentes

En 2006, se informó (Takahashi y Yamanaka 2006) que la introducción de genes que codifican cuatro factores proteicos (OCT4 (Octámero-4; POU clase 5 caja homeostásica 1), SOX2 (SRY (región determinante del sexo Y)-caja 2), KLF4 (factor 4 similar a Krueppel) y c-MYC) en células somáticas de ratón diferenciadas indujeron a esas células a convertirse en células madre pluripotentes, (a las que se hace referencia en el presente documento como "células madre pluripotentes inducidas"), "células iPS" o "iPSC"). Después de este informe original, también se indujeron células madre pluripotentes por la transformación de células somáticas humanas con genes que codifican los factores proteicos humanos similares (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) (Takahashi y col. 2007), o por la transformación de células somáticas humanas con genes que codifican factores humanos OCT4 y SOX2 más genes que codifican otros dos factores humanos, NANOG y LIN28 (homólogo A de Lin-28) (Yu y col. 2007). Todos estos procedimientos utilizaron retrovirus o lentivirus para integrar los genes que codifican los factores de reprogramación en los genomas de las células transformadas y las células somáticas se reprogramaron en células iPS solo durante un largo período de tiempo (por ejemplo, durante más de una semana).

La generación de las células iPS a partir de células somáticas diferenciadas ofrece una gran promesa como un medio posible para el tratamiento de enfermedades a través del trasplante de células. La posibilidad de generar células iPS a partir de células somáticas de individuos enfermos puede permitir el desarrollo de terapias específicas para el enfermo con menor riesgo debido al rechazo inmunitario. Aún más, la generación de células iPS a partir de células somáticas específicas para la enfermedad parece ser prometedora como medio de estudio y desarrollo de fármacos para tratar estados de enfermedad específicos (Ebert y col. 2009, Lee y col. 2009, Maehr y col. 2009).

La administración viral de genes que codifican factores de reprogramación de proteínas (o factores "iPSC") proporciona una manera altamente eficaz para producir células iPS a partir de células somáticas, pero la integración del ADN exógeno en el genoma, tanto aleatoria como no aleatoria, genera resultados impredecibles y pueden, a la larga, provocar cáncer (Nakagawa y col. 2008). Nuevos informes muestran que las células iPS se pueden generar (con menor eficacia) utilizando otros procedimientos que no requieren integración del genoma. Por ejemplo, se demostró que transfecciones repetidas de plásmidos de expresión que contienen genes para OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC en fibroblastos embrionarios de ratón generaban células iPS (Okita y col. 2008). También se generaron células madres pluripotentes inducidas a partir de células somáticas humanas por la introducción de un plásmido que expresaba genes que codifican OCT4, SOX2, KLF4, NANOG y LIN28 humanos (Yu y col. 2009). Otros enfoques exitosos para generar células iPS incluyen tratar células somáticas con: factores de reprogramación de proteína recombinante (Zhou y col. 2009); adenovirus no integradores (Stadtfeld y col. 2008); o transposones piggyBac (Woltjen y col. 2009) para administrar factores de reprogramación. Actualmente, la generación de células iPS utilizando estas técnicas de administración no viral para administrar factores de reprogramación es extremadamente

ineficaz. Los procedimientos futuros para generar células iPS para aplicaciones clínicas potenciales necesitarán incrementar la velocidad y la eficacia de la formación de células iPS mientras mantienen la integridad del genoma.

Se ha desvelado un procedimiento para reprogramar células humanas en iPSC utilizando ARNm sintéticos que tienen toda la citidina reemplazada por 5-metilcitidina y/o uridina por pseudouridina y que codifican los cuatro cócteles canónicos del factor Yamanaka que comprenden KLF4, c-Myc, Oct 4 y SOX2, en Warren y col.: "Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA", Cell Stem Cell 7, 618-630, 5 de noviembre de 2010. De forma importante, en dicho procedimiento, se ha suplementado a los medios el inhibidor de inmunogenicidad B18R. Sin embargo, un elemento esencial de la presente invención es la purificación de la preparación de ARN que comprende moléculas de ARNm modificadas que codifican factores de inducción de iPSC a partir de una cantidad de moléculas contaminantes de ARN, incluido ARNbc, que activaría una respuesta inmunitaria suficiente en las células somáticas para evitar la generación de una iPSC reprogramada. A diferencia de dicha técnica anterior citada, se han generado con éxito iPSC según los procedimientos y la composición de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

Sumario de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para reprogramar el estado de diferenciación de células eucariotas, incluidas células humanas u otras células animales, poniendo en contacto las células con preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en una o más moléculas de ARNm monocatenario diferentes que codifican cada una un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS). Las moléculas de ARNm monocatenario purificadas comprenden preferentemente, al menos, un nucleósido modificado (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en una pseudouridina (Ψ), 5-metilcitosina (m^5C), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'-O}U$), 2-tiouridina (s^2U) y N^6 -metiladenosina (m^6A)) en lugar de, al menos, una porción (por ejemplo, que incluye sustancialmente todos) de los nucleósidos canónicos no modificados correspondientes de los nucleósidos canónicos A, C, G o T no modificados correspondientes. Además, las moléculas de ARNm monocatenario se purifican preferentemente para estar sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que activarían una respuesta involuntaria, disminuirían la expresión de ARNm monocatenario y/o activarían los sensores de ARN (por ejemplo, enzimas dependientes de ARN bicatenario) en las células. En ciertos ejemplos, las preparaciones de ARN purificado están sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que son: más cortas o más largas que las moléculas de ARN monocatenario de longitud completa, ARN bicatenario y/o no protegido. En algunos ejemplos preferidos, la invención proporciona composiciones y procedimientos para reprogramar células eucariotas diferenciadas, incluidas células somáticas humanas u otras células animales, poniendo en contacto las células con preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en una o más moléculas de ARNm monocatenario diferentes que codifican cada una un factor de inducción de células iPS.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para cambiar el estado de diferenciación de una célula somática, que comprenden: introducir un ARNm que codifica un factor de inducción de células iPS en una célula somática para generar una célula desdiferenciada reprogramada, en los que el ARNm comprende, al menos, una 5-metilcitidina (u otra base modificada descrita en el presente documento).

En ciertos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para reprogramar una célula que muestra un primer estado o fenotipo diferenciado en una célula que muestra un segundo estado o fenotipo diferenciado, que comprenden: introducir en una célula que presenta un primer estado diferenciado una preparación de ARN purificado que comprende moléculas de ARNm modificadas que codifican, al menos, un factor de reprogramación y cultivar la célula en condiciones en las que la célula presenta un segundo estado diferenciado. En ciertos ejemplos, las moléculas de ARNm modificadas contienen, al menos, un nucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en pseudouridina o 5-metilcitidina. En ciertos ejemplos, la célula es de un ser humano o un animal. En ejemplos adicionales, la preparación de ARN purificado: i) comprende primeros ARNm monocatenarios que codifican un primer factor de inducción de células iPS, en la que sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios completos comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) está sustancialmente libre de moléculas contaminantes de ARN que pueden activar sensores de ARN en dicha célula somática. En ciertos ejemplos, las moléculas contaminantes de ARN se seleccionan del grupo que consiste en: ARNm parciales que codifican solamente una porción de dicho factor de inducción de células iPS, moléculas de ARN que son más pequeñas que el ARNm de longitud completa, moléculas de ARN que son más grandes que el ARNm de longitud completa, moléculas de ARNm bicatenario y moléculas de ARNm no protegido con caperuza.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para la reprogramación de una célula somática (por ejemplo, desdiferenciación o transdiferenciación), que comprenden: poner en contacto una célula somática con una preparación de ARN purificado para generar una célula reprogramada, en los que la preparación de ARN purificado: i) comprende primeros ARNm monocatenarios que codifican un primer factor de inducción de células iPS, en la que sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios completos comprenden, al menos,

un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) está sustancialmente libre de moléculas contaminantes (por ejemplo, moléculas contaminantes de ARN) que pueden activar sensores de ARN en la célula somática. En realizaciones particulares, las moléculas contaminantes de ARN comprenden: ARNm parciales que codifican solamente una porción del factor de inducción de células iPS, ARNm monocatenarios continuos que codifican el factor de inducción de células iPS y que codifican, al menos, una porción adicional del factor de inducción de células iPS, moléculas de ARNm bicatenario y moléculas de ARNm no protegido con caperuza. En ciertos ejemplos, los primeros ARNm monocatenarios no codifican además una porción adicional del primer factor de inducción de células iPS.

En algunos ejemplos, la célula reprogramada es una célula desdiferenciada (por ejemplo, célula madre o célula tipo célula madre). En otros ejemplos, la célula reprogramada es una célula transdiferenciada (por ejemplo, una célula de la piel se reprograma en una célula neuronal, u otro tipo de cambio). En ejemplos adicionales, los primeros ARNm monocatenarios codifican el primer factor de inducción de iPS completo (por ejemplo, el ARNm codifica la secuencia codificante completa para un factor de inducción de iPS particular). En otros ejemplos, el contacto además comprende poner en contacto la célula somática con un factor de crecimiento y/o citocina (por ejemplo, después de un periodo de tiempo). En ejemplos adicionales, el contacto además comprende poner en contacto la célula somática con un inhibidor de la respuesta inmunitaria.

En ciertos ejemplos, todos o casi todos los nucleósidos de uridina en el primer ARNm monocatenario se reemplazan por nucleósidos de pseudouridina. En otros ejemplos, todos o casi todos los nucleósidos de citidina en el primer ARNm monocatenario se reemplazan por nucleósidos de 5-metilcitidina u otra base citada en el presente documento.

En ejemplos particulares, la presente invención proporciona procedimientos para generar una célula reprogramada, que comprenden: poner en contacto una célula somática con una preparación de ARN purificado para generar una célula reprogramada que es capaz de sobrevivir en un cultivo durante, al menos, 10 días (por ejemplo, al menos 10 días... al menos 13 días...al menos 16 días...al menos 20 días...al menos 40 días... o es capaz de formar una línea celular), en los que la preparación de ARN purificado comprende primeros ARNm monocatenarios que codifican un factor de inducción de células iPS, y en los que la mayoría de los primeros ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina.

En ciertos ejemplos, la preparación de ARN purificado está libre de una cantidad de moléculas contaminantes de ARN que activarían una respuesta inmunitaria en la célula somática suficiente para evitar que la célula reprogramada sobreviva al menos 10 días en cultivo (por ejemplo, al menos 10 días ... al menos 15 días ... al menos 20 días ... al menos 40 días o más). En otros ejemplos, las moléculas contaminantes de ARN incluyen: ARNm parciales que codifican solamente una porción del factor de inducción de células iPS, ARNm monocatenarios continuos que codifican todo el factor de inducción de células iPS y que codifican, al menos, una porción adicional del factor de inducción de células iPS, moléculas de ARNm bicatenario, moléculas de ARNm no protegido con caperuza y mezclas de los mismos. En ciertos ejemplos, la célula reprogramada que se genera es capaz de formar una línea celular reprogramada. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado está libre de una cantidad de moléculas contaminantes de ARN que activarían una respuesta inmunitaria en la célula somática suficiente para evitar la generación de la línea celular reprogramada.

En ejemplos particulares, las moléculas contaminantes de ARN se seleccionan del grupo que consiste en: ARNm parciales que codifican solamente una porción del factor de inducción de células iPS, ARNm monocatenarios continuos que codifican el factor de inducción de células iPS y que codifican, al menos, una porción adicional del factor de inducción de células iPS, moléculas de ARNm bicatenario, moléculas de ARNm no protegido con caperuza y mezclas de los mismos.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para generar una línea celular reprogramada, que comprenden: a) poner en contacto una célula somática con una preparación de ARN purificado para generar una célula reprogramada, en los que la preparación de ARN purificado comprende ARNm que codifica un factor de inducción de células iPS y en los que la mayoría de los ARNm comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y b) cultivar la célula desdiferenciada para generar una línea celular reprogramada. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado está libre de una cantidad de moléculas contaminantes que activarían una respuesta inmunitaria en la célula somática suficiente para evitar la generación de la línea celular reprogramada. En ciertos ejemplos, la respuesta inmunitaria implica la activación de sensores de ARN en la célula somática.

En algunos ejemplos, la presente invención proporciona procedimientos para reprogramar una célula somática, que comprenden: poner en contacto una célula somática con una preparación de ARN purificado para generar una célula reprogramada, en los que la preparación de ARN purificado: i) comprende primeros ARNm monocatenarios que codifican un primer factor de inducción de células iPS, en los que sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) está sustancialmente libre de: a) ARNm parciales que codifican solamente una porción del primer factor de inducción de células iPS y b) moléculas de ARNm bicatenario. En ejemplos adicionales, el primer ARNm monocatenario no codifica además una porción adicional del primer factor de inducción de células iPS. En ejemplos particulares, el

primer ARNm monocatenario codifica completamente el primer factor de inducción de células iPS. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado está también sustancialmente libre (o esencialmente libre o virtualmente libre o libre) de ARNm monocatenarios continuos que codifican el primer factor de inducción de células iPS y que codifica, al menos, una porción adicional del primer factor de inducción de células iPS. En otros ejemplos, sustancialmente todos los primeros ARNm completos monocatenarios están protegidos en el extremo 5'. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado está también sustancialmente libre de moléculas de ARNm no protegido con caperuza. En algunos ejemplos, sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina. En ejemplos adicionales, sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de 5-metilcitidina. En otros ejemplos, sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y, al menos, un resto de 5-metilcitidina.

En ciertos ejemplos, la preparación de ARN purificado comprende un reactivo de transfección. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado se obtiene mediante purificación por HPLC de una muestra de ARN que contiene una cantidad sustancial de los ARNm parciales y los ARNm bicatenarios. En ejemplos adicionales, la preparación de ARN purificado está esencialmente libre de los ARNm parciales y de los ARNm monocatenarios continuos. En algunos ejemplos, la preparación de ARN purificado está esencialmente libre o virtualmente libre o libre de moléculas de ARNm bicatenario. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado está esencialmente libre o virtualmente libre o libre de moléculas de ARNm no protegido con caperuza. En algunos ejemplos, sustancialmente todos los primeros ARNm monocatenarios están poliadenilados. En otros ejemplos, los primeros ARNm monocatenarios completos se protegen con 7- metilguanósina.

En algunos ejemplos, el primer factor de inducción de células iPS se selecciona del grupo que consiste en KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado: i) adicionalmente comprende segundos ARNm monocatenarios que codifican un segundo factor de inducción de células iPS, en la que los segundos ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) adicionalmente está sustancialmente libre de: a) ARNm parciales que codifican solamente una porción del segundo factor de inducción de células iPS y b) ARNm bicatenarios. En otros ejemplos, la preparación de ARN purificado está adicionalmente sustancialmente libre de ARNm monocatenarios continuos que codifican un segundo factor de inducción de células iPS y que codifican, al menos, una porción adicional del segundo factor de inducción de células iPS. En algunos ejemplos, el segundo factor de inducción de células iPS se selecciona del grupo que consiste en KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2. En ciertos ejemplos, la célula somática es un fibroblasto. En otros ejemplos, la célula reprogramada es una célula madre pluripotente. En otros ejemplos, la célula desdiferenciada expresa NANOG y TRA-1-60. En algunos ejemplos, la célula está *in vitro*. En ejemplos adicionales, la célula reside en cultivo. En ejemplos particulares, la célula reside en un medio condicionado por MEF.

En algunos ejemplos, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una preparación de ARN purificado, en los que la preparación de ARN purificado: i) comprende primeros ARNm monocatenarios que codifican un primer factor de inducción de células iPS, en las que, sustancialmente, todos los primeros ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) está sustancialmente libre de moléculas contaminantes de ARN, que son capaces de activar sensores de ARN en una célula somática. En ciertos ejemplos, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden una preparación de ARN purificado, en los que la preparación de ARN purificado: i) comprende primeros ARNm monocatenarios que codifican un primer factor de inducción de células iPS, en las que los segundos ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) está sustancialmente libre de: a) ARNm parciales que codifican solamente una porción del primer factor de inducción de células iPS y b) moléculas de ARNm bicatenario.

En ciertos ejemplos, la preparación de ARN purificado está además sustancialmente libre de ARNm monocatenarios continuos que codifican el primer factor de inducción de células iPS y que codifican, al menos, una porción adicional del primer factor de inducción de células iPS. En algunos ejemplos, la preparación de ARN purificado: i) adicionalmente comprende segundos ARNm monocatenarios que codifican un segundo factor de inducción de células iPS, en la que los segundos ARNm monocatenarios comprenden, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina y ii) está sustancialmente libre de: a) ARNm parciales que codifican solamente una porción del segundo factor de inducción de células iPS y b) ARNm monocatenarios continuos que codifican el segundo factor de inducción de células iPS y que codifican, al menos, una porción adicional del segundo factor de inducción de células iPS.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden un ARNm sintetizado *in vitro* que codifica el gen MYC, en las que el ARNm sintetizado *in vitro* comprende, al menos, un resto de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina. En ciertos ejemplos, las composiciones están sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que son capaces de activar sensores de ARN en una célula somática.

En ejemplos particulares, la presente descripción proporciona procedimientos para inducir a una célula de mamífero para producir la proteína MYC, que comprenden: poner en contacto una célula de mamífero con un ARNm sintetizado *in vitro* que codifica el gen MYC, en los que el ARNm sintetizado *in vitro* comprende, al menos, un resto

de pseudouridina y/o, al menos, un resto de 5-metilcitidina, induciendo a la célula de mamífero, de este modo, para producir la proteína MYC. En otros ejemplos, la célula de mamífero es una célula dendrítica. En otros ejemplos, la célula de mamífero es una célula alveolar, un astrocito, una célula de la microglía o una neurona.

5 En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar a un sujeto que comprende poner en contacto al sujeto con la célula de mamífero que produce proteína MYC descrita anteriormente y en el presente documento.

10 En ejemplos adicionales, la presente descripción proporciona procedimientos para sintetizar una molécula de ARN transcrita *in vitro* que codifica el gen MYC, que comprenden: combinar una ARN polimerasa aislada, una secuencia de ácido nucleico molde que codifica el gen MYC, nucleótidos no modificados y nucleótidos modificados con pseudouridina o 5-metilcitidina en condiciones tales que se genera una molécula de ARN transcrita *in vitro* que codifica el gen MYC que comprende, al menos, un resto de pseudouridina o 5-metilcitidina.

15 Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención demostraron que las moléculas de ARNm se pueden administrar a las células e inducir un proceso de desdiferenciación para generar células desdiferenciadas incluyendo células madre pluripotentes. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para generar células iPS como se define en las reivindicaciones. De forma sorprendente, la administración de ARNm puede proporcionar una generación de células iPS altamente eficaz.

20 La presente invención también se refiere a moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos que comprenden pseudouridina o un nucleósido modificado, a vectores de terapia génica que los comprenden, a procedimientos de síntesis de los mismos y a procedimientos de reemplazo génico, terapia génica, silenciamiento de transcripción génica y a la liberación de proteínas terapéuticas a un tejido *in vivo*, que comprende las moléculas. La presente invención también se refiere a procedimientos para reducir la inmunogenicidad de moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos.

25 En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para desdiferenciar una célula somática, que comprende: introducir ARNm que codifica uno o más factores de inducción de iPSC en una célula somática para generar una célula desdiferenciada.

30 En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para desdiferenciar una célula somática, que comprende: introducir ARNm que codifica uno o más factores de inducción de iPSC en una célula somática y mantener la célula en condiciones en las que la célula es viable y el ARNm que se introduce en la célula se traduce en cantidad suficiente y durante un tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada. En algunos ejemplos preferidos, la célula desdiferenciada es una célula madre pluripotente inducida (iPSC).

35 En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para cambiar el estado de diferenciación (o estado diferenciado) de una célula eucariota, que comprenden: introducir ARNm que codifica uno o más factores de reprogramación en una célula y mantener la célula en condiciones en las que la célula es viable y el ARNm que se introduce en la célula se traduce en cantidad suficiente y durante un tiempo suficiente para generar una célula que presenta un estado de diferenciación cambiado comparado con la célula en la que se introdujo el ARNm. En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para cambiar el estado de diferenciación de una célula eucariota, que comprenden: introducir ARNm que codifica uno o más factores de reprogramación en una célula y mantener la célula en condiciones en las que la célula es viable y el ARNm que se introduce en la célula se traduce en cantidad suficiente y durante un tiempo suficiente para generar una célula que presenta un estado de diferenciación cambiado comparado con la célula en la que se introdujo el ARNm. En algunos ejemplos, el estado cambiado de diferenciación es un estado de diferenciación desdiferenciado comparado con la célula en la que se introdujo el ARNm. Por ejemplo, la célula que presenta el estado de diferenciación cambiado puede ser una célula madre pluripotente que se desdiferencia en comparación con una célula somática en la que se introdujo el ARNm (por ejemplo, una célula somática que se diferencia en un fibroblasto, un cardiomiocito u otro tipo de célula diferenciada). En algunos ejemplos, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula somática de un linaje, fenotipo o función y la célula que presenta el estado cambiado de diferenciación es una célula somática que presenta un linaje, fenotipo o función que es diferente al de la célula en la que se introdujo el ARNm; por tanto, en estas realizaciones, el procedimiento da como resultado la transdiferenciación (Graf y Enver 2009).

40 Los procedimientos de la descripción no están limitados con respecto a una célula particular en la que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos anteriores, la célula en la que se introduce el ARNm deriva de cualquier eucariota multicelular. En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos anteriores, la célula en la que se introduce el ARNm se selecciona de entre una célula humana y otra célula animal. Aunque el trabajo presentado en el presente documento se llevó a cabo utilizando células humanas o de otros animales, los solicitantes adicionalmente consideran que los procedimientos de la presente descripción que comprenden la reprogramación de células humanas y animales mediante la puesta en contacto de las células con una preparación de ARN purificado que consiste en una o más moléculas de ARNm monocatenario purificado, cada una de las cuales codifica un factor de reprogramación de proteínas (por ejemplo, un factor de transcripción) también se refieren a la reprogramación de otras células eucariotas (por ejemplo, células de plantas y células de hongos). En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos anteriores, la célula en la que se introduce el ARNm es una

célula normal que proviene de un organismo que está libre de una enfermedad conocida. En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos anteriores, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula que proviene de un organismo que tiene una enfermedad conocida. En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos anteriores, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula que está libre de una patología conocida. En algunos ejemplos de cualquiera de los procedimientos anteriores, la célula en la que se introduce el ARNm es una célula que presenta un estado de enfermedad o una patología conocida (por ejemplo, una célula cancerosa o célula beta pancreática que presenta propiedades metabólicas de una célula diabética).

La descripción no se limita al uso de un tipo de célula específico (por ejemplo, a un tipo específico de célula somática) en los ejemplos de los procedimientos que comprenden la introducción de ARNm que codifica uno o más factores de inducción de iPSC con el fin de generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula iPSC). Se contempla cualquier célula que es objeto de desdiferenciación utilizando factores de inducción de células iPSC. Dichas células incluyen, aunque sin limitación, fibroblastos, queratinocitos, adipocitos, linfocitos T, linfocitos B, células en sangre de cordón mononuclear, células de la mucosa bucal, células hepáticas, HeLa, MCF-7 u otras células cancerosas. En algunos ejemplos, las células residen *in vitro* (por ejemplo, en cultivo) o *in vivo*. En algunos ejemplos, cuando se generan en cultivo, se utiliza un medio condicionado libre de células (por ejemplo, un medio condicionado por MEF). Como se demuestra a continuación, dicho medio proporcionó una mejor generación de células iPSC. La descripción no se limita, sin embargo, a las condiciones de cultivo utilizadas. Se contempla para su uso cualquier condición de cultivo o medio ahora conocido o identificado posteriormente como útil para los procedimientos de la descripción (por ejemplo, para generar células iPSC a partir de células somáticas y mantener dichas células). Por ejemplo, aunque no se prefiere, en algunos ejemplos del procedimiento, se utiliza una capa de células de alimentación en vez de un medio condicionado para cultivar las células que se tratan utilizando el procedimiento.

En algunos ejemplos de cualquiera de estos procedimientos, el paso de introducir ARNm comprende suministrar el ARNm en la célula (por ejemplo, una célula somática humana u otra célula animal) con un reactivo de transfección (por ejemplo, reactivo de transfección de ARNm TRANSIT™, MirusBio, Madison, WI).

Sin embargo, la descripción no está limitada por la naturaleza del procedimiento de transfección utilizado. De hecho, se contempla cualquier proceso de transfección conocido o identificado en el futuro que sea capaz de suministrar moléculas de ARNm en las células *in vivo* o *in vitro*, incluidos procedimientos que suministran el ARNm en células en cultivo o en un medio de soporte de vida, si dichas células comprenden células aisladas o células que constituyen un tejido u órgano eucariota, o procedimientos que suministran el ARNm *in vivo* en células de un organismo, tal como un ser humano, animal, planta u hongo. En algunos ejemplos, el reactivo de transfección comprende un lípido (por ejemplo, liposomas, micelas, etc.). En algunos ejemplos, el reactivo de transfección comprende una nanopartícula o nanotubo. En algunos ejemplos, el reactivo de transfección comprende un compuesto catiónico (por ejemplo, polietilenimina o PEI). En algunos ejemplos, el procedimiento de transfección utiliza una corriente eléctrica para suministrar el ARNm en la célula (por ejemplo, por electroporación). En algunos ejemplos, el procedimiento de transfección utiliza un procedimiento biolístico para suministrar el ARNm en la célula (por ejemplo, una "pistola génica" o sistema de administración de partículas biolísticas.)

Los datos presentados en el presente documento muestran que, con respecto al ARNm introducido en la célula, ciertas cantidades de los ARNm utilizados en los EJEMPLOS que se describen en el presente documento dieron como resultado una mayor eficacia y una inducción más rápida de células madre pluripotentes a partir de células somáticas concretas utilizadas que otras cantidades de ARNm. Sin embargo, los procedimientos de la presente descripción no se limitan al uso de una cantidad específica de ARNm para introducir en la célula. Por ejemplo, se utilizó un total de tres dosis, comprendiendo cada dosis 18 microgramos de cada uno de los seis ARNm diferentes, codificando cada uno un factor de reprogramación humano diferente, para introducir el ARNm en aproximadamente 3×10^5 células de fibroblastos humanos en una placa de 10 cm (por ejemplo, suministrado utilizando un reactivo de transfección que contiene lípidos), aunque en otros ejemplos, se utilizaron cantidades mayores o menores de los ARNm para introducir en las células.

La descripción no se limita a una forma química concreta del ARNm utilizado, aunque ciertas formas de ARNm pueden producir resultados más eficaces. Sin embargo, en algunos ejemplos preferidos, el ARNm comprende preferentemente, al menos, un nucleósido modificado (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en una pseudouridina (Ψ), 5-metilcitosina (m⁵C), 5-metiluridina (m⁵U), 2'-O-metiluridina (Um o m^{2'-O}U), 2-tiouridina (s²U) y N⁶-metiladenosina (m⁶A)) en lugar de, al menos, una porción del nucleósido canónico correspondiente no modificado (por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, al menos, un nucleósido modificado en lugar de sustancialmente todos los nucleósidos canónicos correspondientes A, C, G, o T no modificados). En algunos ejemplos, el ARNm está poliadenilado. En algunos ejemplos preferidos, se prepara el ARNm por poliadenilación de un ARN transcrito *in vitro* (TIV), comprendiendo el procedimiento poner en contacto el ARN TIV usando una poli(A) polimerasa (por ejemplo, ARN polimerasa de levadura o poli(A) polimerasa de *E. coli*). En algunos ejemplos, el ARNm se poliadenila durante la TIV usando un molde de ADN que codifica la cola de poli(A). Independientemente de si el ARNm se poliadenila utilizando una poli(A) polimerasa o durante la TIV de un molde de ADN, en algunos ejemplos preferidos, el ARNm comprende una cola de poli-A (por ejemplo, una cola de poli-A que tiene 50-200 nucleótidos, por ejemplo, preferentemente 100-200, 150-200 nucleótidos o más de 150 nucleótidos), aunque en algunos ejemplos, se utiliza una cola de poli(A) más larga o más corta. En algunos ejemplos, se protege con caperuza el ARNm utilizado en los

procedimientos. Para maximizar la eficacia de la expresión en las células, se prefiere que la mayoría de las moléculas de ARNm contengan una caperuza. En algunos ejemplos preferidos, las moléculas de ARNm utilizadas en los procedimientos se sintetizan *in vitro* por incubación de ARN primario no protegido con caperuza en presencia de un sistema enzimático de protección con caperuza. En algunos ejemplos preferidos, el ARN primario usado en la reacción enzimática de protección con caperuza se sintetiza por transcripción *in vitro* (TIV) de una molécula de ADN que codifica el ARN que se va a sintetizar. El ADN que codifica el ARN que se va a sintetizar contiene un promotor de ARN polimerasa, al cual se une una ARN polimerasa e inicia la transcripción a partir del mismo. También se conoce en la técnica que las moléculas de ARNm a menudo tienen regiones de secuencia diferente localizadas antes del codón de inicio de la traducción y después del codón de terminación de la traducción que no se traduce. Estas regiones, denominadas región no traducida cinco prima (5' UTR) y región no traducida tres prima (3' UTR), respectivamente, pueden afectar a la estabilidad de ARNm, a la localización de ARNm y a la eficacia traduccional del ARNm al que se unen. Se sabe que ciertas 5'y 3' UTR, tales como las de las alfa y beta globinas, mejoran la estabilidad del ARNm y la expresión de los ARNm. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, los ARNm que codifican factores de reprogramación (por ejemplo, factores de inducción de iPSC) presentan una 5' UTR y/o 3' UTR que dan como resultado una mayor estabilidad de ARNm y una mayor expresión del ARNm en las células (por ejemplo, una alfa globina o una beta globina 5' UTR y/o 3' UTR; por ejemplo, una alfa globina o beta globina 5' UTR y/o 3' UTR de *Xenopus* o humana, o, por ejemplo, un virus del grabado del tabaco (TEV) 5' UTR).

La TIV se puede llevar a cabo utilizando cualquier ARN polimerasa siempre que la síntesis de ARNm a partir del molde de ADN que codifica el ARN se inicie específicamente y suficientemente a partir de un promotor de ARN polimerasa afín y se obtenga ARNm de longitud completa. En algunos ejemplos preferidos, la ARN polimerasa se selecciona entre ARN polimerasa de T7, ARN polimerasa de SP6 y ARN polimerasa de T3. En otros ejemplos, el ARN protegido con caperuza se sintetiza cotranscripcionalmente por el uso de un dinucleótido análogo de caperuza en la reacción de TIV (por ejemplo, utilizando un kit AMPLICAP™ T7 o un kit de transcripción MESSAGEMAX™ T7ARCA-CAPPED MESSAGE; EPICENTRE o CellScript, Madison, WI, EE. UU.). Si la protección con caperuza se lleva a cabo cotranscripcionalmente, el dinucleótido análogo de caperuza es, preferentemente, un análogo antiinverso de caperuza (ARCA). Sin embargo, se prefiere el uso de una reacción de TIV por separado, seguido por una protección con caperuza con un sistema enzimático de protección con caperuza, que da como resultado que aproximadamente el 100% del ARN se proteja con caperuza, sobre la protección con caperuza cotranscripcional, que normalmente da como resultado que solamente el 80% del ARN se proteja con caperuza. Por lo tanto, en algunos ejemplos preferidos, se protege con caperuza un elevado porcentaje de las moléculas de ARNm utilizadas en un procedimiento de la presente descripción (por ejemplo, se protegen más del 80%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, más del 99,5% o más del 99,9% de la población de moléculas de ARNm). En algunos ejemplos preferidos, el ARNm utilizado en los procedimientos de la presente descripción tiene una caperuza con una estructura cap1, lo que significa que el 2'hidroxilo de la ribosa en el penúltimo nucleótido con respecto al nucleótido de caperuza está metilado. Sin embargo, en algunos ejemplos, el ARNm utilizado en los procedimientos tiene una caperuza con una estructura cap0, lo que significa que el 2'hidroxilo de la ribosa en el penúltimo nucleótido con respecto al nucleótido de caperuza no está metilado. Con algunos, pero no todos los transcritos, la transfección de células eucariotas con ARNm que tiene una caperuza con una estructura cap1 da como resultado un nivel más alto o una mayor duración de expresión de proteína en las células transfectadas en comparación con la transfección de las mismas células con el mismo ARNm, pero con una caperuza que tiene una estructura cap0. En algunos ejemplos, el ARNm utilizado en los procedimientos de la presente invención tiene un nucleótido de caperuza modificado. En algunos experimentos llevados a cabo antes de los experimentos presentados en los EJEMPLOS en el presente documento, los presentes solicitantes encontraron que, cuando se transfectaron células de fibroblastos humanos 1079 o IMR90 con ARNm OCT4 que contenían ya sea uridina o pseudouridina en lugar de uridina, el ARNm que contenía pseudouridina se tradujo a un nivel más alto o durante un periodo mayor que el ARNm que contenía uridina. Por lo tanto, en algunos ejemplos preferidos, una o más o todas las uridinas contenidas en el/los ARNm utilizado(s) en los procedimientos de la presente descripción se reemplaza/n por pseudouridina (por ejemplo, sustituyendo pseudouridina-5'-trifosfato en la reacción TIV para sintetizar el ARN en lugar de uridina-5'-trifosfato). Sin embargo, en algunos ejemplos, el ARNm utilizado en los procedimientos de la descripción contiene uridina y no contiene pseudouridina. En algunos ejemplos preferidos, el ARNm comprende preferentemente, al menos, un nucleósido modificado (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en una pseudouridina (Ψ), 5-metilcitosina (m^5C), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'-O}U$), 2-tiouridina (s^2U) y N^6 -metiladenosina (m^6A)) en lugar de, al menos, una porción del nucleósido canónico no modificado correspondiente (por ejemplo, en lugar de sustancialmente todos los nucleósidos canónicos correspondientes A, C, G, o T no modificados). En algunos ejemplos preferidos, el ARNm comprende, al menos, un nucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en una pseudouridina (Ψ) y 5-metilcitosina (m^5C). En algunos ejemplos preferidos, el ARNm comprende tanto pseudouridina (Ψ) como 5-metilcitosina (m^5C). Además, para lograr objetivos específicos, una base de ácido nucleico, un resto de azúcar o un enlace internucleótido en uno o más de los nucleótidos del ARNm que se introduce en la célula eucariota en cualquiera de los procedimientos de la descripción puede comprender una base de ácido nucleico, un resto de azúcar o un enlace internucleótido modificados.

La descripción tampoco está limitada con respecto a la fuente del ARNm que se suministra en la célula eucariota en cualquiera de los procedimientos de la descripción. En algunos ejemplos, tales como los descritos en los EJEMPLOS, el ARNm se sintetiza por transcripción *in vitro* de un molde de ADN que comprende un gen clonado en un vector plasmídico linealizado o por transcripción *in vitro* de un molde de ADN que se sintetiza por PCR o RT-PCR

(es decir, por TIV de un producto de amplificación por PCR), protección con caperuza utilizando un sistema enzimático de protección con caperuza o por protección con caperuza cotranscripcional por incorporación de un dinucleótido análogo de caperuza (por ejemplo, un ARCA) durante la TIV y poliadenilación utilizando una poli(A) polimerasa. En algunos ejemplos preferidos, el ARNm se sintetiza por TIV de un molde de ADN que comprende un gen clonado en un vector plasmídico linealizado o un producto de amplificación por PCR o por RT-PCR, en el que el molde de ADN codifica una cola de 3'poli(A). En otros ejemplos, el ARNm que se suministra en la célula eucariota en cualquiera de los procedimientos de la descripción deriva directamente de una célula o de una muestra biológica. Por ejemplo, el ARNm derivado de una célula o de una muestra biológica se puede obtener por amplificación del ARNm de la célula o muestra biológica utilizando una reacción de amplificación de ARN y protección con caperuza del ARNm amplificado utilizando un sistema enzimático de protección con caperuza o por protección con caperuza cotranscripcional por incorporación de un dinucleótido análogo de caperuza (por ejemplo, un ARCA) durante la TIV y, si el ARNm amplificado no contiene ya una cola de poli(A) codificada por molde a partir de la reacción de amplificación del ARN, poliadenilación del ARNm amplificado utilizando poli(A) polimerasa.

Con respecto a los procedimientos que comprenden la introducción de ARNm que codifica uno o más factores de inducción de células iPS para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, una célula iPS), la descripción no está limitada por la naturaleza de los factores de inducción de células iPS utilizados. Se contempla el uso de cualquier ARNm que codifique uno o más factores de inducción de proteína ahora conocidos, o descubiertos posteriormente, que encuentren utilidad en la desdiferenciación. En algunos ejemplos, se emplean uno o más ARNm que codifican KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 o SOX2. Se han identificado Oct-3/4 y ciertos miembros de la familia de genes Sox (Sox1, Sox2, Sox3 y Sox15) como reguladores transcripcionales implicados en el proceso de inducción. No obstante, se han identificado genes adicionales, incluidos ciertos miembros de la familia Klf (Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5), de la familia Myc (C-myc, L-myc y N-myc), Nanog y LIN28, para aumentar la eficacia de la inducción. Puede usarse uno cualquiera o más de tales factores según se desee.

Si bien las composiciones y los procedimientos de la descripción se pueden usar para generar células iPS, la descripción no se limita a la generación de tales células. Por ejemplo, se puede introducir en una célula ARNm que codifica uno o más factores de reprogramación para generar una célula con un estado de diferenciación cambiado comparado con la célula en la que se introdujo el ARNm. Por ejemplo, se puede utilizar ARNm que codifica uno o más factores de inducción de células iPS para generar una célula desdiferenciada que no es una célula iPS. Tales células encuentran utilidad en investigaciones, cribado de fármacos y otras aplicaciones.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona adicionalmente procedimientos que emplean las células desdiferenciadas generadas por los procedimientos anteriores. Por ejemplo, tales células encuentran utilidad en investigaciones, cribado de fármacos y aplicaciones terapéuticas en seres humanos u otros animales. Por ejemplo, las células generadas pueden encontrar utilidad en la identificación y caracterización de factores de inducción de células iPS, así como otros factores asociados con la diferenciación o desdiferenciación. En algunos ejemplos, las células desdiferenciadas generadas se trasplantan a un organismo o a un tejido que reside *in vitro* o *in vivo*. En algunos ejemplos, un organismo, tejido o sistema de cultivo que aloja las células generadas se expone a un compuesto de prueba y se observa o mide el efecto del compuesto de prueba sobre las células o sobre el organismo, tejido o sistema de cultivo.

En otros ejemplos, se trata adicionalmente una célula desdiferenciada generada utilizando los procedimientos anteriores (por ejemplo, una célula iPS) para generar una célula diferenciada que tiene el mismo estado de diferenciación o tipo celular en comparación con la célula somática a partir de la cual se generó la célula desdiferenciada. En otros ejemplos, se trata adicionalmente la célula desdiferenciada generada utilizando los procedimientos anteriores (por ejemplo, una célula iPS) para generar una célula diferenciada que tiene un estado de diferenciación o tipo celular diferente en comparación con la célula somática a partir de la cual se generó la célula desdiferenciada. En algunos ejemplos, la célula diferenciada se genera a partir de la célula desdiferenciada generada (por ejemplo, la célula iPS generada) por la introducción de ARNm que codifica uno o más factores de reprogramación en la célula iPS generada durante uno o múltiples tratamientos y manteniendo la célula en la que se introduce el ARNm en condiciones en las que la célula es viable y se diferencia en una célula que tiene un estado de diferenciación o tipo celular cambiado en comparación con la célula desdiferenciada generada (por ejemplo, la célula iPS generada) en la que se introduce el ARNm que codifica uno o más factores de reprogramación. En algunos de estos ejemplos, la célula diferenciada generada que tiene el estado de diferenciación cambiado se usa para investigación, cribado de fármacos o aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, en seres humanos u otros animales). Por ejemplo, las células diferenciadas generadas encuentran utilidad en la identificación y caracterización de factores de reprogramación asociados con diferenciación. En algunos ejemplos, las células diferenciadas generadas se trasplantan a un organismo o a un tejido que reside *in vitro* o *in vivo*. En algunos ejemplos, un organismo, tejido o sistema de cultivo que aloja las células diferenciadas generadas se expone a un compuesto de prueba y se observa o mide el efecto del compuesto de prueba sobre las células o sobre el organismo, tejido o sistema de cultivo.

En algunos ejemplos preferidos del procedimiento que comprende introducir ARNm que codifica uno o más factores de inducción de iPSC en una célula somática y mantener la célula en condiciones en las que la célula es viable y el ARNm que se introduce en la célula se expresa en cantidad suficiente y durante tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada (por ejemplo, en los que la célula desdiferenciada es una célula madre pluripotente inducida), el tiempo suficiente para generar una célula desdiferenciada es menos de una semana. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o

igual a 50 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 100 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 150 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 200 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 300 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 400 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 500 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 600 células desdiferenciadas por 3×10^5 células de entrada (por ejemplo, iPSC) en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 700 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 800 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 900 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de este procedimiento, la eficacia de reprogramación para generar células desdiferenciadas es mayor o igual a 1000 células desdiferenciadas (por ejemplo, iPSC) por 3×10^5 células de entrada en las que se introduce el ARNm. Por lo tanto, en algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 2 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 5 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 10 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 20 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 25 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 30 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 35 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus). En algunos ejemplos preferidos, este procedimiento fue más de 40 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus).

La presente descripción adicionalmente proporciona composiciones (sistemas, kits, mezclas de reacción, células, ARNm) utilizadas o útiles en los procedimientos y/o generadas por los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la presente descripción proporciona un ARNm que codifica un factor de inducción de células iPS, teniendo el ARNm pseudouridina en lugar de uridina.

La presente descripción proporciona adicionalmente composiciones que comprenden un reactivo de transfección y un ARNm que codifica un factor de inducción de células iPS (por ejemplo, una mezcla de reactivo de transfección y ARNm). En algunos ejemplos, las composiciones comprenden ARNm que codifica una pluralidad (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más o 6) de factores de inducción de células iPS, incluyendo, pero sin limitación, KLF4, LIN28, C-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2.

Las composiciones pueden comprender adicionalmente cualquier otro reactivo o componente suficiente, necesario o útil para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Tales reactivos o componentes incluyen, aunque sin limitación, reactivos de transfección, medio de cultivo (por ejemplo, medio condicionado por MEF), células (por ejemplo, células somáticas, células iPS), recipientes, cajas, tampones, inhibidores (por ejemplo, inhibidores de RNasa, marcadores (por ejemplo, fluorescentes, luminiscentes, radioactivos, etc.), moléculas de control positivo y/o negativo, reactivos para generar ARNm protegido, hielo seco y otros refrigerantes, instrucciones para su uso, equipo de cultivo celular, equipo de detección/análisis y similares.

Esta descripción proporciona moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos que comprenden pseudouridina o un nucleósido modificado, vectores de terapia génica que comprenden los mismos, procedimientos de terapia génica y procedimientos de silenciamiento de la transcripción génica que comprenden los mismos, procedimientos para reducir la inmunogenicidad de los mismos y procedimientos para sintetizarlos.

- En un ejemplo, la presente descripción proporciona un ARN mensajero que comprende un resto de pseudouridina. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN que codifica una proteína de interés, comprendiendo dicha molécula de ARN un resto de pseudouridina. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN transcrita *in vitro*, que comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado.
- 5 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado, en el que el nucleósido modificado es m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ o 2'-O-metil-U. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un vector de terapia génica, que comprende una molécula de polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, en el que la molécula de polirribonucleótido comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado.
- 10 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) que contiene, como parte de su secuencia, una pseudouridina o un nucleósido modificado y que comprende adicionalmente un ARNip o un ARNhc. En otro ejemplo, la molécula de ARNbc es mayor de 50 nucleótidos de longitud. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.
- 15 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para inducir a una célula de mamífero para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto la célula de mamífero con una molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, induciendo, de este modo, a la célula de mamífero para producir la proteína recombinante.
- 20 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar anemia en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* eritropoyetina, tratándose, de este modo, la anemia en un sujeto.
- 25 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar un vasoespasmo en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), tratándose, de este modo, un vasoespasmo en un sujeto.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para incrementar la tasa de supervivencia de una célula en un sujeto, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una proteína de choque térmico, mejorando, de este modo, la tasa de supervivencia de una célula en un sujeto.
- 30 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para disminuir la incidencia de una reestenosis de un vaso sanguíneo después de un procedimiento que agranda el vaso sanguíneo, que comprende poner en contacto una célula de un vaso sanguíneo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una proteína de choque térmico, disminuyendo, de este modo, una incidencia de una reestenosis en un sujeto.
- 35 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para aumentar el crecimiento de un cabello a partir de un folículo capilar en el cuero cabelludo de un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del cuero cabelludo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una telomerasa o una proteína inmunosupresora, incrementando, de este modo, el crecimiento de cabello a partir de un folículo capilar.
- 40 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento de inducción de la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* la enzima, induciendo, de este modo, la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula.
- 45 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la fibrosis quística en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* el Regulador de Conductancia Transmembrana de Fibrosis Quística (CFTR), tratándose, de este modo, la fibrosis quística en un sujeto.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una tirosina quinasa de Bruton, tratándose, de este modo, la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.
- 50 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar una inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa (ADA IDCS) en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una ADA, tratándose, de este modo, una ADA IDCS.
- 55 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para producir una proteína recombinante, que

comprende poner en contacto un aparato de traducción *in vitro* con un polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, comprendiendo el polirribonucleótido sintetizado *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, produciéndose, de este modo, una proteína recombinante.

5 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para sintetizar una molécula de ARN transcrito *in vitro* que comprende un nucleótido modificado con un nucleósido modificado con pseudouridina, que comprende poner en contacto una polimerasa aislada con una mezcla de nucleótidos no modificados y el nucleótido modificado.

10 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un aparato de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un kit de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

Descripción de las figuras

15 Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención como se define en las reivindicaciones. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de ejemplos específicos presentados en el presente documento.

20 La figura 1 muestra que los ARNm que codifican cada uno de los seis factores de reprogramación humana, preparados como se describe en los EJEMPLOS, se traducen y se localizan en las ubicaciones subcelulares previstas después de la transfección en fibroblastos 1079 humanos de recién nacido. Fibroblastos 1079 humanos no tratados: Las fotografías A, E, I, M, Q y U muestran imágenes de contraste de fase de los fibroblastos humanos 1079 no tratados que no fueron transfectados con un ARNm que codifica un factor de reprogramación y las fotografías B, F, J, N, R y V muestran imágenes fluorescentes de los mismos campos después de que las células se tiñeran con un anticuerpo específico para cada factor de reprogramación; estos resultados muestran que hubo pocas o ninguna de estas proteínas de factor de reprogramación endógena en fibroblastos humanos 1079 no tratados. Fibroblastos 1079 humanos tratados: Las fotografías C, G, K, O, S y W muestran imágenes de contraste de fase de los fibroblastos humanos 1079 que fueron transfectados con un ARNm que codifica el factor de reprogramación indicado y las fotografías D, H, L, P, T y X muestran imágenes fluorescentes de los mismos campos después de que las células se tiñeran con un anticuerpo específico para cada factor de reprogramación 24 horas después de la transfección. Estos resultados muestran que cada una de las proteínas de factor de reprogramación se expresó en las células de fibroblastos 1079 humanos 24 horas después de la transfección con los respectivos ARNm que codifican el factor de reprogramación y que las proteínas del factor de reprogramación se localizaron en las ubicaciones subcelulares previstas. A-T tienen un aumento de 20x. U-X tienen un aumento de 10x.

35 La figura 2 muestra que el ARNm que codifica factores de reprogramación humanos (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 e SOX2) produce células iPS en células somáticas humanas. La figura 2 muestra imágenes de campo brillante (A, C) e imágenes de inmunofluorescencia (B, D) de una colonia de células iPS a los 12 días después de la transfección final con ARNm que codifica factores de reprogramación. La tinción con NANOG se observa en la colonia n.º 1 (B, D). Las imágenes A y B tienen un aumento de 10x. C y D tienen un aumento de 20x.

40 La figura 3 muestra que las colonias de iPS derivadas de células somáticas humanas 1079 e IMR90 son positivas para NANOG y TRA-1-60. La figura 3 muestra imágenes de contraste de fase (A, D, G) e inmunofluorescencia (B, C, E, F, H, I) de colonias de iPS derivadas de células 1079 (A, D) e IMR90 (G). La misma colonia de iPS que se muestra en (A) es positiva tanto para NANOG (B) como para TRA-1-60 (C). La colonia que se muestra en (D) es positiva para NANOG (E) y positiva para TRA-1-60 (F). La colonia de iPS generada a partir de fibroblastos IMR90 (G) es también positiva tanto para NANOG (H) como para TRA-1-60 (I). Todas las imágenes tienen un aumento de 20x.

45 La figura 4 muestra que la formación de colonias de iPSC rápida y con mayor eficacia se consigue transfectando células con ARNm que codifica factores de reprogramación en medio condicionado por MEF. Se detectaron unas 200 colonias 3 días después de la transfección final; en una placa de 10 cm, se transfectaron células IMR90 tres veces con 36 µg de cada ARNm de reprogramación (es decir, que codifica KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2). Las colonias de iPS representativas se muestran a un aumento de 4x (A,B), 10x (C-E) y 20x (F). Ocho días después de la transfección final de ARNm con ARNm que codifican los seis factores de reprogramación, se contaron más de 1000 colonias de iPSC en células IMR90 transfectadas con 18 µg (G, I) o 36 µg (H) de cada uno de los seis ARNm. Se muestran las colonias representativas a un aumento de 4x (G-H) y a un aumento de 10x (I).

50 La figura 5 muestra que las colonias de iPSC derivadas de 1079 e IMR90 son positivas tanto para NANOG como para TRA-1-60. Ocho días después de la transfección final de ARNm con 36 µg de ARNm para cada uno de los seis factores de reprogramación, las colonias de iPSC derivadas de 1079 (mostradas en A, D y G) son positivas para NANOG (B, E y H) y para TRA-1-60 (C, F e I). Ocho días después de la transfección final de ARNm con 18 µg (J-L) o 36 µg (M-O) de ARNm para cada uno de los seis factores de reprogramación, las colonias derivadas de IMR90 también son positivas para NANOG (K, N) y para TRA-1-60 (L, O).

Figura 6. Producción de TNF- α a partir de MDDC transfectadas con ARN natural, que demuestra que el ARN sintetizado *in vitro* no modificado y el ARN bacteriano y el ARN mitocondrial de mamíferos es altamente inmunogénico, mientras que otro ARN de mamíferos es débilmente inmunogénico. Las MDDC humanas se incubaron con Lipofectin® solo o complejo con R-848 (1 μ g/ml), o ARN (5 μ g/ml) de células 293 (ARN totales, nucleares y citoplasmáticos), corazón de ratón (poliA + ARNm), ARN mitocondrial plaquetario humano, ARNt bovino, ARNt bacteriano y ARN total (*E. coli*) con o sin digestión con RNasa. Después de 8 h, se midió TNF- α en los sobrenadantes por ELISA. Se muestran los valores medios $\pm$ SEM. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 7. La activación dependiente de TLR por ARN demuestra que la modificación m6A y s2U bloquea la señalización de TLR3, mientras que todas las modificaciones bloquean la señalización de TLR7 y TLR8 y que el ARN bacteriano menos modificado y ARN no modificado transcrito *in vitro* activan los tres TLR. (A) Se analizaron alícuotas (1 μ g) de ARN-1571 transcrito *in vitro* sin (ninguna) o con modificaciones de nucleósidos m⁵C, m⁶A, Ψ , m⁵U o S²U en gel de agarosa desnaturante seguido de tinción con bromuro de etidio e iluminación UV. (B) Se trataron células 293 que expresan TLR8, TLR7 y TLR3 humano y los vectores de control con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1 μ g/ml) o ARN (5 μ g/ml). Se observan los nucleótidos presentes en ARN-730 y ARN-1571. (C) Se obtuvieron CpG ODN-2006 (5 μ g/ml), LPS (1,0 μ g/ml) y ARN aislado a partir de hígado de rata, línea celular de ratón (TUBO) y bazo humano (total), ARN mitocondrial plaquetario humano o de dos fuentes diferentes de *E. coli*. Sirvieron como control células 293-hTLR9. Después de 8 h, se midió IL-8 en los sobrenadantes por ELISA. Se muestran los valores medios $\pm$ SEM. Las líneas celulares que contienen ARNip dirigido a hTLR3 se indican con asterisco. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

Figura 8. La producción de citocinas por la CD transfectada con ARN demuestra que todas las modificaciones bloquean la activación de citocinas generadas por CD, mientras que solo las modificaciones de uridina bloquean la activación de la CD derivada de sangre. Se trataron las MDDC generadas con GM-CSF/IL-4 (A, C) o GM-CSF/IFN- α MDDC (B), y las CD1 y CD2 primarias (D) durante 8 a 16 h con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1 μ g/ml) o ARN (5 μ g/ml). Se observan los nucleósidos presentes en ARN-1571. Se midieron TNF- α , IL-12(p70) y IFN- α en el sobrenadante por ELISA. Se muestran los valores medios $\pm$ SEM. Los resultados son representativos de 10 (A y C), 4 (B) y 6 (D) experimentos independientes. E. Activación de CD por ARN. Se trataron las MDDC durante 20 h con Lipofectin® solo o complejo con 1 μ g/ml de poli(I):(C) o R-848 como controles positivos (panel superior) o Lipofectin® complejo con el ARN indicado (5 μ g/ml; panel inferior). Se observan los nucleósidos presentes en ARN-1886. Se determinó la expresión de CD83, CD80 y HLA-DR por citometría de flujo.

Figura 9. La activación de CD por ARN demuestra que toda modificación de nucleósidos inhibe la activación de CD mediada por ARN. Se trataron las MDDC durante 20 h con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1 μ g/ml) o ARN-1571, modificado tal y como se indica (5 μ g/ml). (A) Tinción de CD83 y HLA-DR. (B) Niveles de TNF- α en los sobrenadantes y fluorescencia media de CD80 y CD86 en respuesta a la incubación con ARN. Se aumentó el volumen del medio 30 veces para la citometría de flujo, como se indica por el asterisco. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

Figura 10. Se transcribió el ARN-1571 protegido con caperuza que contiene diferentes cantidades (0, 1, 10, 50, 90, 99 y 100% de nucleósido modificado, en relación con el correspondiente NTP no modificado) y se encontró que la modificación de solo unos pocos nucleósidos dio como resultado una inhibición de la activación de CD. A. Se digirieron todos los transcritos a monofosfatos y se analizaron por HPLC de fase inversa para determinar la cantidad relativa de incorporación de nucleósidos modificados. Se muestran los perfiles representativos de absorbancia obtenidos en las proporciones indicadas (Ψ :U). Se observan los tiempos de elución para 3'-monofosfatos de pseudouridina (Ψ), citidina (C), guanosina (G), uridina (U), 7-metilguanosina ("m7G") y adenosina ("A"). (B) Contenido de nucleósido modificado de ARN-1571. Se calculó el porcentaje esperado de m⁶A, o m⁵C en ARN-1571 en función de la cantidad relativa de NTP modificado en la reacción de transcripción y la composición de los nucleósidos de ARN-1571 (A: 505, U: 451, C: 273, G: 342). Los valores para el contenido de nucleósido modificado medido se determinaron basándose en la cuantificación de los cromatogramas de HPLC. Notas: A: valores (%) para m⁶ATP, Ψ TP y m⁵CTP en relación con ATP, UTP y CTP, respectivamente. B: valores para m⁶A, Ψ y m⁵C monofosfatos en relación con todas las NMP. (C) Se transfectaron las MDDC con Lipofectin® complejo con ARN-1571 protegido con caperuza (5 μ g/ml) que contiene la cantidad indicada de m⁶A, Ψ o m⁵C. Después de 8 h, se midió TNF- α en los sobrenadantes. Los datos se expresan como inhibición relativa de TNF- α . Se muestran los valores medios $\pm$ SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes.

Figura 11. La expresión de TNF- α por CD transfectadas con oligorribonucleótidos demuestra que tan solo un nucleósido modificado reduce la activación de CD. (A) Se muestran secuencias de oligorribonucleótidos (ORN) sintetizados químicamente (ORN1-4) (SEQ ID NO: 6-9) o transcritos *in vitro* (ORN5-6) (SEQ ID NO: 10-11). Se resaltan las posiciones de los nucleósidos modificados Um (2'-O-metiluridina), m⁵C y Ψ . Las MDDC humanas se transfectaron con Lipofectin® solo (medio), R-848 (1 μ g/ml) o Lipofectin® complejo con ARN (5 μ g/ml). Cuando se indicó, las células se trataron con 2,5 μ g/ml de cicloheximida (CHX). (B). Después de 8 h de incubación, se midió TNF- α en el sobrenadante. (C) Se analizó el ARN de las células por transferencia Northern. Se muestran los valores medios representativos $\pm$ SEM de 3 experimentos diferentes.

Figura 12. A. El ARNm modificado con Ψ no estimula la producción de citocinas proinflamatorias *in vivo*. Las muestras de suero (6 h después de la inyección) se analizaron por ELISA y revelaron que 3 μ g de ARNm no modificado inducían un nivel más elevado de IFN- α que los 3 μ g de ARNm modificado con Ψ (P < 0,001). Los niveles de IFN- α inducidos por 3 μ g de ARNm modificado con Ψ fueron similares a los obtenidos cuando se inyectó a los animales con lipofectina no complejada. Los valores se expresan como la media $\pm$ s.e.m. (n = 3 o 5

animales/grupo). B. Se observaron resultados similares con TNF- α .

Figura 13. El ARNm que contiene pseudouridina (Ψ) no activa PKR. Ψ : pseudouridina. Control: ARN no modificado. m⁵C: ARNm con modificación m⁵C.

Figura 14. Expresión aumentada de luciferasa a partir de ARN que contiene pseudouridina en el lisado de reticulocitos de conejo. Luc-Y: ARNm con modificación con pseudouridina; luc-C: ARN no modificado. Los datos se expresan normalizando la actividad de la luciferasa frente al ARN de luciferasa no modificado.

Figura 15. Expresión aumentada de renilla a partir de ARNm que contiene pseudouridina en células cultivadas. A. células 293. B. Murina primaria, células dendríticas de ratón derivadas de médula ósea. renilla-Y: ARNm con modificación con pseudouridina; renilla-C: ARN no modificado. Se modificó el ARN con m⁵C, m⁶A y m⁵U como se indica.

Figura 16. A. Efecto aditivo de elementos 3' y 5' sobre la eficacia de traducción de ARNm modificado con Ψ . Se transfectaron células 293 con luciferasa de luciérnaga y ARNm modificado con Ψ que tenía caperuza 5' (capLuc), cola de poliA 3' de 50 nucleótidos de longitud (TEVlucA50), ambos o ninguno de estos elementos (capTEVlucA50 y Luc, respectivamente). Las células se lisaron 4 horas más tarde y las actividades de luciferasa se midieron en alícuotas (1/20^o) del total de los lisados. B. El ARNm modificado con Ψ es más estable que el ARNm no modificado. Se lisaron células 293 transfectadas con CapTEVlucAn que contenían nucleósidos no modificados o modificados con Ψ en los tiempos indicados después de la transfección. Se analizaron alícuotas (1/20^o) de los lisados para luciferasa. Los errores estándar son demasiado pequeños para visualizarse con barras de error. C. La expresión de β -galactosidasa se potencia utilizando ARNm modificado con Ψ en comparación con ARNm convencional. Las células 293 sembradas en placas de 96 pocillos se transfectaron con ARNm complejados con lipofectin (0,25 μ g/pocillo) que codifica β -galactosidasa bacteriana (lacZ). Los transcritos tenían una caperuza y una cola de poliA 3' que era o de 30 nucleótidos de longitud (caplacZ) o de ~200 nucleótidos de longitud (caplacZ-An). Se analizaron construcciones hechas utilizando nucleósidos convencionales de U o Ψ . Las células se fijaron y tiñeron con X-gal, 24 horas después de la transfección. Se tomaron imágenes por microscopía invertida (a un aumento de 40 y 100x) a partir de los pocillos representativos.

Figura 17. A. Expresión de renilla después de inyección intracerebral de ARNm codificante modificado y no modificado. Se inyectó corteza cerebral de rata en 8 sitios/animales. Un hemisferio se inyectó con ARN protegido con caperuza que codifica renilla con modificación con pseudouridina (capRenilla-Y), mientras el hemisferio correspondiente con ARN protegido con caperuza sin modificación de nucleósido (capRenilla-C). Se muestran los datos de 2 animales (6 sitios de inyección). BG; menor nivel de detección del ensayo. B. El ARNm modificado con Ψ suministrado por vía intravenosa se expresa en bazo. Se administró Ψ ARNm complejado con Lipofectin (0,3 μ g de capTEVlucAn/ratón) por inyección en la vena de la cola. Los animales se sacrificaron a las 2 y 4 horas después de la inyección y se midieron las actividades de luciferasa en alícuotas (1/10^o) de órganos homogeneizados en tampón de lisis. Los valores representan las actividades de luciferasa en todos los órganos. C. ARNm modificado con Ψ muestra una mayor estabilidad y traducción *in vivo*. Se suministró capTEVlucAn (0,3 μ g/60 μ l/animal) complejado con Lipofectin con o sin modificaciones con Ψ i.v. a ratones. Los animales se sacrificaron a las 1, 4 y 24 horas después de la inyección y 1/2 de sus bazos se procesaron para mediciones de enzima luciferasa (panel izquierdo) y la otra mitad para análisis de ARN (panel derecho). Se midieron las actividades de luciferasa en alícuotas (1/5^o) del homogeneizado hecho a partir de la mitad de los bazos. Los valores trazados representan actividades de luciferasa en todo el bazo y se expresan como la media $\pm$ s.e.m. (n = 3 o 4/puntos). D. Expresión de luciferasa de luciérnaga después de inyección intracraneal de ARNm. capTEVluc-Y: ARN protegido con caperuza, modificado con pseudouridina que codifica luciferasa de luciérnaga. CapTEVluc-C: ARN protegido con caperuza sin modificación de nucleósidos.

Figura 18. La producción de proteína es dependiente de la cantidad de ARNm suministrado por vía intravenosa en ratones. Las cantidades indicadas de ácidos nucleicos complejados con lipofectin, se suministraron ARNm capTEVlucAn con o sin constituyentes Ψ y ADN de plásmido pCMVluc en un volumen de 60 μ l/animal por inyección intravenosa en ratones. Los animales inyectados con ARNm o ADN de plásmido se sacrificaron a las 6 h o 24 h después de la inyección, respectivamente, y se midieron las actividades de luciferasa en alícuotas (1/10^o) de sus bazos homogeneizados en tampón de lisis. Se muestra el valor de cada animal y las líneas cortas horizontales indican la media; N.D., no detectable.

Figura 19. Expresión de luciferasa de luciérnaga después de administración intratraqueal de ARNm codificante. El ARNm se complejó con lipofectin (o PEI, como se indica) y se inyectó a los animales con 0,3 μ g de ARNm con o sin modificación Ψ que codifica luciferasa de luciérnaga, a continuación, se les sacrificó 3 horas más tarde. Se recogieron y homogeneizaron los pulmones y se midió la actividad de luciferasa en alícuotas de los órganos lisados.

Figura 20. El ARNm modificado con Ψ no induce mediadores inflamatorios después de administración pulmonar. Inducción de TNF- α e IFN- α en suero después de administración intratraqueal de ARNm no modificado o ARNm modificado con Ψ que codifica luciferasa. Los niveles de TNF- α e IFN- α en suero se determinaron por ELISA 24 horas después de la administración de ARNm.

La figura 21 muestra los resultados del Ejemplo 35: El ARNm que codifica luciferasa de Luciérnaga o Renilla con las modificaciones indicadas se complejó con lipofectin y se suministró a células dendríticas murinas (A) y HEK293T (B). Las CD humanas se transfectaron con ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga o renilla complejado con TransIT con las modificaciones indicadas (C). Los datos se expresan como las veces de cambio comparado con el ARNm no modificado.

La figura 22 muestra los resultados del Ejemplo 36: Las reacciones de transcripción de polimerasa de T7 utilizadas para la generación de ARNm dan como resultado grandes cantidades de ARN del tamaño correcto,

pero también contiene contaminantes. Esto se visualiza por la aplicación de ARN a una columna de HPLC de fase inversa que separa el ARN en función del tamaño en condiciones de desnaturalización. Se aplicó ARN TEV-luciferasa-A51 modificado con Ψ a una columna de HPLC en tampón B al 38% y se sometió a un gradiente lineal creciente de tampón B hasta el 55%. El perfil demostró contaminantes tanto más pequeños de lo esperado como más grandes de lo esperado.

La figura 23 muestra los resultados del Ejemplo 37: **(A)** Se suministró ARNm que codifica EPO con las modificaciones indicadas y con o sin purificación por HPLC a CD murinas y los niveles de EPO en el sobrenadante se midieron 24 horas más tarde. Mientras que el ARNm modificado con m5C/ Ψ tenía el mayor nivel de traducción antes de la purificación por HPLC, el ARNm modificado con Ψ tuvo la mayor traducción después de la purificación por HPLC. **(B)** Las CD Humanas se transfectaron con ARNm que codifica renilla con las modificaciones indicadas con o sin purificación por HPLC.

La figura 24 muestra los resultados del Ejemplo 38: **(A)** Las CD Humanas se transfectaron con ARN complejo con TransIT con las modificaciones indicadas con o sin purificación por HPLC. Los niveles de IFN- α se midieron después de 24 horas. La purificación por HPLC aumentó la inmunogenicidad de ARN no modificado, que es dependiente de la secuencia, ya que otros ARN no modificados tenían niveles similares de IFN- α o niveles reducidos después de la purificación por HPLC. El ARN modificado por Ψ tenía niveles no medibles de IFN- α , similares a los de las CD tratadas de control. **(B)** El ARN modificado con Ψ antes (-) y después de purificación por HPLC (P1 y P2) se analizó para ARNbc utilizando transferencia puntual con un anticuerpo monoclonal específico para ARNbc (J2). La purificación de ARN eliminó la contaminación por ARNbc. **(C)** El ARN modificado por Ψ que codifica factores iPS es inmunogénico, que se elimina por purificación del ARN por HPLC.

La figura 25 proporciona la secuencia codificante de ARNm para KLF4 (SEQ ID NO:12) y LIN28 (SEQ ID NO:13).

La figura 26 proporciona la secuencia codificante de ARNm para cMYC (SEQ ID NO:14) y NANOG (SEQ ID NO:15).

La figura 27 proporciona la secuencia codificante de ARNm para OCT4 (SEQ ID NO:16) y SOX2 (SEQ ID NO:17).

La figura 28 muestra que el ARNm que codifica factores de reprogramación humanos (KLF4, c-MYC, OCT4 e SOX2) produce células iPS en células primarias de queratinocitos humanos. La figura 28 muestra imágenes de contraste de fase de células HEKn a los 2 días (A) y a los 11 días (B) de formación de la colonia de iPS y a los 20 días (C) después de la transfección final con ARNm que codifica 4 factores de reprogramación. Las imágenes tienen un aumento de 10x.

La figura 29 muestra que el ARNm que codifica factores de reprogramación humanos (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) produce células iPS en queratinocitos humanos que son positivos para marcadores de células iPS conocidos. La figura 29 muestra imágenes de contraste de fase de colonias derivadas de células HEKn (A, D y G). La misma colonia de iPS que se muestra en (A) es positiva tanto para KLF4 (B) como para LIN28 (C). La colonia que se muestra en (D) es positiva para SSEA4 (E) y positiva para TRA-1-60 (F). La colonia de iPS que se muestra en (A) es positiva para NANOG (H). Todas las imágenes tienen un aumento de 20x.

La figura 30 muestra aumentos en la expresión de 3 mensajes asociados a iPS en células HEK transfectadas con 4 ARNm de reprogramación (KLF4, c-MYC, OCT4 y SOX2) que no incluían el factor de reprogramación NANOG. La expresión aumentada de los mensajes se detectó por qPCR y se normaliza a la expresión de GAPDH. El nivel de expresión de cada mensaje se representa en relación con el nivel encontrado en la línea celular original.

Definiciones

La presente invención se entenderá e interpretará basándose en los términos que se definen a continuación.

Como se usa en el presente documento “sustancialmente todos”, en referencia a ARNm monocatenarios completos que comprenden un resto de pseudouridina o 5-metilcitidina, significa que, de todos los ARNm monocatenarios completos presentes en una muestra, al menos el 95% tiene un resto de pseudouridina o de 5-metilcitidina.

Como se usa en el presente documento “sustancialmente todos”, en referencia a ARNm monocatenarios completos que comprenden un resto de pseudouridina o 5-metilcitidina, significa que, de todos los ARNm monocatenarios completos presentes en una muestra, al menos el 99% tiene un resto de pseudouridina o de 5-metilcitidina.

Como se usa en el presente documento “moléculas contaminantes de ARN” son moléculas que comprenden restos de ARN y que pueden activar, al menos parcialmente, una respuesta inmunitaria cuando se transfectan en una célula (por ejemplo, por la activación de sensores tales como proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), gen-I inducible por ácido retinoico (RIG-I), receptor de tipo Toll (TLR)3, TLR7, TLR8, y oligoadenilato sintetasa (OAS), o moléculas de ARN que pueden activar, al menos parcialmente, una respuesta de interferencia de ARN (ARNi) (por ejemplo, incluida una respuesta a moléculas grandes de ARN bicatenario o a moléculas pequeñas de ARN bicatenario (ARNip)) en la célula. Las moléculas contaminantes de ARN ejemplares incluyen, pero sin limitación: ARNm de longitud parcial o no completa que codifican solamente una porción de un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS de longitud no completa); ARNm monocatenarios que son mayores que el ARNm de longitud completa que codifica un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS), por ejemplo, sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, por “IVT continua” u otros mecanismos; moléculas de ARNm bicatenario grandes o pequeñas; y moléculas de ARNm sin caperuza.

Como se usa en el presente documento, una preparación de ARN purificado está “sustancialmente libre” de moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado), cuando menos del 0,5% del ARN total en la preparación de ARN purificado consiste en moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado). Las cantidades y cantidades relativas de moléculas de ARNm no contaminantes y moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado) se pueden determinar por HPLC u otros procedimientos utilizados en la materia para separar y cuantificar moléculas de ARN.

Como se usa en el presente documento, una preparación de ARN purificado está “esencialmente libre” de moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado), cuando menos del 1,0% del ARN total en la preparación de ARN purificado consiste en moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado). Las cantidades y cantidades relativas de moléculas de ARNm no contaminantes y moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado) se pueden determinar por HPLC u otros procedimientos utilizados en la materia para separar y cuantificar moléculas de ARN.

Como se usa en el presente documento, una preparación de ARN purificado está “virtualmente libre” de moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado), cuando menos del 0,1% del ARN total en la preparación de ARN purificado consiste en moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado). Las cantidades y cantidades relativas de moléculas de ARNm no contaminantes y moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado) se pueden determinar por HPLC u otros procedimientos utilizados en la materia para separar y cuantificar moléculas de ARN.

Como se usa en el presente documento, una preparación de ARN purificado está “libre” de moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado), cuando menos del 0,01% del ARN total en la preparación de ARN purificado consiste en moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado). Las cantidades y cantidades relativas de moléculas de ARNm no contaminantes y moléculas contaminantes de ARN (o un contaminante de ARN particular citado) se pueden determinar por HPLC u otros procedimientos utilizados en la materia para separar y cuantificar moléculas de ARN.

Las expresiones “que comprende”, “que contiene”, “que tiene”, “incluye” y “que incluye” deben interpretarse como “incluyendo”, “pero sin limitación” a menos que se indique otra cosa. Los términos “un”, “una/o” y “el/la, los/las” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención y, específicamente, en el contexto de las reivindicaciones adjuntas, deben interpretarse para abarcar tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o lenguaje ejemplar (“por ejemplo”, “p.ej.”, “tal como” está destinado meramente a ilustrar aspectos o realizaciones de la invención, y no debe interpretarse como que limita el ámbito de la misma, a menos que se indique lo contrario.

Con respecto al uso de la palabra “derivado”, tal como para un ARN (incluido ARNm) o un polipéptido que “deriva” de una muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares, se entiende que tanto el ARN como el polipéptido estaban presentes en la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares, o se obtuvo utilizando el ARN presente en la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares por un proceso tal como una reacción de transcripción *in vitro* o una reacción de amplificación de ARN, en el que el ARN o polipéptido se codifica por o a partir de una copia de todas o de una porción de las moléculas de ARN o polipéptido en la muestra original, muestra biológica, célula, tumor o similares. A modo de ejemplo, tal ARN puede proceder de una transcripción “*in vitro*” o de una reacción de amplificación de ARN, con o sin clonación de ADNc, en lugar de obtenerse directamente de la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares, siempre que el ARN original utilizado para la transcripción *in vitro* o para una reacción de amplificación de ARN fuera de la muestra, muestra biológica, célula, tumor o similares. Las expresiones “muestra” y “muestra biológica” se usan en su sentido más amplio y abarcan muestras o especímenes obtenidos de cualquier fuente que contiene o puede contener células eucariotas, incluidas fuentes biológicas y ambientales. Como se usa en el presente documento, el término “muestra” cuando se usa para referirse a muestras biológicas obtenidas a partir de organismos, incluye fluidos corporales (por ejemplo, sangre o saliva, heces, biopsias, hisopos (por ejemplo, hisopos bucales), células aisladas, exudados y similares. Los organismos incluyen hongos, plantas, animales y seres humanos. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como que limitan los tipos de muestras u organismos que encuentran utilidad con la presente descripción. Además, para realizar investigaciones o estudiar los resultados relacionados con el uso de un procedimiento o composición de la invención, en algunos ejemplos, una “muestra” o “muestra biológica” comprende células fijadas, células tratadas, lisados de células y/o similares. En algunos ejemplos, tales como ejemplos del procedimiento en el que el ARNm se suministra a una célula de un organismo que tiene una enfermedad conocida o a una célula que muestra un estado de enfermedad o patología conocida, la “muestra” o “muestra biológica” también comprende bacterias o virus.

Como se usa en el presente documento, el término “incubación” y variantes del mismo significan poner en contacto uno o más componentes de una reacción con otro componente o componentes, en condiciones y durante suficiente tiempo tal que se forme un producto de reacción deseado.

Como se usa en el presente documento, un “nucleósido” consiste en una base de ácido nucleico (por ejemplo, las bases de ácido nucleico canónicas: guanina (G), adenina (A), timina (T), uracilo (U) y citosina (C)); o una base de ácido nucleico modificada (por ejemplo, 5-metilcitosina (m⁵C)), que se une covalentemente a un azúcar pentosa (por ejemplo, ribosa o 2'-desoxirribosa), mientras que un “nucleótido” o “mononucleótido” consiste en un nucleósido que

está fosforilado en uno de los grupos hidroxilo del azúcar pentosa. Se dice que las moléculas lineales de ácido nucleico tienen un "5' terminal" (extremo 5') y un "3' terminal" (extremo 3') porque, excepto con respecto al protección con caperuza o la adenilación (por ejemplo, adenilación por una ligasa), los mononucleótidos se unen en una dirección a través de un enlace fosfodiéster para producir oligonucleótidos o polinucleótidos, de una manera tal que un fosfato en el carbono 5' de un resto de azúcar de mononucleótido se une a un oxígeno en el carbono 3' del resto de azúcar de su mononucleótido vecino. Por lo tanto, un extremo de un oligonucleótido o polinucleótido monocatenario lineal o un extremo de una cadena de un ácido nucleico bicatenario lineal (ARN o ADN) se denomina "extremo 5'" si su fosfato 5' no está unido o vinculado al oxígeno del carbono 3' de un resto de azúcar de un mononucleótido y como "extremo 3'" si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' que se une a un azúcar de otro mononucleótido. Un nucleótido terminal, como se usa en el presente documento, es el nucleótido de la posición final del extremo 3' o 5'.

Para lograr objetivos específicos, una base de ácido nucleico, un resto de azúcar o un enlace internucleósido (o internucleótido) en uno o más de los nucleótidos del ARNm que se introduce en la célula eucariota en cualquiera de los procedimientos de la descripción puede comprender una base modificada, un resto de azúcar o un enlace internucleósido. Por ejemplo, además de los otros nucleótidos modificados discutidos en otra parte del presente documento para llevar a cabo los procedimientos de la presente descripción, uno o más de los nucleótidos del ARNm también pueden tener una base de ácido nucleico modificada que comprende o consiste en: xantina; aliamino-uracilo; aliamino-timidina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 5-propinil uracilo; 5-propinil citosina; 4-tiouracilo; 6-tioguanina; un aza o desaza uracilo; una aza o desaza timidina; una aza o desaza citosina; un aza o desaza adenina; una aza o desaza guanina; o una base de ácido nucleico que se derivatiza con un resto de biotina, un resto de digoxigenina, un resto fluorescente o quimioluminiscente, un resto de inactivación o algunos otros restos para lograr uno o más fines específicos; y/o uno o más de los nucleótidos del ARNm pueden tener un resto de azúcar, tal como, pero sin limitación: 2'-fluoro-2'-desoxirribosa o 2'-O-metil-ribosa, que proporciona resistencia a algunas nucleasas; o 2'-amino-2'-desoxirribosa o 2'-azido-2'-desoxirribosa, que puede marcarse mediante su reacción con colorantes visibles, fluorescentes, fluorescentes infrarrojos u otros colorantes o productos químicos detectables que tengan un resto electrófilo, fotorreactivo, alquinilo u otro resto químico reactivo.

En algunos ejemplos de la descripción, uno o más de los nucleótidos del ARNm comprenden un enlace internucleósido modificado, tal como un enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato, que es resistente a algunas nucleasas, incluido en un dinucleótido análogo de caperuza (Grudzien-Nogalska y col. 2007) que se usa en una reacción IVT para la protección cotranscripcional del ARN o en la cola de poli(A) (por ejemplo, por incorporación de un nucleótido que tiene el enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato modificado durante la IVT del ARN o, por ejemplo, por incorporación de ATP que contiene el enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosforoseleniato o fosforodiseleniato modificado en una cola de poli(A) en el ARN por poliadenilación utilizando una poli(A) polimerasa). La descripción no se limita a las bases de ácidos nucleicos modificadas, restos de azúcar o enlaces internucleósido enumerados, que se presentan para mostrar ejemplos que pueden usarse para un fin particular en un procedimiento.

Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico" o un "polinucleótido" o un "oligonucleótido" es una secuencia de nucleótidos enlazada covalentemente en los que la posición 3' del resto de azúcar de un nucleótido está unida por un enlace fosfodiéster a la posición 5' del resto de azúcar del siguiente nucleótido (es decir, un enlace fosfodiéster 3' a 5') y en el que los nucleótidos están unidos en una secuencia específica; es decir, un orden lineal de nucleótidos. En algunos ejemplos, el ácido nucleico o polinucleótido u oligonucleótido consiste en o comprende 2'-desoxirribonucleótidos (ADN). En algunos ejemplos, el oligonucleótido consiste en o comprende ribonucleótidos (ARN).

Los términos "aislado" o "purificado", cuando se usan en relación con un polinucleótido o ácido nucleico, como en "ARN aislado" o "ARN purificado", se refieren a un ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos un contaminante con el que está ordinariamente asociado en su fuente. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado o purificado (por ejemplo, ADN o ARN) está presente en una forma o configuración diferente de la que se encuentra en la naturaleza, o en una forma o configuración diferente de la que existía antes de someterlo a un tratamiento o proceso de purificación. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped junto con otros genes, así como proteínas estructurales y funcionales, y se encuentra un ARN específico (por ejemplo, un ARNm específico que codifica una proteína específica) en la célula como una mezcla con otros numerosos ARN y otros componentes celulares. El polinucleótido o ácido nucleico aislado o purificado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria.

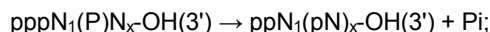
Una "caperuza" o un "nucleótido de caperuza" significa un nucleósido-5'-trifosfato que, en condiciones de reacción adecuadas, se usa como un sustrato por un sistema enzimático de protección con caperuza y que de este modo se une al extremo 5' de un ARN no protegido con caperuza que comprende transcritos de ARN primario o ARN que tiene un 5'-difosfato. El nucleótido que está así unido al ARN también se denomina "nucleótido de caperuza" en el presente documento. Un "nucleótido de caperuza" es un nucleótido de guanina que se une a través de su extremo 5' al extremo 5' de un transcrito de ARN primario. El ARN que tiene el nucleótido de caperuza unido a su extremo 5' se denomina "ARN protegido con caperuza" o "transcrito de ARN protegido con caperuza" o "transcrito protegido con caperuza." Un nucleósido de caperuza común es 7-metilguanosina o N⁷-metilguanosina (a veces denominada "caperuza patrón"), que tiene una estructura designada "m⁷G", en cuyo caso, el ARN protegido con caperuza o "ARN

protegido con caperuza por m⁷G" tiene una estructura designada m⁷G(5')ppp(5')N₁(pN)_xOH(3') o, más simplemente, m⁷GpppN₁(pN)_x o m⁷G[5'] ppp[5']N, en el que m⁷G representa el nucleósido de caperuza 7-metilguanosina, ppp representa el puente trifosfato entre los carbonos 5' del nucleósido de caperuza y el primer nucleótido del transcrito de ARN primario, N₁(pN)_xOH(3') representa el transcrito de ARN primario, de los cuales N₁ es el nucleótido más 5', "p" representa un grupo fosfato, "G" representa un nucleósido de guanosina, "m⁷" representa el grupo metilo en la posición 7 de guanina y "[5']" indica la posición en la que el "p" se une a la ribosa del nucleótido de caperuza y al primer nucleósido del transcrito de ARNm ("N"). Además de esta "caperuza patrón", una variedad de otros análogos de caperuza de origen natural y sintético son conocidos en la técnica. El ARN que tiene cualquier nucleótido de caperuza se conoce como "ARN protegido con caperuza." El ARN protegido con caperuza puede ser de origen natural de una muestra biológica o se puede obtener por protección con caperuza *in vitro* de ARN que tiene un grupo 5' trifosfato o de ARN que tiene un grupo 5' difosfato con un sistema enzimático de protección con caperuza (por ejemplo, sistema enzimático de protección con caperuza de vaccinia o sistema de enzima de protección con caperuza de *Saccharomyces cerevisiae*). Como alternativa, el ARN protegido con caperuza puede obtenerse por transcripción *in vitro* (IVT) de un molde de ADN que contiene un promotor de ARN polimerasa, en el que, además del GTP, la reacción IVT también contiene un dinucleótido análogo de caperuza (por ejemplo, un análogo de caperuza m⁷GpppG o un análogo de caperuza N⁷-metil, 2'-O-metil-GpppG ARCA o un análogo de caperuza N⁷-metil, 3'-O-metil-GpppG ARCA) utilizando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un kit de protección con caperuza AMPLICAP[™] T7 o un kit de transcripción MESSAGEMAX[™] T7 ARCA-CAPPED MESSAGE, EPICENTRE o CellScript).

La protección con caperuza de un transcrito de ARNm primario 5'-trifosforilado *in vivo* (o usando un sistema enzimático de protección con caperuza *in vitro*) se produce a través de varios pasos enzimáticos (Higman y col., 1992, Martin y col., 1975, Myette y Niles 1996).

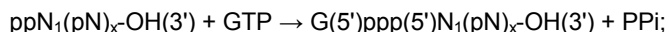
Las siguientes reacciones enzimáticas están involucradas en la protección con caperuza de ARNm eucariota:

(1) La ARN trifosfatasa escinde el 5'-trifosfato de ARNm a un difosfato,



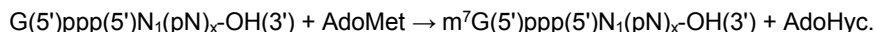
y a continuación

(2) la ARN guaniltransferasa cataliza la unión de GTP al 5'-difosfato de la mayoría de los nucleótidos 5' (N₁) del ARNm,



y, por último,

(3) la guanina-7-metiltransferasa, utilizando S-adenosil-metionina (AdoMet) como un co-factor, cataliza la metilación del nitrógeno 7 de guanina en el nucleótido de caperuza,



El ARN que resulta de la acción de la ARN trifosfatasa y de las actividades enzimáticas de la ARN guaniltransferasa, así como el ARN que se metila adicionalmente por la actividad enzimática de la guanina-7-metiltransferasa, se conoce en el presente documento como "ARN protegido con caperuza 5'" o "ARN protegido con caperuza" y un "sistema enzimático de protección con caperuza" o, más simplemente, una "enzima de protección con caperuza" en el presente documento significa cualquier combinación de uno o más polipéptidos que tienen las actividades enzimáticas que dan como resultado "ARN protegido con caperuza." Los sistemas enzimáticos de protección con caperuza, incluidas las formas clonadas de dichas enzimas, se han identificado y purificado a partir de muchas fuentes y se conocen bien en la materia. (Banerjee 1980, Higman y col. 1992, Higman y col. 1994, Myette y Niles 1996, Shuman 1995, Shuman 2001, Shuman y col. 1980, Wang y col., 1997). Cualquier sistema enzimático de protección con caperuza que puede convertir ARN no protegido con caperuza que tiene un 5' polifosfato en ARN protegido con caperuza se puede utilizar para proporcionar un ARN protegido con caperuza para cualquiera de las realizaciones de la presente invención. En algunos ejemplos, el sistema enzimático de protección con caperuza es un sistema enzimático de protección con caperuza de poxvirus. En algunos ejemplos preferidos, el sistema enzimático de protección con caperuza es una enzima de protección con caperuza de virus vaccinia. En algunos ejemplos, el sistema enzimático de protección con caperuza es una enzima de protección con caperuza de *Saccharomyces cerevisiae*. También, en vista del hecho de que los genes que codifican ARN trifosfatasa, ARN guaniltransferasa y guanina-7-metiltransferasa a partir de una fuente pueden complementar delecciones en uno o todos estos genes de otra fuente, el sistema enzimático de protección con caperuza puede originarse a partir de una fuente, o una o más de las actividades de ARN trifosfatasa, ARN guaniltransferasa y/o guanina-7-metiltransferasa pueden comprender un polipéptido de una fuente diferente.

Un "nucleótido de caperuza modificado" de la presente descripción significa un nucleótido de caperuza en el que el azúcar, la base de ácido nucleico o el enlace internucleósido está químicamente modificado en comparación con el correspondiente nucleótido de caperuza canónico 7-metilguanosina. Los ejemplos de un nucleótido de caperuza modificado incluyen nucleótidos de caperuza que comprenden: (i) un 2'- o 3'-desoxiguanosina-5'-trifosfato modificado (o guanina 2'- o 3'-desoxirribonucleico add-5'-trifosfato) en el que la posición 2'- o 3'-desoxi del resto de azúcar

desoxirribosa se sustituye por un grupo que comprende un grupo amino, un grupo azido, un grupo flúor, un grupo metoxi, un grupo tiol (o mercapto) o un grupo metilíto (o metilmercapto); o (ii) un guanosa-5'-trifosfato modificado, en el que el oxígeno O⁶ de la base guanina está metilado; o (iii) 3'-desoxiguanosina. Por razones de claridad, se entenderá en el presente documento que un "desoxiguanosina-5'-trifosfato sustituido por alcoxi" también se puede denominar "guanosa-5'-trifosfato sustituido con O-alquilo"; a modo de ejemplo, pero sin limitación, 2'-metoxi-2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato (2'-metoxi-2'-dGTP) y 3'-metoxi-3'-desoxiguanosina-5'-trifosfato (3'-metoxi-3'-dGTP) se pueden denominar en el presente documento 2'-O-metilguanosa-5'-trifosfato (2'-OMe-GTP) y 3'-O-metilguanosa-5'-trifosfato (3'-OMe-GTP), respectivamente. Después de unir el nucleótido de caperuza modificado al extremo 5' del ARN no protegido con caperuza que comprende transcritos de ARN primario (o ARN que tiene un 5'-difosfato), la porción de dicho nucleótido de caperuza que se une al ARN no protegido con caperuza que comprende transcritos de ARN primario (o ARN que tiene un 5'-difosfato) se puede denominar en el presente documento un "nucleósido de caperuza modificado" (es decir, sin hacer referencia a los grupos fosfatos a los que está unido), pero, a veces, se denomina "nucleótido de caperuza modificado".

Un "ARN protegido con caperuza de nucleótido modificado" es una molécula de ARN protegido con caperuza que se sintetiza utilizando un sistema enzimático de protección con caperuza y un nucleótido de caperuza modificado, en el que el nucleótido de caperuza en su extremo 5' comprende el nucleótido de caperuza modificado o un ARN protegido con caperuza que se sintetiza cotranscripcionalmente en una reacción de transcripción *in vitro* que contiene un dinucleótido análogo de caperuza modificado en el que el dinucleótido análogo de caperuza contiene la modificación química en el nucleótido de caperuza. En algunos ejemplos, el dinucleótido análogo de caperuza modificado es un análogo de caperuza antiinverso o ARCA (Grudzien y col. 2004, Jemielity y col. 2003, Grudzien-Nogalska y col. 2007, Peng y col. 2002, Stepinski y col. 2001).

Un "ARN primario" o "transcrito de ARN primario" significa una molécula de ARN que se sintetiza por una ARN polimerasa *in vivo* o *in vitro* y cuya molécula de ARN tiene un trifosfato en el carbono 5' del nucleótido en posición más 5'.

Una "reacción de amplificación de ARN" o un "procedimiento de amplificación de ARN" significa un procedimiento para aumentar la cantidad de ARN correspondiente a una o múltiples secuencias de ARN deseadas en una muestra. Por ejemplo, el procedimiento de amplificación de ARN puede comprender: (a) sintetizar ADNc de primera cadena complementario a una o más moléculas de ARN deseadas por la extensión de ADN polimerasa dependiente de ARN de uno o más cebadores que se hibridan con las moléculas de ARN deseadas; (b) sintetizar ADNc bicatenario a partir del ADNc de primera cadena utilizando un proceso en el que un promotor de ARN polimerasa funcional se une a la misma; y (c) poner en contacto el ADNc bicatenario con una ARN polimerasa que se une a dicho promotor en condiciones de transcripción por lo cual se obtiene el ARN correspondiente a una o más moléculas de ARN deseadas. A menos que se indique lo contrario, en relación con un ejemplo específico de la descripción, una amplificación de ARN de acuerdo con la presente descripción significa una reacción de amplificación de ARN codificante, que significa una reacción de amplificación de ARN que sintetiza ARN codificante (por ejemplo, ARN que tiene la misma secuencia que un ARNm u otro transcrito de ARN primario, en lugar del complemento de esa secuencia). Las reacciones de amplificación de ARN codificante conocidas en la materia, que están abarcadas dentro de esta definición incluyen, aunque sin limitación, los procedimientos que sintetizan el ARN codificante descrito en Ozawa y col. (Ozawa y col. 2006) y en las solicitudes de patente de Estados Unidos N.º 20090053775; 20050153333; 20030186237; 20040197802; y 20040171041. El procedimiento de amplificación de ARN descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20090053775 es un procedimiento preferido para obtener ARN amplificado derivado de una o más células, cuyo ARN amplificado se usa a continuación para producir ARNm para su uso en los procedimientos de la presente invención.

Una "poli-A polimerasa" ("PAP") significa una ARN polimerasa independiente de molde que se encuentra en la mayoría de eucariotas, procariotas y virus eucarióticos que utilizan selectivamente ATP para incorporar restos de AMP en los extremos 3'-hidroxilados de ARN. Dado que las enzimas PAP que se han estudiado a partir de plantas, animales, bacterias y virus catalizan, todas ellas, la misma reacción global (Edmonds 1990), están altamente conservadas estructuralmente (Gershon 2000) y carecen de especificidad intrínseca para secuencias particulares o tamaños de moléculas de ARN si la PAP se separa de proteínas que reconocen señales de poliadenilación de AAUAAA (Wilusz y Shenk 1988), pueden usarse para la presente invención enzimas PAP de tipo silvestre y recombinantes purificadas de cualquier variedad de fuentes. En algunos ejemplos, una enzima PAP de *Saccharomyces* (por ejemplo, de *S. cerevisiae*) se usa para poliadenilación para producir preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en uno o más ARNm modificados, cada uno de los cuales codifica un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS). En algunos ejemplos, una enzima PAP de *E. coli* se usa para poliadenilación para hacer preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en uno o más ARNm modificados, cada uno de los cuales codifica un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS).

Un "factor de reprogramación" significa una proteína, polipéptido u otra biomolécula que, cuando se usa solo o en combinación con otros factores o condiciones, produce un cambio en el estado de diferenciación de una célula en la que se introduce o expresa el factor de reprogramación. En algunos ejemplos preferidos de los procedimientos de la presente descripción, el factor de reprogramación es una proteína o un polipéptido que se codifica por un ARNm que se introduce en la célula, generando de este modo una célula que muestra un estado cambiado de diferenciación en

comparación con la célula en la que se introdujo el ARNm. En algunos ejemplos preferidos de los procedimientos de la presente descripción, el factor de reprogramación es un factor de transcripción. Un ejemplo de factor de reprogramación utilizado en un procedimiento de la presente descripción es un "factor de inducción de células iPS."

Un "factor de inducción de células iPS" o "factor de inducción de iPSC" es una proteína, polipéptido u otra biomolécula que, cuando se usa solo o en combinación con otros factores de reprogramación, produce la generación de células iPS a partir de células somáticas. Ejemplos de factores de inducción de células iPS incluyen OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG y LIN28. Los factores de inducción de células iPS incluyen secuencias de polipéptidos de longitud completa o fragmentos biológicamente activos de los mismos. Del mismo modo, un ARNm que codifica un factor de inducción de células iPS puede codificar un polipéptido de longitud completa o fragmentos biológicamente activos del mismo. La secuencia codificante de ARNm para factores de inducción de iPS ejemplares se muestran en las Figuras 25 (KLF4 y LIN28), 26 (cMYC y NANOG) y 27 (OCT4 y SOX2). En ciertos ejemplos, se emplean las secuencias o secuencias similares que se muestran en estas figuras, incluidas las moléculas de ARNm que comprenden adicionalmente, unidos a estas secuencias de ARNm, oligorribonucleótidos que presentan cualquiera de las secuencias UTR 5' o 3', secuencias de Kozak, secuencias IRES, nucleótidos de caperuza y/o secuencias de poli(A) usadas en los experimentos descritos en el presente documento o que son comúnmente conocidos en la técnica y que se pueden utilizar en lugar de los usados en el presente documento uniéndolos con estas secuencias de ARNm que codifican proteínas con el fin de optimizar la traducción de las respectivas moléculas de ARNm en las células y mejorar su estabilidad en la célula para lograr los procedimientos descritos en el presente documento.

"Diferenciación" o "diferenciación celular" significa el proceso biológico que ocurre de forma natural por el que una célula que presenta un estado de diferenciación o un tipo celular menos especializado (por ejemplo, un óvulo fertilizado, una célula de un embrión o una célula en un organismo eucariota) da lugar a una célula que presenta un estado de diferenciación o tipo celular más especializado. Los científicos, incluidos biólogos, biólogos celulares, inmunólogos y embriólogos, utilizan una variedad de procedimientos y criterios para definir, describir o caracterizar diferentes células según su "tipo celular", "estado diferenciado" o "estado de diferenciación." En general, una célula se define, describe o categoriza respecto a su "tipo celular", "estado diferenciado" o "estado de diferenciación" en función de uno o más fenotipos presentados por esa célula, pudiendo incluir dichos fenotipos la forma, una actividad o función bioquímica o metabólica, la presencia de ciertas biomoléculas en la célula (por ejemplo, basándose en manchas que reaccionan con biomoléculas específicas), o en la célula (por ejemplo, basándose en la unión de uno o más anticuerpos que reaccionan con biomoléculas específicas en la superficie celular). Por ejemplo, diferentes tipos de células se pueden identificar y clasificar utilizando un clasificador de células o un instrumento clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La "diferenciación" o "diferenciación celular" se puede producir también en células en cultivo.

El término "reprogramación" como se usa en el presente documento, significa diferenciación o diferenciación celular que se produce como respuesta al suministro de uno o más factores de reprogramación en la célula, directamente (por ejemplo, por suministro de factores de reprogramación de proteínas o polipéptidos en la célula) o indirectamente (por ejemplo, por suministro de la preparación de ARN purificado de la presente invención que comprende una o más moléculas de ARNm, cada una de las cuales codifica un factor de reprogramación) y manteniendo las células en condiciones (por ejemplo, medio, temperatura, niveles de oxígeno y CO₂, matriz y otras condiciones ambientales) que sean propicias para la diferenciación. El término "reprogramación" como se usa en el presente documento, no pretende significar o referirse a una dirección específica o ruta de diferenciación (por ejemplo, de un tipo celular menos especializado a un tipo celular más especializado) y no excluye procesos que proceden en una dirección o ruta de diferenciación de lo que normalmente se observa en la naturaleza. Por lo tanto, en diferentes ejemplos de la presente descripción, "reprogramación" significa e incluye todos y cada uno de los siguientes:

- (1) "Desdiferenciación", que significa un proceso de una célula o tipo celular que presenta un estado de diferenciación más especializado (por ejemplo, un fibroblasto de mamífero, un queratinocito, una célula muscular o una célula neuronal) que va a una célula que presenta un estado de diferenciación o tipo celular menos especializado (por ejemplo, una célula iPS);
- (2) "Transdiferenciación", que significa un proceso de una célula o tipo celular que presenta un estado de diferenciación más especializado (por ejemplo, un fibroblasto de mamífero, un queratinocito o una célula neuronal) que va a otro estado de diferenciación o a otro tipo celular más especializado (por ejemplo, de un fibroblasto o queratinocito a una célula muscular); y
- (3) "Rediferenciación" o "Diferenciación Esperada" o "Diferenciación Natural", que significa un proceso de una célula que presenta cualquier estado de diferenciación o tipo celular particular que va a otro estado de diferenciación u otro tipo celular como se esperaría en la naturaleza si la célula estuviera presente en su lugar o entorno natural (por ejemplo, en un embrión o un organismo), donde dicho proceso se produce *in vivo* en el organismo o en cultivo (por ejemplo, en respuesta a uno o más factores de reprogramación).

Descripción de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

La presente descripción proporciona composiciones y procedimientos para reprogramar el estado de diferenciación de células eucariotas, incluidas células humanas u otras células animales, poniendo en contacto las células con preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en una o más moléculas de ARNm monocatenario diferentes que codifican cada una un factor de reprogramación (por ejemplo, un factor de inducción de células iPS).

Las moléculas de ARNm monocatenario purificadas comprenden, preferentemente, al menos, un nucleósido modificado seleccionado del grupo que consiste en una pseudouridina (Ψ), 5-metilcitosina (m^5C), 5-metiluridina (m^5U), 2'-O-metiluridina (Um o $m^{2'-O}U$), 2-tiouridina (s^2U) y N^6 -metiladenosina (m^6A) en lugar de, al menos, una porción de (por ejemplo, que incluye sustancialmente todos) los nucleósidos canónicos no modificados correspondiente de los nucleósidos canónicos A, C, G o T no modificados correspondientes. Además, las moléculas de ARNm monocatenario se purifican preferentemente para estar sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que activarían una respuesta involuntaria, disminuirían la expresión del ARNm monocatenario y/o activarían los sensores de ARN en las células. En ciertos ejemplos, las preparaciones de ARN purificado están sustancialmente libres de moléculas contaminantes de ARN que son: más cortas o más largas que las moléculas de ARN monocatenario de longitud completa, ARN bicatenario y/o no protegido. En algunos ejemplos preferidos, la descripción proporciona composiciones y procedimientos para reprogramar células eucariotas diferenciadas, incluidas células somáticas humanas u otras células animales, poniendo en contacto las células con preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en una o más moléculas de ARNm monocatenario diferentes que codifican cada una un factor de inducción de células iPS.

En ciertos ejemplos, el ARNm utilizado en las preparaciones de ARN se purifica para eliminar sustancialmente, esencialmente o virtualmente todos los contaminantes, incluyendo sustancialmente, esencialmente o virtualmente todos los contaminantes de ARN. La presente descripción no está limitada con respecto a los procedimientos de purificación utilizados para purificar el ARNm y la descripción incluye el uso de cualquier procedimiento conocido en la técnica o desarrollado en el futuro para purificar el ARNm y eliminar contaminantes, incluidos contaminantes de ARN, que interfieren con el uso previsto del ARNm. Por ejemplo, en ejemplos preferidos, la purificación del ARNm elimina contaminantes que son tóxicos para las células (por ejemplo, induciendo una respuesta inmunitaria innata en las células, o, en el caso de los contaminantes de ARN que comprenden ARN bicatenario, induciendo ARN de interferencia (ARNi), por ejemplo, a través de ARNip o moléculas largas de ARNi) y contaminantes que disminuyen, directa o indirectamente, la traducción del ARNm en las células). En algunos ejemplos, el ARNm se purifica por HPLC utilizando un procedimiento descrito en el presente documento, incluido en los Ejemplos. En ciertos ejemplos, el ARNm se purifica utilizando un sustrato de resina polimérica que comprende copolímero de estireno-divinilbenceno derivatizado C18 y se usa un agente de emparejamiento de iones acetato de trietilamina (TEAA) en el tampón de columna junto con el uso de un gradiente de acetonitrilo para eluir el ARNm y separarlo de los contaminantes de ARN de una manera dependiente del tamaño; en algunos ejemplos, la purificación de ARNm se lleva a cabo utilizando HPLC, pero en otros ejemplos se utiliza una columna de flujo por gravedad para la purificación. En algunos ejemplos, el ARNm se purifica utilizando procedimientos descritos en el libro titulado "RNA Purification and Analysis" por Douglas T. Gjerde, Lee Hoang y David Hornby, publicado por Wiley-VCH, 2009. En algunos ejemplos, la purificación de ARNm se lleva a cabo en un modo no desnaturante (por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente 50 grados centígrados, por ejemplo, a temperatura ambiente). En algunos ejemplos, la purificación de ARNm se lleva a cabo en un modo parcialmente desnaturante (por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente 50 grados centígrados y 72 grados centígrados). En algunos ejemplos, la purificación de ARNm se lleva a cabo en un modo desnaturante (por ejemplo, a una temperatura superior a aproximadamente 72 grados centígrados). Por supuesto, aquellos con conocimiento en la materia sabrán que la temperatura de desnaturación depende de la temperatura de fusión (T_m) del ARNm que se está purificando, así como de las temperaturas de fusión de los híbridos de ARN, ADN o ARN/ADN que contaminan el ARNm. En otros ejemplos, el ARNm se purifica como se describe por Mellits KH y col. (Removal of double-stranded contaminants from RNA transcripts: synthesis of adenovirus VA RNA1 from a T7 vector. *Nucleic Acids Research* 18: 5401-5406, 1990). Estos autores utilizaron una purificación en tres etapas para eliminar los contaminantes que puede utilizarse en ejemplos de la presente descripción. La etapa 1 fue electroforesis en gel de poli(acrilamida) al 8% en urea 7 M (condiciones desnaturantes). La banda principal de ARN se escindió de la lámina de gel y se sometió a electroforesis en gel de poli(acrilamida) al 8% en condiciones no desnaturantes (sin urea) y la banda principal se recuperó de la lámina de gel. Se realizó una purificación adicional en una columna de celulosa CF-11 utilizando una fase móvil de tampón sal de etanol que separa ARN bicatenario de ARN monocatenario (Franklin RM. 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 1504-1511; Barber R. 1966. *Biochem. Biophys. Acta* 114:422; y Zelcer A y col. 1982. *J. Gen. Virol.* 59: 139-148) y la etapa de purificación final fue cromatografía de celulosa. En otros ejemplos, el ARNm se purificó utilizando una columna de hidroxilapatita (HAP) en condiciones no desnaturantes o a temperaturas más altas (por ejemplo, como se describe por Pays E. 1977. *Biochem. J.* 165: 237-245; Lewandowski LJ y col. 1971. *J. Virol.* 8: 809-812; Clawson GA y Smuckler EA. 1982. *Cancer Research* 42: 3228-3231; y/o Andrews-Pfannkoch C y col. 2010. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5039-5045). En otros ejemplos, el ARNm se purificó por cromatografía líquida de intercambio aniónico débil en condiciones no desnaturantes (por ejemplo, como se describe por Easton LE y col. 2010. *RNA* 16: 647-653 to clean up *in vitro* transcription reactions). En algunos ejemplos, el ARNm se purifica utilizando una combinación de cualquiera de los procedimientos anteriores u otro procedimiento conocido en la técnica o desarrollado en el futuro. En otro ejemplo más, el ARNm utilizado en las composiciones y procedimientos de la presente descripción se purifica utilizando un proceso que comprende tratar el ARNm con una enzima que actúa específicamente (por ejemplo, digiere) uno o más ARN contaminantes o ácidos nucleicos contaminantes (por ejemplo, incluyendo ADN), pero que no actúa sobre (por ejemplo, no digiere) el ARNm

deseado. Por ejemplo, el ARNm utilizado en las composiciones y procedimientos de la presente descripción puede purificarse utilizando un proceso que comprende tratar el ARNm con una enzima ribonucleasa III (RNasa III) (por ejemplo, RNasa III de *E. coli*) y el ARNm se purifica a continuación de los productos de digestión de la RNasa III. Una enzima ribonucleasa III (RNasa III) en el presente documento significa una enzima que digiere ARN bicatenario mayor que aproximadamente doce pares de bases para reforzar fragmentos de ARN bicatenario. En algunos ejemplos, el ARNm utilizado en las composiciones y procedimientos de la presente descripción se purifica utilizando un proceso que comprende tratar el ARNm con una o más enzimas que digieren específicamente uno o más ARN contaminantes o ácidos nucleicos contaminantes (por ejemplo, incluyendo ADN).

Esta descripción proporciona moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos que comprenden pseudouridina o un nucleósido modificado, vectores de terapia génica que comprenden los mismos, procedimientos de terapia génica y procedimientos de silenciamiento de la transcripción génica que comprenden los mismos, procedimientos para reducir la inmunogenicidad de los mismos y procedimientos para sintetizarlos. Estas secuencias modificadas están presentes preferentemente en las preparaciones de ARN purificadas descritas en el presente documento.

En un ejemplo, la presente descripción proporciona un ARN mensajero que comprende un resto de pseudouridina. En otro ejemplo, el ARN mensajero codifica una proteína de interés. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN que codifica una proteína de interés, comprendiendo dicha molécula de ARN un resto de pseudouridina. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN transcrita *in vitro*, que comprende una pseudouridina. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN transcrita *in vitro*, que comprende un nucleósido modificado.

Como se proporciona en el presente documento, la presente descripción proporciona procedimientos para sintetizar moléculas de ARN transcrito *in vitro*, que comprenden pseudouridina y/o nucleósidos modificados. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un ARN mensajero que comprende un resto de pseudouridina.

En otro ejemplo, una molécula de ARN transcrita *in vitro* de los procedimientos y composiciones de la presente descripción se sintetiza por ARN polimerasa del fago T7. En otro ejemplo, la molécula se sintetiza por ARN polimerasa del fago SP6. En otro ejemplo, la molécula se sintetiza por ARN polimerasa del fago T3. En otro ejemplo, la molécula se sintetiza por una polimerasa seleccionada entre las polimerasas anteriores. En otro ejemplo, la molécula de ARN transcrita *in vitro* es un oligorribonucleótido. En otro ejemplo, la molécula de ARN transcrita *in vitro* es un polirribonucleótido. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado, en el que el nucleósido modificado es m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ, o 2'-O-metil-U. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado, en el que el nucleósido modificado es m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ, o 2'-O-metil-U.

En otro ejemplo, el oligorribonucleótido o polirribonucleótido sintetizado *in vitro* es un ARN de horquilla corta (hc). En otro ejemplo, el oligorribonucleótido sintetizado *in vitro* es un ARN de interferencia pequeño (ARNip). En otro ejemplo, el oligorribonucleótido sintetizado *in vitro* es cualquier otro tipo de oligorribonucleótido conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción comprende adicionalmente un marco de lectura abierto que codifica una proteína funcional. En otro ejemplo, la molécula de ARN o molécula de oligorribonucleótido funciona sin codificar una proteína funcional (por ejemplo, en silenciamiento transcripcional), como una ARNzima, etc. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido comprende adicionalmente una cola de poliA. En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido no comprende una cola de poliA. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido comprende adicionalmente una caperuza m⁷GpppG. En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido no comprende una caperuza m⁷GpppG. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido comprende adicionalmente un potenciador de la traducción independiente de caperuza. En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido no comprende un potenciador de la traducción independiente de caperuza. En otro ejemplo, el potenciador de la traducción independiente de caperuza es un potenciador de la traducción independiente de caperuza del virus del grabado de tabaco (TEV). En otro ejemplo, el potenciador de la traducción independiente de caperuza es cualquier otro potenciador de la traducción independiente de caperuza conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un vector de terapia génica, que comprende una molécula de

polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, en el que la molécula de polirribonucleótido comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado.

En otro ejemplo, una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción comprende una pseudouridina. En otro ejemplo, la molécula de ARN o molécula de oligorribonucleótido comprende un nucleósido modificado. En otro ejemplo, la molécula de ARN o molécula de oligorribonucleótido es una molécula de ARN u oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

"Pseudouridina" se refiere, en otro ejemplo, a m¹acp³Ψ (1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina. En otro ejemplo, el término se refiere a m¹Ψ (1-metilpseudouridina). En otro ejemplo, el término se refiere a Ψm (2'-O-metilpseudouridina. En otro ejemplo, el término se refiere a m⁵D (5-metildihidouridina). En otro ejemplo, el término se refiere a m³Ψ (3-metilpseudouridina). En otro ejemplo, el término se refiere a un resto de pseudouridina que no está modificado adicionalmente. En otro ejemplo, el término se refiere a un monofosfato, difosfato o trifosfato de cualquiera de las pseudouridinas anteriores. En otro ejemplo, el término se refiere a cualquier otra pseudouridina conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción es un oligorribonucleótido terapéutico.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para administrar una proteína recombinante a un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto el sujeto con una molécula de ARN, oligorribonucleótido, polirribonucleótido o vector de terapia génica de la presente invención, proporcionando de este modo una proteína recombinante a un sujeto.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una molécula de ARN bicatenario que comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado y que comprende adicionalmente un ARNip o ARN de horquilla corta (ARNhc). En otro ejemplo, la molécula de ARNbc es mayor de 50 nucleótidos de longitud. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la pseudouridina o un nucleósido modificado está dentro de la secuencia del ARNip. En otro ejemplo, la pseudouridina o un nucleósido modificado está fuera de la secuencia del ARNip. En otro ejemplo, 1 o más restos de pseudouridina y/o nucleósido modificado están presentes tanto dentro como fuera de la secuencia de ARNip. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, el ARNip o ARNhc está contenido internamente en la molécula del ARNbc. En otro ejemplo, el ARNip o ARNhc está contenido en un extremo de la molécula del ARNbc. En otro ejemplo, uno o más ARNip o ARNhc están contenidos en un extremo de la molécula del ARNbc, mientras que uno o más están contenidos internamente. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la longitud de una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido (por ejemplo, una molécula de ARN monocatenario (ARNmc) o una molécula de ARNbc) de los procedimientos y composiciones de la presente descripción es mayor de 30 nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la molécula de ARN u oligorribonucleótido es mayor de 35 nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 40 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 45 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 55 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 60 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 60 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 80 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 90 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 100 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 120 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 140 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 160 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 180 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 200 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 250 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 300 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 350 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 400 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 450 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 500 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 600 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 700 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 800 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 900 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1000 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1100 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1200 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1300 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1400 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1500 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1600 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 1800 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 2000 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 2500 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 3000 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 4000 nucleótidos. En otro ejemplo, la longitud es de, al menos, 5000 nucleótidos. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, una molécula de ARNbc de los procedimientos y composiciones de la presente descripción se fabrica por transcripción *in vitro*. En otro ejemplo, la etapa de transcripción *in vitro* utiliza ARN polimerasa del fago

T7. En otro ejemplo, la transcripción *in vitro* utiliza ARN polimerasa del fago SP6. En otro ejemplo, la transcripción *in vitro* utiliza ARN polimerasa del fago T3. En otro ejemplo, la transcripción *in vitro* utiliza una ARN polimerasa seleccionada entre las polimerasas anteriores. En otro ejemplo, la transcripción *in vitro* utiliza cualquier otra ARN polimerasa conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la molécula de ARNbc puede procesarse por una enzima celular para producir el ARNip o ARNhc. En otro ejemplo, la enzima celular es una endonucleasa. En otro ejemplo, la enzima celular es Dicer. Dicer es una nucleasa de la familia RNasa III que comienza la interferencia de ARN (ARNi) y fenómenos relacionados por generación de los ARN pequeños que determinan la especificidad de estas vías de silenciamiento de genes (Bernstein E, Caudy AA y col., Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001; 409(6818): 363-6). En otro ejemplo, la enzima celular es cualquier otra enzima celular conocida en la técnica que es capaz de escindir una molécula de ARNbc. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la molécula de ARNbc contiene dos ARNip o ARNhc. En otro ejemplo, la molécula de ARNbc contiene tres ARNip o ARNhc. En otro ejemplo, la molécula de ARNbc contiene más de tres ARNip o ARNhc. En otro ejemplo, El ARNip y/o el ARNhc se liberan de la molécula de ARNbc por una enzima celular. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para administrar un ARNip o ARNhc a una célula, que comprende administrar una molécula de ARNbc de la presente descripción, en el que la célula procesa la molécula de ARNbc para producir el ARNip o ARNhc, administrando de este modo un ARNip o ARNhc a la célula.

En otro ejemplo, el nucleósido que está modificado en una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción es uridina (U). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es citidina (C). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es adenosina (A). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es guanosina (G). Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, el nucleósido modificado de los procedimientos y composiciones de la presente descripción es m⁵C (5-metilcitidina). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es m⁵U (5-metiluridina). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es m⁶A (N⁶-metiladenosina). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es S²U (2-tiouridina). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es Ψ (pseudouridina). En otro ejemplo, el nucleósido modificado es Um (2'-O-metiluridina).

En otros ejemplos, el nucleósido modificado es m¹A (1-metiladenosina); m²A (2-metiladenosina); Am(2'-O-metiladenosina); ms²m⁶A (2-metiltio-N⁶-metiladenosina); i⁶A (~isopenteniladenosina); ms²i⁶A (2-metiltio-N⁶-isopenteniladenosina); io⁶A (N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms²io⁶A (2-metiltio-N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g⁶A (N⁶-glicinilcarbamoiladenosina); t⁶A (N⁶-treonilcarbamoiladenosina); ms²t⁶A (2-metiltio-N⁶-treonilcarbamoiladenosina); m⁶t⁶A (N⁶-metil-N⁶-treonilcarbamoiladenosina); hn⁶A (N⁶-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); ms²hn⁶A (2-metiltio-N⁶-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m¹I (1-metiltiosina); m¹Im (1,2'-O-dimetilinosina); m³C (3-metilcitidina); Cm (2'-O-metilcitidina); S²C (2tiocitidina); ac⁴C (N⁴-acetilcitidina); f⁶C (5-formilcitidina); m⁵Cm (5,2'-O-dimetilcitidina); ac⁴Cm (N⁴-acetil-2'-O-metilcitidina); k²C (lisidina); m¹G (1-metilguanosina); m²G (N²-metilguanosina); m⁷G (7-metilguanosina); Gm(2'-O-metilguanosina); m²₂G (N²,N²-dimetilguanosina); m²Gm (N²,2'-O-dimetilguanosina); m²₂Gm (N²,N²,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wibutosina); o₂yW (peroxiwibutosina); OHyW (hidroxiwibutosina); OHyW* (hidroxiwibutosina no modificada); imG (wiosina); mimG (metilwiosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galactosil-queuosina); manQ (manosilqueuosina); preQo (7-ciano-7-desazaguanosina); PreQ₁ (7-ammometil-7-desazaguanosina); G⁺ (archaeosina); D (dihidrouridina); m⁵Um (5,2'-O-dimetiluridina); S⁴U (4-tiouridina); m⁵s²U (5-metil-2-tiouridina); S²Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp³U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho⁵U (5-hidroxiuridina); mo⁵U (5-metoxiuridina); cmo⁵U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo⁵U (éster metílico de ácido uridina 5-oxiacético); chm⁵U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm⁵U (5-(carboxihidroximetil)uridina metil éster); mcm⁵U (5-metoxycarbonilmetiluridina); mcm⁵Um (5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina); mcm⁵s²U (5-metoxiarbonilmetil-2-tiouridina); nm⁵s²U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm⁵U (5-metilaminometiluridina); mnm⁵s²U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnmse²U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm⁵U (5-carbamoilmetiluridina); ncm⁵Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); Cnm⁵U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm⁵Um (5-carboximetilaminometil-2'-metiluridina); cmnm⁵S²U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m⁶₂A (N⁶,N⁶-dimetiladenosina); Im (2'-O-metilinosina); m⁴C (N⁴-metilcitidina); m⁴Cm (N⁴,2'-O-dimetilcitidina); hm⁵C (5-hidroximetilcitidina); m³U (3-metiluridina); cm⁵U (5-carboximetiluridina); m⁶Am (N⁶,2'-O-dimetiladenosina); m⁶₂Am (N⁶,N⁶,2'-O-trimetiladenosina); m^{2,7}G(N²,7-dimetilguanosina); m^{2,2,7}G (N²,N²,7-trimetilguanosina); m³Um (3,2'-O-dimetiluridina); m⁵D (5-metildihidrouridina); f⁵Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m¹Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m¹Am (1,2'-O-dimetiladenosina); tm⁵U (5-taurinometiluridina); tm⁵s²U (5-taurinometil-2-tiouridina); imG-14 (4-dimetilwiosina); imG2 (isowiosina); o ac⁶A (N⁶-acetiladenosina). Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción comprende una combinación de 2 o más de las modificaciones anteriores.

En otro ejemplo, la molécula de ARN o molécula de oligorribonucleótido comprende una combinación de 3 o más de las modificaciones anteriores. En otro ejemplo, la molécula de ARN o molécula de oligorribonucleótido comprende una combinación de más de 3 de las modificaciones anteriores. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

5 En otro ejemplo, entre el 0,1% y el 100% de los restos en la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción está modificado (por ejemplo, ya sea por la presencia de pseudouridina o una base de nucleósido modificada). En otro ejemplo, el 0,1% de los restos están modificados. En otro ejemplo, el 0,2%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,3%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,4%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,5%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,6%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,8%. En otro ejemplo, la fracción es el 1 %. En otro ejemplo, la fracción es el 1,5%. En otro ejemplo, la fracción es el 2%. En otro ejemplo, la fracción es el 2,5%. En otro ejemplo, la fracción es el 3%. En otro ejemplo, la fracción es el 4%. En otro ejemplo, la fracción es el 5%. En otro ejemplo, la fracción es el 6%. En otro ejemplo, la fracción es el 8%. En otro ejemplo, la fracción es el 10%. En otro ejemplo, la fracción es el 12%. En otro ejemplo, la fracción es el 14%. En otro ejemplo, la fracción es el 16%. En otro ejemplo, la fracción es el 18%. En otro ejemplo, la fracción es el 20%. En otro ejemplo, la fracción es el 25%. En otro ejemplo, la fracción es el 30%. En otro ejemplo, la fracción es el 35%. En otro ejemplo, la fracción es el 40%. En otro ejemplo, la fracción es el 45%. En otro ejemplo, la fracción es el 50%. En otro ejemplo, la fracción es el 60%. En otro ejemplo, la fracción es el 70%. En otro ejemplo, la fracción es el 80%. En otro ejemplo, la fracción es el 90%. En otro ejemplo, la fracción es el 100%.

20 En otro ejemplo, la fracción es menos del 5%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 3%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 1 %. En otro ejemplo, la fracción es menos del 2%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 4%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 6%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 8%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 10%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 12%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 15%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 20%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 30%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 40%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 50%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 60%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 70%.

30 En otro ejemplo, el 0,1% de los restos de un nucleótido dado (uridina, citidina, guanosina o adenina) están modificados. En otro ejemplo, la fracción del nucleótido es el 0,2%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,3%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,4%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,5%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,6%. En otro ejemplo, la fracción es el 0,8%. En otro ejemplo, la fracción es el 1 %. En otro ejemplo, la fracción es el 1,5%. En otro ejemplo, la fracción es el 2%. En otro ejemplo, la fracción es el 2,5%. En otro ejemplo, la fracción es el 3%. En otro ejemplo, la fracción es el 4%. En otro ejemplo, la fracción es el 5%. En otro ejemplo, la fracción es el 6%. En otro ejemplo, la fracción es el 8%. En otro ejemplo, la fracción es el 10%. En otro ejemplo, la fracción es el 12%. En otro ejemplo, la fracción es el 14%. En otro ejemplo, la fracción es el 16%. En otro ejemplo, la fracción es el 18%. En otro ejemplo, la fracción es el 20%. En otro ejemplo, la fracción es el 25%. En otro ejemplo, la fracción es el 30%. En otro ejemplo, la fracción es el 35%. En otro ejemplo, la fracción es el 40%. En otro ejemplo, la fracción es el 45%. En otro ejemplo, la fracción es el 50%. En otro ejemplo, la fracción es el 60%. En otro ejemplo, la fracción es el 70%. En otro ejemplo, la fracción es el 80%. En otro ejemplo, la fracción es el 90%. En otro ejemplo, la fracción es el 100%.

40 En otro ejemplo, la fracción del nucleótido dado es menos del 8%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 10%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 5%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 3%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 1 %. En otro ejemplo, la fracción es menos del 2%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 4%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 6%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 12%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 15%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 20%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 30%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 40%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 50%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 60%. En otro ejemplo, la fracción es menos del 70%.

45 En otro ejemplo, Los términos "ribonucleótido", "oligorribonucleótido" y "polirribonucleótido" se refieren a una cadena de, al menos, 2 combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en otro ejemplo, compuestos que comprenden nucleótidos en los que el resto de azúcar es ribosa. En otro ejemplo, el término incluye tanto ARN como derivados de ARN en los que la cadena principal está modificada. "Nucleótidos se refiere, en otro ejemplo, a las unidades monoméricas de polímeros de ácido nucleico. El ARN puede estar, en otro ejemplo, en forma de un ARNt (ARN transferente), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN no codificante, ARN de interferencia pequeño (ARNip), micro ARN (ARNmi) y ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNip y ARNmi ((Caudy AA y col., Genes & Devel 16: 2491-96) y las referencias se citan este documento. Además, estas formas de ARN pueden ser de cadena sencilla, doble, triple o cuádruple. El término también incluye, en otra realización, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de cadena principal pero las mismas bases. En otro ejemplo, el ácido nucleico artificial es ANP (ácido nucleico peptídico). El ANP contiene cadenas principales peptídicas y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en otro ejemplo, tanto a moléculas de ADN como de ARN. En otro ejemplo, el nucleótido está modificado con oxetano. En otro ejemplo, el nucleótido se modifica por reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otro ejemplo, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la cadena principal de fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y ANP es conocido por los expertos en la materia y se describe en, por ejemplo, Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57 y Raz NK y col Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la materia y se describen,

por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio y G. C. Fareed. Cada derivado de ácido nucleico representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, El término "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena que comprende menos de 25 nucleótidos (nt). En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 24 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 23 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 22 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 21 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 20 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 19 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 18 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 17 nucleótidos. En otro ejemplo, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 16 nucleótidos. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, El término "polirribonucleótido" se refiere a una cadena que comprende más de 25 nucleótidos (nt). En otro ejemplo, "polirribonucleótido" se refiere a una cadena de más de 26 nucleótidos. En otro ejemplo, "polirribonucleótido" se refiere a una cadena de más de 28 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 30 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 32 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 35 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 40 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 50 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 60 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 80 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 100 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 120 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 150 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 200 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 300 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 400 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 500 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 600 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 800 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 1000 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 1200 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 1400 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 1600 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 1800 nucleótidos. En otro ejemplo, se refiere a una cadena de más de 2000 nucleótidos. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para inducir a una célula de mamífero para producir una proteína de interés, que comprende poner en contacto la célula de mamífero con una molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, induciendo, de este modo, a la célula de mamífero para producir una proteína de interés. En otro ejemplo, la proteína de interés es una proteína recombinante. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

"Codificante" se refiere, en otro ejemplo, a una molécula de ARN que codifica la proteína de interés. En otro ejemplo, la molécula de ARN comprende un marco de lectura abierto que codifica la proteína de interés. En otro ejemplo, también se codifican una o más proteínas distintas. En otro ejemplo, la proteína de interés es la única proteína codificada. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento de inducción de una célula de mamífero para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto la célula de mamífero con una molécula de ARN transcrita *in vitro* que codifica la proteína recombinante, la molécula de ARN transcrita *in vitro* comprende además una pseudouridina o un nucleósido modificado, induciendo, de este modo, a la célula de mamífero para producir la proteína recombinante.

En otro ejemplo, una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción se traduce en la célula más eficazmente que una molécula de ARN no modificado con la misma secuencia. En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido presenta una capacidad potenciada para ser traducida por una célula diana. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 2 veces en relación con su homólogo no modificado. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 3 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 5 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 7 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 10 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 15 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 20 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 50 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 100 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 200 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 500 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 1000 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por un factor de 2000 veces. En otro ejemplo, el factor es de 10-1000 veces. En otro ejemplo, el factor es de 10-100 veces. En otro ejemplo, el factor es de 10-200 veces. En otro ejemplo, el factor es de 10-300 veces. En otro ejemplo, el factor es de 10-500 veces. En otro ejemplo, el factor es de 20-1000 veces. En otro ejemplo, el factor es de 30-1000 veces. En otro ejemplo, el factor es de 50-1000 veces. En otro ejemplo, el factor es de 100-1000 veces. En otro ejemplo, el

factor es de 200-1000 veces. En otro ejemplo, la traducción se potencia por cualquier otra cantidad o intervalo de cantidades significativo. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

Los procedimientos para determinar la eficacia de traducción son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, medir la actividad de una proteína indicadora codificada (por ejemplo, luciferasa o renilla [Ejemplos en el presente documento] o proteína fluorescente verde [Wall AA, Phillips AM y col., Effective translation of the second cistron in two Drosophila dicistronic transcripts is determined by the absence of in-frame AUG codons in the first cistron. J Biol Chem 2005;280(30): 27670-8]), o medir el marcador radiactivo incorporado en la proteína traducida (Ngosuwon J, Wang NM y col, Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 2003;278(9): 7034-42). Cada procedimiento representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En algunos estudios de expresión proporcionados en el presente documento, la traducción se midió a partir de un ARN complejo con Lipofectin® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) e inyectado en la vena de la cola de ratones. En los lisados de bazo, el ARN modificado con pseudouridina se tradujo significativamente de manera más eficaz que el ARN no modificado (Figura 17B). En las condiciones utilizadas en el presente documento, la eficacia de los procedimientos basados en transfección de la presente descripción se correlaciona con la capacidad del reactivo de transfección para penetrar en los tejidos, proporcionando una explicación del motivo por el que el efecto fue más pronunciado en las células de bazo. El flujo sanguíneo esplénico es un sistema abierto, con contenidos de sangre que entran directamente en contacto con elementos de la pulpa roja y blanca incluidas células linfoides.

En otro experimento, se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando PKR recombinante humana y su sustrato, eIF2 α en presencia de ARNm protegido con caperuza que codifica renilla (0,5 y 0,05 ng/ μ l). El ARNm que contiene pseudouridina (Ψ) no activaba PKR, como se detectó por la falta tanto de autofosforilación de PKR como de fosforilación de eIF2 α , mientras que el ARN sin modificación de nucleósidos y el ARNm con modificación m5C activaron la PKR. Se sabe que eIF2 α fosforilado bloquea el comienzo de la traducción de ARNm, por lo tanto, la falta de fosforilación permite, en otro ejemplo, potenciar la traducción del ARNm que contiene pseudouridina (Ψ).

En otro ejemplo, la traducción potenciada está en una célula (en relación con la traducción en la misma célula de una molécula de ARN no modificado con la misma secuencia; Ejemplos 13-14). En otro ejemplo, la traducción potenciada está *in vitro* (por ejemplo, en una mezcla de traducción *in vitro* o un lisado de reticulocitos; Ejemplos 13-14). En otro ejemplo, la traducción potenciada está *in vivo* (Ejemplo 13). En cada caso, la traducción potenciada se relaciona con una molécula de ARN no modificada con la misma secuencia, en las mismas condiciones. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción es significativamente menos inmunogénica que una molécula de ARN no modificado sintetizada *in vitro* con la misma secuencia. En otro ejemplo, la molécula de ARN modificado es 2 veces menos inmunogénica que su homóloga no modificada. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 3 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 5 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 7 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 10 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 15 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 20 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 50 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 100 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 200 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 500 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 1000 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por un factor de 2000 veces. En otro ejemplo, la inmunogenicidad de reduce por otra diferencia de veces.

En otro ejemplo, "significativamente menos inmunogénica" se refiere a una disminución detectable de la inmunogenicidad. En otro ejemplo, la expresión se refiere a una disminución en veces de la inmunogenicidad (por ejemplo, una de las disminuciones en veces enumeradas anteriormente). En otro ejemplo, la expresión se refiere a una disminución tal que puede administrarse una cantidad eficaz de la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido sin desencadenar una respuesta inmunitaria detectable. En otro ejemplo, la expresión se refiere a una disminución tal que puede administrarse repetidas veces una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido sin provocar una respuesta inmunitaria suficiente para reducir de manera detectable la expresión de la proteína recombinante. En otro ejemplo, la disminución es tal que puede administrarse repetidas veces una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido sin provocar una respuesta inmunitaria suficiente para eliminar la expresión detectable de la proteína recombinante.

"Cantidad eficaz" de la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido se refiere, en otro ejemplo, a una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéutico. En otro ejemplo, la expresión se refiere a una cantidad suficiente para provocar la expresión de una cantidad detectable de la proteína recombinante. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

La inmunogenicidad reducida de la molécula de ARN, oligorribonucleótido y polirribonucleótido como se desvela, se demuestra en el presente documento (Ejemplos 4-11).

Los procedimientos para determinar la inmunogenicidad son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, medir de la secreción de citocinas (por ejemplo, IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α o β , IL-6, IFN- β o IL-8; Ejemplos en el presente documento), medir la expresión de los marcadores de activación de CD (por ejemplo, CD83, HLA-DR, CD80 y CD86; Ejemplos en el presente documento), o medir la capacidad de actuar como un adyuvante para una respuesta inmunitaria adaptativa. Cada procedimiento representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la inmunogenicidad relativa del nucleótido modificado y su homólogo no modificado se determinan determinando la cantidad de nucleótido modificado requerido para provocar una de las respuestas anteriores en el mismo grado que una cantidad dada del nucleótido no modificado. Por ejemplo, si se requiere el doble de nucleótidos modificados para provocar la misma respuesta, entonces el nucleótido modificado es dos veces menos inmunogénico que el nucleótido no modificado.

En otro ejemplo, la inmunogenicidad relativa del nucleótido modificado y su homólogo no modificado se determinan determinando la cantidad de citocinas (por ejemplo, IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α o β , IL-6, IFN- β o IL-8) secretadas en respuesta a la administración del nucleótido modificado, en relación con la misma cantidad del nucleótido no modificado. Por ejemplo, si se secreta la mitad de las citocinas, entonces el nucleótido modificado es dos veces menos inmunogénico que el nucleótido no modificado. En otro ejemplo, los niveles de fondo de estimulación se restan antes de calcular la inmunogenicidad en los procedimientos anteriores. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, un procedimiento de la presente descripción comprende adicionalmente mezclar la molécula del ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido con un reactivo de transfección antes de la etapa de poner en contacto. En otro ejemplo, un procedimiento de la presente descripción comprende adicionalmente administrar la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido junto con el reactivo de transfección. En otro ejemplo, el reactivo de transfección es un reactivo lipídico catiónico (Ejemplo 6).

En otro ejemplo, el reactivo de transfección es un reactivo de transfección basado en lípidos. En otro ejemplo, el reactivo de transfección es un reactivo de transfección basado en proteínas. En otro ejemplo, el reactivo de transfección es un reactivo de transfección basado en polietilenimina. En otro ejemplo, el reactivo de transfección es fosfato de calcio. En otro ejemplo, el reactivo de transfección es Lipofectin® o Lipofectamine®. En otro ejemplo, el reactivo de transfección es cualquier otro reactivo de transfección conocido en la técnica.

En otro ejemplo, el reactivo de transfección forma un liposoma. Los liposomas, en otro ejemplo, aumentan la estabilidad intracelular, aumentan la eficacia de captación y mejoran la actividad biológica. En otro ejemplo, los liposomas son vesículas esféricas huecas compuestas por lípidos dispuestos de manera similar a los lípidos que forman la membrana celular. Tienen, en otro ejemplo, un espacio interno acuoso para atrapar compuestos solubles en agua y varían en tamaño de 0,05 a varios micrómetros de diámetro. En otro ejemplo, los liposomas pueden suministrar ARN a las células en una forma biológicamente activa.

Cada tipo de agente de transfección representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la célula diana de los procedimientos de la presente descripción es una célula presentadora de antígeno. En otro ejemplo, la célula es una célula animal. En otro ejemplo, la célula es una célula dendrítica (Ejemplo 14). En otro ejemplo, la célula es una célula neuronal. En otro ejemplo, la célula es una célula cerebral (Ejemplo 16). En otro ejemplo, la célula es una célula de bazo. En otro ejemplo, la célula es una célula linfóide. En otro ejemplo, la célula es una célula pulmonar (Ejemplo 16). En otro ejemplo, la célula es una célula de la piel. En otro ejemplo, la célula es un queratinocito. En otro ejemplo, la célula es una célula endotelial. En otro ejemplo, la célula es un astrocito, una célula de la microglía o una neurona (Ejemplo 16). En otro ejemplo, la célula es una célula alveolar (Ejemplo 16). En otro ejemplo, la célula es una célula alveolar de superficie (Ejemplo 16). En otro ejemplo, la célula es un macrófago alveolar. En otro ejemplo, la célula es un neumocito alveolar. En otro ejemplo, la célula es una célula endotelial vascular. En otro ejemplo, la célula es una célula mesenquimática. En otro ejemplo, la célula es una célula epitelial. En otro ejemplo, la célula es una célula hematopoyética. En otro ejemplo, la célula es una célula del epitelio colónico. En otro ejemplo, la célula es una célula de epitelio de pulmón. En otro ejemplo, la célula es una célula de médula ósea.

En otros ejemplos, la célula diana es una célula de Claudius, célula de Hensen, célula de Merkel, célula de Muller, célula de Paneth, célula de Purkinje, célula de Schwann, célula de Sertoli, célula acidófila, célula acinar, adipoblasto, adipocito, célula alfa marrón o blanca, célula amacrina, célula beta, célula capsular, cementocito, célula principal, condroblasto, condrocito, célula cromafín, célula cromofóbica, corticotrópica, célula delta, célula de Langerhans, célula dendrítica folicular, célula enterocromafín, endimocito, célula epitelial, célula basal, célula escamosa, célula endotelial, célula transicional, eritroblasto, eritrocito, fibroblasto, fibrocito, célula folicular, célula germinal, gameto, óvulo, espermatozoide, ovocito, ovocito primario, ovocito secundario, espermatida, espermatozito, espermatozito primario, espermatozito secundario, epitelio germinal, célula gigante, célula glial, astroblasto, astrocito, oligodendroblasto, oligodendrocito, glioblasto, célula caliciforme, gonadotropo, célula granulosa, hemocitoblasto, célula capilar, hepatoblasto, hepatocito, hialocito, célula intersticial, célula yuxtglomerular, queratinocito, queratocito, célula terminal (Iemmal), leucocito, granulocito, basófilo, eosinófilo, neutrófilo, linfoblasto, linfoblasto B,

linfoblasto T, linfocito, linfocito B, linfocito T, linfocito T colaborador inducido, linfocito T Th1, linfocito T Th2, linfocito citolítico natural, timocito, macrófago, célula de Kupffer, macrófago alveolar, célula espumosa, histiocito, célula luteal, célula madre linfocítica, célula linfoide, célula madre linfoide, célula macroglial, célula prolactínica, mastocito, meduloblasto, megacarioblasto, megacariocito, melanoblasto, melanocito, célula mesangial, célula mesotelial, metamielocito, monoblasto, monocito, célula mucosa del cuello, célula muscular, célula muscular cardíaca, célula muscular esquelética, célula muscular lisa, mielocito, célula mielode, célula madre mielode, mioblasto, célula mioepitelial, miofibroblasto, neuroblasto, célula neuroepitelial, neurona, odontoblasto, osteoblasto, osteoclasto, osteocito, célula oxíntica, célula parafolicular, célula paraluteal, célula péptica, pericito, célula mononuclear de sangre periférica, feocromocito, célula falángica, pinealocito, pituicito, célula plasmática, plaquetas, podocito, proeritroblasto, promonocito, promieloblasto, promielocito, pronormoblasto, reticulocito, célula epitelial del pigmento de la retina, retinoblasto, célula pequeña, somatotropo, célula madre, célula sustentacular, célula teloglial o célula zimogénica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

Se pueden tratar una variedad de trastornos empleando procedimientos de la presente descripción incluidos, *entre otros*, trastornos monogénicos, enfermedades infecciosas, trastornos adquiridos, cáncer y similares. Los trastornos monogénicos ejemplares incluyen deficiencia de ADA, fibrosis quística, hipercolesterolemia familiar, hemofilia, enfermedad granulomatosa crónica, distrofia muscular de Duchenne, anemia de Fanconi, anemia falciforme, enfermedad de Gaucher, Síndrome de Hunter, IDSC ligada a X, y similares. En otro ejemplo, el trastorno tratado implica una de las proteínas enumeradas a continuación. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la proteína recombinante codificada por una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido de los procedimientos y composiciones de la presente descripción es ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa.

En otro ejemplo, la proteína recombinante es eritropoyetina (EPO). En otros ejemplos, la proteína recombinante codificada es ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DI01; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FM03; FM04; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PACH3; PGD; PH A2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPT1; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACPI; AGXT; AHHR; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COL4A3; COL4A4; COL6A3; CPSI; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LOT; LHCGR; LSF; MSH2; MSH6; NEB; NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFHX1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNA1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLC1C; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG; ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXP1; PCCB; POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFB2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG; ENAM; ETV2; EVC; F11; FABP2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GN- RHR; GYPA; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2; PKD2; QDPR; SGCB; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1; DTR; EOS; EPD; ERVR; F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMD1A; LOX; LTC4S; MAN2A1; MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFBI; RASAI; SCZDI; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFB1; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPBI; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3; ODDD; OFC1; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1; ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36; CFTR; CHORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMB1; LEP; MET; NCF1; NM; OGDH; OPN1SW; PEX1; PGAM2; PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH; SLC26A3; SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANK1; CA1; CA2; CCAL1; CLN8; CMT4A; CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS;

DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1; FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL;
 MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1; PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFIPC; SGM1; SPG5A;
 STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN; ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP;
 5 AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1;
 ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA; GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1;
 LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H; LMX1B; MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH;
 PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR2; RPD1; SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1;
 TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1; CUBN; CXCL12; CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2;
 HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67; MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PE01; PHYH;
 10 PNLIP; PSAP; PTEN; RBP4; RDPA; RET; SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS;
 AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC; APOA1; APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1;
 CD3E; CD3G; CD59; CDKN1C; CLN2; CNTF; CPT1A; CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4;
 EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2; GIF; HBB; HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; FIND;
 H0MG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS; KCNJ11; KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3;
 15 MY07A; NN01; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2; PGR; PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2;
 ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD; SERPING1; SMPD1; TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101;
 TYR; USH1C; VMD2; VRNI; WT1; WT2; ZNF145; A2M; AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM;
 AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; C1R; CD4; CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF;
 GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2; HMN2; HPD; IGF1; KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5;
 20 KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB; LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS;
 RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TP11; TSC3; ULR; VDR; VWF;
 ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5; CPB2; ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR;
 NYS4; PCCA; RB1; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH;
 CTAA1; DAD1; DFNBS; EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@; grupo IGHC; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MCOP;
 25 MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1;
 SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7; SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USH1A; VP; ACCPN;
 AH02; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1;
 EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1; FES; HCVS; HEXA; IVD; LCS1; LIPC; MY05A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLBP1;
 SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6; ALDOA; APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP;
 30 CHST6; CLN3; CREBBP; CTH; CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASE1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN;
 HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD;
 MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2;
 VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD;
 CCA1; CCZS; CHRN1; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR;
 35 GFAP; GH1; GH2; GP1BA; GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1;
 KRT14L2; KRT14L3; KRT16; KRT16L1; KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT; MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO;
 MY015A; NAGLU; NAPB; NF1; NME1; P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA;
 PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH; RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG;
 SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR; SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNSI; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A;
 40 TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2; CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAM A3; LCFS2;
 MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX;
 BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A; CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD;
 E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB; EXT3; EYCLI; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1;
 HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR; JAK3; KLK3; LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV;
 45 MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9;
 STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3;
 EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; P3; PPCD; PPGB;
 PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2;
 KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB;
 50 CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGC; MN1; NAGA; NE2; OGS2; PDGFB; PPARA;
 PRODH; SC02; SCZD4; SERPIND1; SLC5AI; SOXIO; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2;
 AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5;
 ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS; BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1;
 CHM; CHR39C; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1;
 55 CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2;
 F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDXY; GJB1; GK; GLA;
 GPC3; GPRR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2C; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS;
 KAL1; KFSD; LICAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGCI; MIC5; MIDI;
 MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTMI; MYCL2; MYPI; NDP;
 60 NHS; NPHLI; NROBI; NSX; NYSI; NYX; OAI; OASD; OCRL; ODTI; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW;
 OPN1MW; OTC; P3; PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA;
 PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPSI; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR;
 RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS;
 SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIMP1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS;
 65 WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZFI; AZF2; DAZ;
 GCY; RPS4Y; SMCY; SRY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3;

CLN4; CSF2RA; CTSI; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCOI; MTC03; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; 5 MTTL1; MTTL2; MTTN; MTPP; MTTTS1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PR01; PR0P1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM o TTD.. Cada proteína recombinante representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar anemia en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de 10 ARN sintetizada *in vitro* que codifica eritropoyetina, tratándose, de este modo, la anemia en un sujeto. En otro ejemplo, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* comprende adicionalmente una pseudouridina o un nucleósido modificado. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción. En otro ejemplo, la célula es una célula de tejido subcutáneo. En otro ejemplo, la célula es una célula de pulmón. En otro ejemplo, la célula es un fibroblasto. En otro ejemplo, la célula es un linfocito. En otro ejemplo, la célula es una célula de músculo 15 liso. En otro ejemplo, la célula es cualquier otro tipo de célula conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar un vasoespasmo en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de 20 ARN sintetizada *in vitro* que codifica óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), tratándose, de este modo, un vasoespasmo en un sujeto.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para incrementar la tasa de supervivencia de una célula en un sujeto, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica una proteína de choque térmico, mejorando, de este modo, la tasa de supervivencia de una célula en un sujeto.

En otro ejemplo, la célula cuya tasa de supervivencia mejora es una célula isquémica. En otro ejemplo, la célula no es isquémica. En otro ejemplo, la célula se ha expuesto a un ambiente isquémico. En otro ejemplo, la célula se ha expuesto a un estrés ambiental. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para disminuir la incidencia de una reestenosis de un vaso sanguíneo después de un procedimiento que agranda el vaso sanguíneo, que comprende 30 poner en contacto una célula del vaso sanguíneo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica una proteína de choque térmico, disminuyendo, de este modo, una incidencia de una reestenosis en un sujeto.

En otro ejemplo, el procedimiento es una angioplastia. En otro ejemplo, el procedimiento es cualquier otro procedimiento conocido en la técnica que agranda el vaso sanguíneo. Cada posibilidad representa un ejemplo por 35 separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para aumentar el crecimiento de un cabello a partir de un folículo capilar en el cuero cabelludo de un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del cuero cabelludo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando la molécula de ARN sintetizada *in vitro* 40 una telomerasa o una proteína inmunosupresora, incrementando, de este modo, el crecimiento de cabello a partir de un folículo capilar.

En otro ejemplo, la proteína inmunosupresora es la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH). En otro ejemplo, la proteína inmunosupresora es el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1). En otro ejemplo, la proteína inmunosupresora es el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). En otro ejemplo, a proteína inmunosupresora es cualquier otra proteína inmunosupresora conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un 45 ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento de inducción de la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica la enzima, induciendo, de este modo, la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula.

En un ejemplo, la enzima es catalasa. En otro ejemplo, la enzima es glutatión peroxidasa. En otro ejemplo, la enzima es fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa. En otro ejemplo, la enzima es superóxido dismutasa-1. En otro ejemplo, la enzima es superóxido dismutasa-2. En otro ejemplo, la enzima es cualquier otra enzima con actividad antioxidante conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente 50 descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la fibrosis quística en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica el Regulador de Conductancia Transmembrana de Fibrosis Quística (CFTR), 55

tratándose, de este modo, la fibrosis quística en un sujeto.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica una tirosina quinasa de Bruton, tratándose, de este modo, la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar una inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa (ADA IDCS) en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica una ADA, tratándose, de este modo, una ADA IDCS.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la respuesta inmunitaria de la piel y mejorar la patología de la piel, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica una ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa, reduciendo, de este modo, la respuesta inmunitaria de la piel y mejorando la patología de la piel.

En otro ejemplo, una molécula de ARN o ribonucleótido de la presente descripción se encapsula en una nanopartícula. Los procedimientos para empaquetado de nanopartículas son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Bose S, y col (Role of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection of Human Lung Epithelial Cells. J. Virol. 78:8146. 2004); Dong Y y col. Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials 26:6068. 2005); Lobenberg R. y col (Improved body distribution of ¹⁴C-labelled AZT bound to nanoparticles in rats determined by radioluminography. J Drug Target 5:171. 1998); Sakuma SR y col (Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastrointestinal tract. Int J Pharm 177:161. 1999); Virovic L y col. Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. Expert Opin Drug Deliv 2:707.2005); y Zimmermann E y col., Electrolyte-and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. Eur J Pharm Biopharm 52:203.2001). Cada procedimiento representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

Se pueden utilizar varios ejemplos de intervalos de dosificación de compuestos de la presente descripción en procedimientos de la presente descripción. En un ejemplo, la dosificación está en el intervalo de 1-10 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 2-10 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 3-10 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 5-10 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 2-20 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 3-20 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 5-20 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 10-20 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 3-40 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 5-40 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 10-40 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 20-40 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 5-50 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 10-50 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 20-50 µg/día. En un ejemplo, la dosificación es 1-100 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 2-100 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 3-100 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 5-100 µg/día. En otro ejemplo la dosificación es 10-100 µg/día. En otro ejemplo la dosificación es 20-100 µg/día. En otro ejemplo la dosificación es 40-100 µg/día. En otro ejemplo la dosificación es 60-100 µg/día.

En otro ejemplo, la dosificación es 0,1 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 0,2 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 0,3 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 0,5 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 1 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 2 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 3 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 5 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 10 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 15 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 20 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 30 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 40 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 60 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 80 µg/día. En otro ejemplo, la dosificación es 100 µg/día.

En otro ejemplo, la dosificación es 10 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 20 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 30 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 40 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 60 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 80 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 100 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 150 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 200 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 300 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 400 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 600 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 800 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 1000 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 1,5 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 10 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 15 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 20 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 30 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 50 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 80 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 100 mg/dosis.

En otro ejemplo, la dosificación es 10-20 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 20-30 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 20-40 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 30-60 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 40-80 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 50-100 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 50-150 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 100-200 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 200-300 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 300-400 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 400-600 µg/dosis.

- En otro ejemplo, la dosificación es 500-800 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 800-1000 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 1000-1500 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 1500-2000 µg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-3 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-5 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-10 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-20 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-30 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-50 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-80 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 2-100 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3-10 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3-20 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3-30 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3-50 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3-80 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 3-100 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5-10 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5-20 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5-30 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5-50 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5-80 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 5-100 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 10-20 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 10-30 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 10-50 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 10-80 mg/dosis. En otro ejemplo, la dosificación es 10-100 mg/dosis.
- En otro ejemplo, la dosificación es una dosis diaria. En otro ejemplo, la dosificación es una dosis semanal. En otro ejemplo, la dosificación es una dosis mensual. En otro ejemplo, la dosificación es una dosis anual. En otro ejemplo, la dosis es una en una serie de un número definido de dosis. En otro ejemplo, la dosis es una dosis única. Como se describe a continuación, en otro ejemplo, la ventaja de las moléculas de ARN, oligorribonucleótidos o polirribonucleótidos de la presente descripción es su mayor potencia, que permite el uso de dosis más pequeñas.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto un aparato de traducción *in vitro* con un polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, comprendiendo el oligorribonucleótido sintetizado *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, produciéndose, de este modo, una proteína recombinante.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto un aparato de traducción *in vitro* con una molécula de ARN transcrita *in vitro* de la presente descripción, la molécula de ARN transcrita *in vitro* comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado, produciéndose, de este modo, una proteína recombinante.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un aparato de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un kit de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.
- En otro ejemplo, el aparato de traducción *in vitro* comprende un lisado de reticulocitos. En otro ejemplo, el lisado de reticulocitos es un lisado de reticulocitos de conejo.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir una inmunogenicidad de una molécula de oligorribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el procedimiento la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad de una molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir una inmunogenicidad de un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el procedimiento la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad de un vector de terapia génica.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para potenciar la traducción *in vitro* a partir de una molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN, comprendiendo el procedimiento la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, potenciando, de este modo, la traducción *in vitro* a partir de una molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para potenciar la traducción *in vitro* a partir de un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o molécula de ARN, comprendiendo el procedimiento la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, potenciando, de este modo, la traducción *in vivo* a partir de un vector de terapia génica.
- En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para aumentar la eficacia de la administración de una proteína recombinante mediante un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el procedimiento la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, aumentando, de este modo, la eficacia de la administración de una proteína

recombinante por un vector de terapia génica.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para aumentar la estabilidad *in vivo* del vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o molécula de ARN, comprendiendo el procedimiento la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, aumentando, de este modo, la estabilidad *in vivo* del vector de terapia génica.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para sintetizar una molécula de ARN transcrita *in vitro* que comprende un nucleósido pseudouridina, que comprende poner en contacto una polimerasa aislada con una mezcla de nucleótidos no modificados y el nucleótido modificado (Ejemplos 5 y 10).

En otro ejemplo, los procedimientos de transcripción *in vitro* de la presente descripción utilizan un extracto de una célula animal. En otro ejemplo, el extracto es de un reticulito o célula con una eficacia similar de transcripción *in vitro*. En otro ejemplo, el extracto es de cualquier otro tipo de célula conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

Cualquiera de las moléculas de ARN o moléculas de oligorribonucleótidos de la presente descripción pueden usarse, en otro ejemplo, en cualquiera de los procedimientos de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno, que comprende administrar el antígeno en combinación con ARN mitocondrial (mt) (Ejemplos 4 y 8).

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la capacidad de una molécula de ARN para estimular una célula dendrítica (CD), que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN por un procedimiento de la presente descripción (por ejemplo, véase EJEMPLOS).

En otro ejemplo, la CD es una célula CD1. En otro ejemplo, la CD es una célula CD2. En otro ejemplo, la CD es un subtipo de una célula CD1 o de una célula CD2. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la capacidad de una molécula de ARN para estimular la señalización por TLR3, que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN por un procedimiento de la presente descripción. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la capacidad de una molécula de ARN para estimular la señalización por TLR7, que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN por un procedimiento de la presente descripción. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la capacidad de una molécula de ARN para estimular la señalización por TLR8, que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN por un procedimiento de la presente descripción. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, todos los enlaces internucleósido o internucleótido en la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido son fosfodiéster. En otro ejemplo, los enlaces internucleótido son predominantemente fosfodiéster. En otro ejemplo, la mayoría de los enlaces internucleótido son fosforotioato. En otro ejemplo, la mayoría de los enlaces internucleótido son fosfodiéster. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En otro ejemplo, el porcentaje de los enlaces internucleótido en la molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido que son fosfodiéster está por encima del 50%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 10%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 15%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 20%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 25%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 30%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 35%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 40%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 45%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 55%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 60%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 65%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 70%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 75%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 80%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 85%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 90%. En otro ejemplo, el porcentaje está por encima del 95%.

En otro ejemplo, un procedimiento de la presente descripción comprende aumentar el número, porcentaje o frecuencia de nucleósidos modificados en la molécula de ARN para disminuir la inmunogenicidad o aumentar la eficacia de la traducción. Como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, véase EJEMPLOS), el número de restos modificados en una molécula de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido determina, en otro ejemplo, la magnitud de los efectos observados en la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para introducir una proteína recombinante en una célula de un sujeto, que comprende poner en contacto el sujeto con una molécula de ARN transcrita *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo la molécula de ARN transcrita *in vitro* adicionalmente una

pseudouridina u otro nucleósido modificado, introduciendo, de este modo, una proteína recombinante en una célula de un sujeto.

5 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para disminuir la producción de TNF- α en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto, que comprende la etapa de diseñar el vector que contiene una pseudouridina o una base de nucleósido modificada, disminuyendo, de este modo, la producción de TNF- α en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto.

10 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para disminuir la producción de IL-12 en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto, que comprende la etapa de diseñar el vector que contiene una pseudouridina o una base de nucleósido modificada, disminuyendo, de este modo, la producción de IL-12 en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir una inmunogenicidad de un vector de terapia génica, que comprende introducir un nucleósido modificado en dicho vector de terapia génica, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad de un vector de terapia génica.

15 Como se proporciona en el presente documento, los hallazgos de la presente descripción muestran que la CD primaria tiene una entidad de señalización de ARN adicional que reconoce el ARN modificado con m5C y m6A y cuya señalización se inhibe por la modificación de los restos de U.

20 En otro ejemplo, la ventaja de unas moléculas de ARN, oligorribonucleótido, polirribonucleótido de la presente descripción es que el ARN no se incorpora al genoma (a diferencia de los vectores basados en ADN). En otro ejemplo, una ventaja es que la traducción del ARN y, por lo tanto, la aparición del producto codificado, es instantánea. En otro ejemplo, una ventaja es que la cantidad de proteína generada a partir del ARNm se puede regular administrando más o menos ARN. En otro ejemplo, una ventaja es que la administración repetida de pseudouridina purificada u otras moléculas de ARN, oligorribonucleótido o polirribonucleótido no induce una respuesta inmunitaria, mientras que la administración repetida de ARN no modificado podría inducir vías de señalización por sensores de ARN.

25 En otro ejemplo, una ventaja es carecer de inmunogenicidad, permitiendo la administración repetida sin generación de citocinas inflamatorias. En otro ejemplo, la estabilidad de ARN se incrementa por circularización, disminuyendo la degradación por exonucleasas.

30 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio, que comprende administrar al sujeto un antagonista de una molécula de TLR-3, tratándose, de este modo, un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio.

35 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio, que comprende administrar al sujeto un antagonista de una molécula de TLR-7, tratándose, de este modo, un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio, que comprende administrar al sujeto un antagonista de una molécula de TLR-8, tratándose, de este modo, un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio.

40 En otro ejemplo, la enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio es una enfermedad autoinmunitaria. En otro ejemplo, la enfermedad es lupus eritematoso sistémico (LES). En otro ejemplo, la enfermedad es otra enfermedad conocida en la técnica que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

45 En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un kit que comprende un reactivo utilizado en la realización de un procedimiento de la presente descripción. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un kit que comprende una composición, herramienta o instrumento de la presente descripción.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un kit para medir o estudiar la señalización por un receptor TLR-3, TLR-7 y TLR-8, tal como se ejemplifica en Ejemplo 7.

50 En otro ejemplo, un protocolo de tratamiento de la presente descripción es terapéutico. En otro ejemplo, el protocolo es profiláctico. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

En un ejemplo, la frase "poner en contacto una célula" o "poner en contacto una población" se refiere a un procedimiento de exposición, que puede ser directa o indirecta. En un procedimiento, dicho contacto comprende la inyección directa de la célula por cualquier medio bien conocido en la técnica, tal como microinyección. En otro ejemplo, el suministro a la célula es indirecto, tal como a través de la provisión en un medio de cultivo que rodea a la

célula, o la administración a un sujeto, o a través de cualquier ruta conocida en la técnica. En otro ejemplo, el término "poner en contacto" significa que la molécula de la presente descripción se introduce en un sujeto que recibe un tratamiento y se permite que la molécula entre en contacto con la célula *in vivo*. Cada posibilidad representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

- 5 Los procedimientos para la cuantificación de la frecuencia de reticulocitos y para medir la actividad biológica de EPO son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ramos, AS y col (Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. Braz J Med Biol Res 36:1561). Cada procedimiento representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

- 10 Las composiciones de la presente descripción se pueden administrar, en otro ejemplo, a un sujeto por cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, tal como vía parenteral, paracancerosa, intramucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.

- 15 En otro ejemplo de procedimientos y composiciones de la presente descripción, las composiciones se administran por vía oral y se formulan, por lo tanto, en una forma adecuada para administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pellets y similares. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otro ejemplo de la presente descripción, el principio activo se formula en una cápsula. De acuerdo con este ejemplo, las composiciones de la presente descripción comprenden, además del compuesto activo y el portador o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.

- 20 En otros ejemplos, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otro ejemplo, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y se formulan, por lo tanto, en una forma adecuada para administración intravenosa. En otro ejemplo, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y se formulan, por lo tanto, en una forma adecuada para administración intraarterial. En otro ejemplo, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y se formulan, por lo tanto, en una forma adecuada para administración intramuscular.

- 25 En otro ejemplo, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies del cuerpo y se formulan, por lo tanto, en una forma adecuada para administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen soluciones, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para administración tópica, las composiciones o sus derivados fisiológicamente tolerados se preparan y se aplican como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

- 30 En otro ejemplo, la composición se administra como un supositorio, por ejemplo, un supositorio rectal o un supositorio uretral. En otro ejemplo, la composición farmacéutica se administra por implantación subcutánea de un pellet. En otro ejemplo, el pellet proporciona una liberación controlada del agente durante un período de tiempo.

- 35 En otro ejemplo, el compuesto activo se suministra en una vesícula, por ejemplo, un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat y col., en Liposomes in the Therapy of infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327; véase en general *ibid.*).

- 40 Como se usa en el presente documento, los "diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos para aquellos expertos en la materia. El portador o diluyente puede ser, en diversas realizaciones, un portador o diluyente sólido para formulaciones sólidas, un portador o diluyente líquido para formulaciones líquidas, o mezclas de los mismos.

- 45 En otro ejemplo, los portadores/diluyentes sólidos incluyen, aunque sin limitación, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón gelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa o dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, polimetilacrilato), carbonato cálcico, óxido de magnesio, talco o mezclas de los mismos.

- 50 En otros ejemplos, los portadores farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y tamponados. Son ejemplos de aceites los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol y aceite de hígado de pescado.

- 55 Los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Son ejemplos líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, son portadores líquidos

preferidos agua, solución salina, soluciones acuosas de dextrosa y azúcares relacionados y glicoles tal como propilenglicol o polietilenglicol, particularmente para soluciones inyectables. Son ejemplos de aceites los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol y aceite de hígado de pescado.

- 5 En otro ejemplo, las composiciones además comprenden aglutinantes (por ejemplo, goma arábica, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, almidón glicolato de sodio), tampones (por ejemplo, Tris-HCl., acetato, fosfato) de varios pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción por superficies, 10 detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato sódico), potenciadores de permeabilidad, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, 15 aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato sódico), coadyuvantes de fluidez (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, dietil fatalato, trietil citrato), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico), revestimientos de polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de formación de revestimiento y película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, 20 polimetacrilatos) y/o adyuvantes. Cada uno de los excipientes anteriores representa un ejemplo por separado de la presente descripción.

- En otro ejemplo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el compuesto se libera durante un período de tiempo 25 después de la administración 15. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otro ejemplo, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir, una composición en la que el compuesto entero se libera inmediatamente después de la administración.

- En otro ejemplo, las moléculas de la presente invención se modifican por unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, 30 alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona o poliprolina. Se sabe que los compuestos modificados presentan semividas sustancialmente más largas en la sangre después de la inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes (Abuchowski y col., 1981; Newmark y col., 1982; y Katre y col., 1987). Tales modificaciones también incrementan, en otra realización, la solubilidad de los compuestos en disolución acuosa, eliminan la agregación, potencian la estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y 35 reactividad del compuesto. Como resultado, la actividad biológica *in vivo* deseada se puede conseguir por la administración de tales abducciones de compuestos poliméricos con menos frecuencia o en dosis más bajas que con el compuesto no modificado.

- Un principio activo, en otro ejemplo, se formula en la composición como formas de sal farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (por ejemplo, 40 formadas con los grupos amino libres de una molécula de polipéptido o anticuerpo), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos de hierro y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

- 45 Cada uno de los aditivos anteriores, excipientes, formulaciones y procedimientos representan un ejemplo por separado de la presente descripción.

Ejemplos

En los Ejemplos proporcionados a continuación se emplearon los siguientes protocolos experimentales, salvo que se indique lo contrario.

50 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA LOS EJEMPLOS 1-3

- Cultivo celular. Se cultivaron células de fibroblastos 1079 humanos de prepucio de recién nacido (n.º de Cat CRL-2097, ATCC, Manassas, VA) y células IMR90 humanas (n.º de Cat CCL-186, ATCC) en un Medio MEM Avanzado (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT), Glutamax 2 mM (Invitrogen), β-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma, St. Louis, MO), y 55 Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen). Todas las células se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5%. En algunos experimentos, las células iPS humanas que se indujeron utilizando los procedimientos descritos en el presente documento se mantuvieron en fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEF) (R&D Systems, Minneapolis, MN) en placas de 10 cm pre-recubiertas con gelatina al 0,1% (Millipore, Phillipsburg, NJ) en un medio DMEM/F12 suplementado con

sustituto de suero KnockOut 20%, L-glutamina 0,1 mM (todo de Invitrogen), β -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma) y 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Invitrogen). En algunos experimentos, las células iPS humanas que se indujeron utilizando los procedimientos descritos en el presente documento se mantuvieron en medio condicionado por MEF que se había recolectado como se describe previamente (Xu y col. 2001).

5 Construcciones de Vectores. Los ADNc para los marcos de lectura abiertos (ORF) o KLF4, LIN28, NANOG y OCT4 se amplificaron por PCR a partir de clones de ADNc (Open Biosystems, Huntsville, AL), se clonaron en un vector plasmídico cadena abajo de un promotor de ARN polimerasa de T7 (Mackie 1988, Studier y Moffatt 1986) (por ejemplo, diversos pBluescript™, Agilent, La Jolla, CA o pGEM™, Promega, Madison, WI, vectores) y se secuenciaron. El ORF de SOX2 se amplificó por PCR a partir de un clon de ADNc (Invitrogen) y el ORF de c-MYC se aisló por RT-PCR a partir del ARN total de células HeLa. Los ORF tanto de SOX2 como de c-MYC también se clonaron en un vector plasmídico cadena abajo de un promotor de ARN polimerasa de T7 y se secuenciaron.

Otros vectores plasmídicos alternativos que contienen marcos de lectura abiertos humanos de (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) se clonaron en pBluescriptII. Estos vectores pBluescriptII se construyeron ligando los marcos de lectura abiertos anteriores en los sitios EcoRV (cMyc) o EcoRV/SpeI (KLF4, LIN28, NANOG, OCT4 y SOX2) entre las regiones no traducidas de beta globina de *Xenopus laevis* 5' y 3' (Krieg y Melton 1984).

Producción de ARNm. Las construcciones de plásmidos que contienen el promotor de la ARN polimerasa de T7 (pT7-KLF4, pT7-LIN28, pT7-c-MYC, pT7-OCT4, pT7-SOX2, o pT7-XBg-KLF4, pT7-XBg-LIN28, pT7-XBg-c-MYC, pT7-XBg-OCT4, y pT7-XBg-SOX2) se linealizaron con BamHI y pT7-NANOG y pT7-XBg-NANOG se linealizaron con Xba I. El sistema de producción de ARNm mSCRIPT™ (EPICENTRE o CellScript, Madison, WI, USA) se utilizó para producir ARNm con estructura 5' Cap1 y una cola de poli(A) 3' (por ejemplo, con aproximadamente 150 restos A), con la excepción de que se utilizó pseudouridina-5'-trifosfato (TRILINK, San Diego, CA) en lugar de uridina-5'-trifosfato en las reacciones de transcripción *in vitro* de la ARN polimerasa de T7.

Purificación y Análisis de ARNm. En algunas realizaciones experimentales, el ARNm se purificó por HPLC, las fracciones de columna se recolectaron y las fracciones de ARNm se analizaron con respecto a su pureza e inmunogenicidad como se describe en "Materiales y Procedimientos para los Ejemplos 35-38" y/o como se describe y se muestra en las figuras 22-24. En algunas realizaciones experimentales, se usaron preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en ARNm que codifican uno o más factores de reprogramación que presentaron poca o ninguna inmunogenicidad para los experimentos de reprogramación de células somáticas en células iPS.

30 Reprogramación de Células Somáticas Humanas en MEF. Se sembraron fibroblastos 1079 con 1×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos pre-recubierta con gelatina 0,1% (Millipore) y se cultivaron durante la noche. Los fibroblastos 1079 se transfectoron con cantidades equivalentes de ARNm de cada factor de reprogramación (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) utilizando reactivos de transfección de ARNm TransIT (MirusBio, Madison, WI). Se llevaron a cabo un total de tres transfecciones, llevándose a cabo una transfección cada dos días, con cambios de medios el día después de la primera y segunda transfección. El día después de la tercera transfección, se tripsinizaron las células y se sembraron $3,3 \times 10^5$ células en medio 1079 sobre una placa de 10 cm prerrecubierta con gelatina 0,1% sembrada con $7,5 \times 10^5$ MEF el día anterior. El día después de sembrar los fibroblastos 1079 transfectados en MEF, el medio se cambió a medio de células iPS. El medio de células iPS se cambió cada día. Ocho días después de sembrar las células transfectadas en MEF, se utilizó un medio condicionado por MEF. El medio condicionado por MEF se recolectó como se describe previamente (Xu y col. 2001). Las placas se cribaron todos los días para determinar la presencia de colonias con una morfología iPS usando un microscopio invertido.

Se utilizaron también protocolos alternativos de reprogramación de fibroblastos 1079 e IMR90 en MEF. Los MEF se sembraron con $1,25 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 6 pocillos pre-recubierta con gelatina al 0,1% (Millipore) y se incubaron durante la noche en medios de fibroblastos completos. Los fibroblastos 1079 o IMR90 se sembraron con 3×10^4 células/pocillo en una placa de siembra de 6 pocillos con MEF el día anterior y se cultivaron durante la noche a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. A continuación, se utilizó el Kit mScript para generar un ARNm Cap1/poliadenilado de los siguientes vectores (pT7-XBg-KLF4, pT7-XBg-LIN28, pT7-XBg-c-MYC, pT7-XBg-NANOG, pT7-XBg-OCT4 y pT7-XBg-SOX2) para su uso en estas transfecciones diarias. Se diluyeron los seis ARNm de reprogramación en 100 ng/ μl de cada ARNm. Se agregó igual molaridad de cada ARNm conjuntamente usando los siguientes factores de conversión (OCT4 se establece en 1 y todos los demás ARNm se multiplican por estos factores de conversión para obtener la misma molaridad en cada mezcla de ARNm). KLF=1,32, LIN28=0,58, c-MYC=1,26, NANOG=0,85, OCT4=1 y SOX2=0,88. Para obtener la misma molaridad de cada factor se agregarían conjuntamente 132 μl de ARNm de KLF4, 58 μl de LIN28, 126 μl de c-MYC, 85 μl de NANOG, 100 μl de OCT4 y 88 μl de SOX2 (cada uno a 100 ng/ μl). Una dosis total de 600 μg para transfecciones significaría que se usaron 100 ng (utilizando las conversiones de molaridad anteriores) de cada uno de los seis ARNm de reprogramación. El reactivo de transfección de ARNm TransIT se utilizó para transfectar estas dosis de ARNm. Para todas las transfecciones, Se añadieron grupos de ARNm a 250 μl de medios DMEM/F12 sin aditivos o medios MEM Avanzado sin aditivos. Se añadieron 5 μl de reactivo de refuerzo de ARNm y 5 μl de reactivo de transfección TransIT a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante dos minutos antes de añadir la mezcla de transfección a 2,5 ml de medios MEM Avanzado con FBS al 10% + 100 ng/ml de hFGFb o medios iPS que contienen 100 ng/ml de hFGFb. Se repitieron

las transfecciones cada día durante 10-16 días. Los medios se cambiaron 4 horas después de cada transfección. En algunos experimentos, se tripsinizaron y resembraron las células en una nueva placa MEF entre 5-8 días después de la transfección inicial. Se dividieron las células 1079 a 1/6 o 1/12 en nuevas placas MEF mientras que las células IMR90 se dividieron a 1/3 o 1/6 en nuevas placas MEF.

5 Reprogramación de Células Somáticas Humanas en Medio Condicionado por MEF. Los fibroblastos 1079 o IMR90 se sembraron con 3×10^5 células por placa de 10 cm pre-recubierta con gelatina 0,1% (Millipore) y se cultivaron durante la noche. Los fibroblastos 1079 o IMR90 se transfectaron con cantidades equivalentes de ARNm de factor de reprogramación (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) utilizando reactivos de transfección de ARNm TransIT (MirusBio, Madison, WI). Para cada transfección, se utilizaron 6 µg, 18 µg o 36 µg de cada ARNm de reprogramación (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) por placa de 10 cm. Se llevaron a cabo un total de tres transfecciones, realizándose una transfección cada dos días cambiando el medio el día después de cada una de las primeras y segundas transfecciones. Todas las transfecciones se llevaron a cabo en un medio condicionado por MEF. El día después de la tercera transfección, se tripsinizaron las células y se sembraron con 3×10^5 células en nuevas placas de 10 cm pre-recubiertas con gelatina al 0,1% (Millipore). Las células se cultivaron en un medio condicionado por MEF durante la duración del experimento.

Se llevaron a cabo también transfecciones diarias de ARNm similares a las descritas en la sección anterior, con la única diferencia de que los MEF no se usaron como capas alimentadoras, solo se usó medio condicionado por MEF.

10 Inmunofluorescencia. Las placas de células 1079 o de células iPS derivadas de 1079 se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células iPS se lavaron, a continuación, 3 veces durante 5 minutos cada lavado con PBS seguido de tres lavados en PBS + Tritón X-100 al 0,1%. Las células iPS se bloquearon a continuación en tampón de bloqueo (PBS + Tritón al 0,1%, FBS 2% y BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron a continuación durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (de ratón anti-OCT4 humano n.º de Cat sc-5279, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), (de conejo anti-NANOG humano n.º de Cat 3580, de conejo anti-KLF4 humano n.º de Cat 4038, de ratón anti-LIN28 humano n.º de Cat 5930, de conejo anti-c-MYC humano n.º de Cat 5605, de conejo anti-SOX2 humano n.º de Cat 3579 y de ratón anti-TRA-1-60, todos de Cell Signaling Technology, Beverly, MA) a una dilución 1:500 en tampón de bloqueo. Después de lavar 5 veces en PBS + Tritón X-100 al 0,1%, las células iPS se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-conejo (n.º de Cat 4412, Cell Signaling Technology), secundario anti-ratón FITC (n.º de Cat F5262, Sigma) o un anti-ratón Alexa Fluor 555 (n.º de Cat 4409, Cell Signaling Technology) a diluciones 1:1000 en tampón de bloqueo. Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido Nikon TS100F (Nikon, Tokio, Japón) con una cámara digital monocromática de 2 megapíxeles (Nikon) que utiliza software de elementos NIS (Nikon).

Ejemplo 1

35 Este ejemplo describe pruebas para determinar si las transfecciones con ARNm que codifica KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) dieron como resultado la expresión y la localización subcelular adecuada de cada producto proteico respectivo en fibroblastos 1079 de prepucio fetal de recién nacido. Los ARNm utilizados en los experimentos se realizaron con pseudouridina-5'-trifosfato en sustitución de uridina-5'-trifosfato (Kariko y col., 2008). Los fibroblastos 1079 se transfectaron con 4 µg de cada ARNm por pocillo de una placa de 6 pocillos y el análisis de inmunofluorescencia se realizó 24 horas después de la transfección. Los niveles endógenos de proteína KLF4, 40 LIN28, NANOG, OCT4 y SOX2 fueron indetectables por inmunofluorescencia en células 1079 no transfectadas (Fig. 1: B, F, N, R, V). Los niveles endógenos de c-MYC fueron relativamente altos en células 1079 no transfectadas (Fig. 1J). Las transfecciones con ARNm que codifica los factores de transcripción, KLF4, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2 dieron como resultado la localización principalmente nuclear de cada proteína 24 horas después de las transfecciones de ARNm (Figura 1: D, L, P, T, X). La proteína de unión a ARNm citoplasmática, LIN28, se localizó en el citoplasma (Fig. 1: H).

Ejemplo 2

Habiendo demostrado la transfección eficaz del ARNm y la localización subcelular apropiada de las proteínas de reprogramación, este ejemplo describe el desarrollo de un protocolo para la generación de células iPS a partir de fibroblastos somáticos. Se transfectaron cantidades iguales (en peso) de ARNm de KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2 en fibroblastos 1079 tres veces (una vez cada dos días). El día después de la tercera transfección, se sembraron las células en células alimentadoras MEF irradiadas y se incubaron en medio de células iPS. Seis días después de sembrar los fibroblastos 1079 sobre los MEF irradiados, se hicieron aparentes dos colonias de células iPS putativas en la placa de 10 cm transfectada con 3 µg de ARNm de cada factor de reprogramación (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2). Las colonias se dejaron crecer hasta 12 días después de la última transfección antes de que se fijaran para el análisis de inmunofluorescencia. El marcador NANOG específico de la masa celular interna se usa a menudo para analizar si las colonias de células iPS son realmente colonias de iPS (González y col., 2009, Huangfu y col., 2008). La expresión de NANOG que surge de los ARNm que se transfectaron 12 días antes sería despreciable basándose en los informes previos sobre la duración de la estabilidad y expresión del ARNm (Kariko y col., 2008). La tinción para NANOG mostró que las dos colonias de células iPS eran NANOG positivas (Fig. 2 B, D, y no se muestran). Los fibroblastos circundantes que no formaban parte de la colonia de células iPS eran

NANOG negativos, lo que sugiere que no se reprogramaron en células iPS.

En un experimento posterior usando el mismo protocolo, tanto fibroblastos 1079 como fibroblastos humanos IMR90 se transfectaron con los mismos ARNm de reprogramación. Se detectaron colonias múltiples tan pronto como 4 días después de sembrar las células transfectadas en MEF irradiados. Cuando se usaron 6 µg de cada ARNm (KLF4, LIN28, C-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) en transfecciones en placas de 6 pocillos, se detectaron más tarde 3 colonias de células iPS putativas en ambas líneas celulares después de la siembra en MEF en placas de 10 cm (Figura 3). Además de analizar estas colonias para la expresión de NANOG, también se usó TRA-1-60, un marcador más riguroso de células iPS completamente reprogramadas (Chan y col., 2009) para el análisis de inmunofluorescencia. Las colonias de iPS generadas a partir de fibroblastos 1079 (Fig. 3 A-F) y de fibroblastos IMR90 (Fig. 3 G-I) fueron positivas tanto para NANOG como para TRA-1-60, indicando que estas colonias son colonias de células iPS tipo III totalmente reprogramadas. Este protocolo que comprende tres transfecciones de ARNm que codifica los seis factores de reprogramación y su siembra a continuación en células alimentadoras MEF dio como resultado una eficacia de reprogramación similar (3-6 colonias de iPS por 1×10^6 células de entrada) como se informó previamente por protocolos que comprenden la administración de los mismos factores de reprogramación por transfección de un plásmido de expresión (Aoi y col., 2008).

Ejemplo 3

Este ejemplo describe intentos para mejorar la eficacia de la reprogramación de células diferenciadas usando ARNm. En un enfoque, se utilizó un protocolo que comprendía la transfección de fibroblastos 1079 o IMR90 tres veces (una vez cada dos días) con los ARNm que codifican los seis factores de reprogramación en medio condicionado por MEF en lugar de medio fibroblástico y a continuación el cultivo de los fibroblastos 1079 tratados en medio condicionado por MEF en lugar de su siembra en una capa alimentadora MEF después de los tratamientos. En la dosis de transfección más alta utilizada (36 µg de cada factor de reprogramación por placa de 10 cm), se detectaron 208 colonias de células iPS tres días después de la transfección final (Figura A-F). Curiosamente, no se detectaron colonias de células iPS en las placas transfectadas con 6 o 18 µg de cada uno de los factores de reprogramación a los 3 días, sugiriendo que era importante una dosis superior a 18 µg, en estas condiciones, para que se produjera la formación de colonias de células iPS al cabo de 3 días en medio condicionado por MEF. Las células IMR90 mostraron un número aún mayor de colonias de células iPS, con alrededor de 200 colonias 8 días después de la última transfección en la placa transfectada con tres dosis de 6 µg de cada uno de los seis ARNm del factor de reprogramación y más de 1000 colonias en células IMR90 transfectadas tres veces con dosis de 18 µg o 36 µg de cada uno de los seis ARNm de reprogramación (Figura 4 G-I). Las colonias fueron visibles 3 días después de la transfección final en células 1079, mientras que las colonias solo se hicieron visibles 6-7 días después de la transfección final en las células IMR90. Por lo tanto, las colonias más maduras derivadas de las células 1079 eran más grandes y más densas y más oscuras en las imágenes de campo brillante en comparación con las colonias IMR90 (Figura 4). Todas las colonias en la placa 1079 transfectadas tres veces con 36 µg de cada ARNm de reprogramación fueron positivas tanto para NANOG como para TRA-1-60 8 días después de la transfección final del ARNm (Figura 5 A-I). Todas las colonias de iPS de las IMP90 más inmaduras también fueron positivas tanto para NANOG como para TRA-1-60 (Figura 5 J-O), pero mostraron una tinción menos fuerte para ambos marcadores debido a su naturaleza celular menos densa en comparación con las colonias 1079 más maduras (Figura 5 A-I). El presente protocolo que comprende la administración de los ARNm en células 1079 o IMR90 en medio condicionado por MEF tenía una eficacia de reprogramación de 200 a más de 1000 colonias por 3×10^5 células de entrada. Este protocolo para inducir células iPS fue más rápido y casi 2-3 órdenes de magnitud más eficaz que los protocolos publicados que comprenden la transfección de fibroblastos con plásmidos de ADN que codifican estos mismos seis factores de reprogramación en medio fibroblástico (Aoi y col., 2008). Aún más, este protocolo fue más de 7-40 veces más eficaz que el protocolo publicado que comprende la administración de factores de reprogramación con lentivirus, basándose en los datos publicados sobre el suministro lentiviral de factores de reprogramación en fibroblastos 1079 de recién nacido, lo que dio como resultado aproximadamente 57 colonias de células iPS por 6×10^5 células de entrada (Aoi y col. 2008). Este protocolo también es mucho más rápido que los procedimientos publicados.

Ejemplo 4

LAS MOLÉCULAS DE ARN QUE SE PRODUCEN NATURALMENTE MUESTRAN HABILIDADES DIFERENCIALES PARA ACTIVAR CÉLULAS DENDRÍTICAS MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Plásmidos y Reactivos

Los plásmidos pT7T3D-MART-1 y pUNO-hTLR3 se obtuvieron a partir de ATCC (Manassas, VA) e InvivoGen (San Diego, CA), respectivamente. El pTEVluc se obtuvo a partir de Dr Daniel Gallie (UC Riverside), contiene pT7-TEV (la secuencia líder del ARN genómico del virus del grabado del tabaco)-luciferasa-A50, y se describe en Gallie, DR y col., 1995. El líder 5' del virus del grabado del tabaco y la cola de poli(A) son reguladores de la traducción funcionalmente sinérgicos. Gene 165:233) pSVren se generó a partir de p2luc (Grentzmann G, Ingram JA, y col., A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. RNA 1998;4(4): 479-86) mediante eliminación de la secuencia codificante para luciferasa de luciérnaga con digestiones BamHI y NotI, relleno terminal y religación.

El ARNip específico de TLR3 humano, pTLR3-sh se construyó por inserción de ODN sintético que codifica ARNhc de 20 nucleótidos de longitud con homología con TLR3 humano (nt 703-722, registro: NM_003265) en el plásmido pSilencer 4.1-CMV-neo (Ambion, Austin, TX). pCMV-hTLR3 se obtuvo clonando primero el producto de PCR específico de hTLR3 (nt 80-2887; Registro NM_003265) en pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), a continuación, se liberó con corte por Nhe I-Hind III y subclonación en los sitios correspondientes de pcDNA3.1 (Invitrogen). LPS se obtuvo (E. coli 055:B5) de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO. CpG ODN2006 y R-848 se obtuvieron de InvivoGen.

Células y cultivo celular

Se propagaron células embrionarias de riñón humano 293 (ATCC) en DMEM suplementado con glutamina (Invitrogen) y FCS al 10% (Hyclone, Ogden, UT) (medio completo). En todos los casos en el presente documento, "células 293" se refiere a células embrionarias de riñón humano 293 (HEK). La línea celular 293-hTLR3 se generó por transformación de células 293 con pUNO-hTLR3. Las líneas celulares 293-hTLR7, 293-hTLR8 y 293-hTLR9 (InvivoGen) se cultivaron en medio completo suplementado con blasticidina (10 µg/ml) (InvivoGen). Las líneas celulares 293-ELAM-luc y TLR7-293 (M. Lamphier, Eisai Research Institute, Andover MA) y las células TLR3-293 se cultivaron como se describe (Kariko y col., 2004, mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J Biol Chem 279: 12542-12550). Las líneas celulares 293, 293-hTLR7 y 293-hTLR8 se transfectaron de manera estable con pTLR3-sh y se seleccionaron con G-418 (400 µg/ml) (Invitrogen). Se cribaron las colonias neorresistentes y solo aquellas que no expresaban TLR3, determinadas como colonias con ausencia de respuesta de inicio de secreción de IL-8 a poli(I): (C), se usaron en estudios adicionales. Se obtuvieron muestras por leucoféresis de voluntarios no infectados por VIH a través de un protocolo aprobado por IRB.

Generación de CD murinas

Se generaron CD murinas por recolección de células de médula ósea de la tibia y fémures de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad y lisis de los glóbulos rojos de la sangre. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos a 10^6 células/pocillo en 2 ml de DMEM + FCS al 10% y 20 ng/ml de muGM-CSF (R & D Systems). El día 3, se añadieron 2 ml de medio fresco con muGM-CSF. El día 6 se recolectaron 2 ml de medio/pocillo y las células se sedimentaron y resuspendieron en medio fresco con muGM-CSF. El día 7 del cultivo, se recogieron y lavaron las CDmu.

ARN Natural

Se aislaron mitocondrias de plaquetas obtenidas del Banco de Sangre de la Universidad de Pensilvania utilizando un procedimiento de lisis con fraccionamiento. (Mitochondria isolation kit; Pierce, Rockford, IL). Se aisló ARN de las mitocondrias purificadas y de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de células 293, células 293 no fraccionadas, hígado de rata, línea de células de ratón TUBO y cadena DH5alfa de *E. coli* de Master Blaster® (BioRad, Hercules, CA). Se compraron ARNt bovino, ARNt de trigo, ARNt de levadura, ARNt de *E. coli*, poli(A) + ARNm de corazón de ratón y poli(I):(C) de Sigma, todo el ARN de bazo humano y ARN de *E. coli* se compraron en Ambion. Los oligorribonucleótidos-5'-monofosfato se sintetizaron químicamente (Dharmacon, Lafayette, CO).

Se incubaron muestras de alícuotas de ARN en presencia de nucleasa Benzonase (1 U por 5 µl de ARN a 1 microgramo por microlitro (µg/µl) durante 1 h) (Novagen, Madison, WI). Se digirieron alícuotas de ARN-730 con fosfatasa alcalina (New England Biolabs). Las muestras de ARN se analizaron por agarosa desnaturizante o electroforesis en gel de poliacrilamida para garantizar la calidad. Los ensayos para LPS en preparaciones de ARN que utilizan el análisis de Lisado de Amebocitos de Limulus de coágulo de gel fueron negativos con una sensibilidad de 3 picogramos por mililitro (pg/ml) (University of Pennsylvania, Core Facility).

Análisis de HPLC

Se separaron y visualizaron nucleósidos monofosfato a través de HPLC. Para liberar nucleósidos 3' monofosfato libres, se digirieron 5 µg de alícuotas de ARN con 0,1 U de RNasa T2 (Invitrogen) en 10 µl de NaOAc 50 mM y tampón EDTA 2 mM (pH 4,5) durante la noche, a continuación, las muestras se inyectaron en una HPLC Agilent 1100 utilizando a una columna Waters Symmetry C 18 (Waters, Milford, MA). A una velocidad de flujo de 1 ml/min, se realizó un gradiente desde tampón A al 100% (KH_2PO_4 30 mM y fosfato de tetraetilamonio 10 mM [PicA reagent, Waters], pH 6,0) hasta tampón B al 30% (acetonitrilo) durante 60 minutos. Los nucleótidos se detectaron utilizando una matriz de fotodiodos a 254 nm. Las identidades se verificaron por tiempos de retención y espectros.

Ensayos de célula dendrítica

Se trataron células dendríticas en placas de 96 pocillos (aproximadamente $1,1 \times 10^5$ células/pocillo) con R-848, Lipofectin® o Lipofectin®-ARN durante 1 h, a continuación, se cambió el medio. Al cabo de 8 h (salvo que se indique lo contrario), las células se recogieron para aislamiento de ARN o para citometría de flujo, mientras que el medio del cultivo recolectado se sometió a ELISA para citocinas. Los niveles de IL-12 (p70) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), IFN-α, TNF-α, y IL-8 (Biosource International, Camarillo, CA) se midieron en sobrenadantes por ELISA tipo sándwich. Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado o cuadruplicado y se midieron por duplicado.

Análisis por transferencia Northern

El ARN se aisló a partir de MDDC después de una incubación de 8 h después del tratamiento como se describe anteriormente. Cuando se indicó, las células se trataron con 2,5 µg/ml de cicloheximida (Sigma) 30 minutos antes de la estimulación y a lo largo de toda la duración de la incubación. Las muestras de ARN se procesaron y analizaron en transferencias Northern como se describe (Kariko y col, 2004, *ibid*) usando sondas de TNF-α y GAPDH humanas derivadas de plásmidos (pE4 y pHcGAP, respectivamente) obtenidos de ATCC.

RESULTADOS

Para determinar el potencial inmunoestimulador de diferentes subtipos de ARN celular, se aisló ARN de diferentes compartimentos subcelulares - es decir, citoplasma, núcleo y mitocondria. Estas fracciones de ARN, así como el ARN total, ARNt y ARNm seleccionado por cola de poliA, todos procedentes de mamífero, se complejaron con Lipofectin® y se añadieron a MDDC. Mientras que el ARN de mamífero total, nuclear y citoplasmático estimularon MDDC, como se evidencia por la secreción detectable de TNF-α, los niveles de TNF-α fueron mucho menores que los inducidos por ARNm sintetizado *in vitro* (Figura 6). Además, el ARNt de mamífero no indujo ningún nivel detectable de TNF-α, mientras que el ARN mitocondrial (mt) indujo mucho más TNF-α que los otros subtipos de ARN de mamífero. El ARN bacteriano total fue además un potente activador de MDDC; por el contrario, el ARNt bacteriano indujo únicamente un bajo nivel de TNF-α. Los ARNt de otras fuentes (levadura, germen de trigo, bovino) fueron no estimuladores. Se observaron resultados similares cuando se analizaron ARN de otras fuentes de mamífero. Cuando se digirieron muestras de ARN con Benzonase, que escinde ARNmc y ARNbc, la señalización de ARN se eliminó en MDDC, verificando que la secreción de TNF-α se debía al ARN en las preparaciones. Los potenciales de activación de los tipos de ARN analizados presentaban una correlación inversa con el grado de modificación de nucleósidos. Se obtuvieron resultados similares en los experimentos descritos en este Ejemplo para ambos tipos de citocinas generadas por CD.

Estos hallazgos demuestran que la inmunogenicidad del ARN se ve afectada por el grado de modificación de nucleósidos, tendiendo a disminuir la inmunogenicidad un mayor grado de modificación.

Ejemplo 5**SÍNTESIS *IN VITRO* DE MOLÉCULAS DE ARN CON NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES*****ARN transcrito in vitro***

Utilizando ensayo de transcripción *in vitro* (kits MessageMachine y MegaScript; Ambion,) se generaron los siguientes ARN largos por ARN polimerasa de T7 (RNAP) como se describe, (Kariko y col, 1998, Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA. Biochim Biophys Acta 1369, 320-334) (Nota: los nombres de los moldes se indican entre paréntesis; el número en el nombre del ARN especifica la longitud): RNA-1866 (pTEVluc linealizado con Nde I) codifica luciferasa de luciérnaga y una cola de poli(A) de 50 nucleótidos de longitud. RNA-1571 (pSVren linealizado con Ssp I) codifica luciferasa de Renilla. RNA-730 (pT7T3D-MART-1 linealizado con Hind III) codifica el antígeno de melanoma humano MART-I. RNA-713 (pTIT3D-MART-1 linealizado con EcoR I) corresponde a la secuencia no codificante de MART-1, RNA497 (pCMV-hTLR3 linealizado con Bgl II) codifica un fragmento 5' parcial de hTLR3. Las secuencias de las moléculas de ARN son como sigue:

RNA-1866:

ES 2 769 129 T3

[illegible]

RNA-1571:

ggcuagccaccaugacuucgaaaguuuauauccagaacaaaggaaacggauaauacugguccgaguggugggccgaug
 uaaacaaaugaaguuuugauucauuuauuuuuuuuauauggauucagaaaaacugcagaaaaugcuguuuuuuuuuuacau
 gguaacgcggccucuuuuuuuauuggcgacauuuugugccacauuuagagccaguagcgcgguguauuuuaccagaccuuu
 uuuguauugggcaaaucaggcaaaucugguaaugguuucuuauagguuacuuugaucuuuacaaauaucuuacugcaugguuug
 aacuuuuaauuuuaccaaagaagaucauuuuugucggccauuuuggggugcuuuguuuggcuuuacuuuauagcuauagagc
 aucaagauaagaucaaaagcaauaguuacacgcugaaauguuaguuagauuugaaucauagggaugaaugggccugauuuuga
 agaagauuuugcguugaucaaaucugaagaaggagaaaaauuguuuuuggagaauaacuuuucugggaaaccauguuugcca
 ucaaaaaucagagaaaguuagaaccagaagaauuugcagcauaucuugaaccauucaaaagagaaaggguagaauucgucgucc
 aacauuaucauaggccucgugaaaucccguuuaguuuuuagguuuaaccugacguuuguaaaaauuuuaggaauuuauaauugcu
 uaucuacgugcaagugauuuuacaaaaauuuuuuugaauucggaccaggaauuuuuccaaugcuauuuguuagaaggug
 ccaagaaguuuccuaauacugaauuuugucaaaguuuuuagguuucuuuuuucgcaagaagauccagcuauuaggggaaa
 auauaucaaaucguuucguugagcgaguucucaaaaaagaacaaauugucgacggggggcccuaggaaauuuuuagggaagau
 uggccuuccuacaagggaaggccagggaauuuuucucagagcagaccagagccaacagccccaccagaagagagcuucagguc
 uggggugagagacaacaacuccccucagaagcaggagccgauagacaaggaacuguaucuuuaacuuuccucagauacucu
 uuugcaacgacccucgucacauaaagauaggggggcaacuaaagggaucggccgcuucgagcagacauagauaagauacauu
 gaugaguuuuggacaaaccacaacuagaaugcagugaaaaaaugcuuuuuuugugaaaaauuugaugcuauuugcuuuuuuug
 uaaccauuuaagcugcaauuaacaaguuuaacaacaacaauugcauucauuuuuauuuuucagguucagggggagguguggga

 gguuuuuuuaagcaaguuuuuaccuacaaaugugguuaaaucgauaaguuuuuacagauccagguggcacuuuucggggaa
 augugcgcggaaaccuuuuuuguuuuuuuuuucuaaaucuuuacaaauuaguuuuccgcuauagagacaauaaccugauaaau
 gcuucaauuu (SEQ ID No: 2).

RNA-730:

gggaauuuugggccucgaggccaagaauucggcacgaggcacgcggccagccagcagacagaggacucucauuuagggaaggug
 uccugugcccugaccuacaagaugccaagagaagaugcucacuucaucuaugguuaccccaagaaggggcacggccacucuu
 acaccacggcugaagaggccgcgugggauccggaucagagacaguuuagcugcucacugggcuguuugguauug
 uagaagacgaaauggauacagagccuugauggauaaaaugcuucauuuuggcacuaauugccuuuacaagaagaugccac
 aagaaggguuugaucacgggacagcaagugucucuucaagagaaaaacugugaaccugugguucccaauuccaccucg
 uuauagagaaacucucugcagaacagucaccaccaccuuuuuacuuuagagccagcgagacaccugagacauugcugaaaauu
 uuucucucacacuuuugcuugaauuuuuuacagacaucauauuucuuuuggaugguuagggaaaaaugcaagccaucu
 cuauuuuuuagucaguuuuuuuuuagguuuccgcuagcaguuuacuuuagugaggaaugagagaaauuuuuuuuu
 gggaauuuccaucauuuuuauuuuugcauugcauuaaaaaaaaaaaaaaaaaaacugcgccgca (SEQ ID No: 3).

RNA-713

[illegible]

RNA-497:

[illegible]

Para obtener ARN modificado, la reacción de transcripción se ensambló con la sustitución de uno (o dos) de los NTP
5 básicos con el/los correspondiente(s) derivado(s) de trifosfato del nucleótido modificado 5-metilcitidina, 5-
metiluridina, 2-tiouridina, N⁶-metiladenosina o pseudouridina (TriLink, San Diego, CA). En cada reacción de
transcripción, los 4 nucleótidos o sus derivados estaban presentes a una concentración 7,5 milimolar (mM). En
experimentos seleccionados, como se indica, se incluyó también análogo de caperuza m7GpppG 6 mM (New
England BioLabs, Beverly, MA) para obtener ARN protegido con caperuza. Se generaron ORN5 y ORN6 utilizando
10 moldes de oligodesoxinucleótidos de ADN y T7 RNAP (kit de construcción de ARNiP Silencer®. Ambion).

RESULTADOS

Para analizar adicionalmente el efecto de las modificaciones de nucleósidos en la inmunogenicidad, se desarrolló un sistema *in vitro* para producir moléculas de ARN con pseudouridina o nucleósidos modificados. Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* en las que 1 o 2 de los 4 nucleótidos trifosfato (NTP) se sustituyeron con un NPT con nucleósido modificado correspondiente. Se transcribieron varios conjuntos de ARN con diferentes secuencias primarias que varían en longitud entre 0,7-1,9 kb y que contienen ninguno, 1 o 2 tipos de nucleósidos modificados. Los ARN modificados eran indistinguibles de sus homólogos no modificados en su movilidad en electroforesis en gel desnaturalizante, mostrando que estaban intactos y no modificados de otra manera (Figura 7A). Este procedimiento funcionó eficazmente con cualquiera de las polimerasas de fago T7, SP6 y T3 y, por lo tanto, es generalizable a una amplia variedad de ARN polimerasas.

Estos hallazgos proporcionan un nuevo sistema *in vitro* para la producción de moléculas de ARN con nucleósidos modificados.

Ejemplo 6

25 **EL ARN TRANSCRITO *IN VITRO* ESTIMULA TLR3 HUMANA, Y LAS MODIFICACIONES DE NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA INMUNOGENICIDAD DE ARN MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

Se sembraron células 293 parenterales, 293-hTLR7 y 293-hTLR8, que expresan ARNip específico de TLR3 y 293 hTLR9, TLR3-293 en placas de 96 pocillos (5×10^4 células/pocillo) y se cultivaron sin antibióticos. Al día siguiente, se expusieron las células a R-848 o ARN complejoado con Upofectin® (Invitrogen) como se describe (Kariko y col., 1998, *ibid*). Se eliminó el ARN después de una hora (h) y las células se incubaron adicionalmente en medio completo durante 7 h. Se recolectaron los sobrenadantes para la medición de IL-8.

RESULTADOS

Para determinar si la modificación de nucleósidos influye en la activación de TLR mediada por ARN, se transformaron de manera estable células embrionarias de riñón humano 293 para expresar TLR3 humano. Las líneas celulares se trataron con ARN complejado con Lipofectin® y la activación de TLR se monitorizó como se indica 10 por la liberación de interleucina (IL)-8. Se analizaron varias moléculas de ARN diferentes. El ARN transcrito *in vitro* no modificado provocó un alto nivel de secreción de IL-8. El ARN que contiene modificaciones de nucleósidos m6A o s2U, por el contrario, no indujo secreción detectable de IL-8 (Figura 7B). Las otras modificaciones de nucleósidos analizadas (es decir m5C, m5U, Ψ y m5C/Ψ) tuvieron un efecto supresor menor en la estimulación de TLR3 (Figura 7B). "Ψ" se refiere a pseudouridina.

Por lo tanto, modificaciones de nucleósido tales como m6A, S2U, m5C, m5U, Ψ, reducen la inmunogenicidad de ARN mediado por la señalización de TLR3.

Ejemplo 7

EL ARN TRANSCRITO *IN VITRO* ESTIMULA TLR7 y TLR8 HUMANAS, Y LAS MODIFICACIONES DE NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA INMUNOGENICIDAD DE ARN

Para analizar la posibilidad de que 293 exprese TLR3 endógeno que interfiere con la evaluación de los efectos del ARN en receptores TLR específicos, se eliminó la expresión de TLR3 endógeno de la línea celular 293-TLR8 por transfección estable de las células con un plásmido que expresa ARN de horquilla corta (hc) específico de TLR3 (también conocido como ARNip). Esta línea celular se usó para un estudio adicional, ya que no respondió a poli(I):(C), a LPS ni a oligodesoxinucleótidos (ODN) que contienen CpG, lo que indica la ausencia de TLR3, TLR4 y TLR9, pero sí respondió a R-848, el ligando afín de TLR8 humano (Figura 7B). Cuando las células 293-hTLR8 que expresan ARNhc dirigido a TLR3 (células 293-hTLR8 shRNA-TLR3) se transfectaron con ARN transcrito *in vitro*, secretaron grandes cantidades de IL-8. Por el contrario, El ARN que contiene la mayoría de las modificaciones de nucleósidos (m5C, m5U, Ψ y m5C/Ψ, S2U) eliminó la estimulación (no más producción de IL-8 que el control negativo, es decir, vector vacío). La modificación m6A tuvo un efecto variable, en algunos casos eliminando y en otros casos reduciendo la liberación de IL-8 (Figura 7B).

Los resultados de este Ejemplo y del Ejemplo anterior muestran que (a) el ARN con enlaces internucleótido fosfodiéster naturales (por ejemplo, ARN transcrito *in vitro*) estimula TLR3, TLR7 y TLR8 humanos; y (b) modificaciones de nucleósidos tales como m6A, m5C, m5U, s2U y Ψ, solas o en combinación, reducen la inmunogenicidad de ARN mediado por la señalización de TLR3, TLR7 y TLR8. Además, estos resultados proporcionan un nuevo sistema para estudiar la señalización por receptores TLR específicos.

Ejemplo 8

LAS MODIFICACIONES DE NUCLEÓSIDO REDUCEN LA INMUNOGENICIDAD DE ARN MEDIADO POR LA SEÑALIZACIÓN POR TLR7 y TLR8

El siguiente conjunto de experimentos analizó la capacidad del ARN aislado de fuentes naturales para estimular TLR3, TLR7 y TLR8. El ARN de diferentes especies de mamíferos se transfectaron en las líneas celulares 293 que expresan TLR3, TLR7 y TLR8 descritas en el Ejemplo anterior. Ninguna de las muestras de ARN de mamífero indujo la secreción de IL-8 por encima del nivel del control negativo. Por el contrario, el ARN total bacteriano obtenido de dos fuentes diferentes de *E. coli* indujo la secreción fuerte de IL-8 en células transfectadas con TLR3, TLR7 y TLR8, pero no con TLR9 (Figura 7C). Ni el LPS ni el ADN no metilado (CpG ODN) (los posibles contaminantes en ARN bacteriano aislado) activaron los TLR3, TLR7 o TLR8 analizados. El ARN mitocondrial aislado de plaquetas humanas estimuló TLR8, pero no TLR3 o TLR7.

Estos resultados demuestran que el ARN transcrito *in vitro* y bacteriano no modificados son activadores de TLR3, TLR7 y TLR8, y el ARN mitocondrial estimula TLR8. Además, estos resultados confirman el hallazgo de que la modificación de nucleósidos del ARN disminuye su capacidad de estimular TLR3, TLR7 y TLR8.

Ejemplo 9

LAS MODIFICACIONES DE NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA CAPACIDAD DE ARN PARA INDUCIR SECRECIÓN DE CITOCINAS Y LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN POR CD

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Ensayos de estimulación de CD

Después de 20 h de incubación con ARN, se tiñeron CD con mAb CD83-ficoeritrina (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ), HLA-DR-Cy5PE, y mAb CD80 o CD86-isotiocianato de fluoresceína y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur® usando el software CellQuest® (BD Biosciences). Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron al final de una incubación de 20 h y se sometieron a ELISA para citocinas. Los niveles de IL-12 (p70) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), El IFN-α y TNF-α (Biosource International, Camarillo, CA) se midieron en

los sobrenadantes por ELISA. Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado o cuadruplicado y se midió cada muestra por duplicado.

RESULTADOS

5 Los siguientes experimentos probaron la capacidad del ARN que contiene nucleósidos modificados o no modificados para estimular citocinas generadas por MDDC. Las modificaciones de nucleósidos disminuyeron de forma reproducible la capacidad del ARN 5 para inducir la secreción de TNF- α e IL-12 tanto por GM-CSF/IL-4 generado por MDDC como por IFN- α generado por (MDCMG)/MDDC, en la mayoría de los casos, a niveles no mayores que el control negativo (Figuras 8A y B). Los resultados fueron similares cuando se analizaron otros conjuntos de ARN con las mismas modificaciones de base, pero diferentes secuencias primarias y longitudes, o cuando el ARN se modificó adicionalmente añadiendo una estructura de caperuza 5' y/o una cola de poliA en el extremo 3' o eliminando el resto 5'-trifosfato. Los ARN de diferente longitud y secuencia indujeron cantidades variables de TNF- α de CD, típicamente menos de una diferencia de dos veces (Figura 8C).

15 A continuación, el ensayo se llevó a cabo en CD1 y CD2 primarias. El monocitoide primario (CD1, BDCA1 +) y plasmacitoide (CD2, BDCA4 +) CD se purificaron a partir de sangre periférica. Ambos tipos de células produjeron TNF- α cuando se expusieron a R-848, pero solo CD1 respondió a poli(I):(C), en un nivel muy bajo, lo que indica una ausencia de actividad de TLR3 en CD2. La transfección de transcritos *in vitro* indujo la secreción de TNF- α tanto en CD1 como en CD2, mientras que los transcritos modificados con m5U, Ψ o s2U no fueron estimuladores (Figura 8D). A diferencia de las citocinas generadas por CD, la modificación m5C y la m6A del ARN no disminuyeron su capacidad estimulante en las CD1 y CD2 primarias. Los transcritos con doble modificación m6A/ Ψ fueron no estimulantes, mientras que una mezcla de moléculas de ARN con un solo tipo de modificación (m6A + Ψ) fue un potente inductor de citocinas. Por lo tanto, la modificación de uridina ejerció un efecto supresor dominante sobre una molécula de ARN *in cis* en CD primaria. Estos resultados fueron consistentes entre todos los donantes analizados.

25 Estos hallazgos muestran que ARN transcrito *in vitro* estimula la producción de citocinas por CD. Además, dado que CD2 no expresa TLR3 o TLR8, y la modificación m5C y m6A del ARN disminuyó su capacidad estimulante de TLR7, estos hallazgos muestran que la CD primaria tiene una entidad de señalización de ARN adicional que reconoce el ARN modificado m5C y m6A y cuya señalización se inhibe por la modificación de los restos de U.

30 Como indicadores de inmunogenicidad adicionales, se midió la expresión en la superficie celular de las moléculas CD80, CD83, CD86 y MHC de clase II, y la secreción de TNF- α por análisis FACS de MDDC tratado con ARN-1571 y sus versiones modificadas. La modificación de ARN con pseudouridina y nucleósidos modificados m5c, m6A, s2U y m6A/ Ψ) disminuyeron estos marcadores (Figura 9), confirmando los anteriores hallazgos.

En resumen, La capacidad del ARN para inducir a las CD a madurar y secretar citocinas depende del subtipo de CD, así como de las características de la modificación de nucleósido presente en el ARN. Una cantidad creciente de modificación disminuye la inmunogenicidad del ARN.

Ejemplo 10

35 LA SUPRESIÓN DE LA ESTIMULACIÓN INMUNITARIA MEDIADA POR ARN ES PROPORCIONAL AL NÚMERO DE NÚCLEOSIDOS MODIFICADOS PRESENTES EN ARN

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

CD humana

40 Para citocinas generadas por CD, se purificaron monocitos a partir de PBMC por centrifugación discontinua en gradiente de Percoll. La fracción de baja densidad (enriquecida en monocitos) se redujo en las células B, T y NK usando perlas magnéticas (Dynal, Lake Success, NY) específicas para CD2, CD16, CD 19 y CD56, produciendo monocitos altamente purificados como se determina por citometría de flujo usando mAb anti-CD14 (> 95%) o antiCD1 1c (> 98%).

45 Para generar CD inmaduras, se cultivaron monocitos purificados en medio AIM V libre de suero (Life Technologies), suplementado con GM-CSF (50 ng/ml) + IL-4 (100 ng/ml) (R & D Systems, Minneapolis, MN) en medio AIM V (Invitrogen) para la generación de DC derivadas de monocitos (MDDC) como describe (Weissman, D y col, 2000. J Biol Chem 165: 4710-4717). También se generaron CD por tratamiento con GM-CSF (50 ng/ml) + IFN- α (1.000 V/ml) (R & D Systems) para obtener IFN- α MDDC (Santini y col., 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. J Exp Med 191: 1777-178).

Las CD mieloides y plasmacitoides primarias (CD1 y CD2) se obtuvieron a partir de sangre periférica utilizando kits de aislamiento de células BDCA-1 y BDCA-4 (Miltenyi Biotec Auburn, CA), respectivamente.

RESULTADOS

La mayor parte del ARN modificado con nucleósidos utilizado hasta ahora contenía un tipo de modificación que se

produce en aproximadamente el 25% de los nucleótidos totales en el ARN (por ejemplo, todas las bases de uridina). Para definir la frecuencia mínima de nucleósidos modificados particulares que es suficiente para reducir la inmunogenicidad en las condiciones utilizadas en el presente documento, se generaron moléculas de ARN con números limitados de nucleósidos modificados. En el primer conjunto de experimentos, el ARN se transcribió *in vitro* en presencia de proporciones variables de m6A, Ψ (pseudouridina) o m5C a sus NTP correspondientes no modificados. Se esperaba que la cantidad de incorporación de nucleósidos fosfato modificados en el ARN fuera proporcional a la proporción contenida en la reacción de transcripción, dado que las producciones de ARN obtenidas con T7 RNAP mostraron que la enzima utiliza NTP de m6A, Ψ o m5C casi tan eficientemente como los NTP básicos. Para confirmar esta expectativa, se digirió el ARN transcrito en presencia de UTP: Ψ en una proporción de 50:50 y se encontró que contenía UMP y Ψ en una proporción de casi 50:50 (Figura 10A).

Se introdujeron moléculas de ARN con un contenido de nucleósido modificado creciente por transfección en MDDC, y se evaluó la secreción de TNF- α . Cada modificación (m6A, Ψ y m5C) inhibió la secreción de TNF- α proporcionalmente a la fracción de bases modificadas. Incluso las cantidades más pequeñas de bases modificadas analizadas (0,2-0,4%, que corresponden a 3-6 nucleósidos modificados por molécula de 1571 nt), fueron suficientes para inhibir de forma cuantificable la secreción de citocinas (Figura 10B). El ARN con niveles de nucleósidos modificados del 1,7-3,2% (14-29 modificaciones por molécula) presentó una reducción del 50% en la inducción de la expresión de TNF- α . En las células 293 que expresan TLR, se requirió un mayor porcentaje (2,5%) de contenido de nucleósido modificado para inhibir los sucesos de señalización mediados por ARN.

Por lo tanto, la pseudouridina y nucleósidos modificados reducen la inmunogenicidad de las moléculas de ARN, incluso cuando están presentes como una pequeña fracción de los restos.

En experimentos adicionales, se sintetizaron oligorribonucleótidos (ORN) de 21 unidades con enlaces fosfodiéster internucleótido en los que los nucleósidos modificados (m5C, Ψ o 2'-O-metil-U [Um]) se sustituyeron en una posición particular (Figura 11A). Aunque el ORN no modificado inducía la secreción de TNF- α , este efecto fue eliminado por la presencia de una única modificación de nucleósido (Figura 11B). Se obtuvieron resultados similares con células 293 transformadas con TLR-7 y TLR-8 que expresan ARNp dirigido a TLR3.

Los resultados anteriores se confirmaron midiendo niveles de ARNm de TNF- α en MDDC por ensayo de transferencia Northern, usando tanto el anterior ORN de 21 unidades (ORN1) como transcritos sintetizados *in vitro* de 31 unidades (ORN5 y ORN6). Para amplificar la señal, se añadió cicloheximida, que bloquea la degradación de los ARNm seleccionados, a algunas muestras, como se indica en la Figura. El ODN no modificado aumentó los niveles de ARNm de TNF- α , mientras que los ORN que contienen un único nucleósido modificado fueron significativamente menos estimulantes; ORN2-Um presentó la mayor disminución en la producción de TNF- α (Figura 11C). Se observaron resultados similares en células RAW de tipo macrófago de ratón y en CD humana.

En resumen, cada una de las modificaciones analizadas (m6A, m5C, m5U, s2U, Ψ y 2'-O-metil) suprimió la estimulación inmunitaria mediada por ARN, incluso cuando están presentes como una pequeña fracción de los restos. Se observó una supresión adicional cuando se aumentó la proporción de nucleósidos modificados.

Ejemplo 11

LA MODIFICACIÓN DE ARN CON PSEDOURIDINA REDUCE SU INMUNOGENICIDAD *IN VIVO*

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina en la inmunogenicidad del ARN *in vivo*, se formaron complejos de 0,25 μ g de ARN con Lipofectin® y se inyectaron por vía intratraqueal en ratones, se extrajo sangre de los ratones 24 h más tarde y los niveles circulantes de TNF- α e IFN- α se analizaron en muestras de suero. El ARNm protegido con caperuza y modificado con pseudouridina, indujo significativamente menos ARNm de TNF- α y de IFN- α que el que se produjo por ARNm no modificado (Figuras 12A-B).

Estos resultados proporcionan evidencia adicional de que el ARNm modificado con pseudouridina es significativamente menos inmunogénico *in vivo* que el ARN no modificado.

Ejemplo 12

EL ARN QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA PRESENTA CAPACIDAD DISMINUIDA PARA ACTIVAR LA PRK

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Ensayos de fosforilación de PKR

Se incubaron alícuotas de PKR agarosa activa (Upstate) en presencia de cóctel de magnesio/ATP (Upstate), mezcla de tampón de quinasa y de [γ - 32 P] ATP y moléculas de ARN durante 30 minutos a 30 °C. Se analizaron ARN no modificados y ARN con modificación de nucleósido (m5C, pseudouridina, m6A, m5U) y ARNbc. Se añadió eIF2a recombinante humana (BioSource), y las muestras se incubaron adicionalmente durante 5 min, 30 °C. Las reacciones se detuvieron por la adición de tampón de muestra NuPage LDS con reactivo reductor (Invitrogen), se desnaturalizaron durante 10 min, 70 °C y se analizaron en PAGE al 10%. Los geles se secaron y se expusieron a la

película. Se utilizó como control positivo Heparina (1 U/μl), un activador de PKR.

RESULTADOS

Para determinar si el ARNm que contiene pseudouridina activa la proteína quinasa dependiente de ARNbc (PKR), se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando PKR recombinante humana y su sustrato, eIF2α (factor de iniciación eucariota 2 alfa) en presencia de ARNm protegido con caperuza que codifica renilla (0,5 y 0,05 ng/μl). El ARNm que contiene pseudouridina (Ψ) no activó PKR, como se detectó por la falta tanto de autofosforilación de PKR como de fosforilación de eIF2α, mientras que el ARN sin modificación de nucleósidos y el ARNm con modificación m⁵C activaron la PKR (Figura 13). Por lo tanto, la modificación con pseudouridina disminuye la inmunogenicidad de ARN.

Ejemplo 13

TRADUCCIÓN POTENCIADA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE ARN QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA Y M⁵C *IN VITRO*

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Traducción in vitro de ARNm en lisado de reticulocitos de conejo

La traducción *in vitro* se llevó a cabo en lisado de reticulocitos de conejo (Promega, Madison WI). Una alícuota de 9 μl del lisado se suplementó con 1 μl (1 μg) de ARNm y se incubó durante 60 minutos a 30 °C. Una alícuota de 1 μl se retiró para el análisis utilizando sistemas de ensayo de luciérnaga y renilla (Promega, Madison WI) y un luminómetro LUMAT LB 950 (Berthold/EG & G Wallac, Gaithersburg, MD) con un tiempo de medición de 10 segundos.

RESULTADOS

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina en la eficacia de traducción de ARN *in vitro*, Se incubó (0,1 μg/μl) ARNm no protegido con caperuza modificado con pseudouridina que codifica luciferasa de luciérnaga en lisado de reticulocitos de conejo durante 1 hora a 30 °C y se determinó la actividad de la luciferasa. El ARNm que contiene pseudouridina se tradujo más de 2 veces más eficazmente que el ARN sin pseudouridina en lisados de reticulocitos de conejo, pero no en extracto de trigo o lisado de *E. coli* (Figura 14), mostrando que la modificación con pseudouridina aumenta la eficiencia de traducción de ARN. Se obtuvieron resultados similares con ARN modificado con m⁵C. Cuando se añadió una cola de poliA a ARNm que contenía pseudouridina, se observó un aumento adicional de 10 veces en la eficacia de la traducción. (Ejemplo 10).

Por lo tanto, la modificación con pseudouridina y m⁵C aumenta la eficacia de la traducción de ARN y la adición de una cola de poli(A) al ARNm que contiene pseudouridina aumenta adicionalmente la traducción.

Ejemplo 14

TRADUCCIÓN POTENCIADA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE ARN QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA EN CÉLULAS CULTIVADAS

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Ensayos de traducción en células

Se sembraron placas de 96 pocillos con 5 x 10⁴ células por pocillo 1 día antes de la transfección. Se ensamblaron complejos lipofectin®-ARNm y se añadieron directamente a las monocapas celulares después de eliminar el medio de cultivo (0,2 μg de ARNm-0,8 μg de lipofectin en 50 μl por pocillo). Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 1 hora a 37 °C, en una incubadora de CO₂ al 5%, a continuación, se reemplazó la mezcla con medio fresco, precalentado que contenía FCS al 10%, a continuación, se analizaron las células como se describe en el Ejemplo anterior.

RESULTADOS

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina en la traducción de ARN en células cultivadas, se transfectaron células 293 con ARNm protegido con caperuza, transcrito *in vitro*, modificado con nucleósido que codifica la proteína indicadora renilla. Las células se lisaron 3 h después del inicio de la transfección y los niveles de renilla se midieron por ensayos enzimáticos. En células 293, los ADN modificados con pseudouridina y m⁵C se tradujeron casi 10 veces y 4 veces más eficazmente, respectivamente, que el ARNm no modificado (Figura 15A).

A continuación, el experimento se llevó a cabo con CD primaria de ratón derivada de médula ósea, en este caso lisando las células 3 h y 8 h después de la transfección. El ARN que contiene la modificación con pseudouridina se tradujo 15-30 veces más eficazmente que el ARN no modificado (Figura 15B).

Se obtuvieron resultados de expresión similares usando CD humanas y otras células primarias y líneas celulares establecidas, que incluyen COH y células RAW de tipo macrófago de ratón. En todos los tipos de células, la modificación con pseudouridina produjo la mayor potenciación de las modificaciones probadas.

- 5 Por lo tanto, la modificación con pseudouridina aumentó la eficacia de traducción de ARN en todos los tipos de células analizados, incluyendo diferentes tipos de tanto células presentadoras de antígenos profesionales como células presentadoras de antígenos no profesionales, proporcionando evidencia adicional de que la modificación con pseudouridina aumenta la eficacia de la traducción del ARN.

Ejemplo 15

10 **LOS ELEMENTOS 5' Y 3' POTENCIAN ADICIONALMENTE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm ψ EN CÉLULAS DE MAMÍFERO**

- 15 Para probar el efecto de elementos estructurales de ARN adicionales sobre la potenciación de la traducción por la modificación con pseudouridina, se sintetizó un conjunto de ARNm ψ que codificaban luciferasa de luciérnaga que contenían combinaciones de las siguientes modificaciones: 1) una secuencia 5' no traducida única (TEV, un potenciador de la traducción independiente de caperuza), 2) caperuza y 3) cola de poliA. Se evaluó la capacidad de estas modificaciones para potenciar la traducción de ARNm ψ o ARNm convencional (Figura 16A). Estos elementos estructurales potenciaron aditivamente la eficacia de traducción tanto del ARNm convencional como de ARNm ψ , presentando ARNm ψ una mayor producción de proteína de todas las construcciones.

- 20 La capacidad de expresión de proteínas a partir de la construcción de ARNm ψ de luciferasa de luciérnaga más eficaz, capTEVlucA50 (que contiene TEV, caperuza y una cola extendida de poli(A)) se examinó a continuación durante 24 horas en células 293 (Figura 16B). El ARNm ψ produjo más proteína en todos los puntos de tiempo analizados y confirió una expresión de luciferasa más persistente que las construcciones de ARNm convencionales equivalentes, mostrando que las modificaciones ψ estabilizan el ARNm.

- 25 Para probar si la modificación ψ del ARNm mejoraba la eficacia de traducción en células de mamífero *in situ*, se generaron construcciones de ARNm ψ caplacZ con o sin colas de poliA prolongadas (A_n) y que codifican β -galactosidasa (lacZ) y se usaron para transfectar células 293. 24 h después de la administración de ARNm, se detectaron aumentos significativos en los niveles de β -galactosidasa por visualización X-gal, tanto en caplacZ como en caplacZ- A_n , en comparación con los correspondientes transcritos de control (convencionales) (Figura 16C). Esta tendencia se observó cuando se analizó el número de células que expresaban niveles detectables de β -galactosidasa o la magnitud de la señal en células individuales.

30 **Ejemplo 13**

TRADUCCIÓN PONTENCIADA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE ARN *IN VIVO* QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Inyecciones intracerebrales de ARN

- 35 Todos los procedimientos con animales estuvieron de acuerdo con la Guía NIH para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se anestesiaron ratas macho Wistar (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal). Las cabezas se colocaron en un marco estereotáxico, y se realizaron ocho orificios de trépano de 1,5 mm de diámetro espaciados de manera bilateral (coordenadas relativas al bregma: anterior/posterior + 3,0, -3, -6 mm; lateral $\pm$ 2,5 mm) dejando la duramadre intacta. Se realizaron inyecciones intracraneales utilizando una jeringa de 25 μ l (Hamilton, Reno, NV) con una aguja estéril de calibre 30 y 2,54 cm (Beckton 25 Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) que se fijó a un soporte de sonda grande y un brazo estereotáctico. Para evitar el espacio de aire en la jeringa, la base de la aguja se llenó con 55 μ l de complejo antes de unir la aguja, y el resto de la muestra se extrajo a través de la aguja. Se determinó la profundidad de inyección (2 mm) en relación con la superficie de la duramadre, y se administraron 4 μ l de complejo (32 ng de ARNm) en una infusión en embolada única y rápida. 3 horas (h) más tarde, las ratas se sacrificaron con halotano y los cerebros se eliminaron en solución salina tamponada con fosfato enfriada.

Inyección de ARN en la vena de cola de ratón

- 50 Se inyectaron (en embolada) en venas de la cola de ratones hembra BALB/c, (Charles River Laboratories) 60 μ l de ARN complejo con Lipofectin® (0,26 μ g). Se retiraron los órganos y se homogeneizaron en tampón de lisis de luciferasa o Renilla en tubos de microcentrífuga usando una mano de mortero. Los homogeneizados se centrifugaron y se analizó la actividad en los sobrenadantes.

Suministro de ARN al pulmón

Se anestesiaron ratones hembra BALB/c usando ketamina (100 mg/kg) y xilasina (20 mg/kg). Se hicieron pequeñas incisiones en la piel adyacente a la tráquea. Cuando la tráquea estaba expuesta, se instilaron en la tráquea 501-11

de ARN complejo con Lipofectin® (0,2 µg) hacia el pulmón. Se cerraron las incisiones y se permitió que los animales se recuperaran. 3 horas después del suministro de ARN, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se retiraron los pulmones, se homogeneizaron con tampón de lisis de luciferasa o Renilla (250 µl) y se analizó la actividad. En diferentes conjuntos de animales, se recolectaron, coagularon y centrifugaron muestras de sangre (100 µl/animal) de las venas de la cola. Se usaron fracciones de suero para determinar niveles de TNF e IFNα por ELISA como se describe en los Ejemplos anteriores, utilizando anticuerpos específicos de ratón.

RESULTADOS

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina en la traducción de ARN *in vivo*, cada hemisferio de cortezas cerebrales de rata se inyectó con ARN modificado con pseudouridina o ARN no modificado que codifica renilla, cualquiera de los dos protegidos con caperuza, y se midió la traducción del ARN. El ARN modificado con pseudouridina se tradujo significativamente de manera más eficaz que el ARN no modificado. (Figura 17A).

A continuación, se llevaron a cabo estudios de expresión en ratones. Se utilizaron ARNm que codifican luciferasa de luciérnaga porque ninguna enzima de mamífero endógena interfiere con su detección. Los transcritos (no modificados y ARNmψ) se construyeron con caperuza, TEV (CapTEV A₅₀) y colas de poli(A) ampliadas (-200 nt). Se inyectaron 0,25 µg de ARN complejo con Lipofectin® en ratones (vía intravenosa (i.v.) en la vena de la cola). En una serie de órganos se estudió la actividad de luciferasa para determinar el sitio de medición óptimo. La administración de 0,3 µg de ARNmψ capTEVlucAn indujo una alta expresión de luciferasa en el bazo y una expresión moderada en la médula ósea, pero poca expresión en pulmón, hígado, corazón, riñón o cerebro (Figura 17B). En estudios posteriores, se estudiaron los bazos.

A continuación, se compararon las eficacias de traducción del ARNm convencional y ARNmψ (0,015 mg/kg; 0,3 µg/animal administrados por vía intravenosa) en experimentos de curso temporal. La actividad luciferasa fue fácilmente detectable en 1 h, alcanzó su punto máximo a las 4 h y disminuyó a las 24 h tras la administración de ARNm convencional o de ARNmψ, pero en todo momento fue sustancialmente mayor en animales a los que se les dio ARNmψ (Figura 17C, panel izquierdo). A las 24 horas, únicamente los animales inyectados con ARNmψ demostraron actividad de luciferasa esplénica detectable (4 veces más que los niveles de fondo). Se obtuvo un patrón de expresión relativo similar (entre ARNm modificado y no modificado) cuando se inyectaron en los animales ARNm que codifican luciferasa de *Renilla* (capRen con o sin modificaciones ψ) en lugar de luciferasa de luciérnaga, o cuando los esplenocitos de ratón aislados se expusieron a ARNm en cultivo.

En el siguiente experimento, se suministraron 0,25 µg de ARNm-Lipofectin® a los pulmones de ratón por inyección intratraqueal. El ARNm protegido con caperuza modificado con pseudouridina se tradujo de manera más eficaz que el ARNm protegido con caperuza sin modificación con pseudouridina (Figura 17D).

Por lo tanto, la modificación con pseudouridina aumenta la eficacia de la traducción de ARN *in vitro*, en células cultivadas e *in vivo* en múltiples modelos animales y por múltiples vías de administración, mostrando su aplicación generalizada como un medio para aumentar la eficacia de la traducción de ARN.

Ejemplo 17

LA MODIFICACIÓN CON PSEUDOURIDINA POTENCIA LA ESTABILIDAD DE ARN *IN VIVO*

Los análisis Northern de ARN esplénico 1 y 4 h después de la inyección en los animales del Ejemplo anterior revelaron que los ARNm administrados, en sus formas intactas y parcialmente degradadas, fueron fácilmente detectables (Figura 17C, panel derecho). Por el contrario, a las 24 horas, el ARNm capTEVlucAn no modificado estaba por debajo del nivel de detección, mientras que el ARNmψ capTEVlucAn, aunque parcialmente degradado, todavía era claramente detectable. Por lo tanto, el ARNmψ se conserva de manera más estable *in vivo* que el ARNm control.

Para probar si la producción de proteína *in vivo* es cuantitativamente dependiente de la concentración de ARNm administrado por vía intravenosa, se administraron ARNm a ratones a 0,015-0,150 mg/kg (0,3-3,0 µg de capTEVlucAn por animal) y se analizaron los bazos 6 horas más tarde como se describe anteriormente. La expresión de luciferasa se correlacionó cuantitativamente con la cantidad de ARN inyectado (Figura 18) y a cada concentración.

Estos hallazgos confirman los resultados del Ejemplo 15, demostrando que ARNmψ es más estable que el ARN no modificado. La inmunogenicidad adicional de ARNmψ fue menor que la de ARN no modificado, como se describe anteriormente en el presente documento (Figura 12 y Figura 17C, panel derecho).

Para resumir los Ejemplos 16-17, las 3 ventajas del ARNmψ en comparación con el ARNm convencional (traducción potenciada, estabilidad aumentada e inmunogenicidad reducida) observadas *in vitro* también se observan *in vivo*.

Ejemplo 18

EL ARNmψ SUMINISTRADO A TRAVÉS DEL TRACTO RESPIRATORIO SE COMPORTA DE MANERA SIMILAR

AL ARNm ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA

Para probar la posibilidad de suministrar ARNm ψ por inhalación, se suministraron ARNm complejados con Lipofectin® o PEI que codifican luciferasa de luciérnaga a ratones por la vía intratraqueal, colocándose una aguja en la tráquea y pulverizándose la solución de ARNm en los pulmones. De forma similar al suministro intravenoso, se observó una expresión de luciferasa significativamente mayor con ARNm ψ en comparación con ARNm no modificado (Figura 19), aunque se produjo significativamente menos proteína con la vía intratraqueal en comparación con la intravenosa. El ARNm no modificado administrado por vía intratraqueal se asoció con concentraciones significativamente más altas de citocinas inflamatorias (IFN- α y TNF- α) en comparación con los controles de vehículo, mientras que el ARNm ψ no (Figura 19).

Por lo tanto, el ARNm ψ se puede suministrar por inhalación sin activar la respuesta inmune innata.

Ejemplo 19

SUMINISTRO DE ARNm ψ -EPO EN CÉLULAS 293

El ARNm ψ se generó a partir de un plásmido que contenía el ADNc de EPO humana. Cuando se transfectaron 0,25 μ g de ARNm ψ -EPO en 10^6 células 293 cultivadas, se produjeron más de 600 mU/ml de proteína EPO. Por lo tanto, las moléculas de ARN modificado de la presente invención son eficaces para suministrar proteínas recombinantes a las células.

Ejemplo 20

PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE ARNm ψ QUE CODIFICAN EPO

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

La secuencia codificante de EPO se clona usando técnicas de enzimas de restricción para generar 2 nuevos plásmidos, pTEV-EPO y pT7TS-EPO, que se usan como moldes para la producción de ARNm ψ -EPO. Los ARNm ψ -EPO se producen a partir de estos moldes por transcripción *in vitro* (kits MessageMachine® y MegaScript®; Ambion,) utilizando ARN polimerasa de T7 (RNAP), incorporando nucleósidos a concentraciones equimolares (7,5 mM). Para incorporar las modificaciones de nucleósidos, ψ trifosfato ((TriLink, San Diego, CA) reemplaza a UTP en la reacción de transcripción. Para garantizar la protección con caperuza del ARNm ψ , se incluye también un análogo de caperuza no reversible, 3'-O-Mem7GpppG 6 mM (New England BioLabs, Beverly, MA). Los ARNm ψ tienen una cola de poli(A) en una reacción de $\sim 1,5$ μ g/ μ l de ARN, ATP 5 mM y 60 U/ μ l de poli(A) polimerasa de levadura (USB, Cleveland, OH) mezclada a 30 °C durante 3 a 24 h. La calidad de los ARNm ψ se evalúa por electroforesis en gel de agarosa desnaturante. También se realizan ensayos para LPS en las preparaciones de ARNm que usan el análisis de Lisado de Amebocitos de Limulus de coágulo de gel con una sensibilidad de 3 pg/ml.

RESULTADOS

La región 3' proximal no traducida (3' UTR) del ARNm ψ -EPO conserva un elemento estabilizante rico en pirimidina de ~ 90 nt de longitud procedente del ARNm de EPO naciente, que estabiliza el ARNm de EPO por asociación específica con una proteína ubicua, proteína de unión a ARNm de eritropoyetina (ERBP). Para maximizar la estabilidad de ARNm ψ -EPO, se incorporan 2 alteraciones en el plásmido de EPO para mejorar la estabilidad y la eficacia traduccional del ARNm transcrito: 1) La secuencia A5' UTR del virus del grabado del tabaco (TEV) se incorpora cadena arriba de la secuencia codificante de EPO para generar pTEV-EPO. 2) Se genera un plásmido, pT7TS-EPO, en el que el ADNc de EPO está flanqueado por secuencias que corresponden a 5' y 3' UTR de ARNm de beta globina de Xenopus.

Además, se amplía la longitud de la cola de poli(A) durante la producción del ARNm ψ a partir de estos moldes de plásmido, al aumentar el período de incubación de la reacción de poli(A) polimerasa. La mayor longitud de la cola de poli(A) disminuye la velocidad a la que el ARNm ψ se degrada durante la traducción.

Estas mejoras dan como resultado una eficacia de traducción *in vivo* potenciada, minimizando, por lo tanto, la dosis terapéutica del producto final.

Ejemplo 21

ANÁLISIS *IN VITRO* DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE CONTRUCCIONES DE ARNm DE EPO

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Preparación de células de mamífero.

Se propagaron células embrionarias de riñón humano 293 (ATCC) en DMEM suplementado con glutamina (Invitrogen) y FCS al 10% (Hyclone, Ogden, UT) (medio completo). Se obtuvieron muestras por leucoféresis de voluntarios no infectados por VIH a través de un protocolo aprobado por IRB. Las CD se producen como se describe

anteriormente y se cultivaron con GM-CSF (50 ng/ml) + IL-4 (100 ng/ml) (R & D Systems) en AIM V medium® (Invitrogen).

- 5 Las células del bazo murino y CD se obtuvieron por procedimientos publicados. En resumen, los bazos de ratones BALB/c se retiran asépticamente y se pican con pinzas en medio completo. Los fragmentos de tejido se sedimentan por gravedad y la suspensión de células individuales se lava y se lisa con tampón de lisis AKC (Sigma). Las CD murinas derivan de células de médula ósea recolectadas de fémures y tibia de ratones BALB/c de 6-9 semanas de edad. Las células se cultivan en DMEM que contiene FCS al 10% (Invitrogen) y 50 ng/ml de muGM-CSF (R&D) y se usan el día 7.

Transfección de células y detección de EPO y citocinas proinflamatorias

- 10 Las transfecciones se llevan a cabo con Lipofectin en presencia de tampón fosfato, un procedimiento de suministro eficaz para la expresión celular esplénica e *in vitro*. Se añade ARNm ψ -EPO (0,25 μ g/pocillo; 100.000 células) a cada tipo celular por triplicado durante 1 hora y el sobrenadante se reemplaza por medio fresco. 24 horas más tarde, se recolecta el sobrenadante para la medición por ELISA de EPO, IFN- α o β y TNF- α .

RESULTADOS

- 15 Para evaluar el impacto de UTR únicas en la potenciación de la eficacia traduccional de ARNm ψ , el ARNm ψ -EPO que contiene o no contiene, cada mejora (elemento 5' TEV, (β -globina 5' y 3' UTR) con colas largas de poli(A) se prueban para la producción de proteína *in vitro* y activación inmunitaria *in vitro* usando ARNm de EPO que contiene nucleósidos convencionales como controles. La eficacia de la producción de proteína de cada ARNm se evalúa en líneas celulares de mamíferos, (HEK293, CHO), CD primarias humanas y murinas y células de bazo para cada
20 ARNm. Se evalúa la medición de la EPO total producida en todos los tipos celulares y la inmunogenicidad (citocinas proinflamatorias asociadas al sobrenadante) en las células primarias. La construcción de ARNm que demuestra la combinación óptima de alta producción de EPO (en 1 o más tipos celulares) y baja inducción de citocinas se usa en estudios posteriores. Las mejoras en 5' y 3' UTR de ARNm ψ -EPO y las colas de poli (A) más largas dan como resultado una potenciación estimada de 2-10 veces en la eficacia de la traducción, sin aumento en la
25 inmunogenicidad.

Ejemplo 22

CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EPO Y RESPUESTA BIOLÓGICA A ARNm ψ -EPO *IN VIVO*

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Administración de ARNm ψ -EPO a ratones.

- 30 Todos los estudios con animales en el presente documento se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía NIH para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania. Se anestesian ratones hembra BALB/c (n= 5 por condición experimental; 6 semanas, 18 -23 g; Charles River Laboratories) usando halotano al 3,5% en una mezcla de N₂O y O₂ (70:30), a continuación, se reduce el halotano al 1% y se mantiene la anestesia usando una máscara nasal. Las temperaturas corporales de los animales se mantienen durante todo el procedimiento usando una almohadilla térmica calentada a 37 °C. Los complejos de ARNm ψ -PO-lipofectin (construidos mezclando cantidades variables de ácido nucleico con 1 μ l de lipofectin en 60 μ l de volumen final) se inyectan en la vena lateral de la cola. Las muestras de sangre se recolectan 3 veces al día durante 3 días después de la inyección de ARNm durante el estudio de curso temporal, en 1 momento óptimo en los estudios de dosis-respuesta y diariamente desde los días 2-6 en los estudios de
40 reticulocitosis.

Determinación de reticulocitos por citometría de flujo.

- Las muestras de sangre completas se tiñen usando reactivo Retic-COUNT (BD Diagnostics) y los sucesos de datos se adquieren en un citómetro de flujo FACScan. Los glóbulos rojos (RBC) se seleccionan por las propiedades de dispersión directa y lateral y se analizan con respecto a la captación de Naranja de Tiazol. Las células teñidas con
45 reactivo Retic-COUNT se detectan por fluorescencia y los reticulocitos se expresan como el porcentaje de RBC total. Se cuentan, al menos, 50.000 sucesos por muestra.

RESULTADOS

Para optimizar la producción de proteína EPO humana (EPOh) biológicamente funcional en respuesta a ARNm que codifica EPO, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- 50 Curso temporal de producción de EPO después de una única inyección de ARNm ψ -EPO. Después de la administración intravenosa de 1 μ g de ARNm ψ -EPO, se mide EPOh en serie desde 1-96 h después de la administración de ARNm ψ -EPO por ELISA, para determinar la semivida de la proteína EPO en el suero. Esta semivida es el resultado tanto de la semivida de la proteína EPO como de la semivida funcional del ARNm ψ -EPO. El momento óptimo resultante para medir la proteína EPO después de la administración de ARNm ψ -EPO

se utiliza en estudios posteriores.

Dosis-respuesta de producción de EPO después de una única inyección con ARNm ψ -EPO. Para determinar la correlación entre la cantidad de proteína EPO producida y la cantidad de ARNm ψ -EPO administrado, se administran concentraciones crecientes de ARNm ψ -EPO (0,01 a 1 μ g/animal) y se mide EPO en el momento óptimo.

Relación entre producción de EPOh y reticulocitosis. Para medir el efecto de ARNm ψ -EPO en un correlato biológico de la actividad de EPO, se usa citometría de flujo para determinar la frecuencia de reticulocitos en sangre). La citometría de flujo tiene un coeficiente de variación de <3%. Los ratones reciben una dosis única de ARNm ψ -EPO y se extrae sangre de ratones diariamente desde los días 2-6. La relación entre la dosis de ARNm ψ -EPO y la frecuencia de reticulocitos se evalúa a continuación en el momento de máxima reticulocitosis. La dosis de ARNm ψ -EPO que conduce a un aumento de, al menos, un 5% en el recuento de reticulocitos se utiliza en estudios posteriores. Se obtienen concentraciones séricas de EPOh en ratones de aproximadamente 50 mU/ml y/o un aumento en la frecuencia de reticulocitos de aproximadamente 5%.

Ejemplo 23

MEDICIÓN DE RESPUESTAS INMUNITARIAS A ARNm ψ -EPO *IN VIVO*

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Detección de citocinas en el plasma.

En muestras de suero obtenidas de sangre recolectada en diferentes momentos durante y después de 7 administraciones diarias de ARNm complejo con lipofectin se analizan IFN- α de ratón, TNF- α y IL-12 utilizando kits ELISA.

Análisis por transferencia Northern.

Se separaron alícuotas (2,0 μ g) de muestras de ARN aisladas de bazo por electroforesis en gel de agarosa desnaturante al 1,4%, se transfirieron a membranas cargadas (Schleicher y Schuell) y se hibridaron en MiracleHyb® (Stratagene). Las membranas se tratan con sondas para TNF- α , moléculas de señalización de IFN aguas abajo (por ejemplo, IRF7, IL-12 p35 y p40 y GAPDH) y otros marcadores de activación inmunitaria. La especificidad de todas las sondas se confirma por secuenciación. Para sondear las membranas, se etiquetan 50 ng de ADN utilizando Redivue [alfa-³²P] dCTP® (Amersham) con un kit de marcaje de cebadores aleatorios (Roche). Las membranas hibridadas se exponen a la película Kodak BioMax MS utilizando una pantalla de intensificador de MS a -70 °C.

Histopatología.

Los bazos de ratones tratados con ARNm ψ -EPO y tratados con control positivo y negativo se recogen, se fijan, se seccionan, se tiñen con hematoxilina y eosina y se examinan por un patólogo veterinario en busca de signos de activación inmunitaria.

RESULTADOS

Para confirmar la inmunogenicidad reducida de las moléculas de ARN de la presente invención, los ratones (n = 5) reciben dosis diarias de ARNm ψ -EPO durante 7 días, y a continuación se evalúan los sucesos adversos mediados por inmunidad, como los indicados por las concentraciones séricas de citocinas, la expresión esplénica de ARNm que codifican proteínas inflamatorias y el examen patológico. Las dosis máximas administradas son de 3 μ g o 5 veces la dosis única eficaz como se determina anteriormente. El ARNm no modificado y Lipofectin® solo se usan como controles positivo y negativo, respectivamente.

Estos estudios confirman la inmunogenicidad reducida de las moléculas de ARN de la presente invención.

Ejemplo 24

POTENCIACIÓN ADICIONAL DE PROCEDIMIENTOS DE SUMINISTRO DE ARNm ψ -EPO

Formación de complejos de nanopartículas.

Se mezclan soluciones de polímero y ARNm ψ para formar complejos. Se prueban y optimizan diversas condiciones de formulación: (1) los complejos de sub-22 nm polietilenimina (PEI)/ARNm se preparan por adición de 25 volúmenes de ARNm a 1 volumen de PEI en agua sin mezclar durante 15 minutos. (2) La poli-L-lisina-poli-etilenglicol tipo varilla (PLL-PEG) con dimensiones promedio de 12x150 nm se sintetiza por adición lenta de 9 volúmenes de ARNm a 1 volumen de CK₃₀-PEG_{10k} en tampón de contraíón acetato mientras se agita con vórtice. (3) Para la síntesis de polímero portador de genes biodegradables, Se sintetiza el anhídrido poliaspártico co-etilenglicol (PAE) por policondensación de apertura de anillo de anhídrido N- (benciloxicarbonil)-L-aspartato y etilenglicol. A continuación, la amina colgante del ácido aspártico se desprotege y protona por acidificación con cloruro de hidrógeno y se condensa con ARNm. (4) Para la última generación de nanopartículas, se añade alícuota Stock

CK₃₀PEG_{10k} en forma de acetato de amonio (1,25 ml; 6,4 mg/ml) a tubos Eppendorf siliconados. a continuación, el ARNm se agrega lentamente a CK₃₀PEG_{10k} (2,5 mg en 11,25 ml de H₂O libre de RNasa) durante 1-2 minutos. Después de 15 minutos, se diluye a 1:2 en H₂O libre de RNasa.

Suministro intratraqueal.

- 5 Los ratones se anestesiaron con halotano al 3% (70% N₂O + 30% O₂) en una cámara de anestesia y se mantuvieron con halotano al 1% (70% N₂O + 30% O₂) durante la operación con un cono nasal. Se expone la tráquea y se infunden 50 µl de complejo de ARNm con 150 µl de aire en el pulmón a través de la tráquea usando jeringa Hamilton de 250 µl (Hamilton, Reno, NV) con una aguja de 27 G de 1,27 cm.

RESULTADOS

- 10 Para mejorar la eficacia del suministro y la expresión de ARNm ψ administrado por vía intratraqueal (i.t.), ARNm ψ se encapsula en nanopartículas. El empaquetado de nanopartículas implica condensar y encapsular ADN (por ejemplo) en partículas que son más pequeñas que el poro de la membrana nuclear, utilizando productos químicos que incluyen poli-L-lisina y polietilenglicol. El ARN se empaqueta en 4 formulaciones de nanopartículas diferentes (PEI, PLL, PAE y CK₃₀PEG_{10k}) y se compara la eficacia del suministro de ARNm para comparar el ARNm ψ que codifica luciferasa (Luc-ARNm). La cinética del suministro y la respuesta a la dosis se caracterizan a continuación utilizando ARNm ψ -EPO.

Ejemplo 25

PREVENCIÓN DE REESTENOSIS POR SUMINISTRO EN LA ARTERIA CARÓTIDA DE ARNm MODIFICADO QUE CODIFICA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO RECOMBINANTE

20 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Diseño experimental

- El ARN se administra a la arteria carótida de las ratas por inyección intraarterial cerca del momento de la angioplastia con balón, después de lo cual se restablece el flujo sanguíneo. Las ratas se sacrifican 3 h después de la inyección, se escinden secciones de la arteria carótida, se recogen y se homogeneizan las células endoteliales vasculares y la actividad de la luciferasa se determina como se describe en los Ejemplos anteriores.

RESULTADOS

El ARN modificado con pseudouridina que codifica luciferasa se administra a las ratas en las arterias carótidas. 3 horas más tarde, se puede detectar ARN luciferasa en el lugar de suministro, pero no en lugares adyacentes.

- 30 A continuación, este protocolo se usa para prevenir la reestenosis de un vaso sanguíneo después de la angioplastia con balón en un modelo de reestenosis animal, por el suministro de ARN modificado que codifica una proteína de choque térmico, por ejemplo, HSP70; un factor de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (V-EGF) o factor de crecimiento similar a insulina (IGF); o una proteína que regula negativamente o antagoniza la señalización del factor de crecimiento. La administración de ARN modificado reduce la incidencia de reestenosis.

35 Ejemplo 26

TRATAMIENTO DE FIBROSIS QUÍSTICA POR EL SUMINISTRO DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN CFTR AL EPITELIO RESPIRATORIO

- Se suministra ARN modificado con pseudouridina o nucleósido que codifica CFTR, como se describe en el Ejemplo 16, a los pulmones de un modelo animal de fibrosis quística y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Scholte BJ, y col (Animal models of cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2004; 3 Suppl2: 183-90) o Copreni E, y col., Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. GeneTher 2004; 11 Suppl 1: S67-75). La administración de ARN mejora la fibrosis quística.

- 45 En experimentos adicionales, las moléculas de ARN modificado de la presente invención se usan para suministrar a los pulmones, otras proteínas recombinantes de valor terapéutico, por ejemplo, a través de un inhalador que suministra ARN.

Ejemplo 27

TRATAMIENTO DE XLA POR EL SUMINISTRO DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN ADA A CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

- 50 El ARN modificado con pseudouridina o nucleósido que codifica ADA se administra a las células hematopoyéticas de un modelo animal de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, y se evalúa su efecto sobre la enfermedad tal

como se describe en Tanaka M, Gunawan F, y col., inhibition of heart transplant injury and graft coronary artery disease after prolonged organ ischemia by selective protein kinase C regulators. J Thorac Cardiovasc Surg 2005;129(5): 1160-7) o Zonta S, Lovisetto F, y col., Ureteroneocystostomy in a swine model of kidney transplantation: a new technique. J Surg Res. 2005 Apr;124(2):250-5). Se encuentra que la administración del ARN mejora la XLA.

Ejemplo 28

PREVENCIÓN DE RECHAZO DE ÓRGANOS POR SUMINISTRO DE MOLÉCULAS DE ARNm QUE CODIFICAN PROTEÍNAS INMUNOMODULADORAS A UN LUGAR DE TRASPLANTE

El ARNm modificado con pseudouridina o nucleósido que codifica una citocina, una quimioquina o un interferón IS (por ejemplo, IL-4, IL-13, IL-10 o TGF- β) se suministra a un lugar de trasplante de un modelo animal de rechazo de trasplante de órganos y se evalúa su efecto sobre la incidencia de rechazo como se describe en Yu PW, Tabuchi R S y col, Sustained correction of B-cell development and function in a murine model of X-linked agammaglobulinemia (XLA) using retroviral-mediated gene transfer. Blood. 2004 104(5): 1281-90) o Satoh M, Mizutani A y col, X-linked immunodeficient mice spontaneously produce lupus-related anti20 RNA helicase A autoantibodies, but are resistant to pristane-induced lupus. Int Immunol 2003, 15(9):1117-24). La administración de ARN reduce la incidencia del rechazo de trasplante.

Ejemplo 29

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK, MUCOPOLISACARIDOSIS, Y OTROS ERRORES METABÓLICOS CONGÉNITOS POR EL SUMINISTRO DE ARNm A TEJIDOS CORPORALES

Se suministra ARN modificado con pseudouridina o nucleósido que codifica esfingomielinasa a pulmón, cerebro u otro tejido de los modelos animales de la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A y B y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Passini MA, Macauley SL, y col., AAV vector-mediated correction of brain pathology in a mouse model of Niemann-Pick A disease. Mol Ther 2005; 11(5): 754-62) o Buccoliero R, Ginzburg L, y col., Elevation of lung surfactant phosphatidylcholine in mouse models of Sandhoff and of Niemann-Pick A disease. J Inherit Metab Dis 2004;27(5): 641-8). Se encuentra que la administración del ARN mejora la enfermedad.

El ARN modificado con pseudouridina o nucleósido alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa o enzimas relacionadas se suministra a los tejidos corporales de un modelo animal de mucopolisacaridosis y se evalúa su efecto en la enfermedad como se describe en Simonaro CM, D'Angelo M, y col., Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. Pediatr Res 2005;57(5 Pt 1): 701-7) o McGlynn R, Dobrenis K, y col., Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. J Comp Neurol 2004 20;480(4): 415-26). La administración de ARN mejora la enfermedad.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARN modificado de la presente invención se usan para proporcionar factores de coagulación (por ejemplo, para hemofílicos). En experimentos adicionales, las moléculas de ARN modificado de la presente invención se usan para proporcionar ácido- β -glucosidasa para tratar la enfermedad de Gaucher. En experimentos adicionales, las moléculas de ARN modificado de la presente invención se usan para proporcionar alfa-galactosidasa A para tratar de la enfermedad de Fabry. En experimentos adicionales, las moléculas de ARN modificado de la presente invención se usan para proporcionar citocinas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARN modificado de la presente invención se usan para corregir errores de metabolismo congénitos, por administración de moléculas de ARNm que codifican, por ejemplo ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FM03; FM04; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPT1; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACPI; AGXT; AH HR; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COL4A3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LOT; LHCGR; LSFC; MSH2; MSH6; NEB; NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REGIA; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFH1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRY; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; F1H; FOXL2; GBE1; GLB1; GLC1C; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG;

ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXPI; PCCB; POU1
 FI; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFB2; THPO;
 THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA;
 5 AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG; ENAM; ETFDH; EVC; F11; FABP2;
 FGA;FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYP; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD;
 KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2; PKD2; QDPR; SGCB;
 SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3BI; APC;
 ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1; DTR; EOS; EPD; ERVR;
 10 F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMD1A; LOX; LTC4S; MAN2A1; MCC;
 MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFB; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2;
 SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFB; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB;
 BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1;
 FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1;
 IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3;
 15 OOD; OFC1; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PPAC;
 PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2;
 TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1; ASL; ASNS; AUTS1;
 BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36; CFTR; CHORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS;
 CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9;
 20 HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMB1; LEP; MET; NCF1 ;NM; OGDH; OPN1SW; PEX1; PGAM2;
 PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH; SLC26A3;
 SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANKI; CA1; CA2; CCAL1; CLN8; CMT4A;
 CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS; DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1;
 FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL; MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1;
 25 PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN;
 ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5;
 CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA;
 GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H; LMX1B;
 MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR; RPD1;
 30 SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1; CUBN; CXCL12;
 CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPSI; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67;
 MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PE01; PHYH; PNL1P; PSAP;PTEN; RBP4; RDPA; RET; SFTPA1;
 SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC; APOA1;
 APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G; CD59; CDKN1C; CLN2; CNTF; CPT1A;
 35 CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2; GIF;
 HBB; HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS; KCNJ11;
 KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NN01; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2;
 PGR; PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD; SERPING1;
 SMPD1; TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C; VMD2; VRN1; WT1; WT2; ZNF145; A2M;
 40 AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; C1R; CD4; CDK4; CNA1;
 COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2; HMN2; HPD; IGF1;
 KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB; LYZ; MGCT; MPE;
 MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPM;
 SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TPM; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5; CPB2; ED2; EDNRB;
 45 ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RB1; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2;
 SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVDI; BCH; CTA1; DAD1; DFNB5; EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@;
 grupo IGH; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MCOP; MJD; MNG1 MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2;
 PABN1; PSEN1 PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7; SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1;
 TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USH1A; VP; ACCPN; AH02; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3;
 50 CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1; FES; HCVS; HEXA; IVD;
 LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLBP1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6; ALDOA;
 APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH; CTM; CYBA; CYLD; DHS;
 DNASE1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN; HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2;
 IL4R; LIPB; MC2R; MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2; PXE; SALL1; SCA4;
 55 SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA;
 AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1B; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS;
 EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2; GP1BA; GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB3; ITGB4;
 KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3; KRT16; KRT16L1; KRT16L2; KRT17; KRT9;
 MAPT; MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO; MYO15A; NAGLU; NAPB; NF1; NME1; P4HB; PAFAH1B1;
 60 PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH; RARA; RCV1; RMSA1;
 RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR; SOST; SOX9; SSTR2;
 SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2; CNSN; CORD1; CYB5;
 DCC; F5F8D; FECH; PEO; LAM A3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF;
 TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A; CCO; CEACAM5; COMP;
 65 CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB; EXT3; EYCL1; FTL; FUT1;
 FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1; HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR; JAK3; KLK3; LDLR; LHB; LIG1;

LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOPI; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1; NAGA; NF2; OGS2; PDGFB; PPARG; PRODH; SC02; SCZD4; SERPIND1; SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS; BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM; CHR39C; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDXY; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2C; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MID1; MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NR0B1; NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW; OPN1MW; OTC; P3; PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA; PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1; SII; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS; SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIMP1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS; WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ; GCY; RPS4Y; SMCY; SRY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTC01; MTC03; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTPP; MTTT1; MTTT2; MTTT3; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PR01; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM o TTD.

Ejemplo 30

TRATAMIENTO DE VASOESPASMO POR SUMINISTRO DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN iNOS A TEJIDOS CORPORALES

Se suministra ARN modificado con pseudouridina o nucleósido que codifica óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) al endotelio vascular de modelos de animales de vasoespasmo (por ejemplo, hemorragia subaracnoidea) y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Pradilla G, Wang PP, y col., Prevention of vasospasm by anti-CD 11/CD18 monoclonal antibody therapy following subarachnoid hemorrhage in rabbits. J Neurosurg 2004;101(1): 88-92) o Park S, Yamaguchi M, y col., Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. Stroke 2004;35(10): 2412-7). La administración de ARN mejora la enfermedad.

Ejemplo 31

RESTAURACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL CABELLO POR EL SUMINISTRO DE ARNm MODIFICADO QUE CODIFICA UNA PROTEÍNA INMUNOSUPRESORA

Se suministra ARN modificado con pseudouridina o nucleósido que codifica una telomerasa o una proteína inmunosupresora (por ejemplo, α -MSH, TGF- β 1 o IGF-I a los folículos pilosos de los animales utilizados como modelos de pérdida de cabello o calvicie, y se evalúa su efecto sobre el crecimiento del cabello como se describe en Jiang J, Tsuboi R, y col., Topical application of ketoconazole stimulates hair growth in C3H/HeN mice. J Dermatol 2005;32(4): 243-7) o McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, y col., Transfer of CD8(+) cells induces localized hair loss whereas CD4(+)/CD25(-) cells promote systemic alopecia areata and CD4(+)/CD25(+) cells blockade disease onset in the C3H/HeJ mouse model. J Invest Dermatol 2005;124(5): 947-57). La administración del ARN restaura el crecimiento del cabello.

Ejemplo 32

SÍNTESIS DE UNA MOLÉCULA DE ARN TRANSCRITA *IN VITRO* CON UN ARNiP QUE CONTIENE NUCLEÓSIDOS ALTERADOS

Una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) que comprende pseudouridina o un nucleósido modificado y que comprende además un ARN de interferencia pequeño (ARNiP) o ARN de horquilla corta (ARNhc) se sintetiza por el siguiente procedimiento: Se sintetizan cadenas de ARN complementarias con la secuencia deseada que contiene uridina o 1 o más nucleósidos modificados por transcripción *in vitro* (por ejemplo, por ARN polimerasa de fago T7, SP6 o T3) como se describe en el Ejemplo 5. Las moléculas de ARNbc presentan inmunogenicidad reducida. En otros experimentos, la molécula de ARNbc se diseña para ser procesada por una enzima celular para producir el

ARNip o ARNhc. Debido a que las moléculas de ARNbc de varios cientos de nucleótidos se sintetizan fácilmente, cada ARNbc también puede diseñarse para que contenga varias moléculas de ARNip o ARNhc, para facilitar el suministro de múltiples ARNip o ARNhc a una sola célula diana.

Ejemplo 33

5 USO DE UNA MOLÉCULA DE ARN TRANSCRITA *IN VITRO* CON NUCLEÓSIDOS ALTERADOS PARA SUMINISTRAR ARNip

La molécula de ARNbc del ejemplo anterior se compleja con un reactivo de transfección (por ejemplo, un reactivo de transfección catiónico, un reactivo de transfección basado en lípidos, un reactivo de transfección basado en proteína, un reactivo de transfección basado en polietilenimina o fosfato de calcio) y se administra a una célula diana de interés. Las enzimas en o sobre la superficie de la célula diana degradan el ARNbc en la(s) molécula(s) deseada(s) de ARNip o de ARNhc. Este procedimiento silencia eficazmente la transcripción de 1 o más genes celulares que corresponden a la(s) secuencia(s) de ARNip o ARNhc.

Ejemplo 34

15 PRUEBA DEL EFECTO DE MODIFICACIONES ADICIONALES DE NUCLEÓSIDOS EN LA INMUNOGENICIDAD DEL ARN Y LA EFICACIA DE LA TRADUCCIÓN

Se introducen modificaciones de nucleósidos adicionales en ARN transcrito *in vitro*, usando los procedimientos descritos anteriormente en los Ejemplos 5 y 10 y se prueban sus efectos sobre la eficacia de traducción de inmunogenicidad como se describe en los Ejemplos 4-11 y 12-18, respectivamente. Se encuentra que ciertas modificaciones adicionales disminuyen la inmunogenicidad y potencian la traducción. Estas modificaciones son realizaciones adicionales de los procedimientos y composiciones de la presente invención.

Las modificaciones probadas incluyen, por ejemplo: m¹A; m²A; Am; ms²m⁶A; i⁶A; ms²i⁶A; 10⁶A; ms²i⁰6A; g⁶A; t⁶A; ms²t⁶A; m⁶t⁶A; hn⁶A; ms²hn⁶A; Ar(p); I; m¹I; m¹Im; m³C; Cm; S²C; ac⁴C; f⁵c; m⁵Cm; ac⁴Cm; k²c; m¹G; m²G; m⁷G; Gm; m²G; m²Gm; m²Gm; Gr(p); yW; o₂yW; OHyW; OHyW*; imG; mimG; Q; oQ; galQ; manQ; preQ₀; PreQ₁; G⁺; D; m⁵Um', m¹Ψ; Ψm; S⁴U; ·m⁵s²U', S²Um, 'acp³U·, ho⁵u., mo⁵U·; cmo⁵U·; mcmo⁵U; chm⁵U; mchm⁵U·; mcm⁵U; mcm⁵UM; mcm⁵s²U; nm⁵s²U; mnm⁵U; mnm⁵s²U; mnm⁵se²U; ncm⁵U; ncm⁵Um; cmnm⁵U; cmnm⁵Um; cmnm⁵s²U; m⁶₂A; Im; m⁴C; m⁴Cm; hm⁵C; m³U; m¹acp³Ψ; cm⁵U; m⁶Am; m⁶₂Am; m^{2,7}G; m^{2,2,7}G; m³Um; m⁵D; m³Ψ; f⁵Cm; m¹Gm; m¹Am; tm⁵U; tm⁵s²U; imG-14; imG2; y ac⁶A.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA LOS EJEMPLOS 35-38

Purificación de ARN por HPLC: El ARNm producido por transcripción de polimerasa de T7 se purificó por HPLC usando una matriz de columna de microesferas de copolímero de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) no porosa alquilada (2,1 μm) (columna de 21 mm X 100 mm) y un sistema tampón de acetato de trietilamonio (TEAA) con un gradiente de acetonitrilo. El tampón A contenía 0,1 M de TEAA y el tampón B contenía 0,1 M de TEAA y acetonitrilo al 25%. Las columnas se equilibraron con un 38% de tampón B en el tampón A, cargados con ARN, y a continuación se procesaron con un gradiente lineal al 55% de tampón B durante 30 minutos a 5 ml/minuto. Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico deseado. Los análisis de ARN se llevaron a cabo con la misma matriz de columna y sistema de tampón, pero usando una columna de 7,8 mm x 50 mm a 1,0 ml/min y una duración de gradiente de 25 minutos.

Aislamiento de ARN a partir de fracciones de columna: Las fracciones recolectadas se combinaron y, en primer lugar, se concentró su contenido de ARN utilizando unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana 30K (Millipore). El dispositivo de filtro se llenó con 15 ml de muestra y se centrifugó a 4.000x g durante 10 minutos (4 °C) en una centrifuga Thermo Scientific Sorvall ST16R utilizando un rotor de cubeta oscilante. En estas condiciones, puede eliminarse ~ 98% del volumen de disolvente. Cuando las fracciones recolectadas tenían un volumen de más de 15 ml, la unidad de filtro se reutilizó relleno con fracciones de columna adicionales y centrifugando de nuevo hasta que todo el ARN estaba en un tubo. Para eliminar la sal y el disolvente del ARN concentrado, se añadió agua libre de nucleasa (hasta 15 ml) y se centrifugó nuevamente el dispositivo de filtro. El procedimiento de "lavado" se repitió hasta que la concentración del acetonitrilo fue <0,001%. La muestra desalinizada y sin disolvente se eliminó del dispositivo de filtración y el ARN se recuperó por precipitación durante la noche a -20 °C en NaOAc (0,3 M, pH 5,5), isopropanol (1 volumen) y glucógeno (3 μl). El ARN precipitado se recolectó, se lavó dos veces con etanol al 75% enfriado con hielo y se reconstituyó en agua.

Transferencia puntual de ARNbc: Se transfirió ARN (25-100 ng) a una membrana de nitrocelulosa, se dejó secar, se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% en tampón TBS suplementado con Tween-20 al 0,05% (TBS-T), y se incubó con mAb J2 o K1 específico de ARNbc (English & Scientific Consulting) durante 60 minutos. Las membranas se lavaron 6 veces con TBS-T y a continuación se hicieron reaccionar con anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con HRP (Jackson Immunology). Después de lavar 6 veces, se detectó ARNbc con la adición del sustrato SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce) y la captura de imágenes durante 30 segundos a 2 minutos en un sistema de imagen digital Fujifilm LAS1000.

Generación de célula dendrítica: Se obtuvieron muestras por monocitoféresis de voluntarios normales través de un protocolo aprobado por IRB. Las CD humanas se produjeron tratando monocitos con GM-CSF (50 ng/ml) + IL-4 (100 ng/ml) (R&D Systems) en medio AIM V (Invitrogen) durante 7 días. En los días 3 y 6, se agregó un 50% de volumen de medio nuevo con citocinas.

- 5 Se generaron CD murinas aislando células mononucleares de médula ósea de ratones Balb/c y cultivando en medio RPMI + FBS al 10% suplementado con GM-CSF (20 ng/ml, Peprotech). En los días 3 y 6, se agregó un 50% de volumen de medio nuevo con GM-CSF. Las células no adherentes se usaron después de 7 días de cultivo.

- 10 **Complejación con Lipofectin de ARN:** Se añadió solución madre de tampón de fosfato en DMEM libre de suero para dar concentraciones finales de fosfato de potasio 20 mM y BSA 100 ng/ml, pH 6,4. Para 3 pocillos de una placa de 96 pocillos, se preparó ARN complejo con lipofectin en las siguientes proporciones: se añadieron 2,4 µl de lipofectin a 21,3 µl de medio DMEM libre de suero con tampón fosfato y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 0,75 µg de ARN en 9,9 µl de DMEM libre suero y la mezcla se incubó durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 116,4 ml de DMEM libre de suero para enrasar a un volumen final de 150 ml. La mezcla se agitó con vórtice.

- 15 **Complejación con TransIT de ARN:** Para cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se añadieron 0,25 µg de ARN a 17,3 µl of de DMEM libre de suero en hielo. Se añadió reactivo ARNm TransIT (0,3 ul) con agitación con vórtice seguido de 0,2 µl de reactivo de refuerzo de ARNm y se agitó con vórtice. Se añadió ARN complejo a los 5 minutos de la formación.

- 20 **Transfecciones celulares:** Para el ARN complejo con lipofectin, se añadieron 50 µl (0,25 µg de ARN/pocillo) directamente a las células, 5×10^5 por pocillo. Las células transfectadas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5%. La mezcla de lipofectina-ARN se eliminó y se reemplazó con 200 µl de medio que contenía suero precalentado. Para el ARN complejo con TransIT, se añadieron 17 µl de complejo a las células, 5×10^5 por pocillo, en 200 µl de medio que contenía suero. Las células se lisaron en medios de lisis específicos, de 3 a 24 horas después de la transfección y se midió la actividad luciferasa de luciérnaga o renilla con sustratos específicos en un luminómetro.

- 25 **Análisis de inmunogenicidad de ARN:** Se trataron CD (murinas y humanas) en placas de 96 pocillos (5×10^5 células/pocillo) con medio o lipofectin o ARN complejo con TransIT. Se recogió el sobrenadante después de 24 h y se sometió a análisis. Los niveles de IFN-α (TransIT suministrado por ARN) o TNF-α (Lipofectin suministrado por ARN) (Biosource International, Camarillo, CA) se midieron en los sobrenadantes por ELISA. Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado o cuadruplicado y se midieron por duplicado.

Ejemplo 35

- Este ejemplo examina la dependencia de la secuencia y tipo celular de la traducción de ARNm modificado con Ψ-, m5C y Ψ/m5C en relación con el ARN no modificado (U). El ARNm que codifica luciferasa de Luciérnaga o Renilla con las modificaciones indicadas se complejó con lipofectin y se suministró a células dendríticas murinas (A) y HEK293T (B). Las CD humanas se transfectaron con ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga o renilla con las modificaciones indicadas complejo con TransIT (C). Los datos demuestran que la modificación óptima varía según la secuencia del ARN y el tipo celular que lo traduce. También muestra que la potenciación provocada por la incorporación de nucleósidos modificados es sustancialmente mayor para células primarias en comparación con líneas celulares transformadas. Se midió la actividad enzimática en células lisadas utilizando sustratos específicos y la medida de luz producida en un luminómetro y se expresó como un aumento de veces en comparación con el ARN (U) no modificado.

Ejemplo 36

- Las reacciones de transcripción de polimerasa de fago utilizadas para la generación de ARNm dan como resultado grandes cantidades de ARN del tamaño correcto, pero también contiene contaminantes. Esto se visualiza por la aplicación de ARN a una columna de HPLC de fase inversa que separa el ARN en función del tamaño en condiciones de desnaturalización. Se aplicó ARN TEV-luciferasa-A51 modificado con Ψ a una columna de HPLC en tampón B al 38% y se sometió a un gradiente lineal de aumento de tampón B hasta el 55%. El perfil demostró contaminantes tanto más pequeños de lo esperado como más grandes de lo esperado. Estos resultados se muestran en la Figura 22.

Ejemplo 37

- La purificación por HPLC aumenta la traducción de todos los tipos de ARN modificados o no modificados, pero el ARNm modificado con Ψ es el que mejor se traduce. Los resultados se muestran en la Figura 23: (A) Se suministró ARNm que codifica EPO con las modificaciones indicadas y con o sin purificación por HPLC a CD murinas y los niveles de EPO en el sobrenadante se midieron 24 horas después. Mientras que el ARNm modificado con m5C/Ψ tenía el mayor nivel de traducción antes de la purificación por HPLC, el ARNm modificado con Ψ tuvo la mayor traducción después de la purificación por HPLC. (B) Las CD Humanas se transfectaron con ARNm que codifica renilla con las modificaciones indicadas con o sin purificación por HPLC. De manera similar a las CD murinas y

ARNm-EPO, después de la purificación por HPLC, el ARNm modificado con Ψ tenía el mayor nivel de traducción.

Ejemplo 38

El ARNm modificado con Ψ , m5C y Ψ /m5C tiene bajos niveles de inmunogenicidad que se reduce a los niveles de control con purificación por HPLC. Los resultados se muestran en la Figura 24: (A) Las CD Humanas se transfectoron con ARN complejoado con TransIT con las modificaciones indicadas con o sin purificación por HPLC. Los niveles de IFN- α se midieron después de 24 horas. La purificación por HPLC aumentó la inmunogenicidad de ARN no modificado, que es dependiente de la secuencia, ya que otros ARN no modificados tenían niveles similares o niveles reducidos de IFN- α . El ARN modificado con Ψ tenía niveles no medibles de IFN- α similares a los de las CD tratadas de control. (B) El ARN modificado con Ψ antes (-) y después de purificación por HPLC (P1 y P2) se analizó para ARNbc utilizando transferencia puntual con un anticuerpo monoclonal específico para ARNbc (J2). La purificación de ARN eliminó la contaminación por ARNbc. (C) El ARN modificado por Ψ que codifica factores iPS es inmunogénico, que se elimina por purificación del ARN por HPLC.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA LOS EJEMPLOS 39-41

Cultivo celular. Se cultivaron células de queratinocitos epidérmicos humanos neonatales (HEKn) en Medio EpiLife suplementado con suplemento de crecimiento para queratinocitos y Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen). Todas las células se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5%. Las células iPS humanas que se indujeron utilizando procedimientos descritos en el presente documento se transfirieron a una placa de 6 pocillos recubierta con matriz de matrigel cualificada para CSEh después de la transfección.

Construcciones de Vectores. En general lo mismo que los Ejemplos 1-3.

Producción de ARNm. En general lo mismo que los Ejemplos 1-3.

Purificación y Análisis de ARNm. En algunas realizaciones experimentales, el ARNm se purificó por HPLC, las fracciones de columna se recolectaron y las fracciones de ARNm se analizaron con respecto a su pureza e inmunogenicidad como se describe en "Materiales y Procedimientos para los Ejemplos 35-38" y/o como se describe y se muestra en las figuras 22-24. En algunas realizaciones experimentales preferidas, se usaron preparaciones de ARN purificado que comprenden o consisten en ARNm que codifican uno o más factores de reprogramación que presentaron poca o ninguna inmunogenicidad para los experimentos de reprogramación de células somáticas en células iPS.

Reprogramación de Queratinocitos Primarios. Las células HEKn se sembraron con 1×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos en medio EpiLife y se cultivaron durante la noche. Las células se transfectoron con cantidades equivalentes de ARNm de cada factor de reprogramación (KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2) o un subconjunto de los factores utilizando reactivos de transfección ARNm TransIT™ (MirusBio, Madison, WI). Se llevaron a cabo tres transfecciones, cada dos días, con cambios de medios cada día. El día después de la tercera transfección, se tripsinizaron las células y se sembraron en medio mTeSR1 (StemCell Technologies) en placas de 6 pocillos prerrecubiertas con matrigel. El medio de células mTeSR se cambió diariamente. Las células de se mantuvieron a 37 °C con CO₂ al 5%. Se cribaron las placas para cambios morfológicos utilizando un microscopio invertido.

Las células HEKn también se reprogramaron por una única transfección por electroporación con iguales cantidades de ARNm de cada factor de reprogramación. Las células se sembraron directamente en placas recubiertas con matrigel a una densidad de 1×10^5 células por placa de 6 pocillos o de $7,5 \times 10^5$ células por placa de 10 cm en medio mTeSR1 que se cambió diariamente.

Inmunofluorescencia. En general lo mismo que los Ejemplos 1-3

RT-PCR cuantitativa El ARN celular se transcribió de forma inversa utilizando procedimientos patrón y un cebador oligo d(T)₂₁ a partir de cantidades equivalentes de ARN celular. Se amplificaron tres mensajeros usando cebadores específicos de genes y PCR en tiempo real usando detección verde SYBR y normalización de GAPDH. Los niveles de expresión se determinaron en relación con el nivel de expresión en la línea celular HEKn original, y se representaron como cambios en el nivel umbral del ciclo (C_t).

Ejemplo 39

Este ejemplo describe el desarrollo de un protocolo para la generación de células iPS a partir de queratinocitos somáticos. Se transfectoron cantidades iguales (en peso) de ARNm de KLF4, c-MYC, OCT4 y SOX2 en células HEKn tres veces (una vez cada dos días) con Reactivo ARNm TransIT™. El medio se cambió diariamente. El día después de la tercera transfección, se sembraron las células en placas recubiertas con matrigel y se cultivaron en medio de células mTeSR1. A los 11 días después de la primera transfección, comenzó a aparecer la morfología celular reprogramada (Fig. 28).

Ejemplo 40

Este ejemplo describe la caracterización de células resultantes de la transfección de queratinocitos primarios con cantidades iguales de ARNm de KLF4, LIN28, c-MYC, NANOG, OCT4 y SOX2. Se sometieron a electroporación una vez millón de células HEK293T con 5 microgramos de cada ARNm y se sembraron en placas de 10 cm recubiertas con matrigel en medio celular mTeSR1. 15 días después de la transfección, las células se fijaron para análisis de inmunofluorescencia. Las colonias resultantes fueron positivas para los marcadores de iPS KLF4, LIN28, SSEA4, TRA-1-60 y NANOG (Fig. 29).

Ejemplo 41

Este ejemplo describe las diferencias de expresión entre queratinocitos primarios y queratinocitos reprogramados con cantidades iguales de ARNm de KLF4, c-MYC, OCT4 y SOX2. Se sometieron a electroporación una vez 7,5 x 10⁵ células HEK293T con 3 o 5 microgramos de cada ARNm y se sembraron en placas de 10 cm recubiertas con matrigel en medio mTeSR1. El medio se cambió diariamente. 13 días después de la transfección, se transfirieron las células a placas recién recubiertas con matrigel. 21 días después de la transfección, el ARN celular total se purificó a partir de células HEK293T sin transfectar y dos pocillos de células reprogramadas. Cantidades iguales de cada ARN celular se convirtieron en ADNc y se analizaron por qPCR. Se detectaron niveles aumentados de NANOG, CRIPTO y REX1 por qPCR usando cebadores específicos de mensaje (Fig. 30). Se ha mostrado que estos tres mensajeros están elevados en las células iPS (Aasen T y col. 2008. Nature Biotech 26: 1276). Ninguno de estos factores se introdujo en las células por transfección; por lo tanto, los cambios en la expresión se deben a la influencia de los factores de reprogramación que se introdujeron.

Ejemplo 42

Transdiferenciación de células con ARNm

Las células se pueden transdiferenciar utilizando preparaciones de ARNm purificado descritas en el presente documento, o los ARNm descritos en el presente documento, o las preparaciones de ARNm purificado que contienen ARNm modificados descritos en el presente documento. En este Ejemplo, se emplea una preparación de ARN purificado que contiene ARNm de OCT4 que tiene, al menos, una pseudouridina o una 5-metilcitidina. Tales ARNm de OCT4 purificados y modificados sustituyen a los vectores que codifican OCT4 en el protocolo descrito por Szabo y col. (Nature 468: 521-528, 2010) y en el protocolo descrito en Racilla y col. (Gene Therapy, 1-10, 2010). En un ejemplo de cada uno de estos procedimientos, la preparación de ARN purificado comprende o consiste en ARNm de OCT 4, en el que todos los nucleósidos de uridina se reemplazan por nucleósidos de pseudouridina. En un ejemplo de cada uno de estos procedimientos, la preparación de ARN purificado comprende o consiste en ARNm de OCT 4, en el que todos los nucleósidos de citidina se reemplazan por nucleósidos de 5-metilcitidina. En un ejemplo de cada uno de estos procedimientos, la preparación de ARN purificado comprende o consiste en ARNm de OCT 4, en el que todos los nucleósidos de uridina se reemplazan por nucleósidos de pseudouridina y todos los nucleósidos de citidina se reemplazan por nucleósidos de 5-metilcitidina. En ejemplos preferidos, el ARNm de OCT4 se purifica para estar libre de ARN contaminantes. La referencia Racilla y col. describe un sistema en el que los queratinocitos humanos se transdiferenciaron siendo redirigidos a una ruta de diferenciación alternativa. En particular, se empleó la transfección transitoria de queratinocitos de piel humana con el factor de transcripción OCT4. Después de 2 días, estas células transfectadas manifestaron expresión de genes embrionarios endógenos y mostraron una metilación genómica reducida. Se mostró que tales células se podían convertir en tipos de células neuronales y mesenquimales contráctiles.

La referencia Szabo y col. demostró la capacidad de generar células progenitoras y maduras del destino hematopoyético directamente a partir de fibroblastos dérmicos humanos sin establecer la pluripotencia. En particular, la expresión ectópica de factores de transcripción hematopoyéticos activados con OCT4, junto con el tratamiento específico de citocinas, permitió la generación de células que expresan el marcador de panleucocitos CD45. Estas células únicas derivadas de fibroblastos dieron lugar a linajes granulocíticos, monocíticos, megacariocíticos y eritroides y demostraron la capacidad de injerto *in vivo*.

Además del uso de OCT4, ambos protocolos también emplearon citocinas o factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante (TGF), PDGF-BB, factor de células madre (SCF) y ligando de tirosina quinasa 3 similar a FMS (Flt3L). Se podrían usar otros factores de crecimiento y citocinas, tales como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IL-3, IL-6, eritropoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGFII) y proteína morfogenética ósea 4 (BMP-4). Como tal, en ciertos ejemplos, Racilla y col. o Szabo y col. los protocolos se repiten con la sustitución del ARNm de OCT4 modificado (por ejemplo, modificado con pseudouridina y/o modificado con 5-metilcitidina), junto con el uso de los factores de crecimiento o citocinas citados anteriormente. En algunos ejemplos, se ponen en contacto las células con las citocinas y/o proteínas de factor de crecimiento que se usan. En otros ejemplos, las células se ponen en contacto con ARNm modificados (por ejemplo, ARNm modificados como se describe en la presente solicitud, por ejemplo, por ejemplo, modificado con pseudouridina y/o 5-metilcitidina) que codifica una o más de las citocinas y/o factores de crecimiento que se utilizan en el protocolo de transdiferenciación. A partir de esta descripción, quedará claro, que la presente divulgación incluye poner en contacto una célula animal o humana con una preparación de ARN purificado que comprende o consiste en ARNm que codifica un factor de reprogramación para transdiferenciar una célula que tiene un primer estado de diferenciación o fenotipo en una célula que tiene un segundo estado de diferenciación o

fenotipo.

Referencias

- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321: 699-702.
- 5 Banerjee AK. 1980. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* 44: 175-205.
- Chan EM, y col. 2009. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27: 1033-1037.
- Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277-280.
- 10 Edmonds M. 1990. Polyadenylate polymerases. *Methods Enzymol* 181: 161-170.
- Feng, R y col. 2008. PU.1 and C/EBPa/b convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105: 6057-6062.
- Gershon PD. 2000. (A)-tail of two polymerase structures. *Nat Struct Biol* 7: 819-821.
- 15 Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, Rodriguez Piza I, Izpisua Belmonte JC. 2009. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8918-8922.
- Graf T, Enver T. 2009. Forcing cells to change lineages. *Nature* 462: 587-594.
- Grudzien E, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. 2004. Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA* 10: 1479-1487.
- 20 Grudzien-Nogalska E, Jemielty J, Kowalska J, Darzynkiewicz E, Rhoads R. 2007. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *RNA* 13: 1745-1755.
- Higman MA, Bourgeois N, Niles EG. 1992. The vaccinia virus mRNA (guanine-N7-)-methyltransferase requires both subunits of the mRNA capping enzyme for activity. *J Biol Chem* 267: 16430-16437.
- Higman MA, Christen LA, Niles EG. 1994. The mRNA (guanine-7-)-methyltransferase domain of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. Expression in *Escherichia coli* and structural and kinetic comparison to the intact capping enzyme. *J Biol Chem* 269: 14974-14981.
- 25 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26: 1269-1275.
- Ieda, M y col. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142: 375-386.
- 30 Jemielity J, Fowler T, Zuberek J, Stepinski J, Lewdorowicz M, Niedzwiecka A, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. 2003. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties. *RNA* 9: 1108-1122.
- Kariko K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. 2008. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 16: 1833-1840.
- 35 Krieg PA, Melton DA. 1984. Functional messenger RNAs are produced by SP6 In vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 7057-7070.
- Lee G, y col. 2009. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461:402-406.
- 40 Mackie GA. 1988. Vectors for the synthesis of specific RNAs *in vitro*. *Biotechnology* 10: 253-267.
- Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. 2009. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 15768-15773.
- Martin SA, Paoletti E, Moss B. 1975. Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-)-methyltransferase from vaccinia virions. *J Biol Chem* 250: 9322-9329.
- 45 Myette JR, Niles EG. 1996. Domain structure of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. Expression in *Escherichia coli* of a subdomain possessing the RNA 5'-triphosphatase and guanylyltransferase activities and a kinetic comparison to the full-size enzyme. *J Biol Chem* 271: 11936-11944.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26: 101-106.
- 50 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949-953.
- Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. 2006. Amplification and analysis of cDNA generated from a single cell by 5'-RACE: application to isolation of antibody heavy and light chain variable gene sequences from single B cells. *Biotechniques* 40: 469-470, 472, 474 passim.
- 55 Peng ZH, Sharma V, Singleton SF, Gershon PD. 2002. Synthesis and application of a chain-terminating dinucleotide mRNA cap analog. *Org Lett* 4: 161-164.
- Racila D y col. 2010. Transient expression of OCT 4 IS sufficient to allow human keratinocytes to change their differentiation pathway. *Gene Therapy advance online publication*, (28 de octubre de 2010; doi:10.1038/gt.2010.148).
- 60 Shuman S. 1995. Capping enzyme in eukaryotic mRNA synthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50: 101-129.
- Shuman. 2001. Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 1-40.
- Shuman S, Surks M, Furneaux H, Hurwitz J. 1980. Purification and characterization of a GTP-pyrophosphate

exchange activity from vaccinia virions. Association of the GTP-pyrophosphate exchange activity with vaccinia mRNA guanylyltransferase. RNA (guanine-7-)methyltransferase complex (capping enzyme). J Biol Chem 255: 11588-11598.

Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science 322: 945-949.

Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. 2001. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. RNA 7: 1486-1495.

Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol 189: 113-130.

Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, Levadoux-Martin M, Bhatia M. 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. Nature. 468: 521-526.

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126: 663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131: 861-872.

Vierbuchen T y col. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature 463: 1035-1041.

Wang SP, Deng L, Ho CK, Shuman S. 1997. Phylogeny of mRNA capping enzymes. Proc Natl Acad Sci USA 94: 9573-9578.

Wilusz J, Shenk T. 1988. A 64 kd nuclear protein binds to RNA segments that include the AAUAAA polyadenylation motif. Cell 52: 221-228.

Woltjen K, y col. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature 458: 766-770.

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19: 971-974.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science 324: 797-801.

Yu J, y col. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318: 1917-1920.

Zhou H, y col. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell 4: 381-384.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los fideicomisarios de la Universidad de Pensilvania

<120> PREPARACIONES DE ARN QUE COMPRENDEN ARN MODIFICADO PURIFICADO PARA REPROGRAMAR CÉLULAS

<130> GADA001PEP03

<140> EP

<141> 07-12-2010

<150> EP 16 181 434.8

<151> 07-12-2010

<150> EP 10 836 557.8

<151> 07-12-2010

<150> US 61/267,312

<151> 07-12-2009

<150> US 11/990,646

<151> 27-03-2009

<150> PCT/US 2006/032372

<151> 21-08-2006

<150> US 60/710,164

<151> 23-08-2005

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1864

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

5

<400> 1

ggaauucuca acacaacaua uacaaaacaa acgaauucuca agcaaucaag cauucuiacuu	60
cuauugcagc aaauuaaauc auuucuuuuu aagcaaaagc aaauuucuga aaauuuucac	120
cauuuacgaa cgauagccau ggaagacgcc aaaaacauaa agaaaggccc ggcgccauuc	180
uauccucuag aggauggaac cgcuggagag caacugcaua aggcuaugaa gagauacgcc	240
cugguuccug gaacaauugc uuuuacagau gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg	300
gaauacuucg aaauguccgu ucgguuggca gaagcuanga aacgauaugg gcugaauaca	360
aaucacagaa ucgucguaug cagugaaaac ucucuucaau ucuuuaugcc gguguugggc	420
gcguuauuuu ucggaguugc aguugcgccc gcgaacgaca uuuauaauga acgugaauug	480
cucaacagua ugaacauuuc gcagccuacc guaguguuug uuuccaaaaa gggguugcaa	540
aaaauuuuga acgugcaaaa aaaauuacca auaauccaga aaauuuuuau cauggauucu	600

aaaacggauu accagggauu ucagucgaug uacacguucg ucacaucuca ucuaccuccc 660
 gguuuuaaug aaucagauuu uguaccagag uccuuugauc gugacaaaac aaungcacug 720
 auaaugaauu ccucuggauc uacuggguaa ccuaaggugug uggcccuucc gcuaagaacu 780
 gccugcguca gauucucgca ugccagagau ccuaauuuug gcaaucaaaau cauuccggau 840
 acugcgauuu uaaguguugu uccauuccau cacgguuuug gaauuuuac uacacucgga 900
 uauuugauau guggauuucg agucgucuaa auguauagau uugaagaaga gcuguuuuua 960
 cgaucuccuuc aggauuacaa aaucacaaag gcguugcuag uaccaacccu auuuucauuc 1020
 uucgccaaaa gcacucugau ugacaaauac gauuuaucau auuuacacga aaungcuucu 1080
 gggggcgcac cucuuucgaa agaagucggg gaagcggugug caaacgcuu ccaucuuca 1140
 gggauacgac aaggauaugg gcucacugag acuacaucag cuauucugau uacacccgag 1200
 ggggaugaua aaccggggcg gcugcguaaa guuguuccau uuuuugaagc gaagguugug 1260
 gaucuggaua ccgggaaaac gcugggcggu aaucagagag gcgaauuug ugucagagga 1320
 ccuaugauua uguccgguaa uguaaaacau ccggaagcga ccaacgccuu gauugacaag 1380
 gauggauggc uacauucugg agacauagcu uacugggacg aagacgaaca cuucuucaua 1440
 guugaccgcu ugaagucuuu aaauaaauac aaaggauauc agguuggccc cgcugaaug 1500
 gaucgauau uguuacaaca ccccaacauc uucgacgcgg gcguggcagg ucuucccgac 1560
 gaugacgccg gugaacuucc cggcgccguu guuguuuugg agcacggaaa gacgaugacg 1620
 gaaaaagaga ucguggauua cguggccagu caaguaacaa ccgcgaaaaa guugcgcgga 1680
 ggaguugugu uuguggacga aguaccgaaa ggucuuaccg gaaaacucga cgcaagaaaa 1740
 aucagagaga uccucauaaa ggccaagaag ggcggaaagu ccaauuugua aaauuaacu 1800
 cuagaggauu cccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860
 aaca 1864

<210> 2
 <211> 1571
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 2

ggcuagccac caugacuucg aaaguuuuug auccagaaca aaggaaacgg augauaacug 60
guccgcagug guggggccaga uguaaacaaa ugaauuguucu ugaaucauuu auuaauuauu 120
augauucaga aaaacaugca gaaaaugcug uuauuuuuuu acaugguaac gcggccucuu 180
cuuauuuuug gcgacauguu gugccacaua uugagccagu agcgcgguu auuauaccag 240
accuuauugg uaugggcaaa ucaggcaaa cuuguaaugg uucuuauagg uuacuugauc 300
auuacaaaua ucuuacugca ugguuuugaac uucuuauuu accaaagaag aucauuuuug 360
ucggccauga uuggggugcu uguuuggcau uucauuauag cuaugagcau caagauaaga 420
ucaaagcaau aguucacgcu gaaaguguag uagaugugau ugaaucaugg gaugauggc 480
cugauauuga agaagauauu gcguugauca aaucugaaga aggagaaaaa augguuuugg 540
agaauaacuu cuucguggaa accauguugc caucaaaaau caugagaaag uuagaaccag 600
aagaauuugc agcauaucuu gaaccuuca aagagaaagg ugaaguucgu cguccaacau 660
uaucauggcc ucgugaauc ccguuagaa aaggugguua accugacguu guacaaaauug 720
uuaggaauua uauugcuuau cuacgugcaa gugaugauuu accaaaaaug uuauuugaau 780
cggacccagg auucuuuucc aaugcuauug uugaaggugc caagaaguuu ccuaauacug 840
aaauugucua aguaaaaggu cuucauuuuu cgcaagaaga ugcaccugau gaaaugggaa 900
aaauauucua aucguucguu gagcgaguuc ucaaaaauga acaauugucg acggggggccc 960
cuaggaauuu uuuaaggaag aucugggccuu ccuacaaggg aaggccaggg aaauuucuuu 1020
agagcagacc agagccaaca gccccaccag aagagagcuu caggucuggg guagagacaa 1080
caacuccccc ucagaagcag gagccgauag acaaggaacu guauccuuu acuucccua 1140
gaucacucuu uggcaacgac ccucgucac aaauaagaua ggggggcaac uaaagggauc 1200
ggccgcuuuc agcagacaug auuagauaca uugaugaguu uggacaaacc acaacuagaa 1260
ugcagugaaa aaaaugcuuu auuugugaaa uuugugaugc uauugcuuuu uuuguaacca 1320
uuauaagcug caauaaacaa guuaacaaca acaauugcau ucauuuuuug uuucagguuc 1380
agggggaggu gugggagguu uuuaaaagca aguaaaaccu cuacaaaugu gguaaaaucg 1440
auaaguuuua acagauccag guggcacuuu ucgggggaa uugcgcgga ccccuauuug 1500
uuuauuuuuc uaaauacauu caauaugua uccgcucaug agacaauaac ccugauaaa 1560
gcuucaauaa u 1571

<210> 3
<211> 726
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Sintético

<400> 3

gggaauuugg cccucgaggc caagaauucg gcacgaggca cgcggccagc cagcagacag	60
aggacucuca uuaaggaagg uguccugugc ccugacccua caagaugcca agagaagaug	120
cucacuucan cuaugguuac cccaagaagg ggcacggcca cucuuacacc acggcugaag	180
aggccgcugg gaucgggauc cugacaguga uccugggagu cuuacugcuc aucggcuguu	240
ggauuuguag aagacgaaau ggauacagag ccuugaugga uaaaagucuu cauguuggca	300
cucaaugugc cuuaacaaga agauggccac aagaagggguu ugaucaucgg gacagcaaag	360
ugucucuuca agagaaaaac ugugaaccug ugguucccaa ugcuccaccu gcuaaugaga	420
aacucucugc agaacaguca ccaccaccuu auucaccuua agagccagcg agacaccuga	480
gacaugcuga aauuauuucu cucacacuuu ugcuugaaau uaauacagac aucuaauguu	540
cuccuuugga augguguagg aaaaaugcaa gccaucucua auaauaaguc aguguuaaaa	600
uuuuaguagg uccgcuagca guacuaauca ugugaggaaa ugaugagaaa uauuaaaug	660
ggaaaacucc aucaauaaau guugcaaugc augauaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacugcg	720
gccgca	726

5

<210> 4

<211> 712

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 4

gggaauaagc uugcgggccgc aguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuaucaugca uugcaacaau 60
uauugaugga guuuucccaa uuuauauuuu cucaucauuu ccucacauga uuaguacugc 120
uagcggaccu acuaaaauuu uaacacugac uuauuuuag agauggcuug cauuuuuccu 180
acaccuucc aaaggagaac auuagauguc uguauaaaau caagcaaaag ugugagagaa 240
auaauuucag caugucucag gugucucgcu ggcucuuuag gugaauaagg ugguggugac 300
uguucugcag agaguuuucuc auuagcaggu ggagcauugg gaaccacagg uucacaguuu 360
uucucuugaa gagacacuuu gcugucccga uguaucaaacc cuucuuuggg gcaucuuuuu 420
guuaaggcac auugagugcc aacaugaaga cuuuuaucca ucaaggcucu guauccauuu 480
cgucuuucac aaauaccaaca gccgaugagc aguaagacuc ccaggaucau ugucaggau 540
ccgaucccag cggccucuuu agccgugggug uaagagugggc cgugcccccuu cuugggguaa 600
ccauagauga agugagcauc uucucuuggc aucuuuguagg gucagggcac aggacaccuu 660
ccuaaugag aguccucugu cugcuggcug gccgcgugcc ucgugccgaa uu 712

<210> 5
<211> 494
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 5

gggagaccca agcuggcuag cagucaucca acagaaucau gagacagacu uugccuugua 60

ucuacuuuug ggggggcccuu uugcccuuug ggauugcugug ugcauccucc accaccaagu 120
gcacuguuag ccaugaaguu gcugacugca gccaccugaa guugacucag guacccgaug 180
aucuaccac aaacauaaca guguuugaacc uuacccauaa ucaacucaga agauuaccag 240
ccgccaacuu cacaagguaa agccagcuua cuagcuugga uguaggauuu aacaccaucu 300
caaaacugga gccagaauug ugccagaaac uucccauguu aaaaguuuug aaccuccagc 360
acaugagcu aucucaacu ucugauaaaa ccuuugccuu cugcacgaau uugacugaac 420
uccaucucau guccaacuca auccagaaaa uuaaaaauaa ucccuuuguc aagcagaaga 480
auuuauacac auua 494

<210> 6
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

	<400> 6 uggauccggc uuugagau cu	21
5	<210> 7 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
10	<220> <221> modified_base <222> (11)..(11) <223> um	
15	<400> 7 uggauccggc uuugagau cu	21
20	<210> 8 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
25	<220> <221> modified_base <222> (6)..(6) <223> m5c	
30	<400> 8 uggauccggc uuugagau cu	21
35	<210> 9 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
40	<220> <221> modified_base <222> (12)..(12) <223> p	
45	<400> 9 uggauccggc uuugagau cu	21
50	<210> 10 <211> 31 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
	<400> 10 gggagacagg gguguccgcc auuuccaggu u	31
	<210> 11 <211> 31 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	

<400> 11
gggagacagg cuauaacuca cauaauguau u 31

<210> 12
<211> 1440
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

augagggcagc caccugggcga gucugacaug gcugucagcg acgcgcugcu cccaucuuuc	60
uccacguucg cgucugggccc ggcggggaagg gagaagacac ugcgucaagc agguugccccg	120
aauaaccgcu ggcgggagga gcucucccac augaagcgac uccccccagu gcuucccggc	180
cgccccuauug accugggcggc ggcgaccgug gccacagacc uggagagcgcg cggagccggu	240
gcggcuucg gcgguagcaa ccuggcgccc cuaccucgga gagagaccga ggaguucaac	300
gaucuccugg accuggacuu uauucucucc aaauccguga cccaucucc ggagucagug	360
gcggccacog uguccucguc agcgucagcc uccucuuugu cgucgcccug gagcagcggc	420
ccugccagcg cgccuccac cugcagcuuc accuaucgga uccggggccgg gaacgacccg	480
ggcguggcgc cggggcgac ggcgggaggc cuccucuaug gcaggagug cgccccccu	540
ccgacggcuc ccuuaaccu ggcgggacau aacgacguga gcccucggg cggcuucgug	600
gccgagcucc ugcggccaga auuggacccg guguaauuc cgccgcagca gccgcagccg	660
ccagguggcg ggcugauggg caaguucgug cugaaggcgu cgcugagcgc ccugggcagc	720
gaguacggca gcccgucggu caucagcguc agcaaaggca gccugacgg cagccacccg	780
gugguggugg cgccuacaa cggcgggccg ccgcgcacgu gcccgaagau caagcaggag	840
gcggucucuu cgugcaccca cuugggcgcu ggacccccuc ucagcaaug ccaccggccg	900
gcugcacacg acuuccccu ggggcggcag cccccagca ggacuacccc gaccuggggu	960
cuugaggaag ugcugagcag cagggacugu caccugccc ugccgcucc ucccggcuuc	1020
cauccccacc cggggcccaa uuaccuacc uuccugccc aucagaugca gccgcaaguc	1080
ccgcgcucc auuaccaaga gcucaugcca cccgguuccu gcaugccaga ggagcccaag	1140
ccaaagaggg gaagacgauc guggccccg aaaaggaccg ccaccacac uuugauuac	1200
gcgggcugcg gcaaaaccua cacaaagagu ucccaucuca aggcacaccu gcgaaccac	1260
acaggugaga aaccuuacca cugugacugg gacggcugug gauggaaaau cggccgcuca	1320
gaugaacuga ccaggcacua ccguaaaacac acggggcacc gcccgucca gugccaaaaa	1380
ugcgaccgag cauuuuccag gucggaccac cucgccuuac acaugaagag gcauuuuuaa	1440

<210> 13
<211> 529
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

augggcuccg uguccaacca gcaguuugca gguggcugcg ccaaggcggc agaagaggcg	60
cccgaggagg cgccggagga cgcgccccgg gcggcgagcg agccucagcu gcugcacggg	120
gcgggcaucu guaagugguu caacgugcgc augggguucg gcuuccuguc caugaccgcc	180
cgcgccgggg ucgcgcucga cccccagug gaugucuuug ugcaccagag uaagcugcac	240
auggaagggu uccggagcuu gaaggagggu gaggcagugg aguucaccuu uaagaaguca	300
gccaaggggc uggaauccau ccgugucacc ggaccuggug gaguauucug uauugggagu	360
gagaggcggc caaaaggaaa gagcaugcag aagcgcagau caaaaggaga caggugcuac	420
aacuguggag gucuagauca ucaugccaag gaaugcaagc ugccacccca gcccaagaag	480
ugccacuucu gccagagcau cagccauaug guagccucau guccgcuga	529

5

<210> 14

<211> 1365

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 14

auggauuuuu uucggguagu ggaaaaccag cagccucccg cgacgaugcc ccucaacguu	60
agcuucacca acaggaacua ugaccucgac uacgacucgg ugcagccgua uuucucucgc	120
gacgaggagg agaacuucua ccagcagcag cagcagagcg agcugcagcc cccggcgccc	180
agcagaggaua ucuggaagaa auucgagcug cugcccaccc cgccccuguc cccuagccgc	240
cgcuccgggc ucugcucgcc cuccuacguu gcggucacac ccuucucccu ucggggagac	300
aacgacggcg guggcgggag cuucuccacg gccgaccagc uggagauggu gaccgagcug	360
cugggaggag acauggugaa ccagaguuuu aucugcgacc cggacgacga gaccuucauc	420
aaaaacauca ucauccagga cuguaugugg agcggcuucu cgcccgccgc caagcucguc	480
ucagagaagc uggccuccua ccaggcugcg cgcaaagaca gcggcagccc gaacccccgc	540
cgcggccaca gcgucugcuc caccuccagc uuguaccugc aggaucugag cgccgcccgc	600
ucagagugca ucgaccccuc gguggucuuc cccuaccuc ucaacgacag cagcucgccc	660
aaguccugcg ccucgcaaga cuccagcgcc uucucuccgu ccucggauuc ucugcucucc	720
ucgacggagu ccuccccgca gggcagcccc gagccccugg ugcuccauga ggagacaccg	780
cccaccacca gcagcgacuc ugaggaggaa caagaagaug aggaagaaau cgauguuguu	840
ucuguggaaa agaggcaggc uccuggcaaa agguacagagu cuggaucacc uucugcugga	900
ggccacagca aaccuccuca cagcccacug guccucaaga ggugccacgu cuccacacau	960
cagcacaacu acgcagcgcc ucccuccacu cggaaggacu auccugcugc caagaggguc	1020
aaguuggaca gugucagagu ccugagacag aucagcaaca accgaaaug caccagcccc	1080
agguccucgg acaccgagga gaaugucaag aggcgaacac acaacgucuu ggagcgccag	1140
aggaggaacg agcuaaaacg gagcuuuuuu gccucgugug accagaucuu ggaguuggaa	1200
aacaugaaa agggccccaa gguaguuauc cuuaaaaaag ccacagcaua cauccugucc	1260
guccaagcag aggagcaaaa gcucauuucu gaagaggacu uguugcggaa acgacgagaa	1320
caguugaaac acaaacuuga acagcuacgg aacucuuugug cguaa	1365

<210> 15
 <211> 918
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15

augagugugg auccagcuug ucccacaaagc uugccuugcu uugaagcauc cgacuguaaa	60
gaauucucac cuaugccugu gauuuguggg ccugaagaaa acuauccauc cuugcaaaug	120
ucuucugcug agaugccuca cacagagacu gucucuccuc uuccuuccuc cauggaucug	180
cuuauucagg acagcccuga uucuuaccac agucccaaaag gcaaacaacc cacuucugca	240
gagaauagug ugcacaaaaa ggaagacaag gucccguca agaaacagaa gaccagaacu	300
guguucucuu ccaccagcu guguguacuc aaugauagau uucagagaca gaaauaccuc	360
agccuccagc agaugcaaga acucuccaac auccugaacc ucagcuacaa acaggugaag	420
accugguucc agaaccagag aaugaaucuu aagagguggc agaaaaacaa cuggccgaag	480
aaugcaaug gugugacgca gaaggccuca gcaccuaccu accccagccu cuacucuucc	540
uaccaccagg gaugccuggu gaaccgcacu gggaaaccuuc caauguggag caaccagacc	600
uggaacaauu caaccuggag caaccagacc cagaacauc aguccuggag caaccacucc	660
uggaacacuc agaccuggug caccacauc uggaacauc aggccuggaa cagucccuuc	720
uaaauucugug gagaggaauc ucugcagucc ugcaugcacu uccagccaaa uucuccugcc	780
agugacuugg aggcugccuu ggaagcugcu ggggaaggcc uuaauguaau acagcagacc	840
acuagguaau uuaguacucc acaaaccaug gauuuauucc uaaacuacuc caugaacug	900
caaccugaag acguguga	918

<210> 16
 <211> 1083
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

5

auggcgggac accuggcuuc agauuuugcc uucucgcccc cuccaggugg ugagaggugau	60
gggccagggg ggccggagcc gggcuggguu gauccucgga ccuggcuaag cuuccaaggc	120
ccuccuggag ggccaggaa cgggcccggg guugggcccag gcucugaggu gugggggguu	180
cccccaugcc ccccgccgua ugaguucugu gggggggaugg cguacugugg gccccagggu	240
ggaguggggc uagugcccca aggcggcuug gagaccucuc agccugaggg cgaagcagga	300
gucggggugg agagcaacuc cgauggggccc uccccggagc ccugcaccgu caccuccgu	360
gccgugaagc uggagaagga gaagcuggag caaaacccgg aggaguccca ggacaucaaa	420
gcucugcaga aagaacucga gcaauuugcc aagcuccuga agcagaagag gaucacccug	480
ggauauacac aggccgaugu ggggcucacc cuggggguuc uauuugggaa gguauucagc	540
caaacgacca ucugccgcuu ugaggcucug cagcuuagcu ucaagaacau guguaagcug	600
cggcccuugc ugcagaagug gguggaggaa gcugacaaca augaaaau cuu caggagaua	660
ugcaaagcag aaaccucgu gcaggcccga aagagaaagc gaaccaguau cgagaaccga	720
gugagaggca accuggagaa uuuguuccug cagugcccga aaccacacu gcagcagauc	780
agccacaucg cccagcagcu ugggcucgag aaggauuggg uccgagugug guucuguaac	840
cggcgccaga agggcaagcg aucaagcagc gacuaugcac aacgagagga uuugaggcu	900
gcugggucuc cuuucucagg gggaccagug uccuuuccuc ugccccagg gccccauuuu	960
gguaccccag gcuaugggag ccucacauuc acugcacugu acuccucggu cccuuuccu	1020
gagggggaag ccuuuuuuuu ugucucuguc accacucugg gcucucccau gcauucaaac	1080
uga	1083

<210> 17
 <211> 954
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17

ES 2 769 129 T3

auguacaaca ugauggagac ggagcugaag ccgccggggcc cgcagcaaac uucggggggc	60
ggcggcggca acuccaccgc ggcggcggcc ggcggcaacc agaaaaacag cccggaccgc	120
gucaagcggc ccaugaaugc cuucauggug uggucccgcg ggcagcggcg caagauggcc	180
caggagaacc ccaagaugca caacucggag aucagcaagc gccuggggcg cgaguggaaa	240
cuuuugucgg agacggagaa ggcggccguuc aucgacgagg cuaagcggcu gcgagcgcu	300
cacaugaagg agcacccgga uuauaaauac cggccccggc ggaaaaccaa gacgcucaug	360
aagaaggaua aguacacgu gcccggcggg cugcuggccc cggcgggcaa uagcauggcg	420
agcggggucg ggguggggcg cggccugggc gggggcguga accagcgcau ggacaguuac	480
gcgcacauga acggcuggag caacggcagc uacagcauga ugcaggacca gcugggcuac	540
ccgcagcacc cgggccucaa ugcgcacggc gcagcgcaga ugcagcccau gcaccgcua	600
gacgugagcg ccugcgagua caacuccaug accagcucgc agaccuacau gaacggcucg	660
cccaccuaca gcauguccua cucgcagcag ggcacccug gcauggcucu uggcuccaug	720
gguucggugg ucaaguccga ggccagcucc agccccccug ugguuaccuc uuccuccac	780
uccagggcg cugccaggc cggggaccuc cgggacauga ucagcaugua ucuccccgc	840
gccgaggugc cggaaccgc cggcccgagc agacuucaca ugucccagca cuaccagagc	900
ggcccgugc cggcacggc cauaaacggc acacugcccc ucucacacau guga	954

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento no terapéutico o *in vitro* de inducción de una célula de mamífero para producir una proteína recombinante, comprendiendo el procedimiento poner en contacto repetidas veces dicha célula de mamífero con ARNm sintetizado *in vitro* que comprende un marco de lectura abierto que codifica dicha proteína recombinante;

5 en el que el ARNm sintetizado *in vitro* comprende Ψ o $m^1\Psi$ (1-metilpseudouridina); y
 en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro* se purifica utilizando un procedimiento que elimina moléculas contaminantes de ARN que son inmunogénicas y tóxicas para la célula por inducción de una respuesta inmunitaria innata, como se determina midiendo la secreción reducida de citocinas IFN- α o TNF- α a partir de células dendríticas transfectadas con dichas moléculas de ARNm sintetizadas *in vitro* purificadas en comparación
 10 con la secreción de dichas citocinas a partir de células dendríticas transfectadas con ARNm sintetizado *in vitro* no purificado.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que menos del 0,01 % del ARN total en dicho ARNm sintetizado *in vitro* consiste en moléculas contaminantes de ARN bicatenario.

3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el resultado de dicho procedimiento
 15 de purificación es que dicho ARNm sintetizado *in vitro* puede administrarse repetidas veces sin inducir una respuesta inmunitaria suficiente para eliminar la expresión detectable de la proteína recombinante o que dicho ARNm sintetizado *in vitro* carece de inmunogenicidad, lo que permite el suministro repetido sin generación de citocinas inflamatorias.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro*
 20 comprende:

- A. una cola de poli-A;
- B. una caperuza 5' o un potenciador de traducción independiente de caperuza;
- C. el nucleósido modificado 5-metilcitidina (m^5C) en lugar de citidina.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho procedimiento de purificación
 25 comprende:

- A. purificación de dicho ARNm sintetizado *in vitro* utilizando una purificación por HPLC o por columna de flujo por gravedad; y/o
- B. tratar dicho ARNm sintetizado *in vitro* con una enzima ribonucleasa III (RNasa III) de modo que se generen
 30 productos de digestión por RNasa y purificar dichos productos de digestión por RNasa III cortos por separado de dicho ARNm.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha proteína codificada por dicho ARNm sintetizado *in vitro* se selecciona del grupo que consiste en: eritropoyetina (EPO); una enzima detectable seleccionada de luciferasa de luciérnaga, luciferasa de *Renilla*, beta-galactosidasa bacteriana (lacZ) y proteína verde fluorescente (GFP); un factor de transcripción seleccionado de MYC y SRY o MCOP; un factor de crecimiento o
 35 citocina seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante betal (TGF-beta1), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), hormona estimulante de melanocitos alfa (alfa-MSH); factor de crecimiento de tipo de insulina I (IGF-I); IL-4; IL-13; e IL-10; óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); una proteína de choque término; regulador de la conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR); una enzima con actividad antioxidante seleccionada de entre catalasa, fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa-1 y superóxido dismutasa-2;
 40 tirosina cinasa de Bruton; adenosina desaminasa; ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa; ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPTO; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1;
 45 SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHRH; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CM- CWTB; CNGA3; COL3A1; COLAA3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LCT; LHCGR; LSFC; MSH2; MSH6; NEB; NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1; SOS1;
 50 SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFH1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLCLC; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG;

ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXP1; PCCB;
 POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFB2;
 THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP;
 5 AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG; ENAM; ETFDH; EVG; F11; FABP2;
 FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYP A; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF;
 JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2; PKD2; QDPR; SGCB;
 SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3B1; APC;
 ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1; DTR; EOS; EPD; ERVR;
 10 F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMDLA; LOX; LTC4S; MAN2A1; MCC;
 MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFB1; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2;
 SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFB1; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB;
 BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1;
 FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1;
 IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3;
 15 ODD; OFCO; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PPAC;
 PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2;
 TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1; ASL; ASNS; AUTS1;
 BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36; CFTR; CHORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS;
 CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9;
 20 HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMBI; LEP; MET; NCF1; NM; OGDH; OPN1SW; PEX1; PGAM2;
 PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH; SLC26A3;
 SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANK1; CA1; CA2; CCAL1; CLN8; CMT4A;
 CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS; DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1;
 FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL; MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1;
 25 PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN;
 ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5;
 CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA;
 GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H; LMX1B;
 MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP A; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR2; RPD1;
 30 SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1; CUBN; CXCL12;
 CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2;
 MKI67; MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP; PTEN; RBP4; RDPA; RET;
 SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC;
 APOAL; APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G; CD59; CDKNLC; CLN2; CNTF;
 35 CPT1A; CTCSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2;
 GIF; HBB; HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS;
 KCNJ11; KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1;
 PGL2; PGR; PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD;
 SERPING1; SMPD1; TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C; VMD2; VRNI; WT1; WT2;
 40 ZNF145; A2M; AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; CIR; CD4;
 CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2;
 HMN2; HPD; IGF1; KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB;
 LY2; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PKBK; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2;
 SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TPI1; TSC3; ULR; VDR; WWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1;
 45 CLN5; CPB2; ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RB1;
 RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5;
 EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@; IGHG group; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C;
 MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7;
 SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USHLA; VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM;
 50 CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1;
 FES; HCVS; HEXA; IVD; LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLBP1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A;
 WMS; ABCC6; ALDOA; APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH;
 CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASE1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN; HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1;
 HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS;
 55 PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE;
 ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1; CHRNE; CMT1A;
 COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2; GP1BA; GPSC; GUCY2D;
 ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3; KRT16; KRT16L1;
 KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT; MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO; MYO15A; NAGLU; NAPB; NF1; NME1;
 60 P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH;
 RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR;
 SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2;
 CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCF2; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1;
 SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A; CCO;
 65 CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB; EXT3;
 EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1; HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR; JAK3;

KLK3; LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1; NAGA; NE2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1; SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS; BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM; CHR39c; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDXY; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MID1; MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX21; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NROB1; NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW; OPN1MW; OTC; P3; PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA; PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS; SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIM1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS; WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ; GCY; RPS4Y; SMCY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCO1; MTCO3; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTPP; MTTT1; MTTT2; MTTT3; MTTT4; MTTT5; MTTT6; MTTT7; MTTT8; MTTT9; MTTT10; MTTT11; MTTT12; MTTT13; MTTT14; MTTT15; MTTT16; MTTT17; MTTT18; MTTT19; MTTT20; MTTT21; MTTT22; MTTT23; MTTT24; MTTT25; MTTT26; MTTT27; MTTT28; MTTT29; MTTT30; MTTT31; MTTT32; MTTT33; MTTT34; MTTT35; MTTT36; MTTT37; MTTT38; MTTT39; MTTT40; MTTT41; MTTT42; MTTT43; MTTT44; MTTT45; MTTT46; MTTT47; MTTT48; MTTT49; MTTT50; MTTT51; MTTT52; MTTT53; MTTT54; MTTT55; MTTT56; MTTT57; MTTT58; MTTT59; MTTT60; MTTT61; MTTT62; MTTT63; MTTT64; MTTT65; MTTT66; MTTT67; MTTT68; MTTT69; MTTT70; MTTT71; MTTT72; MTTT73; MTTT74; MTTT75; MTTT76; MTTT77; MTTT78; MTTT79; MTTT80; MTTT81; MTTT82; MTTT83; MTTT84; MTTT85; MTTT86; MTTT87; MTTT88; MTTT89; MTTT90; MTTT91; MTTT92; MTTT93; MTTT94; MTTT95; MTTT96; MTTT97; MTTT98; MTTT99; MTTT100; MTTT101; MTTT102; MTTT103; MTTT104; MTTT105; MTTT106; MTTT107; MTTT108; MTTT109; MTTT110; MTTT111; MTTT112; MTTT113; MTTT114; MTTT115; MTTT116; MTTT117; MTTT118; MTTT119; MTTT120; MTTT121; MTTT122; MTTT123; MTTT124; MTTT125; MTTT126; MTTT127; MTTT128; MTTT129; MTTT130; MTTT131; MTTT132; MTTT133; MTTT134; MTTT135; MTTT136; MTTT137; MTTT138; MTTT139; MTTT140; MTTT141; MTTT142; MTTT143; MTTT144; MTTT145; MTTT146; MTTT147; MTTT148; MTTT149; MTTT150; MTTT151; MTTT152; MTTT153; MTTT154; MTTT155; MTTT156; MTTT157; MTTT158; MTTT159; MTTT160; MTTT161; MTTT162; MTTT163; MTTT164; MTTT165; MTTT166; MTTT167; MTTT168; MTTT169; MTTT170; MTTT171; MTTT172; MTTT173; MTTT174; MTTT175; MTTT176; MTTT177; MTTT178; MTTT179; MTTT180; MTTT181; MTTT182; MTTT183; MTTT184; MTTT185; MTTT186; MTTT187; MTTT188; MTTT189; MTTT190; MTTT191; MTTT192; MTTT193; MTTT194; MTTT195; MTTT196; MTTT197; MTTT198; MTTT199; MTTT200; MTTT201; MTTT202; MTTT203; MTTT204; MTTT205; MTTT206; MTTT207; MTTT208; MTTT209; MTTT210; MTTT211; MTTT212; MTTT213; MTTT214; MTTT215; MTTT216; MTTT217; MTTT218; MTTT219; MTTT220; MTTT221; MTTT222; MTTT223; MTTT224; MTTT225; MTTT226; MTTT227; MTTT228; MTTT229; MTTT230; MTTT231; MTTT232; MTTT233; MTTT234; MTTT235; MTTT236; MTTT237; MTTT238; MTTT239; MTTT240; MTTT241; MTTT242; MTTT243; MTTT244; MTTT245; MTTT246; MTTT247; MTTT248; MTTT249; MTTT250; MTTT251; MTTT252; MTTT253; MTTT254; MTTT255; MTTT256; MTTT257; MTTT258; MTTT259; MTTT260; MTTT261; MTTT262; MTTT263; MTTT264; MTTT265; MTTT266; MTTT267; MTTT268; MTTT269; MTTT270; MTTT271; MTTT272; MTTT273; MTTT274; MTTT275; MTTT276; MTTT277; MTTT278; MTTT279; MTTT280; MTTT281; MTTT282; MTTT283; MTTT284; MTTT285; MTTT286; MTTT287; MTTT288; MTTT289; MTTT290; MTTT291; MTTT292; MTTT293; MTTT294; MTTT295; MTTT296; MTTT297; MTTT298; MTTT299; MTTT300; MTTT301; MTTT302; MTTT303; MTTT304; MTTT305; MTTT306; MTTT307; MTTT308; MTTT309; MTTT310; MTTT311; MTTT312; MTTT313; MTTT314; MTTT315; MTTT316; MTTT317; MTTT318; MTTT319; MTTT320; MTTT321; MTTT322; MTTT323; MTTT324; MTTT325; MTTT326; MTTT327; MTTT328; MTTT329; MTTT330; MTTT331; MTTT332; MTTT333; MTTT334; MTTT335; MTTT336; MTTT337; MTTT338; MTTT339; MTTT340; MTTT341; MTTT342; MTTT343; MTTT344; MTTT345; MTTT346; MTTT347; MTTT348; MTTT349; MTTT350; MTTT351; MTTT352; MTTT353; MTTT354; MTTT355; MTTT356; MTTT357; MTTT358; MTTT359; MTTT360; MTTT361; MTTT362; MTTT363; MTTT364; MTTT365; MTTT366; MTTT367; MTTT368; MTTT369; MTTT370; MTTT371; MTTT372; MTTT373; MTTT374; MTTT375; MTTT376; MTTT377; MTTT378; MTTT379; MTTT380; MTTT381; MTTT382; MTTT383; MTTT384; MTTT385; MTTT386; MTTT387; MTTT388; MTTT389; MTTT390; MTTT391; MTTT392; MTTT393; MTTT394; MTTT395; MTTT396; MTTT397; MTTT398; MTTT399; MTTT400; MTTT401; MTTT402; MTTT403; MTTT404; MTTT405; MTTT406; MTTT407; MTTT408; MTTT409; MTTT410; MTTT411; MTTT412; MTTT413; MTTT414; MTTT415; MTTT416; MTTT417; MTTT418; MTTT419; MTTT420; MTTT421; MTTT422; MTTT423; MTTT424; MTTT425; MTTT426; MTTT427; MTTT428; MTTT429; MTTT430; MTTT431; MTTT432; MTTT433; MTTT434; MTTT435; MTTT436; MTTT437; MTTT438; MTTT439; MTTT440; MTTT441; MTTT442; MTTT443; MTTT444; MTTT445; MTTT446; MTTT447; MTTT448; MTTT449; MTTT450; MTTT451; MTTT452; MTTT453; MTTT454; MTTT455; MTTT456; MTTT457; MTTT458; MTTT459; MTTT460; MTTT461; MTTT462; MTTT463; MTTT464; MTTT465; MTTT466; MTTT467; MTTT468; MTTT469; MTTT470; MTTT471; MTTT472; MTTT473; MTTT474; MTTT475; MTTT476; MTTT477; MTTT478; MTTT479; MTTT480; MTTT481; MTTT482; MTTT483; MTTT484; MTTT485; MTTT486; MTTT487; MTTT488; MTTT489; MTTT490; MTTT491; MTTT492; MTTT493; MTTT494; MTTT495; MTTT496; MTTT497; MTTT498; MTTT499; MTTT500; MTTT501; MTTT502; MTTT503; MTTT504; MTTT505; MTTT506; MTTT507; MTTT508; MTTT509; MTTT510; MTTT511; MTTT512; MTTT513; MTTT514; MTTT515; MTTT516; MTTT517; MTTT518; MTTT519; MTTT520; MTTT521; MTTT522; MTTT523; MTTT524; MTTT525; MTTT526; MTTT527; MTTT528; MTTT529; MTTT530; MTTT531; MTTT532; MTTT533; MTTT534; MTTT535; MTTT536; MTTT537; MTTT538; MTTT539; MTTT540; MTTT541; MTTT542; MTTT543; MTTT544; MTTT545; MTTT546; MTTT547; MTTT548; MTTT549; MTTT550; MTTT551; MTTT552; MTTT553; MTTT554; MTTT555; MTTT556; MTTT557; MTTT558; MTTT559; MTTT560; MTTT561; MTTT562; MTTT563; MTTT564; MTTT565; MTTT566; MTTT567; MTTT568; MTTT569; MTTT570; MTTT571; MTTT572; MTTT573; MTTT574; MTTT575; MTTT576; MTTT577; MTTT578; MTTT579; MTTT580; MTTT581; MTTT582; MTTT583; MTTT584; MTTT585; MTTT586; MTTT587; MTTT588; MTTT589; MTTT590; MTTT591; MTTT592; MTTT593; MTTT594; MTTT595; MTTT596; MTTT597; MTTT598; MTTT599; MTTT600; MTTT601; MTTT602; MTTT603; MTTT604; MTTT605; MTTT606; MTTT607; MTTT608; MTTT609; MTTT610; MTTT611; MTTT612; MTTT613; MTTT614; MTTT615; MTTT616; MTTT617; MTTT618; MTTT619; MTTT620; MTTT621; MTTT622; MTTT623; MTTT624; MTTT625; MTTT626; MTTT627; MTTT628; MTTT629; MTTT630; MTTT631; MTTT632; MTTT633; MTTT634; MTTT635; MTTT636; MTTT637; MTTT638; MTTT639; MTTT640; MTTT641; MTTT642; MTTT643; MTTT644; MTTT645; MTTT646; MTTT647; MTTT648; MTTT649; MTTT650; MTTT651; MTTT652; MTTT653; MTTT654; MTTT655; MTTT656; MTTT657; MTTT658; MTTT659; MTTT660; MTTT661; MTTT662; MTTT663; MTTT664; MTTT665; MTTT666; MTTT667; MTTT668; MTTT669; MTTT670; MTTT671; MTTT672; MTTT673; MTTT674; MTTT675; MTTT676; MTTT677; MTTT678; MTTT679; MTTT680; MTTT681; MTTT682; MTTT683; MTTT684; MTTT685; MTTT686; MTTT687; MTTT688; MTTT689; MTTT690; MTTT691; MTTT692; MTTT693; MTTT694; MTTT695; MTTT696; MTTT697; MTTT698; MTTT699; MTTT700; MTTT701; MTTT702; MTTT703; MTTT704; MTTT705; MTTT706; MTTT707; MTTT708; MTTT709; MTTT710; MTTT711; MTTT712; MTTT713; MTTT714; MTTT715; MTTT716; MTTT717; MTTT718; MTTT719; MTTT720; MTTT721; MTTT722; MTTT723; MTTT724; MTTT725; MTTT726; MTTT727; MTTT728; MTTT729; MTTT730; MTTT731; MTTT732; MTTT733; MTTT734; MTTT735; MTTT736; MTTT737; MTTT738; MTTT739; MTTT740; MTTT741; MTTT742; MTTT743; MTTT744; MTTT745; MTTT746; MTTT747; MTTT748; MTTT749; MTTT750; MTTT751; MTTT752; MTTT753; MTTT754; MTTT755; MTTT756; MTTT757; MTTT758; MTTT759; MTTT760; MTTT761; MTTT762; MTTT763; MTTT764; MTTT765; MTTT766; MTTT767; MTTT768; MTTT769; MTTT770; MTTT771; MTTT772; MTTT773; MTTT774; MTTT775; MTTT776; MTTT777; MTTT778; MTTT779; MTTT780; MTTT781; MTTT782; MTTT783; MTTT784; MTTT785; MTTT786; MTTT787; MTTT788; MTTT789; MTTT790; MTTT791; MTTT792; MTTT793; MTTT794; MTTT795; MTTT796; MTTT797; MTTT798; MTTT799; MTTT800; MTTT801; MTTT802; MTTT803; MTTT804; MTTT805; MTTT806; MTTT807; MTTT808; MTTT809; MTTT810; MTTT811; MTTT812; MTTT813; MTTT814; MTTT815; MTTT816; MTTT817; MTTT818; MTTT819; MTTT820; MTTT821; MTTT822; MTTT823; MTTT824; MTTT825; MTTT826; MTTT827; MTTT828; MTTT829; MTTT830; MTTT831; MTTT832; MTTT833; MTTT834; MTTT835; MTTT836; MTTT837; MTTT838; MTTT839; MTTT840; MTTT841; MTTT842; MTTT843; MTTT844; MTTT845; MTTT846; MTTT847; MTTT848; MTTT849; MTTT850; MTTT851; MTTT852; MTTT853; MTTT854; MTTT855; MTTT856; MTTT857; MTTT858; MTTT859; MTTT860; MTTT861; MTTT862; MTTT863; MTTT864; MTTT865; MTTT866; MTTT867; MTTT868; MTTT869; MTTT870; MTTT871; MTTT872; MTTT873; MTTT874; MTTT875; MTTT876; MTTT877; MTTT878; MTTT879; MTTT880; MTTT881; MTTT882; MTTT883; MTTT884; MTTT885; MTTT886; MTTT887; MTTT888; MTTT889; MTTT890; MTTT891; MTTT892; MTTT893; MTTT894; MTTT895; MTTT896; MTTT897; MTTT898; MTTT899; MTTT900; MTTT901; MTTT902; MTTT903; MTTT904; MTTT905; MTTT906; MTTT907; MTTT908; MTTT909; MTTT910; MTTT911; MTTT912; MTTT913; MTTT914; MTTT915; MTTT916; MTTT917; MTTT918; MTTT919; MTTT920; MTTT921; MTTT922; MTTT923; MTTT924; MTTT925; MTTT926; MTTT927; MTTT928; MTTT929; MTTT930; MTTT931; MTTT932; MTTT933; MTTT934; MTTT935; MTTT936; MTTT937; MTTT938; MTTT939; MTTT940; MTTT941; MTTT942; MTTT943; MTTT944; MTTT945; MTTT946; MTTT947; MTTT948; MTTT949; MTTT950; MTTT951; MTTT952; MTTT953; MTTT954; MTTT955; MTTT956; MTTT957; MTTT958; MTTT959; MTTT960; MTTT961; MTTT962; MTTT963; MTTT964; MTTT965; MTTT966; MTTT967; MTTT968; MTTT969; MTTT970; MTTT971; MTTT972; MTTT973; MTTT974; MTTT975; MTTT976; MTTT977; MTTT978; MTTT979; MTTT980; MTTT981; MTTT982; MTTT983; MTTT984; MTTT985; MTTT986; MTTT987; MTTT988; MTTT989; MTTT990; MTTT991; MTTT992; MTTT993; MTTT994; MTTT995; MTTT996; MTTT997; MTTT998; MTTT999; MTTT1000; MTTT1001; MTTT1002; MTTT1003; MTTT1004; MTTT1005; MTTT1006; MTTT1007; MTTT1008; MTTT1009; MTTT1010; MTTT1011; MTTT1012; MTTT1013; MTTT1014; MTTT1015; MTTT1016; MTTT1017; MTTT1018; MTTT1019; MTTT1020; MTTT1021; MTTT1022; MTTT1023; MTTT1024; MTTT1025; MTTT1026; MTTT1027; MTTT1028; MTTT1029; MTTT1030; MTTT1031; MTTT1032; MTTT1033; MTTT1034; MTTT1035; MTTT1036; MTTT1037; MTTT1038; MTTT1039; MTTT1040; MTTT1041; MTTT1042; MTTT1043; MTTT1044; MTTT1045; MTTT1046; MTTT1047; MTTT1048; MTTT1049; MTTT1050; MTTT1051; MTTT1052; MTTT1053; MTTT1054; MTTT1055; MTTT1056; MTTT1057; MTTT1058; MTTT1059; MTTT1060; MTTT1061; MTTT1062; MTTT1063; MTTT1064; MTTT1065; MTTT1066; MTTT1067; MTTT1068; MTTT1069; MTTT1070; MTTT1071; MTTT1072; MTTT1073; MTTT1074; MTTT1075; MTTT1076; MTTT1077; MTTT1078; MTTT1079; MTTT1080; MTTT1081; MTTT1082; MTTT1083; MTTT1084; MTTT1085; MTTT1086; MTTT1087; MTTT1088; MTTT1089; MTTT1090; MTTT1091; MTTT1092; MTTT1093; MTTT1094; MTTT1095; MTTT1096; MTTT1097; MTTT1098; MTTT1099; MTTT1100; MTTT1101; MTTT1102; MTTT1103; MTTT1104; MTTT1105; MTTT1106; MTTT1107; MTTT1108; MTTT1109; MTTT1110; MTTT1111; MTTT1112; MTTT1113; MTTT1114; MTTT1115; MTTT1116; MTTT1117; MTTT1118; MTTT1119; MTTT1120; MTTT1121; MTTT1122; MTTT1123; MTTT1124; MTTT1125; MTTT1126; MTTT1127; MTTT1128; MTTT1129; MTTT1130; MTTT1131; MTTT1132; MTTT1133; MTTT1134; MTTT1135; MTTT1136; MTTT1137; MTTT1138; MTTT1139; MTTT1140; MTTT1141; MTTT1142; MTTT1143; MTTT1144; MTTT1145; MTTT1146; MTTT1147; MTTT1148; MTTT1149; MTTT1150; MTTT1151; MTTT1152; MTTT1153; MTTT1154; MTTT1155; MTTT1156; MTTT1157; MTTT1158; MTTT1159; MTTT1160; MTTT1161; MTTT1162; MTTT1163; MTTT1164; MTTT1165; MTTT1166; MTTT1167; MTTT1168; MTTT1169; MTTT1170; MTTT1171; MTTT1172; MTTT1173; MTTT1174; MTTT1175; MTTT1176; MTTT1177; MTTT1178; MTTT1179; MTTT1180; MTTT1181; MTTT1182; MTTT1183; MTTT1184; MTTT1185; MTTT1186; MTTT1187; MTTT1188; MTTT1189; MTTT1190; MTTT1191; MTTT1192; MTTT1193; MTTT1194; MTTT1195; MTTT1196; MTTT1197; MTTT1198; MTTT1199; MTTT1200; MTTT1201; MTTT1202; MTTT1203; MTTT1204; MTTT1205; MTTT1206; MTTT1207; MTTT1208; MTTT1209; MTTT1210; MTTT1211; MTTT1212; MTTT1213; MTTT1214; MTTT1215; MTTT1216; MTTT1217; MTTT1218; MTTT1219; MTTT1220; MTTT1221; MTTT1222; MTTT1223; MTTT1224; MTTT1225; MTTT1226; MTTT1227; MTTT1228; MTTT1229; MTTT1230; MTTT1231; MTTT1232; MTTT1233; MTTT1234; MTTT1235; MTTT1236; MTTT1237; MTTT1238; MTTT1239; MTTT1240; MTTT1241; MTTT1242; MTTT1243; MTTT1244; MTTT1245; MTTT1246; MTTT1247; MTTT1248; MTTT1249; MTTT1250; MTTT1251; MTTT1252; MTTT1253; MTTT1254; MTTT1255; MTTT1256; MTTT1257; MTTT1258; MTTT1259; MTTT1260; MTTT1261; MTTT1262; MTTT1263; MTTT1264; MTTT1265; MTTT1266; MTTT1267; MTTT1268; MTTT1269; MTTT1270; MTTT1271; MTTT1272; MTTT1273; MTTT1274; MTTT1275; MTTT1276; MTTT1277; MTTT1278; MTTT1279; MTTT1280; MTTT1281; MTTT1282; MTTT1283; MTTT1284; MTTT1285; MTTT1286; MTTT1287; MTTT1288; MTTT1289; MTTT1290; MTTT1291; MTTT1292; MTTT1293; MTTT1294; MTTT1295; MTTT1296; MTTT1297; MTTT1298; MTTT1299; MTTT1300; MTTT1301; MTTT1302; MTTT1303; MTTT1304; MTTT1305; MTTT1306; MTTT1307; MTTT1308; MTTT1309; MTTT1310; MTTT1311; MTTT1312; MTTT1313; MTTT1314; MTTT1315; MTTT1316; MTTT1317; MTTT1318; MTTT1319; MTTT1320; MTTT1321; MTTT1322; MTTT1323; MTTT1324; MTTT1325; MTTT1326; MTTT1327; MTTT1328; MTTT1329; MTTT1330; MTTT1331; MTTT1332; MTTT1333; MTTT1334; MTTT1335; MTTT1336; MTTT1337; MTTT1338; MTTT1339; MTTT1340; MTTT1341; MTTT1342; MTTT1343; MTTT1344; MTTT1345; MTTT1346; MTTT1347; MTTT1348; MTTT1349; MTTT1350; MTTT1351; MTTT1352; MTTT1353; MTTT1354; MTTT1355; MTTT1356; MTTT1357; MTTT1358; MTTT1359; MTTT1360; MTTT1361; MTTT1362; MTTT1363; MTTT1364; MTTT1365; MTTT1366; MTTT1367; MTTT1368; MTTT1369; MTTT1370; MTTT1371; MTTT1372; MTTT1373; MTTT1374; MTTT1375; MTTT1376; MTTT1377; MTTT1378; MTTT1379; MTTT1380; MTTT1381; MTTT1382; MTTT1383; MTTT1384; MTTT1385; MTTT1386; MTTT1387; MTTT1388; MTTT1389; MTTT1390; MTTT1391; MTTT1392; MTTT1393; MTTT1394; MTTT1395; MTTT1396; MTTT1397; MTTT1398; MTTT1399; MTTT1400; MTTT1401; MTTT1402; MTTT1403; MTTT1404; MTTT1405; MTTT1406; MTTT1407; MTTT1408; MTTT1409; MTTT1410; MTTT1411; MTTT1412; MTTT1413; MTTT1414; MTTT1415; MTTT1416; MTTT1417; MTTT1418; MTTT1419; MTTT1420; MTTT1421; MTTT1422; MTTT1423; MTTT1424; MTTT1425; MTTT1426; MTTT1427; MTTT1428; MTTT1429; MTTT1430; MTTT1431; MTTT1432; MTTT1433; MTTT1434; MTTT1435; MTTT1436; MTTT1437; MTTT1438; MTTT1439; MTTT1440; MTTT1441; MTTT1442; MTTT1443; MTTT1444; MTTT1445; MTTT1446; MTTT1447; MTTT1448; MTTT1449; MTTT1450; MTTT1451; MTTT1452; MTTT1453; MTTT1454; MTTT1455; MTTT1456; MTTT1457; MTTT1458; MTTT1459; MTTT1460; MTTT1461; MTTT1462; MTTT1463; MTTT1464; MTTT1465; MTTT1466; MTTT1467; MTTT1468; MTTT1469; MTTT1470; MTTT1471; MTTT1472; MTTT1473; MTTT1474; MTTT1475; MTTT1476; MTTT1477; MTTT1478; MTTT1479; MTTT1480; MTTT1481; MTTT1482; MTTT1483; MTTT1484; MTTT1485; MTTT1486; MTTT1487; MTTT

en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro* comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante;

en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro* se purifica usando un procedimiento que elimina moléculas contaminantes de ARN que son inmunogénicas y tóxicas para la célula induciendo una respuesta inmunitaria innata, como se determina midiendo la secreción reducida de citocinas IFN- α o TNF- α de células dendríticas transfectadas con dichas moléculas de ARNm *in vitro* en comparación con la secreción de dicha citocina de células dendríticas transfectadas con ARNm sintetizado *in vitro* no purificado.

9. El uso de la reivindicación 8, en el que dicha proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO); un factor de transcripción seleccionado de MYC y SRY o MCOP; un factor de crecimiento o citocina seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante-beta1 (TGF-beta1), factor insulínico de crecimiento (IGF), hormona estimulante de melanocitos alfa (alfa-MSH); factor insulínico de crecimiento I (IGF-I); IL-4; IL-13; e IL-13; óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); una proteína de choque térmico; regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR); una enzima con actividad antioxidante seleccionada de entre catalasa, fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa-1 y superóxido dismutasa-2; tirosina cinasa de Bruton; adenosina desaminasa; ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa; ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPTO; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLOM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHHR; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COLAA3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LCT; LHCGR; LSFC; MSH2; MSH6; NEB; NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFXH1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLCLC; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG; ITH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBX1; PCCB; POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFB2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG; ENAM; ETFDH; EVC; F11; FABP2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYPA; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2; PKD2; QDPR; SGCB; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHD1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1; DTR; EOS; EPD; ERVR; F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMDLA; LOX; LTC4S; MAN2A1; MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFBI; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFBI; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IFGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOC51; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3; ONDD; OGAD; PARK2; PBCA; PBCRA1; PCB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1; ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36; CFTR; CHORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMB1; LEP; MET; NCF1; NM; OGDH; OPN1SW; PEX1; PGAM2; PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH; SLC26A3; SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANK1; CA1; CA2; CCAL1; CLN8; CMT4A; CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS; DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1; FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL; MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1; PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN; ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA; GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H; LMX1B; MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR2; RPD1; SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1; CUBN; CXCL12; CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67; MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP; PTEN; RBP4; RDP4; RET;

SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC;
 APOAL; APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G; CD59; CDKNLC; CLN2; CNTF;
 CPT1A; CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2;
 GIF; HBB; HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS;
 5 KCNJ11; KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1;
 PGL2; PGR; PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD;
 SERPING1; SMPD1; TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C; VMD2; VRNI; WT1; WT2;
 ZNF145; A2M; AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; CIR; CD4;
 CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2;
 10 HMN2; HPD; IGF1; KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRT6B; KRT6B; KRT6B;
 LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2;
 SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TPI1; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1;
 CLN5; CPB2; ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RB1;
 RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTA1; DAD1; DFNB5;
 15 EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@; IGH group; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C;
 MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7;
 SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USHLA; VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM;
 CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1;
 FES; HCVS; HEXA; IVD; LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLB1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A;
 20 WMS; ABCC6; ALDOA; APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH;
 CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASE1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN; HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1;
 HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS;
 PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE;
 ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1; CHRN2; CMT1A;
 25 COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2; GP1BA; GPSC; GUCY2D;
 ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3; KRT16; KRT16L1;
 KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT; MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO; MYO15A; NAGLU; NAPB; NF1; NME1;
 P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH;
 RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR;
 30 SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2;
 CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1;
 SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCK- DHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A;
 CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB;
 EXT3; EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1; HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR;
 35 JAK3; KLK3; LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3;
 OPA3; PEPD; PRPF31; PRPN3; PRX; PSG1; PVRL1; RYR1; SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3;
 TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5;
 GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP;
 CBS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1;
 40 SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR;
 DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1; NAGA; NE2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1;
 SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2;
 AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS;
 BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM; CHR39c; CIDX; CLA2;
 45 CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4;
 DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5;
 FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDXY; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST;
 HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2;
 MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MID1; MLLT7; MLS; MRSD;
 50 MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NROB1;
 NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW; OPN1MW; OTC; P3;
 PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA; PLP1; POF1; POLA;
 POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3;
 RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS; SYN1; SYP; TAF1;
 55 TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIM1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS; WSN; WTS; WWS;
 XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ; GCY; RPS4Y;
 SMCY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1;
 DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EE1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI;
 HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT;
 60 LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCO1; MTCO3; MTCYB;
 MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2;
 MTTN; MTPP; MTTT1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1; RBS;
 RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; y TTD.

10. Un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende Ψ o m1 Ψ (1-metilpseudouridina) para su uso en un procedimiento
 65 de terapia génica,

- en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro* se purifica utilizando un procedimiento que elimina moléculas contaminantes de ARN que son inmunogénicas y tóxicas para la célula induciendo una respuesta inmunitaria innata, según lo determinado midiendo la secreción reducida de citocinas IFN- α o TNF- α de células dendríticas transfectadas con dichas moléculas de ARNm *in vitro* purificadas en comparación con la secreción de dicha citocina de células dendríticas transfectadas con ARNm sintetizado *in vitro* sin purificar; y
- 5 en el que dicha terapia génica comprende la administración repetida de dicho ARNm sintetizado *in vitro* a un sujeto.
11. El uso o el ARNm sintetizado *in vitro* para el uso de las reivindicaciones 8-10, en el que menos del 0,01 % del ARN total en dicho ARNm sintetizado *in vitro* purificado consiste en moléculas contaminantes de ARN bicatenario.
- 10 12. El uso o el ARNm sintetizado *in vitro* para el uso de las reivindicaciones 8-11, en el que el resultado de dicho procedimiento de purificación es que dicho ARNm sintetizado *in vitro* puede administrarse repetidas veces sin inducir una respuesta inmunitaria suficiente para eliminar la expresión detectable de la proteína recombinante o que dicho ARNm sintetizado *in vitro* carece de inmunogenicidad, lo que permite el suministro repetido sin generación de citocinas inflamatorias.
- 15 13. El uso o el ARNm sintetizado *in vitro* para el uso de las reivindicaciones 8-12, en el dicho procedimiento de purificación comprende:
- A. purificación de dicho ARNm sintetizado *in vitro* usando una purificación por HPLC o columna de flujo por gravedad; y/o
- 20 B. tratar dicho ARNm sintetizado *in vitro* con una enzima ribonucleasa III (RNasa III) de tal manera que se generan productos de digestión de RNasa III cortos y purificar dichos productos de digestión por RNasa III cortos por separado de dicho ARNm.
14. El uso o el ARNm sintetizado *in vitro* para el uso de las reivindicaciones 8-13, en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro* comprende además m⁵C (5-metilcitidina).
- 25 15. El uso de la reivindicación 8 o el ARNm sintetizado *in vitro* para el uso de la reivindicación 10, en el que dicha inmunogenicidad se determina adicionalmente midiendo la secreción de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8.
16. El uso de la reivindicación 8 o el ARNm sintetizado *in vitro* para el uso de la reivindicación 10, en el que la inmunogenicidad se determina adicionalmente midiendo la secreción de citocinas, preferentemente IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β or IL-8.
- 30 17. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende moléculas de ARNm sintetizadas *in vitro* que comprenden Ψ o m¹ Ψ (1-metilpseudouridina) que carecen de inmunogenicidad para células de mamífero, comprendiendo el procedimiento:
- 35 purificar ARNm sintetizado *in vitro* usando un procedimiento que elimina moléculas contaminantes de ARN que son inmunogénicas y tóxicas para la célula induciendo una respuesta inmunitaria innata, según lo determinado midiendo la secreción reducida de IFN- α o TNF- α de células dendríticas transfectadas con dichas moléculas de ARNm *in vitro* purificadas en comparación con la secreción de dicha citocina de células dendríticas transfectadas con ARNm sintetizado *in vitro* sin purificar.

FIG. 1

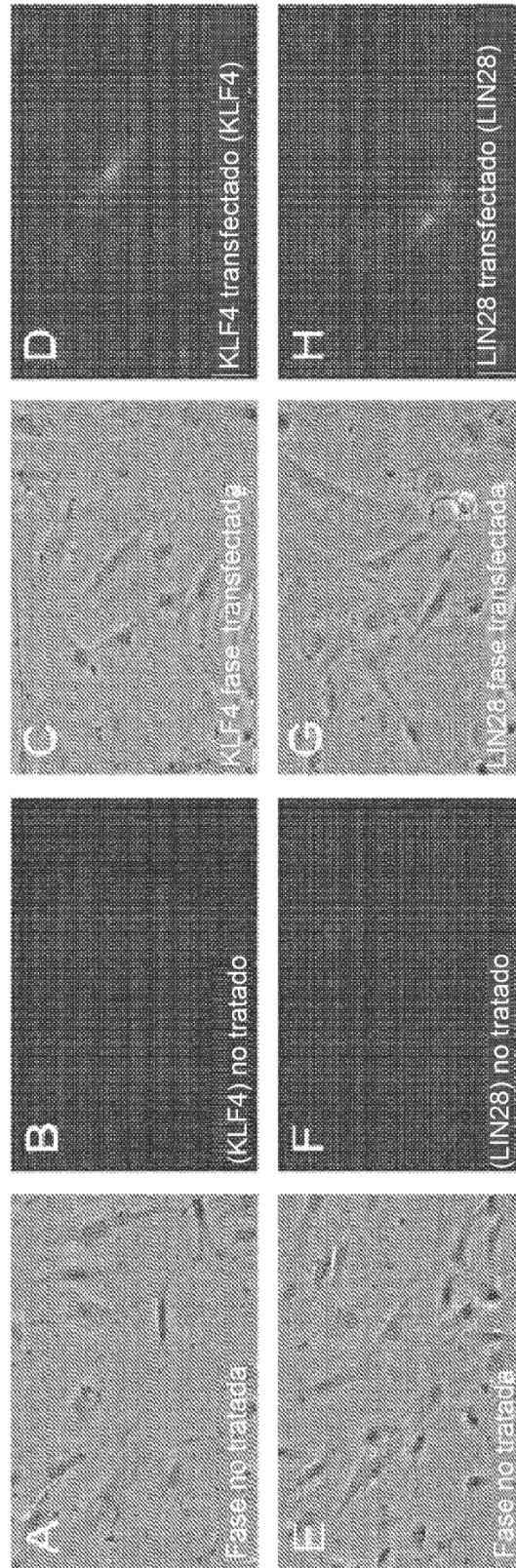


FIG. 1

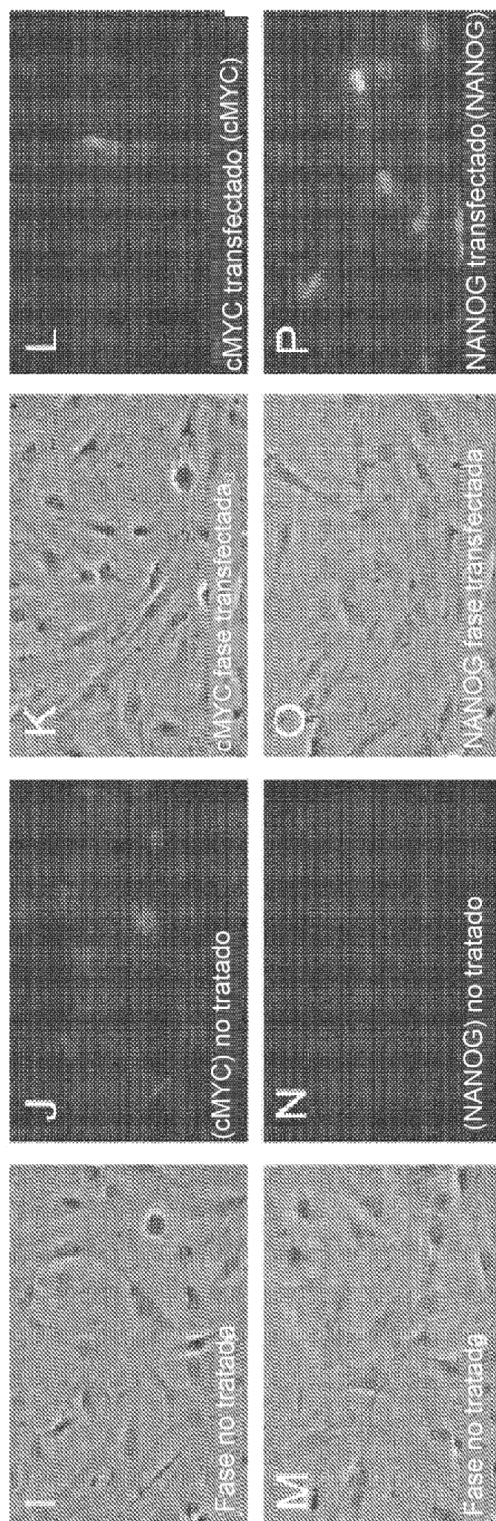


FIG. 1

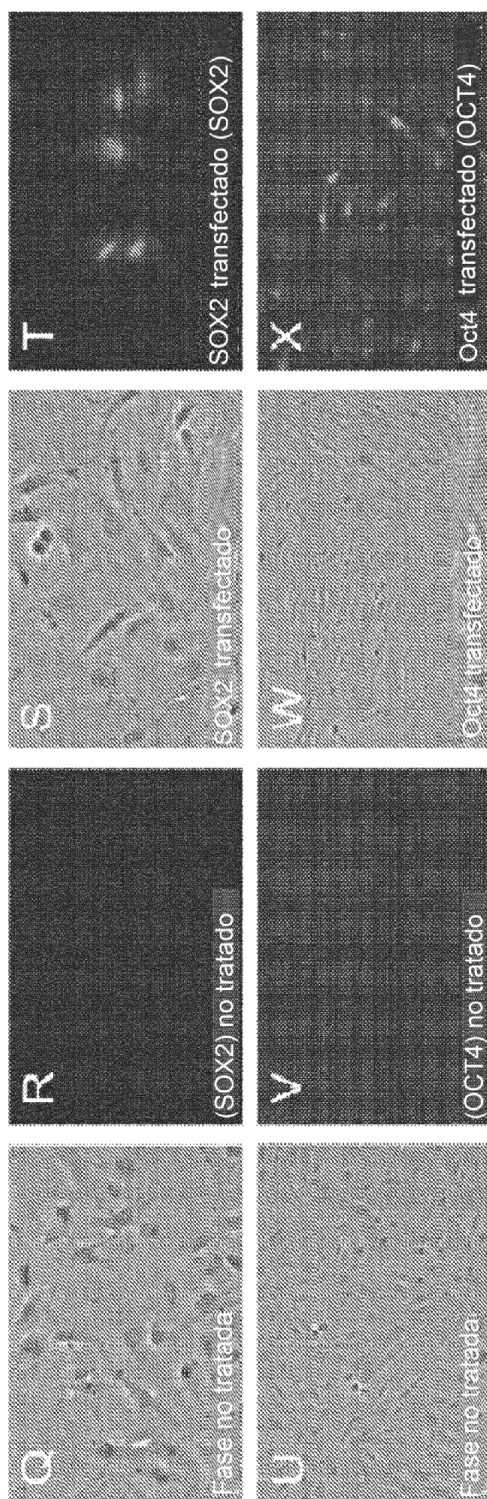


FIG. 2

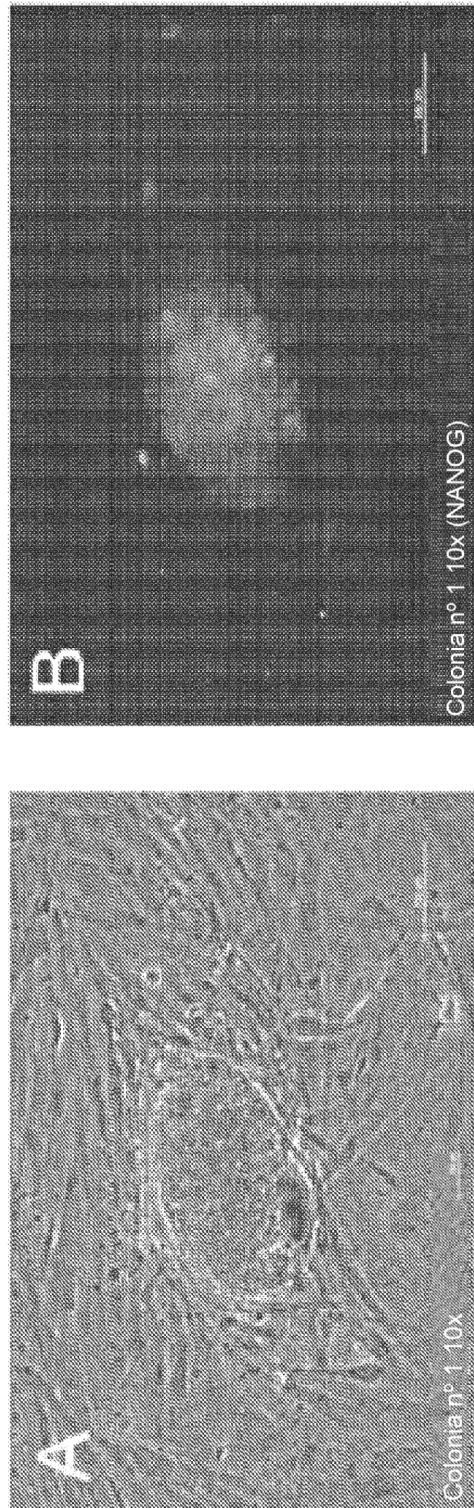


FIG. 2

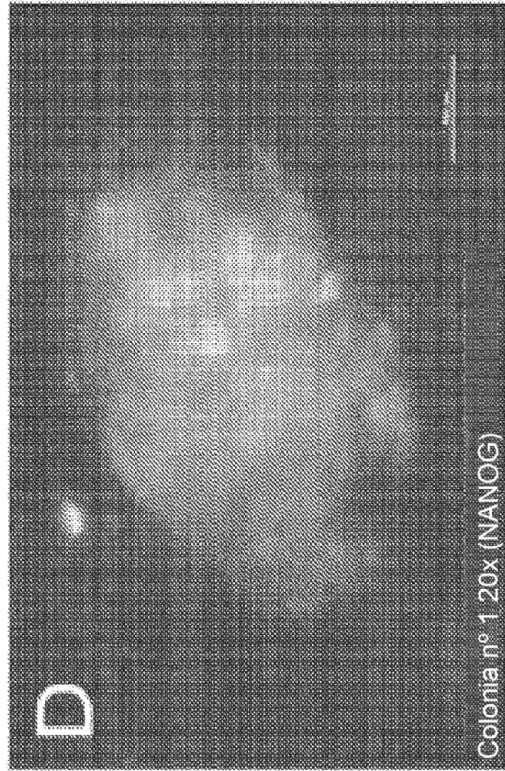


FIG. 3

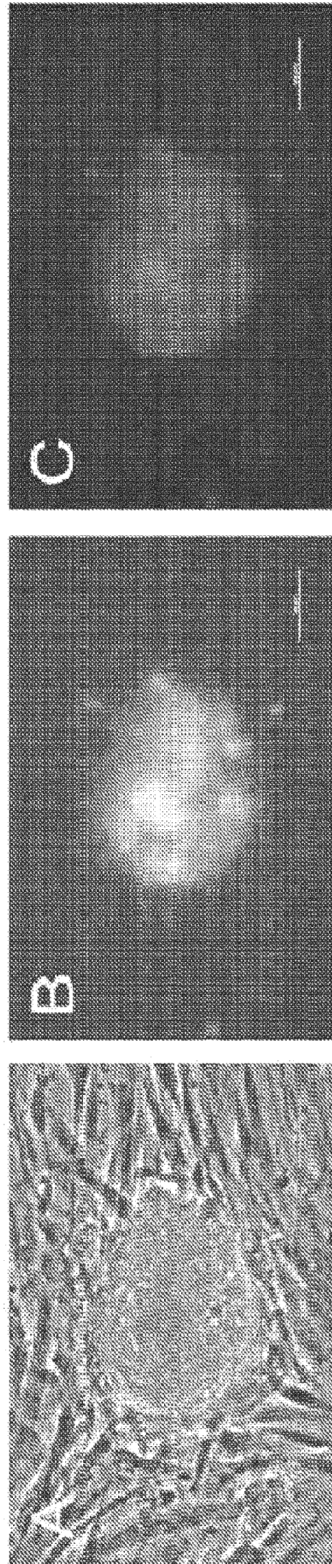


FIG. 3

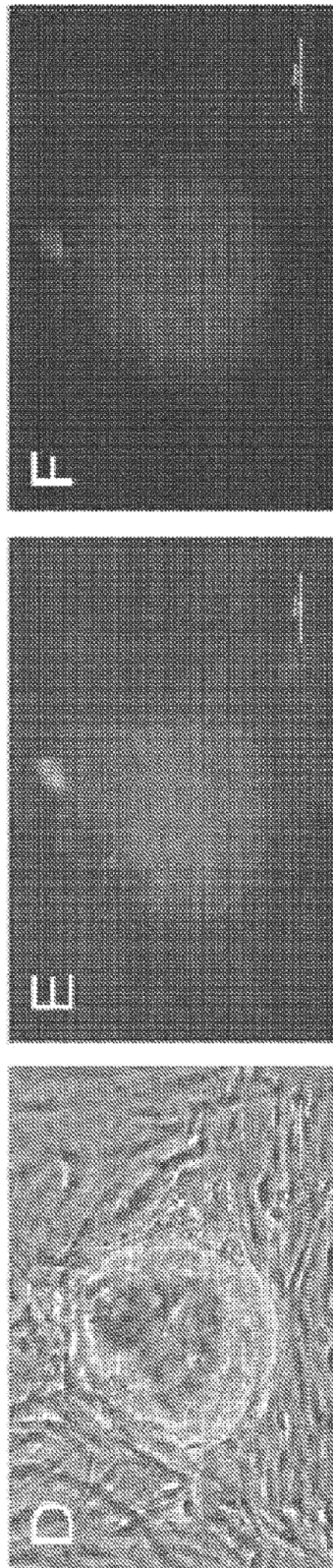


FIG. 3

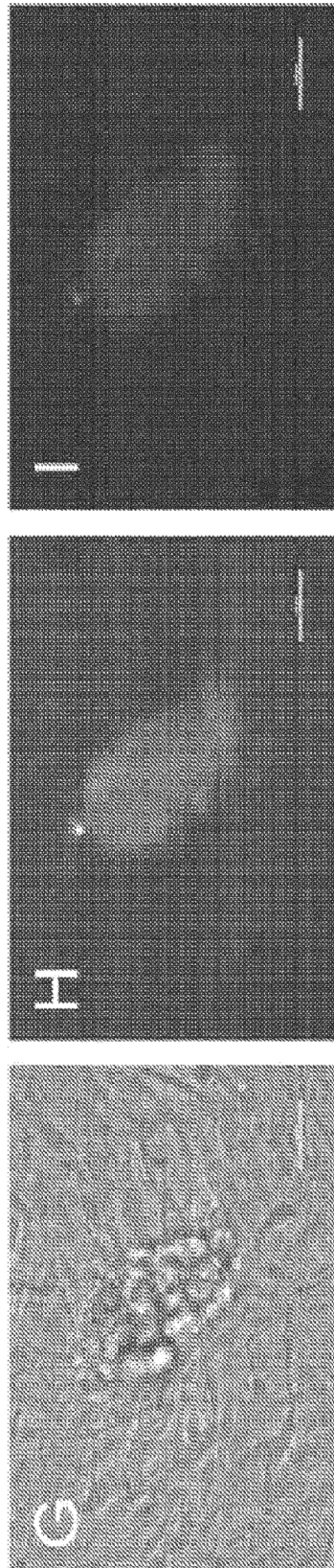


FIG. 4

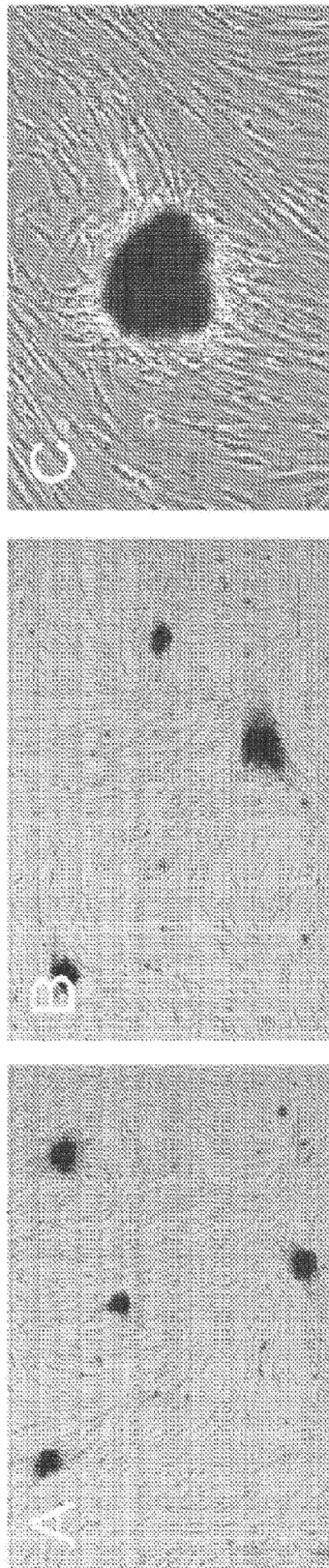


FIG. 4

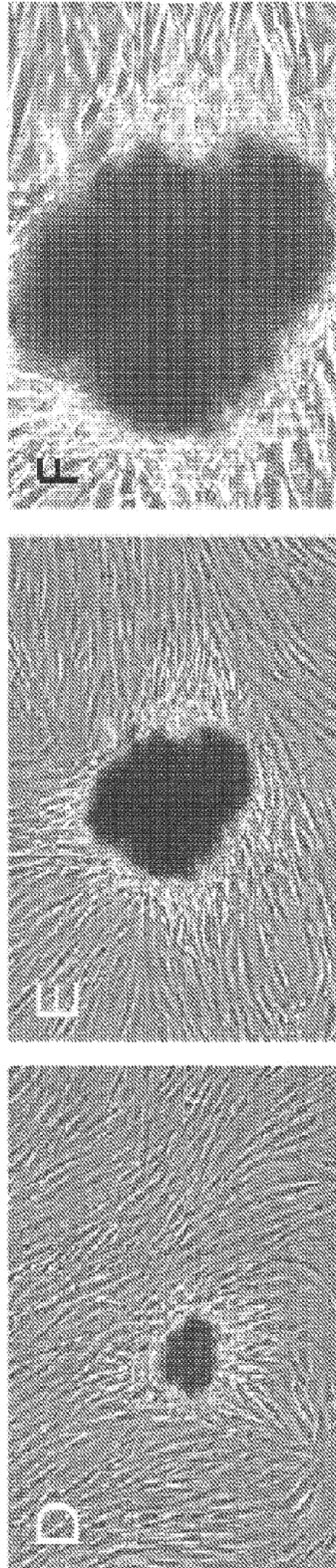


FIG. 4

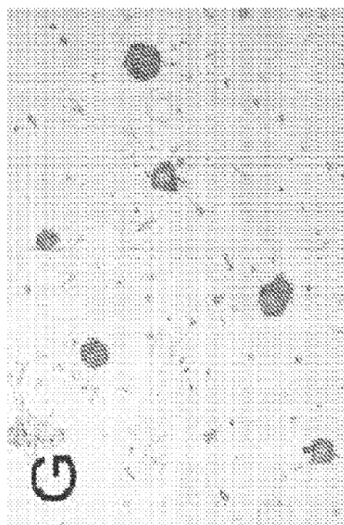
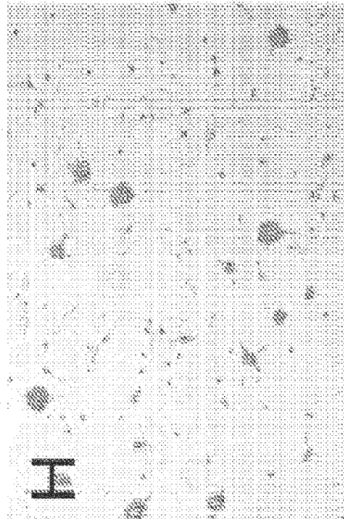
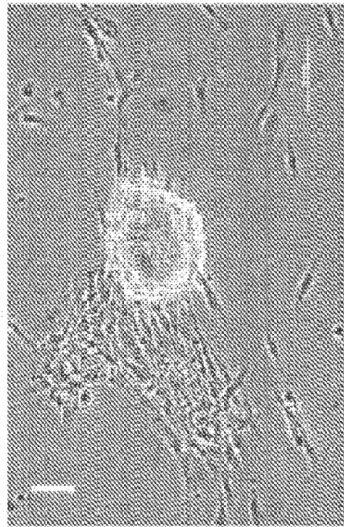


FIG. 5

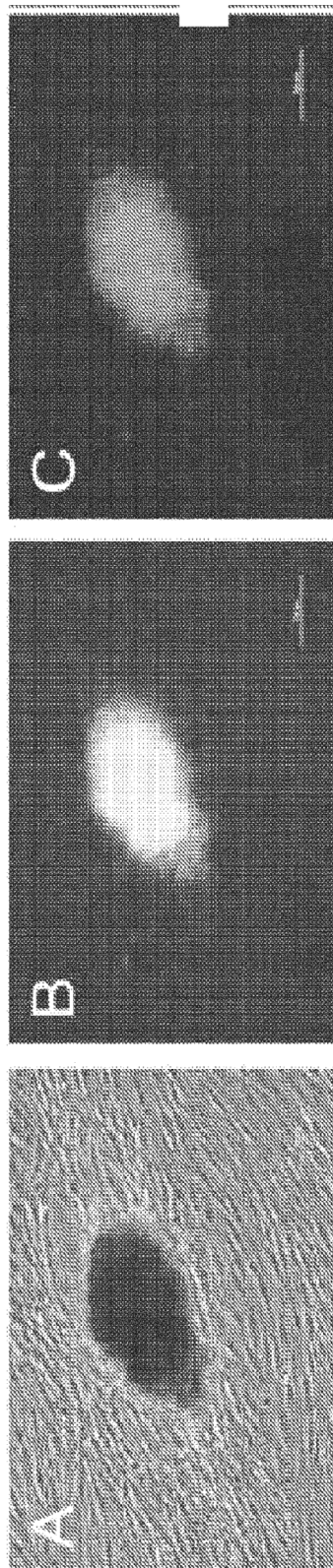


FIG. 5

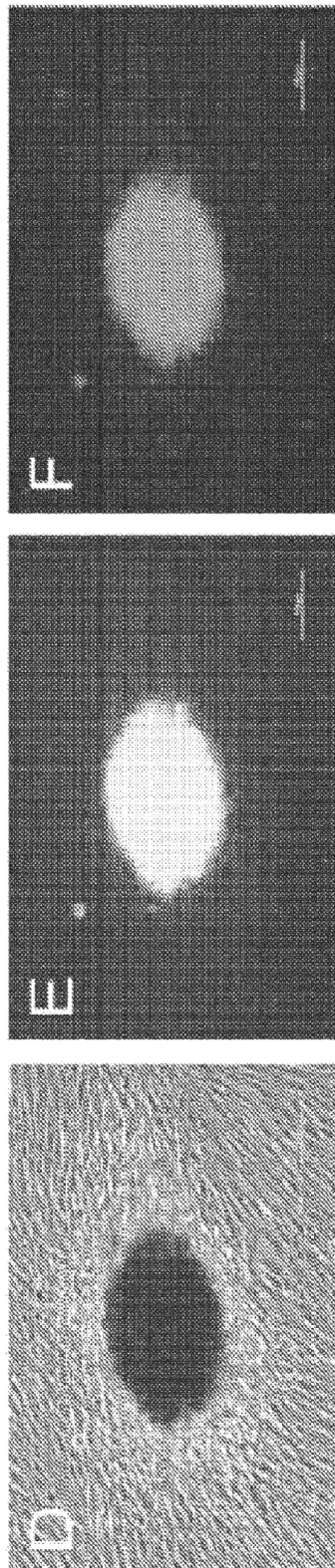


FIG. 5

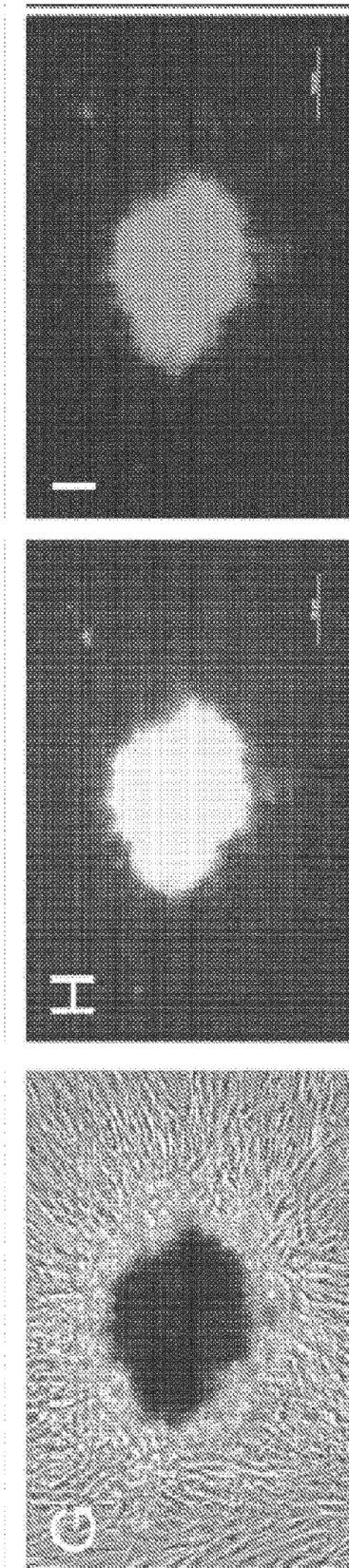


FIG. 5

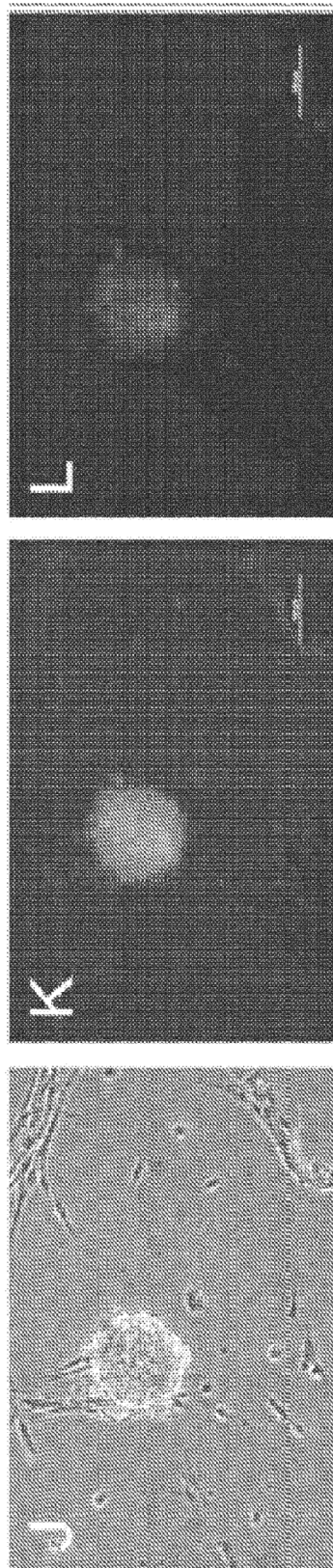


FIG. 5

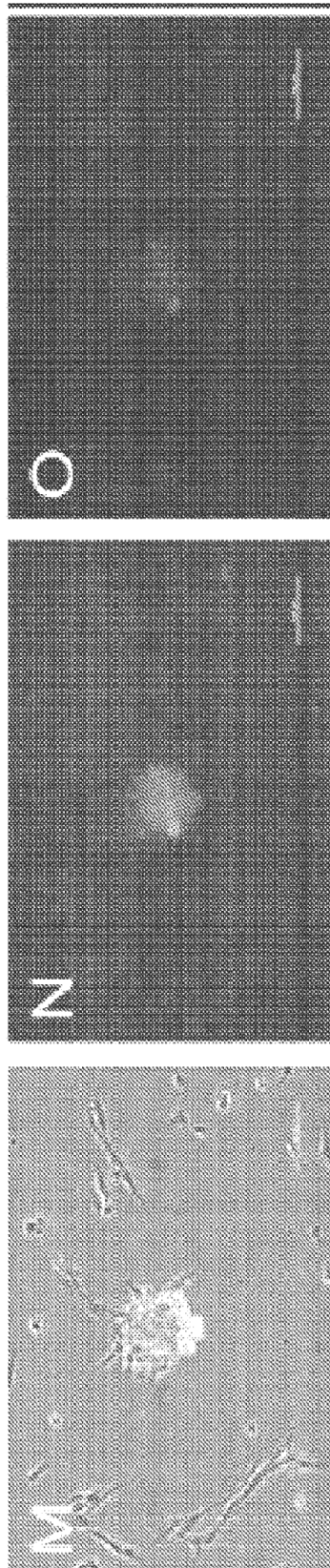


FIG. 6

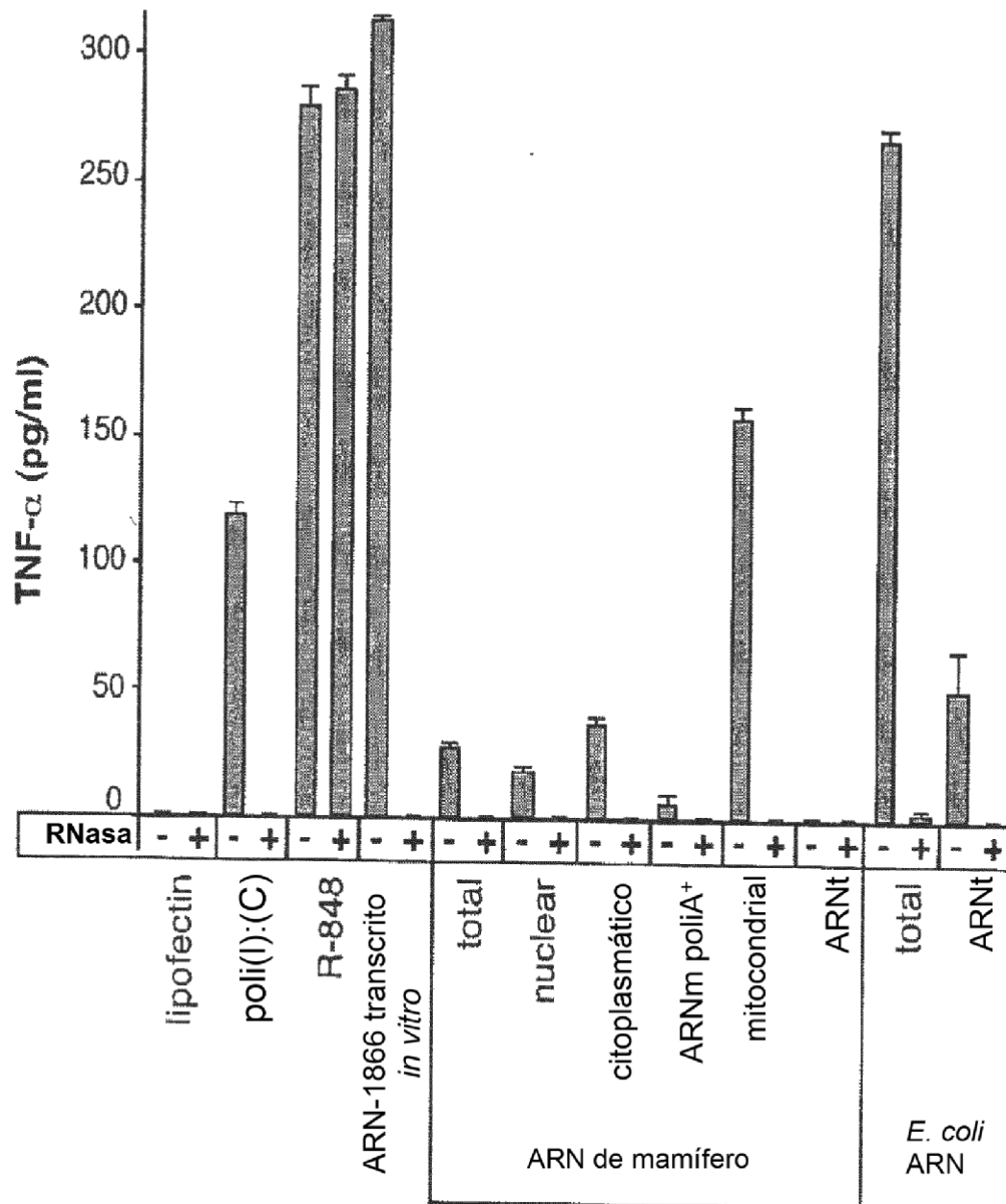


FIG. 7

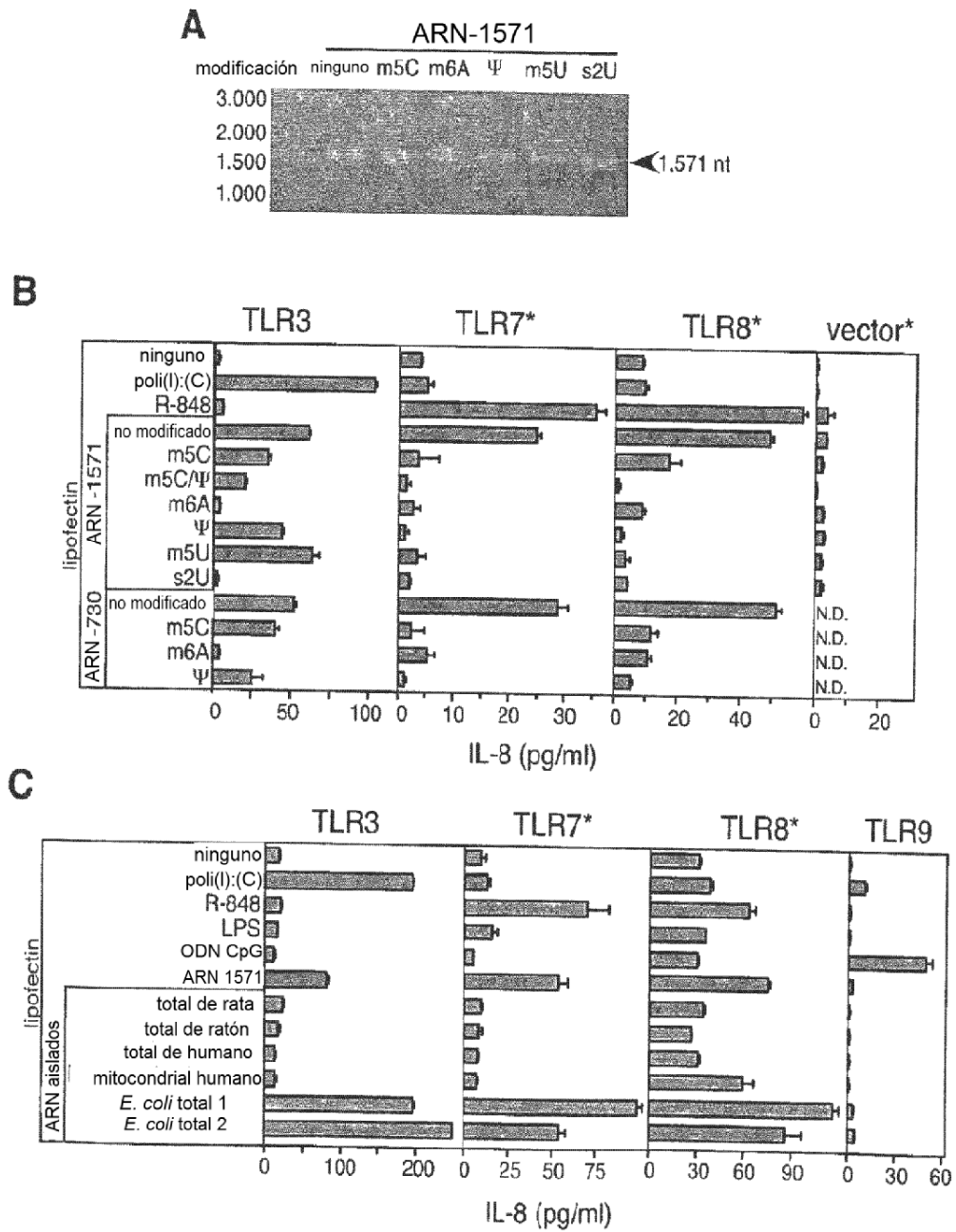


FIG. 8

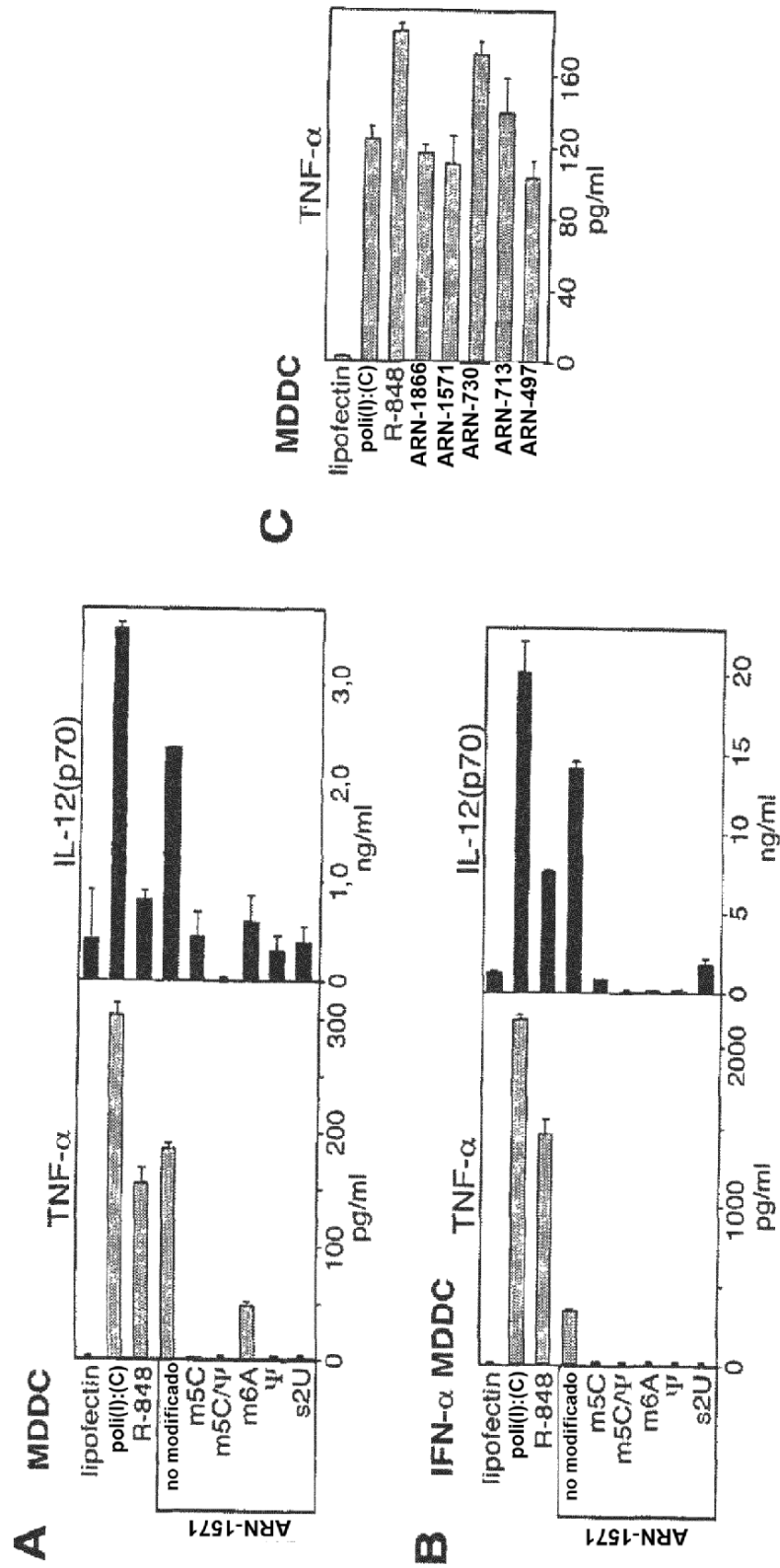


FIG. 8

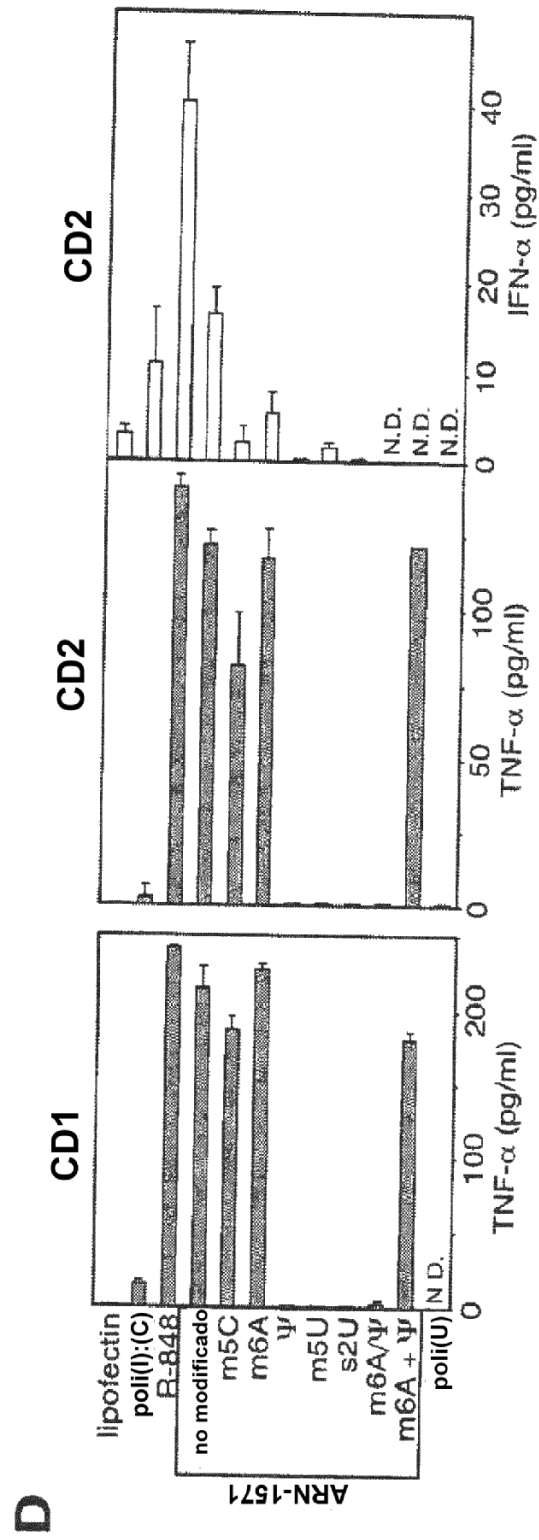


FIG. 8E

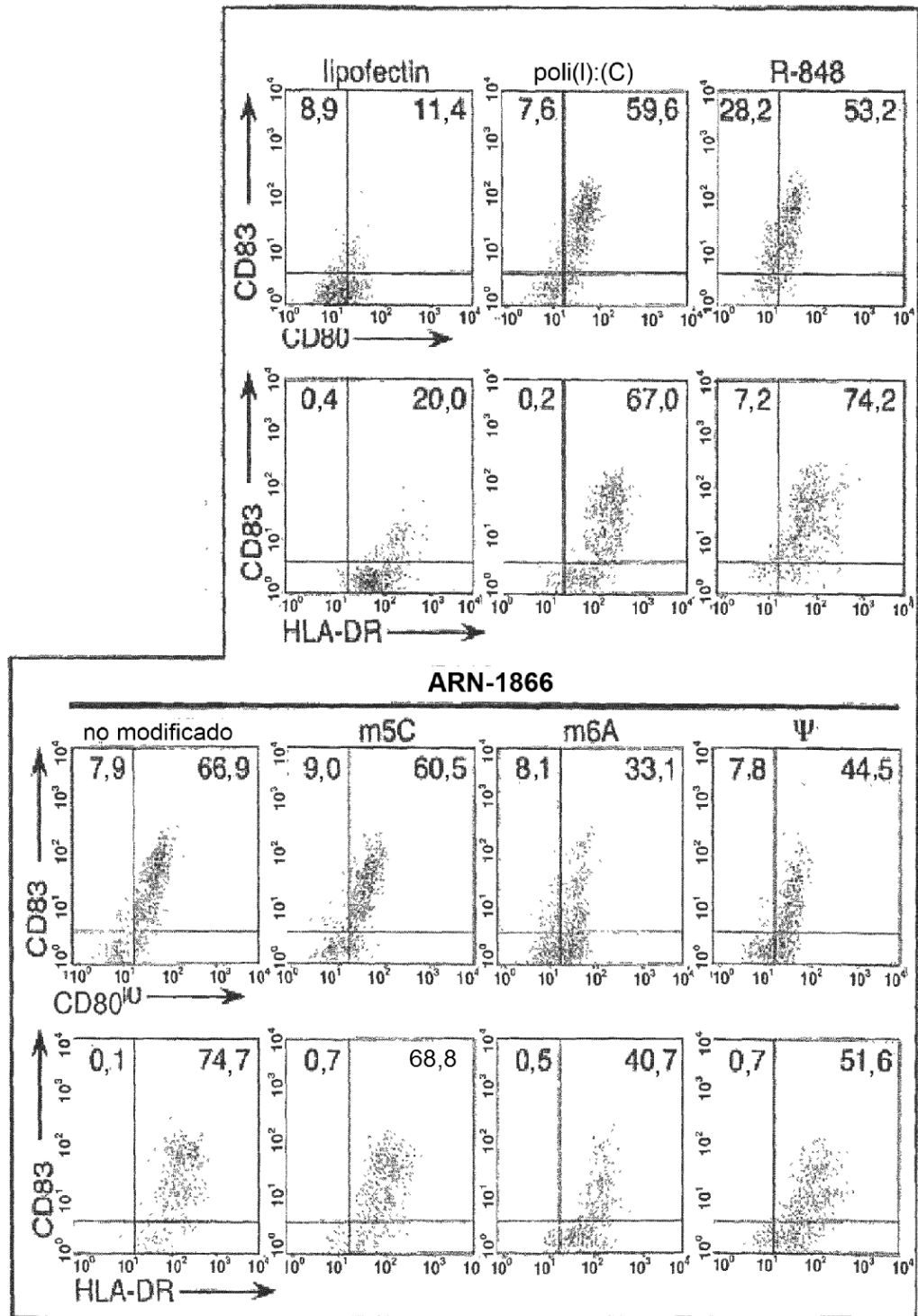


FIG. 9

A

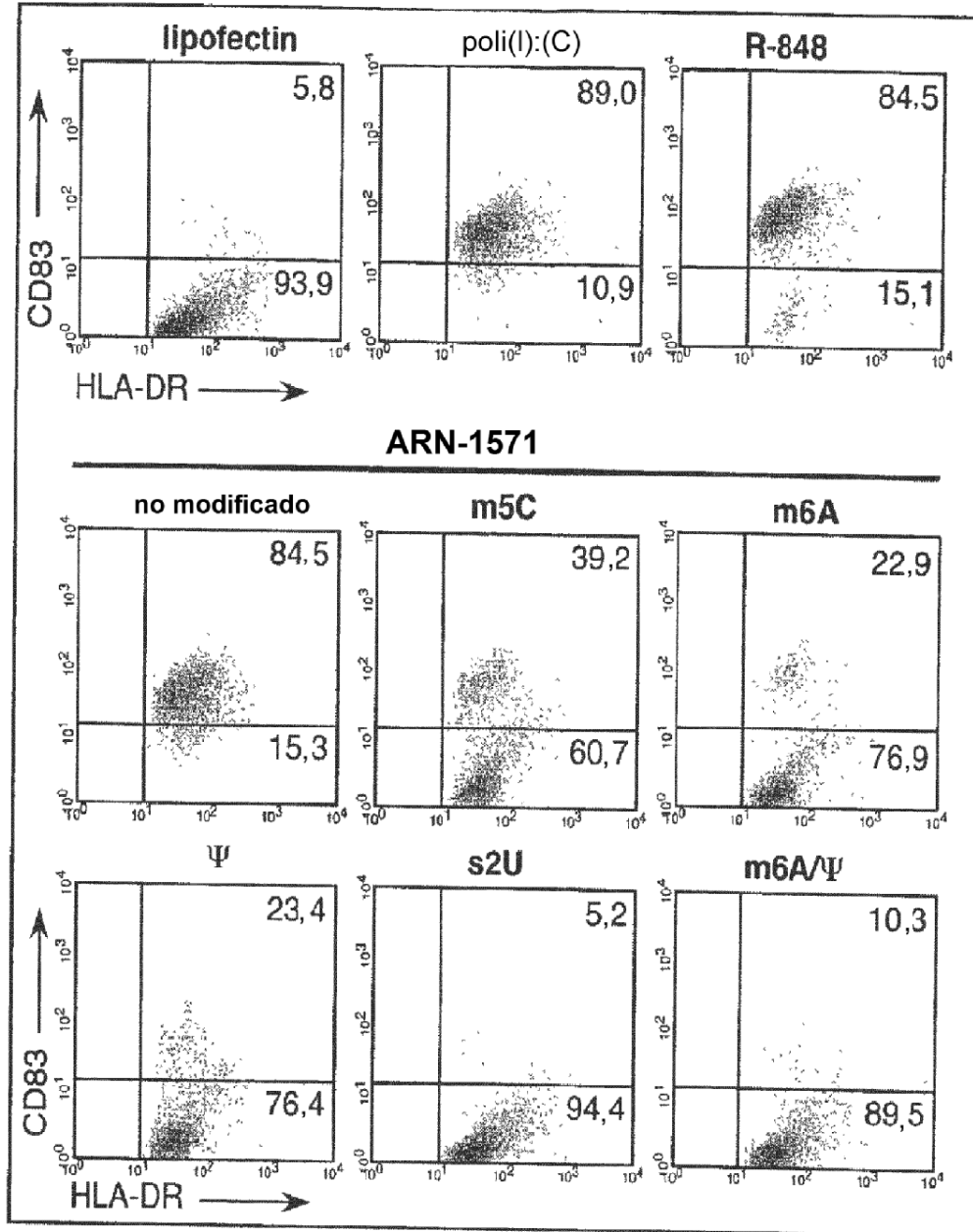


FIG. 9

B

	TNF- α^*	CD80	CD86
	pg/ml	fluorescencia media	
lipofectin	0	7,6	55,3
poli(I):(C)	45,6	59,4	257,4
R848	48,3	55,2	235,4
ARN-1571			
no modificado	26,7	52,7	246,4
<i>m5C</i>	0	16,4	108,6
<i>m6A</i>	0	12,4	78,4
Ψ	0	12,0	87,5
<i>s2U</i>	0	8,0	62,7
<i>m6A/\Psi</i>	0	8,6	68,4

FIG. 10

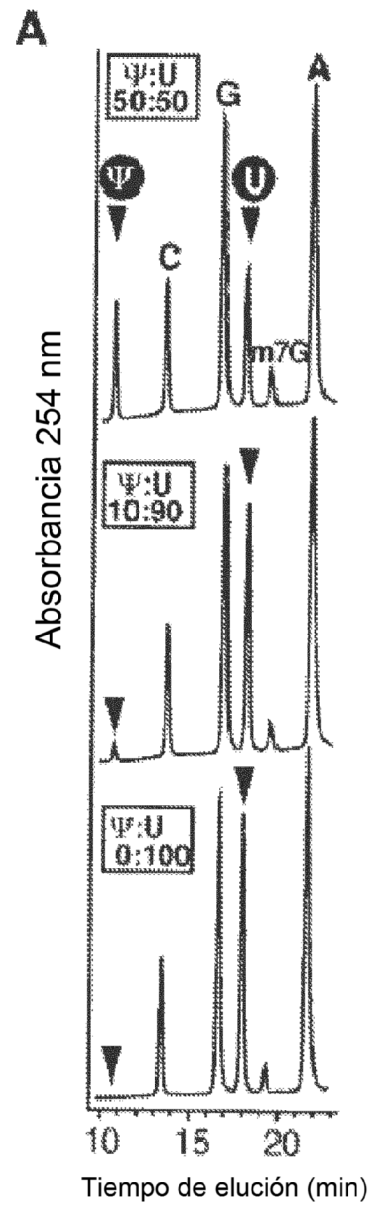


FIG. 10

Nucleósido modificado en reacción ^a (%)	m6A										ψ										m5C									
	0	1	10	50	90	99	100	1	10	50	90	99	100	1	10	50	90	99	100	1	10	50	90	99	100					
en ARN ^b																														
esperado (%)	0	0.3	3.2	16	29	32	32	0.3	2.9	14	26	28	29	0.2	1.7	9	16	17	17	0.2	1.7	9	16	17	17					
medido (%)	0	<0.2	0.9	11	28	31	32	0.2	1.9	12	24	28	29	0.4	1.4	9	15	17	17	0.4	1.4	9	15	17	17					
medido (número)	0	<3	14	176	443	490	505	3	29	193	381	441	451	6	23	135	230	270	273	6	23	135	230	270	273					

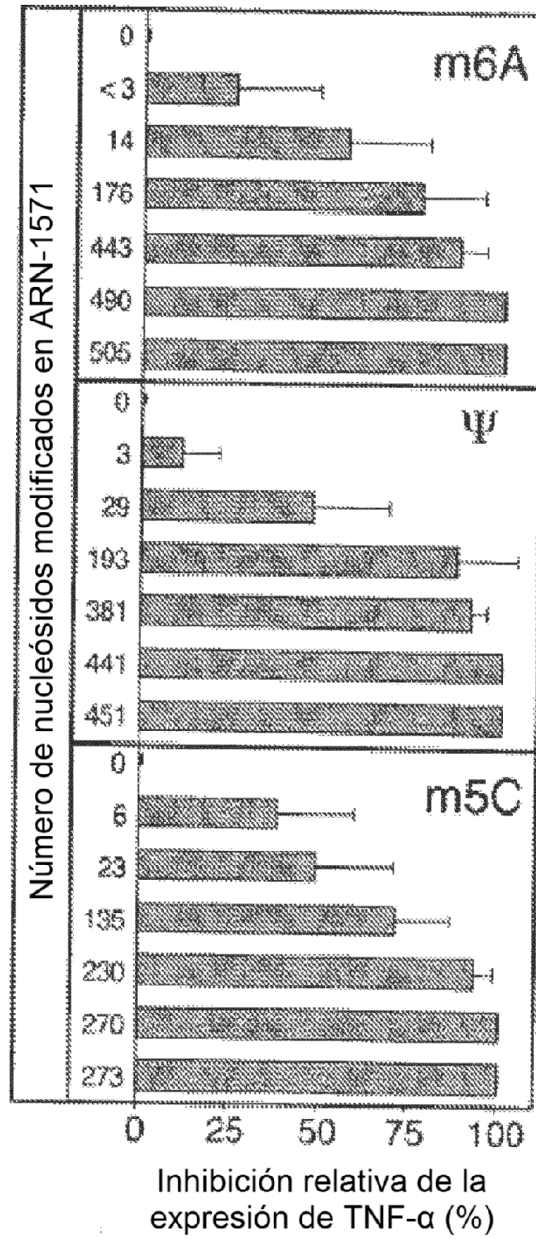
FIG. 10**C**

FIG. 11

A

ORN1-control	5' pUGGAUCCGGGCUUUGAGAUCUU	SEQ ID NO: 6
ORN2-Dm	5' pUGGAUCCGGGCUUUGAGAUCUU	SEQ ID NO: 7
ORN3-m5C	5' pUGGAUm5CCGGGCUUUGAGAUCUU	SEQ ID NO: 8
ORN4-Ψ	5' pUGGAUCCGGGCUΨUGAGAUCUU	SEQ ID NO: 9
ORN5	5' pppGGGAGACAGGGGUGUCCGCCAUUCCAGGUU	SEQ ID NO: 10
ORN6	5' pppGGGAGACAGGCUAUAACUCACAUAAUGUAUU	SEQ ID NO: 11

FIG. 11

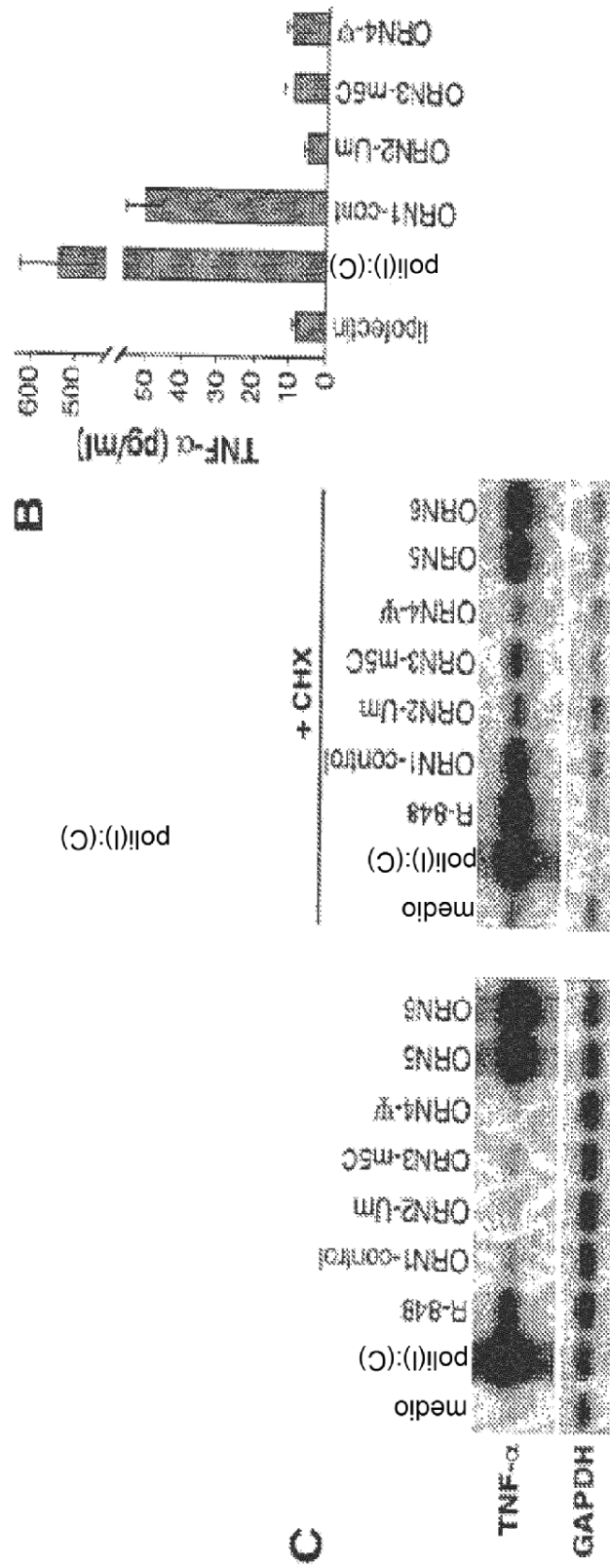


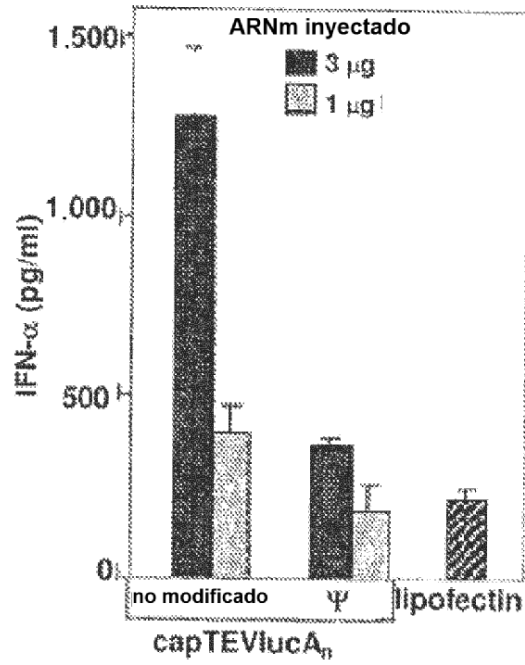
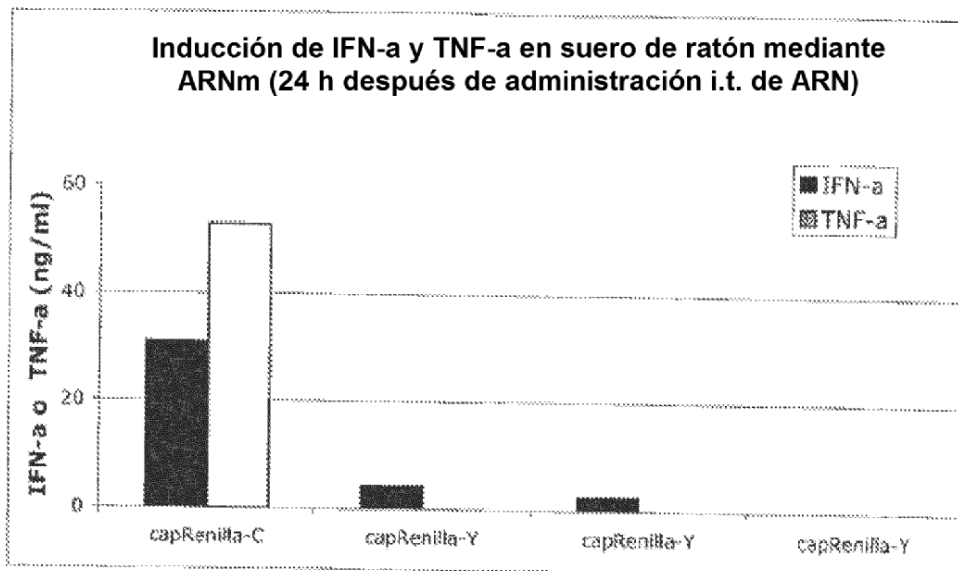
FIG. 12**A.****B.**

FIG. 13

Activación de PKR mediante ARNm

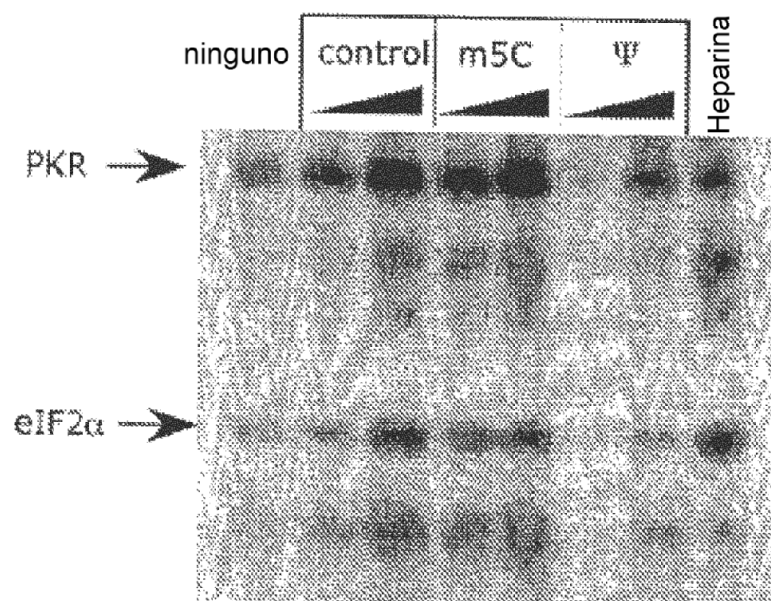


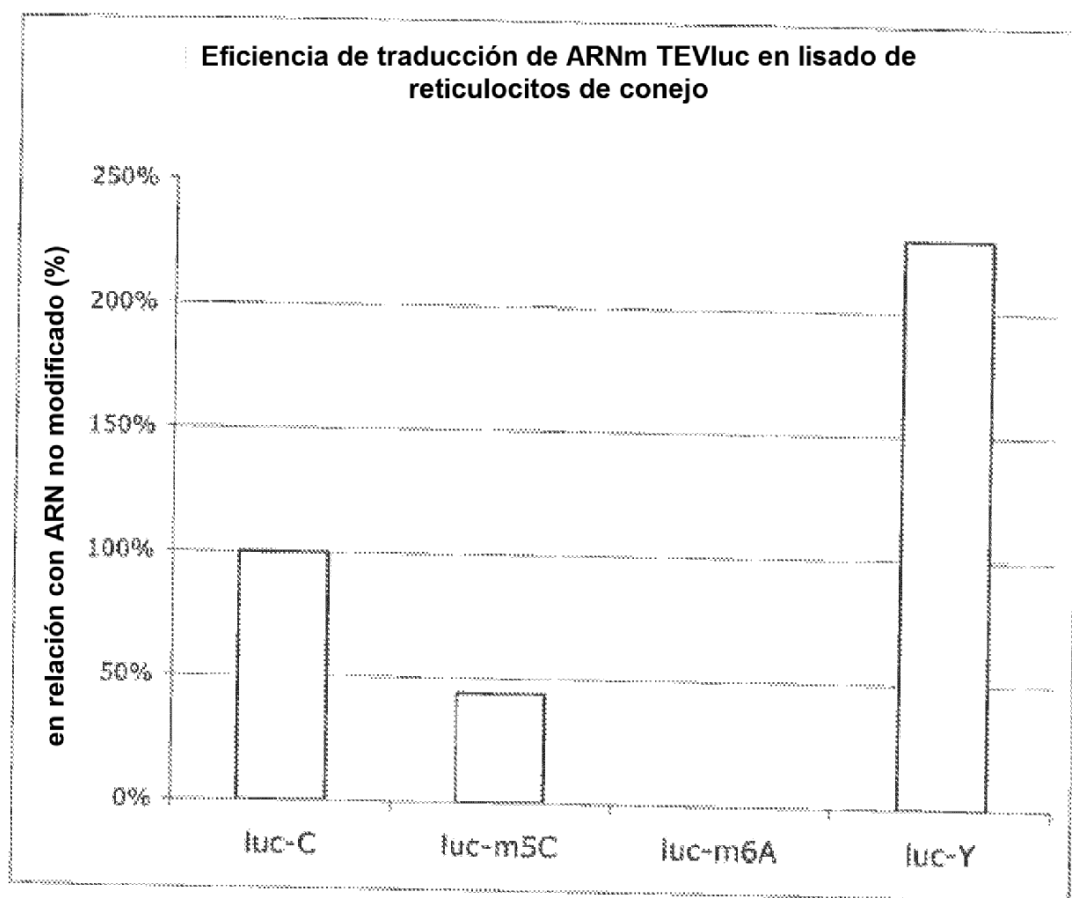
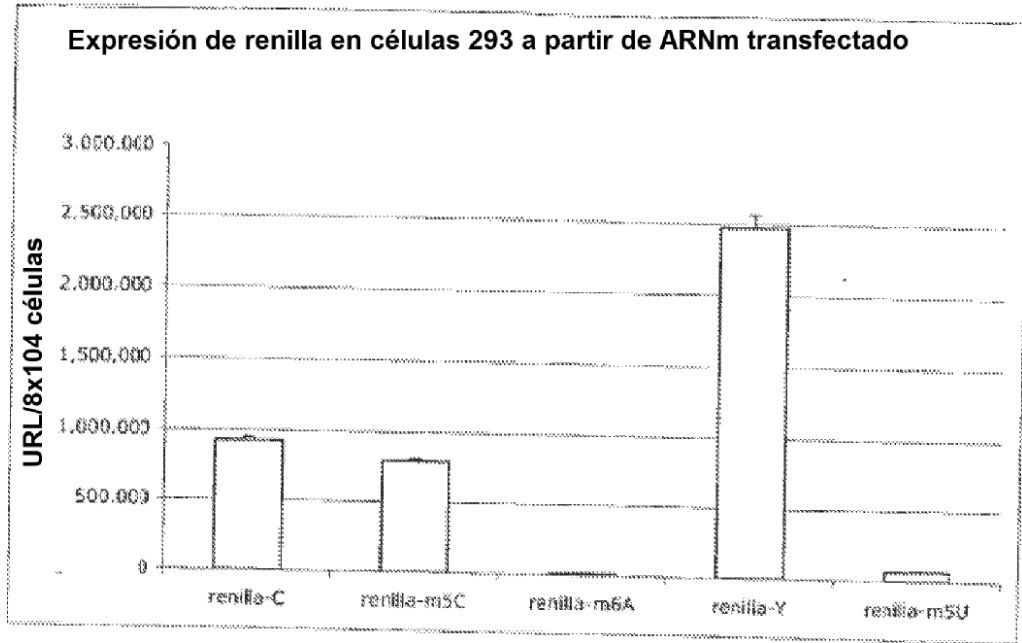
FIG. 14

FIG. 15

A.



B.

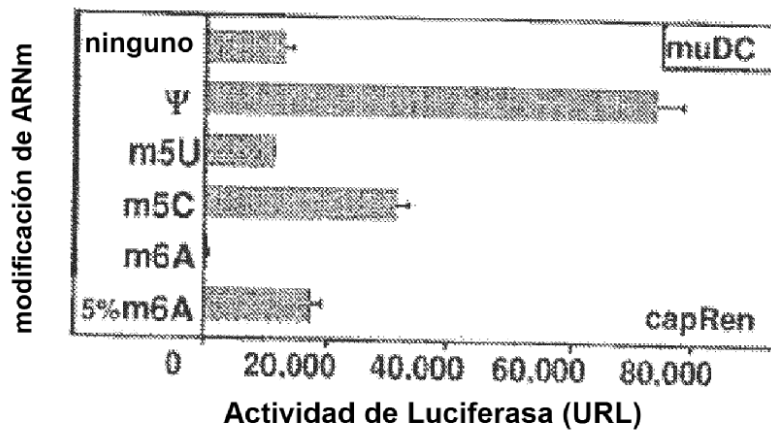


FIG. 16

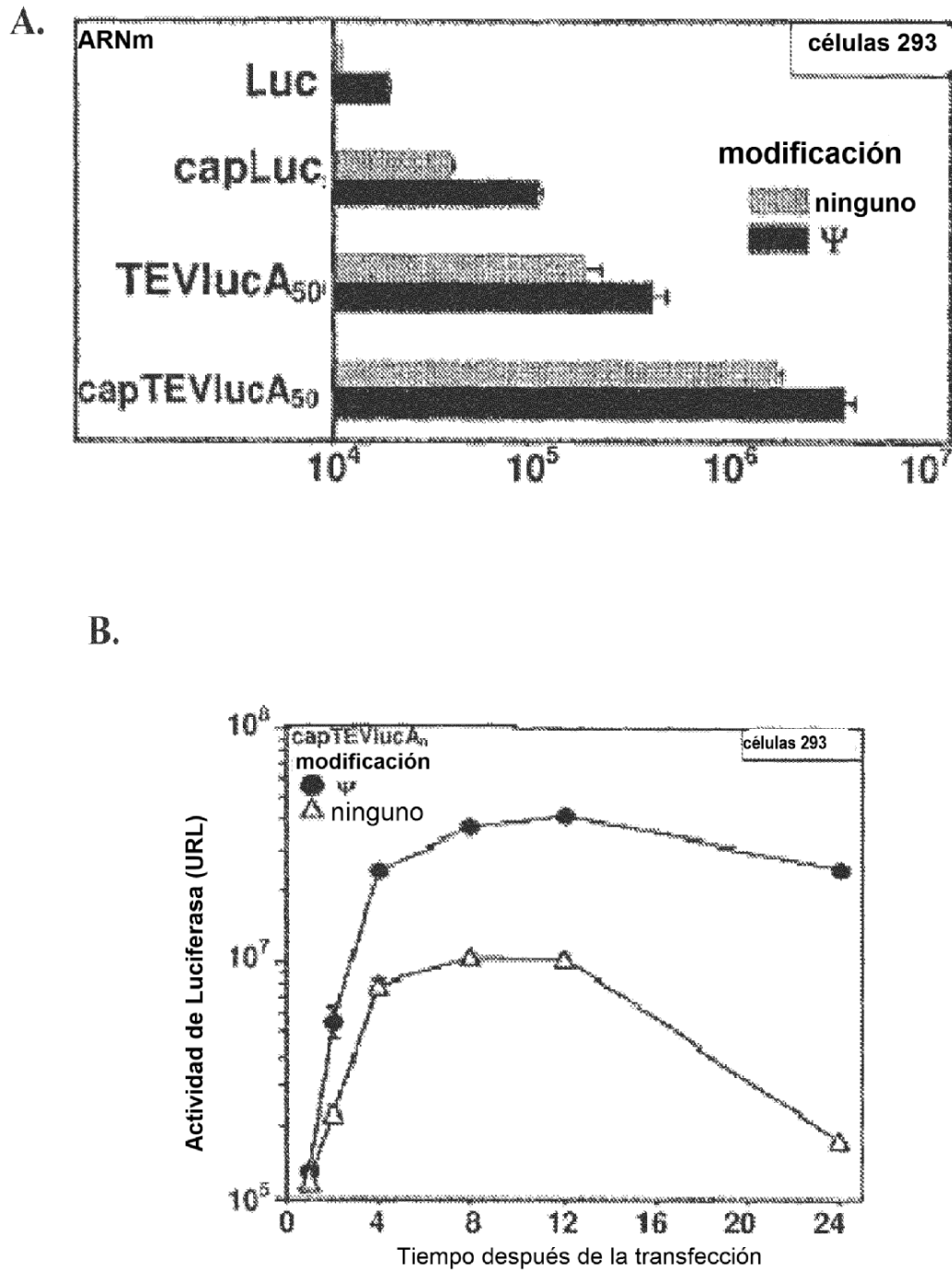


FIG. 16

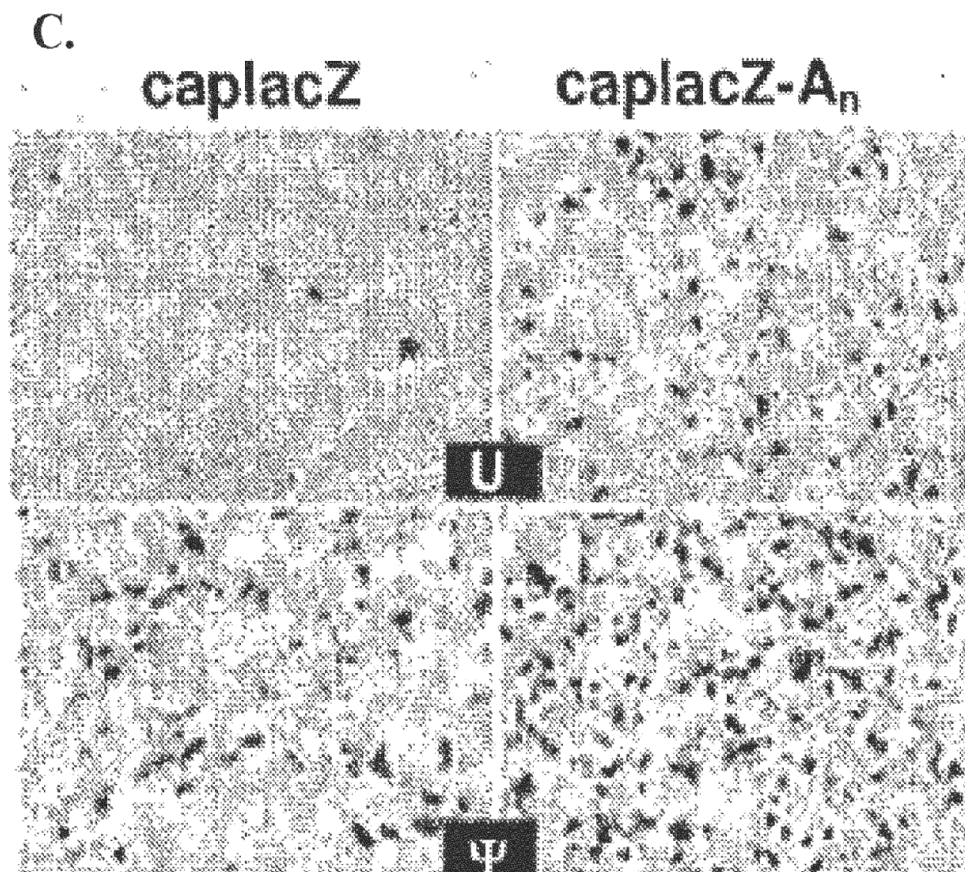


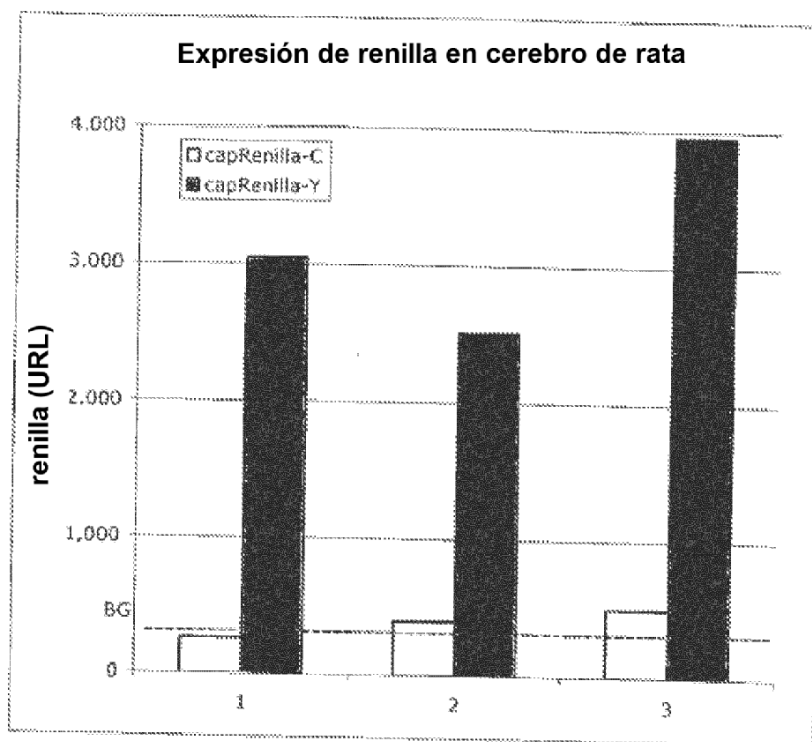
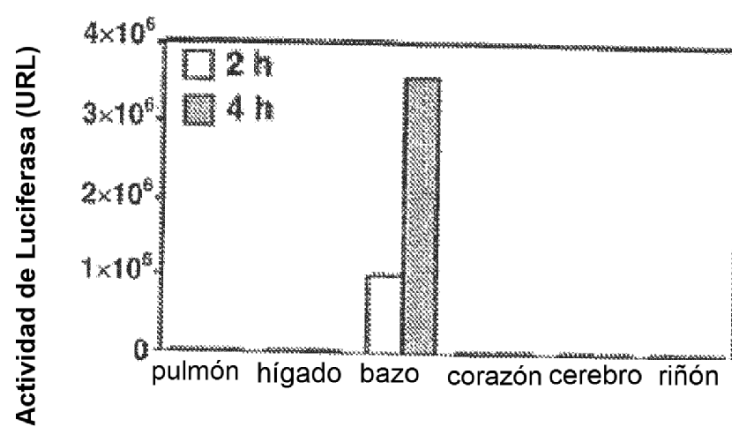
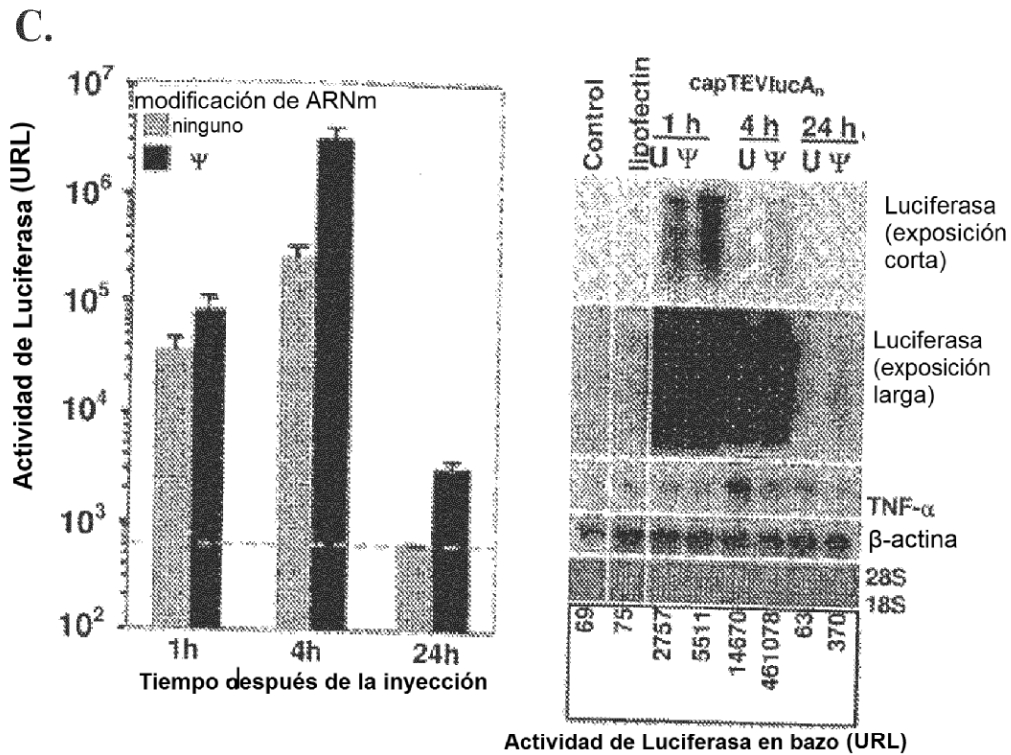
FIG. 17**A.****B.**

FIG. 17



D.

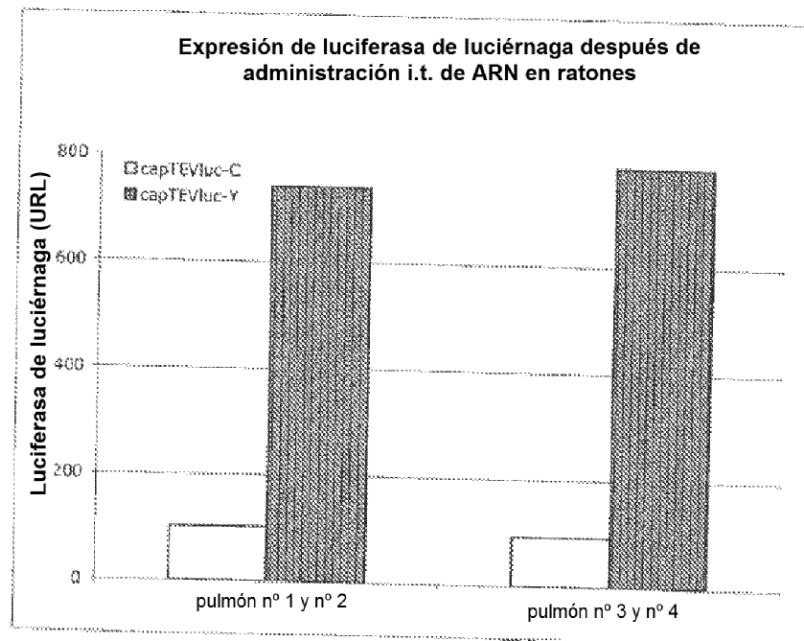


FIG. 18

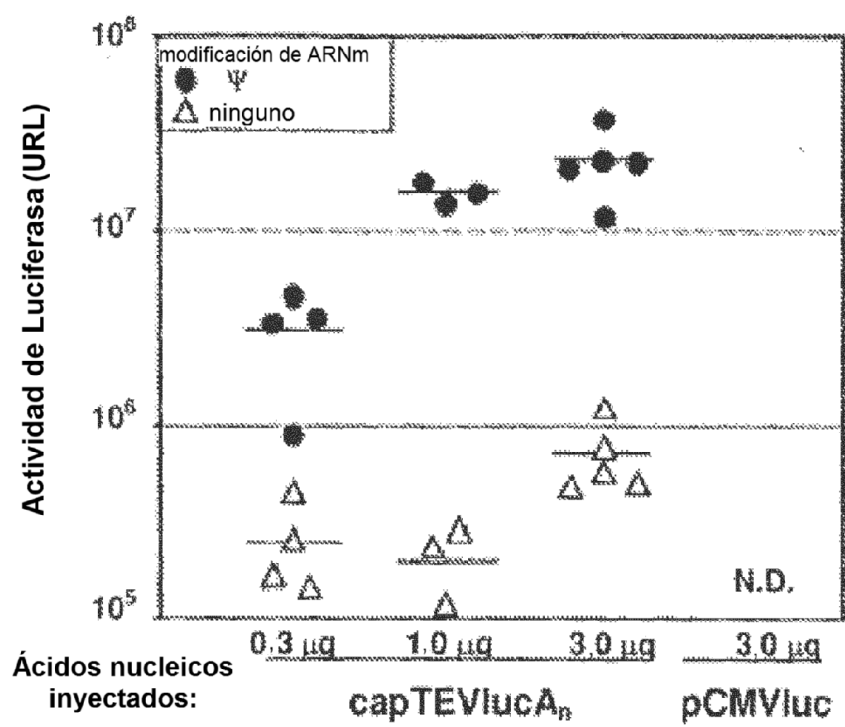


FIG. 19

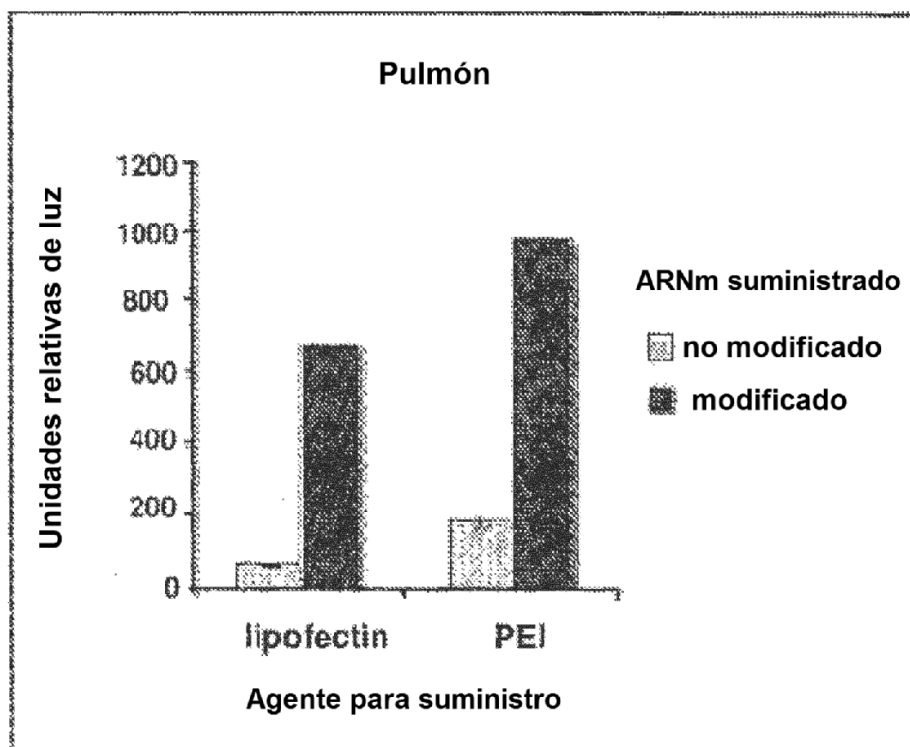


FIG. 20

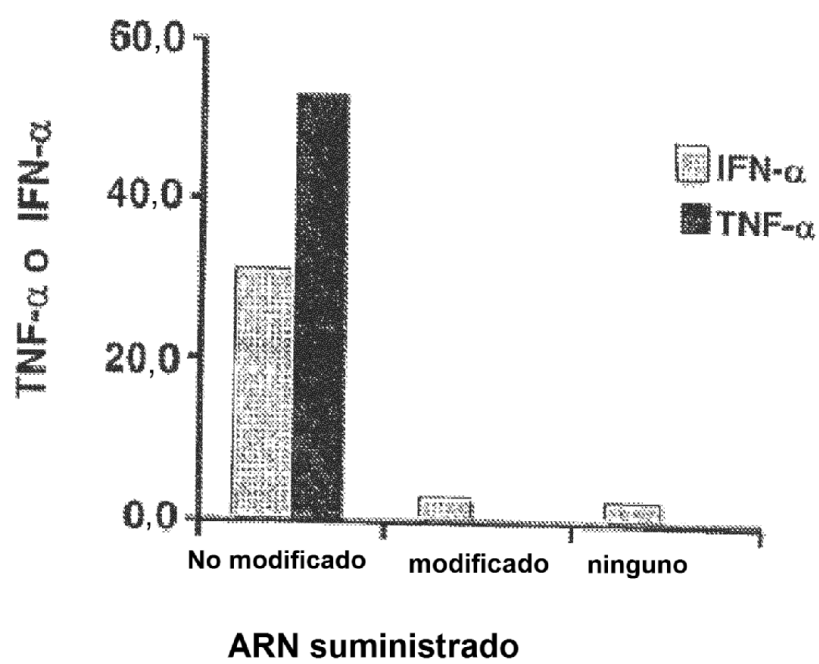


FIG. 21

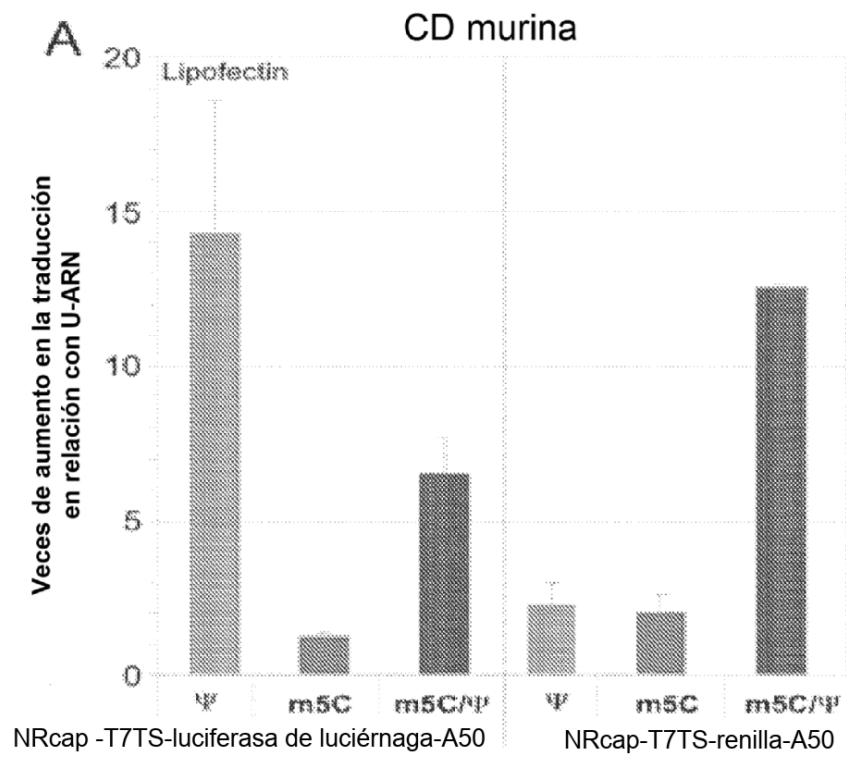


FIG. 21

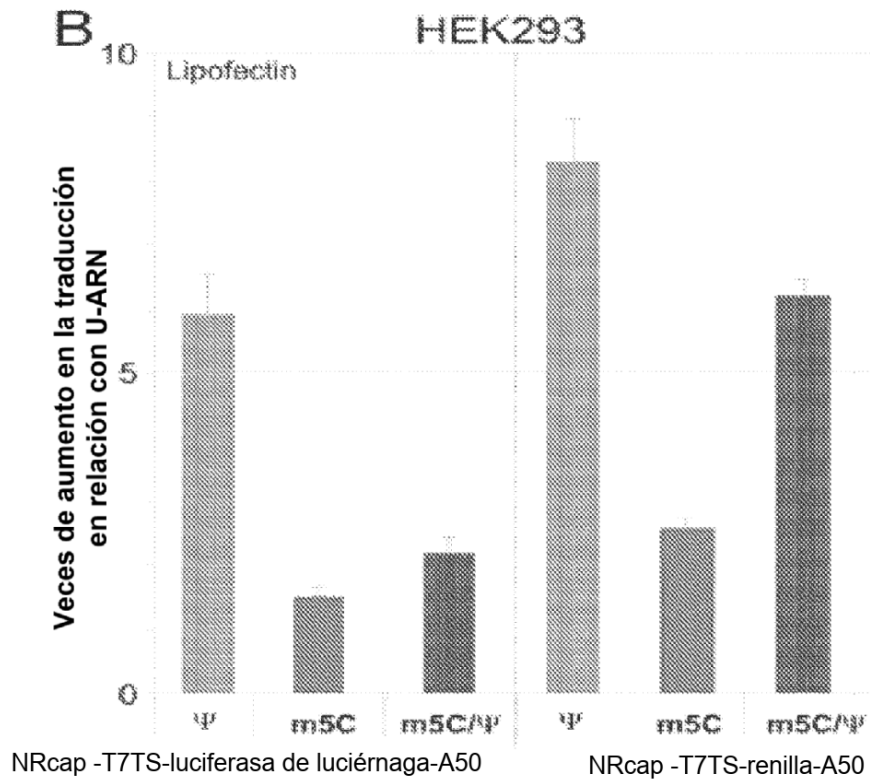


FIG. 21

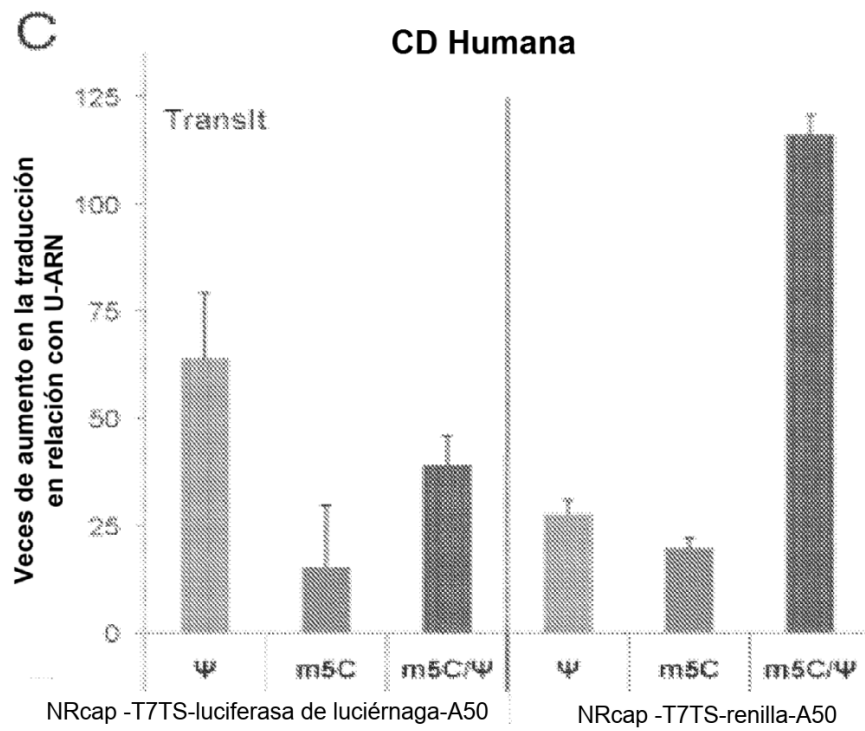


FIG. 22

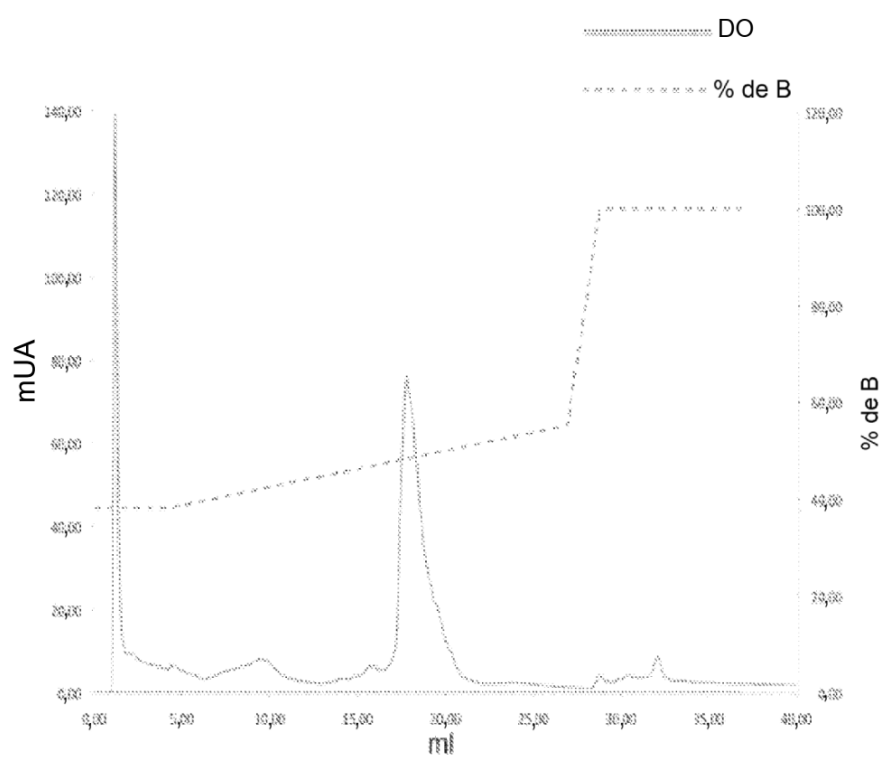


FIG. 23

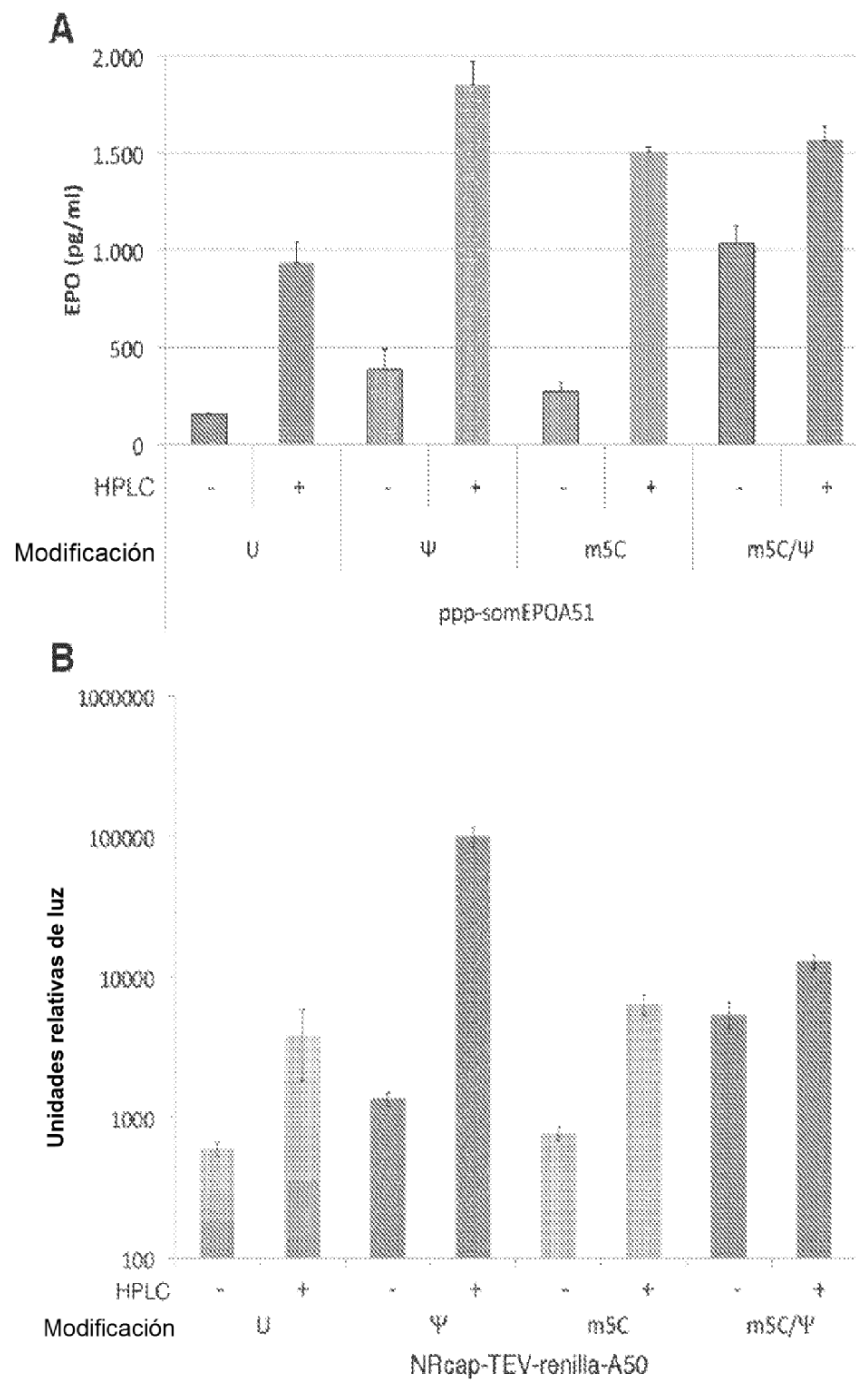


FIG. 24

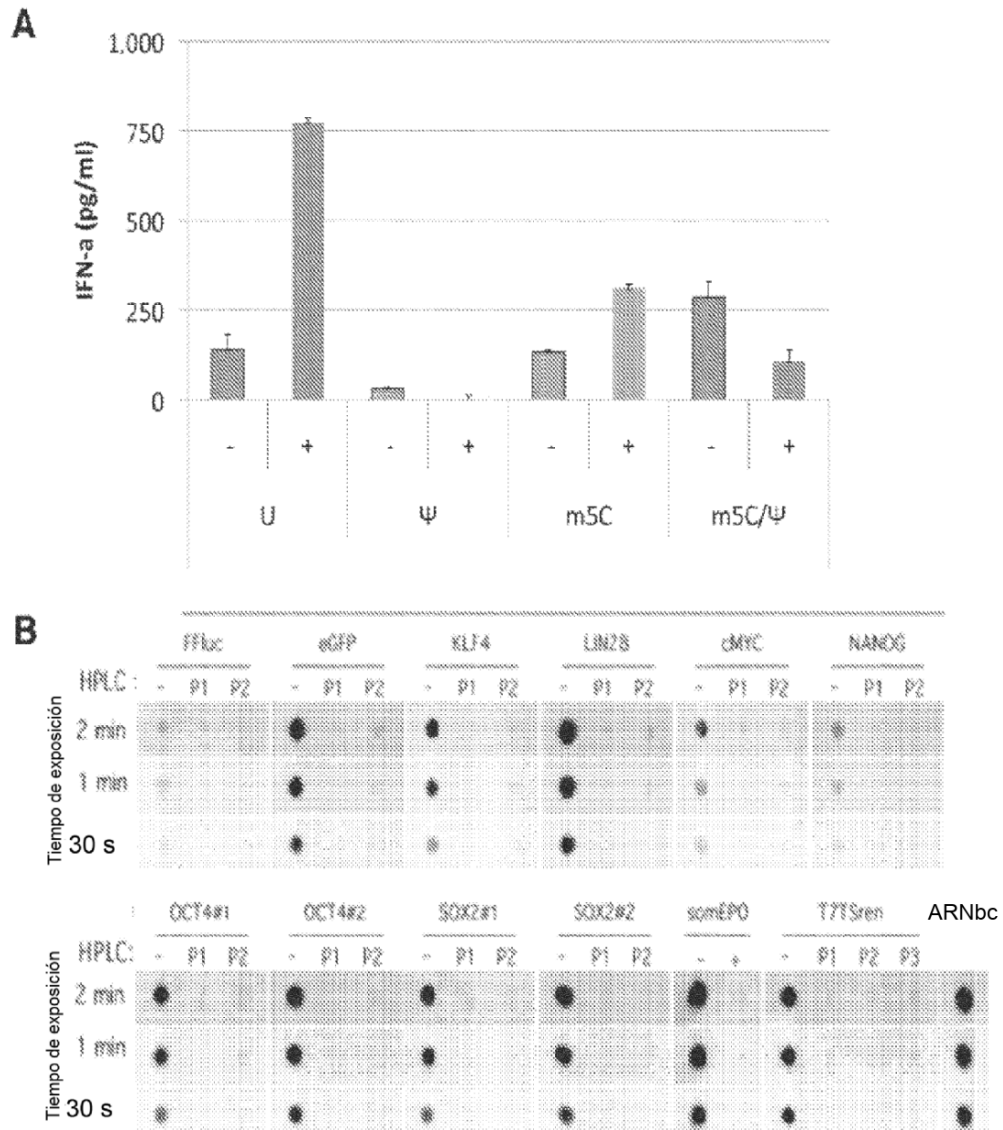


FIG. 24

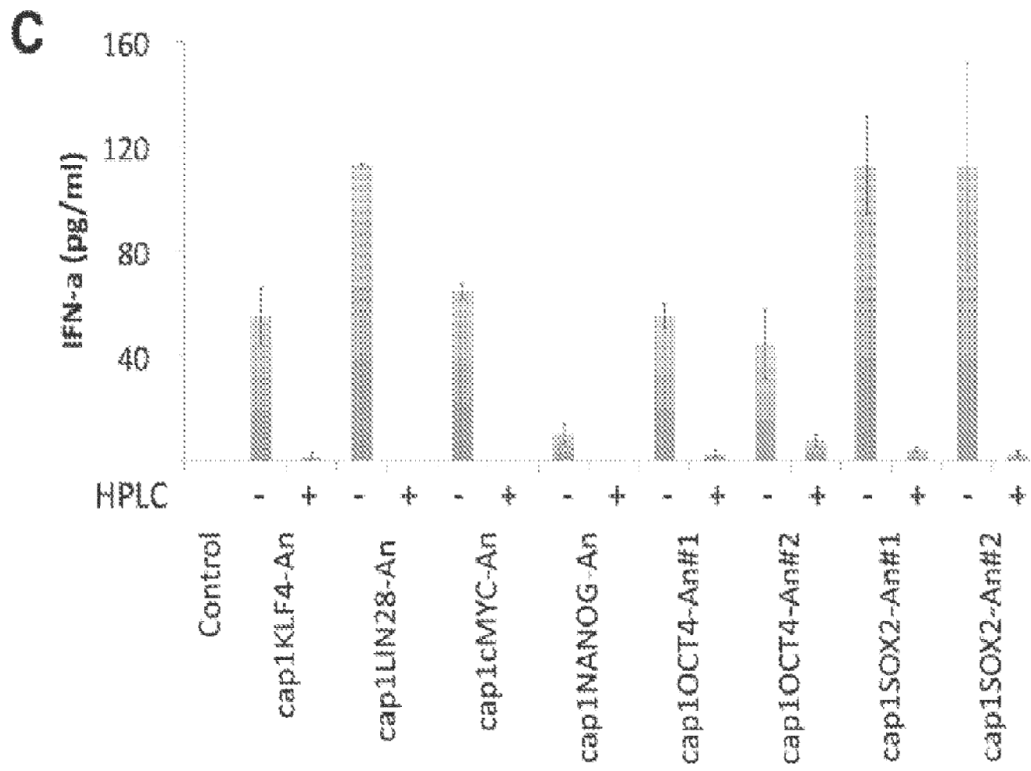


FIG. 25**Sdc del ARNm para KLF4 (SEQ ID NO: 12)**

5' AUGAGGCAGCCACCUGGCGAGUCUGACAUGGCUGUCAGCGACGCGCUGCUCCCAUCUUUCUC
CACGUUCGCGUCUGGCCCCGGCGGGAAGGGAGAAGACACUGCGUCAAGCAGGUGCCCCGAAUAAAC
CGCUGGCGGGAGGAGCUCUCCACAUAGAAGCGACUUCUCCCCAGUGCUUCCCGGCCGCCCUAUG
ACCUGGCGGGCGGCGACCGUGGCCACAGACCUGGAGAGCGGGCGGAGCCGGUGCGGCUUGCGGCGG
UAGCAACCJGGCGCCCCUACCUCGGAGAGAGACCAGGAGUUAACGAUCUCCUGGACCUGGAC
UUUAUUCUCUCCAAUUCGUGACCCAUCCUCCGGAGUCAGUGGCCGCCACCGUGUCCUCGUCAG
CGUCAGCCUCCUCUUCGUCGUCGCCGUCGAGCAGCGGCCUCCAGCGCGCCUCCACCUGCAG
CUUACCUAUUCCGAUCCGGGCGGGGAACGACCCGGGCGUGGCGCCGGGCGGCACGGGCGGAGGC
CUCCUCUAJGGCAGGGAGUCCGCUCCCCUCCGACGGCUCCUUAACCGGCGGACAUCAACG
ACGUGAGCCCCUCGGGCGGCUUCGUGGCCGAGCUCCUGCGGCCAGAAUUGGACCCGGUGUACA
UCCGCCGCGAGCAGCCGAGCCGCCAGGUGGCGGGCUGAUGGGCAAGUUCGUGCUGAAGGCGUCG
CUGAGCGCCCCUGGCAGCGAGUACGGCAGCCCGUCGGUUAUCAGCGUCAGCAAAGGCAGCCCU
ACGGCAGCCACCCGGUGGUGGUGGCGCCCUACAACGGCGGGCGCGCGCACGUGCCCCAAGAU
CAAGCAGGAGGCGGUCUCUUCGUGCAGCCACUUGGGCGCUGGACCCCUUCAGCAAUGGCCAC
CGGCCGCGCUGCACACGACUUCUCCCCUGGGGCGGCAGCUCCCCAGCAGGACUACCCCGACCCUGG
GUCUUGAGGAAGUGCUGAGCAGCAGGGACUGUCACCCUGCCUGCCGCUUCCUCCCGGCUUCCA
UCCCCACCCGGGGCCCAAUUACCAUCCUCCUGCCGAUCAGAUAGCAGCCGCAAGUCCCGCCG
CUCCAUAUACCAAGAGCUCUAGCCACCCGGUCCUGCAUGCCAGAGGAGCCCAAGCCAAAGAGGG
GAAGACGAJCGUGGCCCCGGAAGAGGACCGCCACCCACACUUGUGAUUACGCGGGCUGCGGCAA
AACCUACACAAAGAGUCCCAUCUCAAGGCACACCUUGCGAACCACACAGGUGAGAAACCUUAC
CACUGUGACUGGGACGGCUGUGGAUGGAAAUUCGCCCCGUCAGAUGAACUGACCAGGCACUACC
GUAAACACACGGGCGACCGCCCGUCCAGUGCCAAAAUUGCGACCGAGCAUUUCCAGGUCGGA
CCACCUCGCCUACACAUGAAGAGGCAUUUUUAA-3'

Sdc del ARNm para LIN28 (SEQ ID NO:13)

5' AUGGGCJCCGUGUCCAACCAGCAGUUUGCAGGUGGCUGCGCCAAGGCGGCAGAAGAGGCGCC
CGAGGAGGCGCCGAGGACGCGGCCGGGCGGCGGACGAGCCUCAGCUGCUGCACGGUGCGGGC
AUCUGUAAGUGGUUCAACGUGCGCAUGGGGUUCGGCUUCCUGUCCAUGACCGCCGCGCGGGG
UCGCGCUCGACCCCCAGUGGAUGUCUUUGUGCACCAGAGUAAGCUGCACAUUGGAAGGGUCCG
GAGCUUGAAGGAGGGUGAGGCAGUGGAGUUCACCUUUAAGAAGUCAGCCAAGGGUCUGGAAUCC
AUCCGUGUCACCGGACCUGGUGGAGUAUUCUGUAUUGGGAGUGAGAGGCGCCAAAAGGAAAGA
GCAUGCAGAAGCGCAGAUCAAAGGAGACAGGUGCUACAACUGUGGAGGUCUAGAUAUCAUGC
CAAGGAUGCAAGCUGCCACCCAGCCCAAGAAGUGCCACUUCUGCCAGAGCAUCAGCCAUUG
GUAGCCUCAUGUCCGCUGA-3'

FIG. 26

Sdc del ARNm para cMYC (SEQ ID NO:14)

5AUGGAUUUUUUCGCGUAGUGGAAAACAGCAGCCUCCCGCGACGAUGCCCCUCAACGUUAGC
UUCACCAACAGGAACUAUGACCUCGACUACGACUCGGUGCAGCCGUUUUUUACUGCGACGAGG
AGGAGAACUUCUACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGAGCUGCAGCCCCCGCGCGCCAGCGAGGAU
CUGGAAGAAAUCGAGCUGCUGCCCCACCCCGCCCCUGUCCCCUAGCCGCGCGCUCGCGGCUUCG
UCGCCCCUCCUACGUUGCGGUCACACCCUUCUCCCCUUCGGGGAGACAACGACGGCGGUGGCGGGA
GCUUUCUCCACGCGCGACCAGCUGGAGAUGGUGACCGAGCUGCUGGGAGGAGACAUGGUGAACCA
GAGUUUCAUCUGCGACCCGGACGACGAGACCUUCAUCAAAAAACAUCAUCAUCCAGGACUGUAUG
UGGAGCGGCUUCUCGGCGCGCGCCAAGCUCGUCUCAGAGAAGCUGGCCUCCUACCAGGCUGCGC
GCAAAGACAGCGGCAGCCCGAACCCCGCGCGCGGCCACAGCGUCUCGUCCACCUCACGCUUGUA
CCUGCAGGAUCUGAGCGCCGCGCCGCUUCAGAGUGCAUCGACCCUUCGGUGGUUCUCCCCUACCCU
CUCAACGACAGCAGCUCGCCCCAAGUCCUGCGCCUCGCAAGACUCCAGCGCCUUCUUCUCCGUCCU
CGGAUUCUCUGCUCUCCUCGACGGAGUCCUCCCCGCGAGGGCAGCCCCGAGCCCCUGGUGCUCCA
UGAGGAGACACCGCCCCACCACCAGCAGCGACUCUGAGGAGGAACAAGAAGAUAGGAAGAAAUC
GAUGUUGUUUCUGUGGAAAAGAGGCAGGCUCUUGGCAAAAGGUCAGAGUCUGGAUCACCUUCUG
CUGGAGGCCACAGCAAACCUCCUACAGCCCCACUGGUCCUCAAGAGGUGCCACGUCUCCACACA
UCAGCACAACUACGACGCGCCUCCUCCACUCGGAAGGACUAUCCUGCUGCCAAGAGGGUCAAG
UUGGACAGUGUCAGAGUCCUGAGACAGAUACGCAACAACCGAAAAUGCACCAGCCCCAGGUCCU
CGGACACCGAGGAGAAUGUCAAGAGGCGAACACACAACGUCUUGGAGCGCCAGAGGAGGAACGA
GCUAAAACGGAGCUUUUUUGCCUGCGUGACCAGAUCCCGGAGUUGGAAAACAUGAAAAGGCC
CCCAAGGUAGUUAUCCUAAAAAAGCCACAGCAUACAUCCUGUCCGUCCAAGCAGAGGAGCAAA
AGCUCAUUUUCUGAAGAGGACUUGUUGCGGAAACGACGAGAACAGUUGAAACACAAACUUGAACA
GCUACGGAACUCUUGUGCGUAA-3'

Sdc del ARN m para NANOG (SEQ ID NO:15)

5' -

AUGAGUGUGGAUCCAGCUUGUCCCCAAAGCUUGCCUUGCUUUGAAGCAUCCGACUGUAAAGAAU
CUUCACCUAUGCCUGUGAUUUGUGGGCCUGAAGAAAACUAUCCAUCCUUGCAAUGUCUUCUGC
UGAGAUGCCUCACACAGAGACUGUCUCUCCUCUCCUCCUCCAUGGAUCUGCUUAUUCAGGAC
AGCCCUGAUUCUUCACCAGUCCCCAAAGGCAAACAACCCACUUCUGCAGAGAAUAGUGUCGCAA
AAAAGGAAGACAAGGUCCCGUCAAGAAACAGAAGACCAGAACUGUGUUCUCUCCACCCAGCU
GUGUGUACUCAAUGAUAGAUUUCAGAGACAGAAAUACCUCAGCCUCCAGCAGAUGCAAGAACUC
UCCAACAUCCUGAACCUCAGCUACAAACAGGUGAAGACCUGGUUCCAGAACCAGAGAAUGAAAU
CUAAGAGGUGGCAGAAAAACAACUGGCCGAAGAAUAGCAAUGGUGUGACGCAGAAGGCCUCAGC
ACCUACCUACCCAGCCUCUACUCUCCUACCACCAGGGAUGCCUGGUGAACCCGACUGGGAAC
CUUCCAAUGUGGAGCAACCAGACCUGGAACAAUUCAACCUGGAGCAACCAGACCCAGAACAUC
AGUCCUGGAGCAACCACUCCUGGAACACUCAGACCUGGUGCACCCAAUCCUGGAACAAUCAGGC
CUGGAACAGUCCCUUCUAUAACUGUGGAGAGGAAUUCUCUGCAGUCCUGCAUGCACUCCAGCCA
AAUUCUCCUGCCAGUGACUUGGAGGCUGCCUUGGAAGCUGCUGGGGAAGGCCUUAUGUAAUAC
AGCAGACCACUAGGUUUUUAGUACUCCACAAACCAUGGAUUUAUCCUAAACUACUCCAUGAA
CAUGCAACCUGAAGACCGUGUGA-3'

FIG. 27**Sdc del ARNm para OCT4 (SEQ ID NO:16)**

5' -

AUGGCGGGACACCUGGCUUCAGAUUUUGCCUUCUCGCCCCCUCAGGUGGUGGAGGUGAUGGGC
 CAGGGGGGCGCGAGCCGGGCUGGGUUGAUCCUCGGACCUGGCUAAGCUUCCAAGGCCCUCUGG
 AGGGCCAGGAAUCGGGCGGGGGUUGGGCCAGGCUCUGAGGUGUGGGGGAUCCCCCAUGCCCC
 CCGCCGUAJGAGUUCUGUGGGGGGAUGGCGUACUGUGGGCCCCAGGUUGGAGUGGGGCUAGUGC
 CCCAAGGCGGCUCUGGAGACCUCUCAGCCUGAGGGCGAAGCAGGAGUCGGGGUGGAGAGCAACUC
 CGAUGGGGGCCUCCCCGGAGCCCGCACCUGACCCCCUGGUGCCGUGAAGCUGGAGAAGGAGAAG
 CUGGAGCAAAACCCGGAGGAGUCCCAGGACAUCAAAGCUCUCGAGAAAGAACUCGAGCAAUUUG
 CCAAGCUCCUGAAGCAGAAGAGGAUACCCUGGGGAUUAACACAGGCCGAUGUGGGGCUCACCCU
 GGGGUUCJAUUUGGGAAGGUAUUCAGCCAAACGACCAUCUGCCGCUUUGAGGCUCUGCAGCUU
 AGCUUCAAGAACAUGUGUAAGCUGCGGCCCCUUGCUGCAGAAGUGGGUGGAGGAAGCUGACAACA
 AUGAAAUCUUCAGGAGAUUGCAAAGCAGAAACCCUCGUGCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGAAC
 CAGUAUCGAGAACCAGUGAGAGGCAACCUGGAGAAUUUGUUCUGCAGUGCCCCGAAACCCACA
 CUGCAGCAGAUACAGCCACAUCGCCAGCAGCUUGGGCUCGAGAAGGAUGUGGUCCGAGUGUGGU
 UCUGUAACCGGCGCCAGAAGGGCAAGCGAUCAAGCAGCGACUAUGCACAACGAGAGGAUUUUGA
 GGCUGCUGGGUCUCCUUUCUCAGGGGGACCAGUGUCCUUUCCUCUGGCCCCAGGGCCCCAUUUU
 GGUACCCCAGGCUAUGGGAGCCUCACUUCACUGCACUGUACUCCUCGGUCCCUUCCCUGAGG
 GGGAAGCCJUUCCCCCUGUCUCUGUCACCACUCUGGGCUCUCCAUGCAUUCAAACUGA-3'

Sdc del ARNm para SOX2 (SEQ ID NO:17)

5' -

AUGUACAACAUGAUGGAGACGGAGCUGAAGCCGCCGGGGCCGCAGCAAACUUCGGGGGGCGGCG
 GCGGCAACJCCACCGCGGCGGCGGCGGCGGCAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGCGUCAAGCG
 GCCAUGAAGGCCUUAUGGUGUGGUCCCCGCGGGCAGCGGCGCAAGAUGGCCCCAGGAGAACCCC
 AAGAUGCACAACUCGGAGAUACAGCAAGCGCCUGGGCGCCGAGUGGAAACUUUUGUCGGAGACGG
 AGAAGCGGCGGUUAUCGACGAGGCUAAGCGGCUGCGAGCGCUGCACAUGAAGGAGCACCCGGA
 UUAUAAAUAACCGCCCCGGCGGAAAACCAAGACGCUCAUGAAGAAGGAUAAGUACACGCUGCCC
 GGCGGGCUGCUGGCCCCCGGCGGCAUAGCAUGGCGAGCGGGUCGGGGUGGGCGCCGGCCUGG
 GCGCGGGCGUGAACCAGCGCAUGGACAGUUAACGCGCACAUGAACGGCUGGAGCAACGGCAGCUA
 CAGCAUGAJGCAGGACCAGCUGGGCUACCCCGCAGCACCCGGGCCUCAAUGCGCACGGCGCAGCG
 CAGAUAGCAGCCCAUGCACCGCUACGACGUGAGCGCCUGCAGUACAACUCCAUGACCAGCUCGC
 AGACCUACAUGAACGGCUCGCCCACCUACAGCAUGUCCUACUCGAGCAGGGCACCCUGGCAU
 GGCUCUUGGCUCCAUGGGUUCGGUGGUCAAGUCCGAGGCCAGCUCAGCCCCCUGUGGUUACC
 UCUUCCUCCACUCCAGGGCGCCUGCCAGGCCGGGGACCUCGGGACAUGAUCAGCAUGUAUC
 UCCCCGGCGCCGAGGUGCCGGAACCCGCCGCCCCAGCAGACUUCACAUGUCCAGCACUACCA
 GAGCGGCGCGGUGCCCGGCACGGCAUUAACGGCACACUGCCCCUCACACAUGUGA-3'

FIG. 28

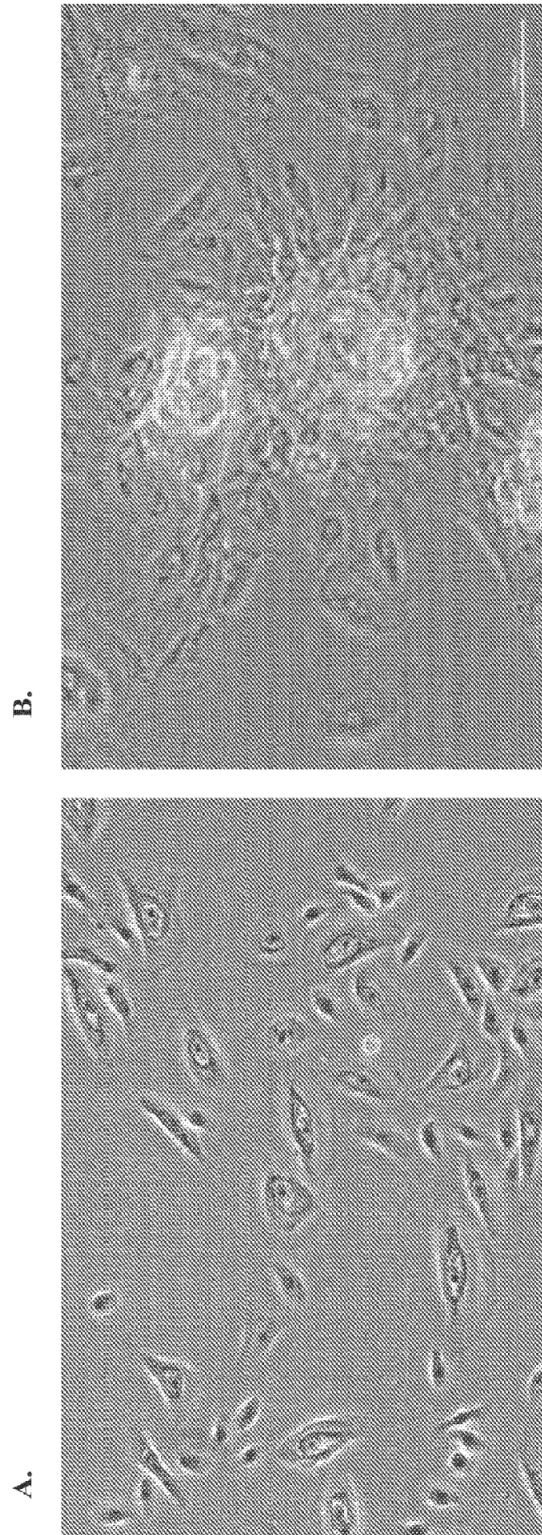


FIG. 28

C:

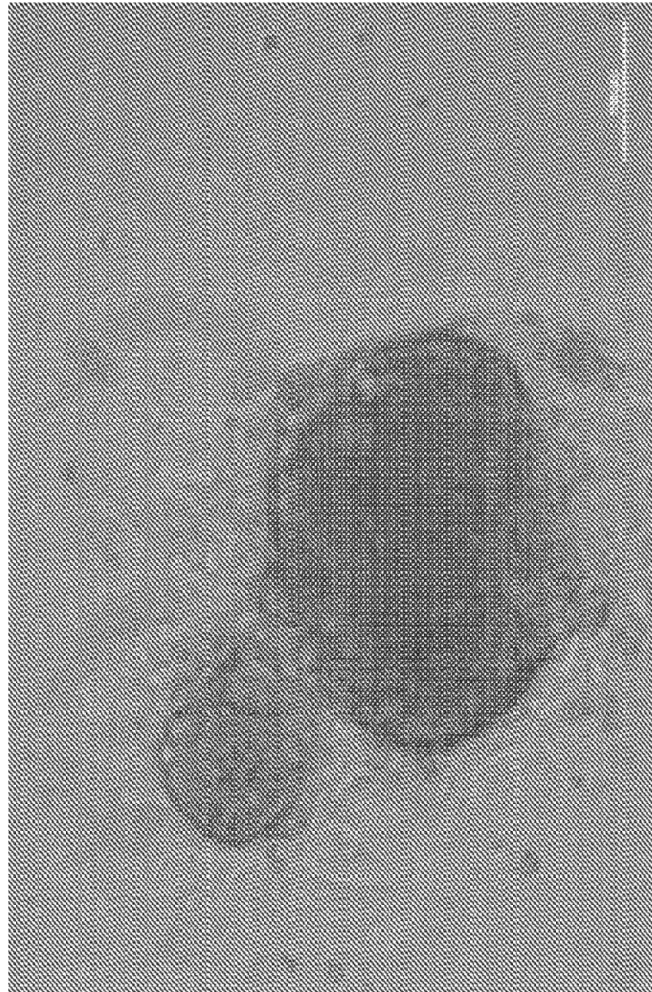
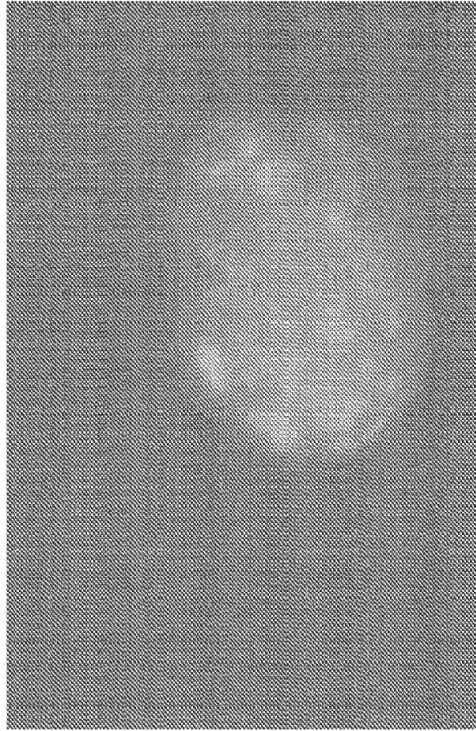


FIG. 29

B.



A.

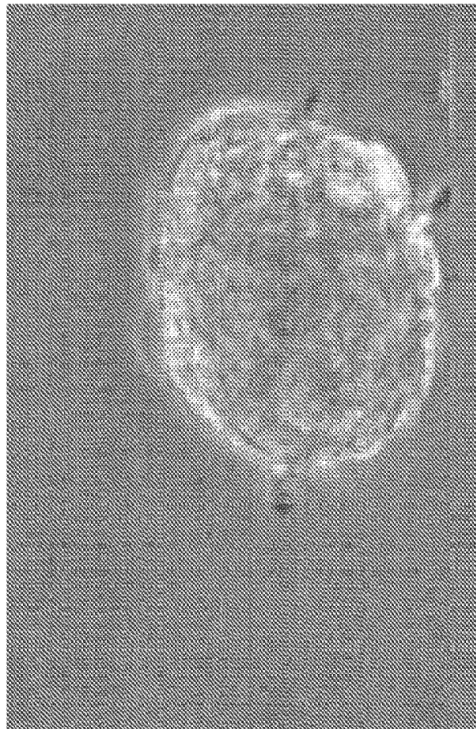


FIG. 29

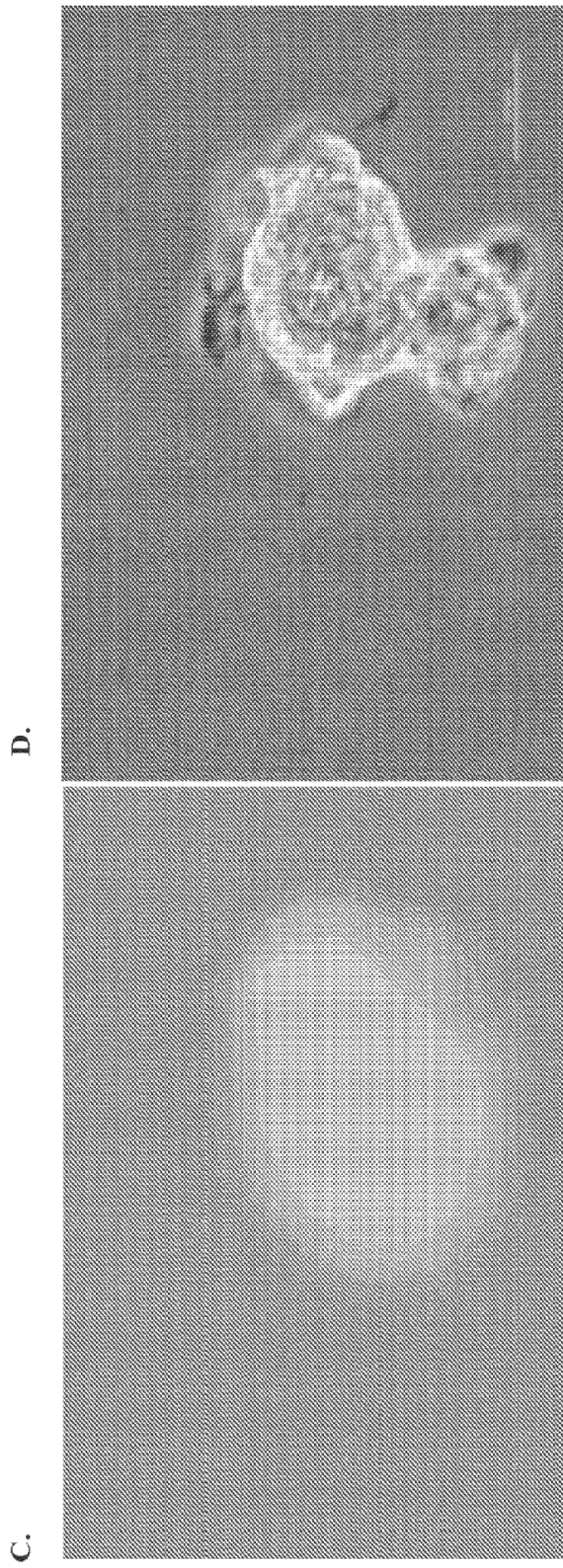


FIG. 29

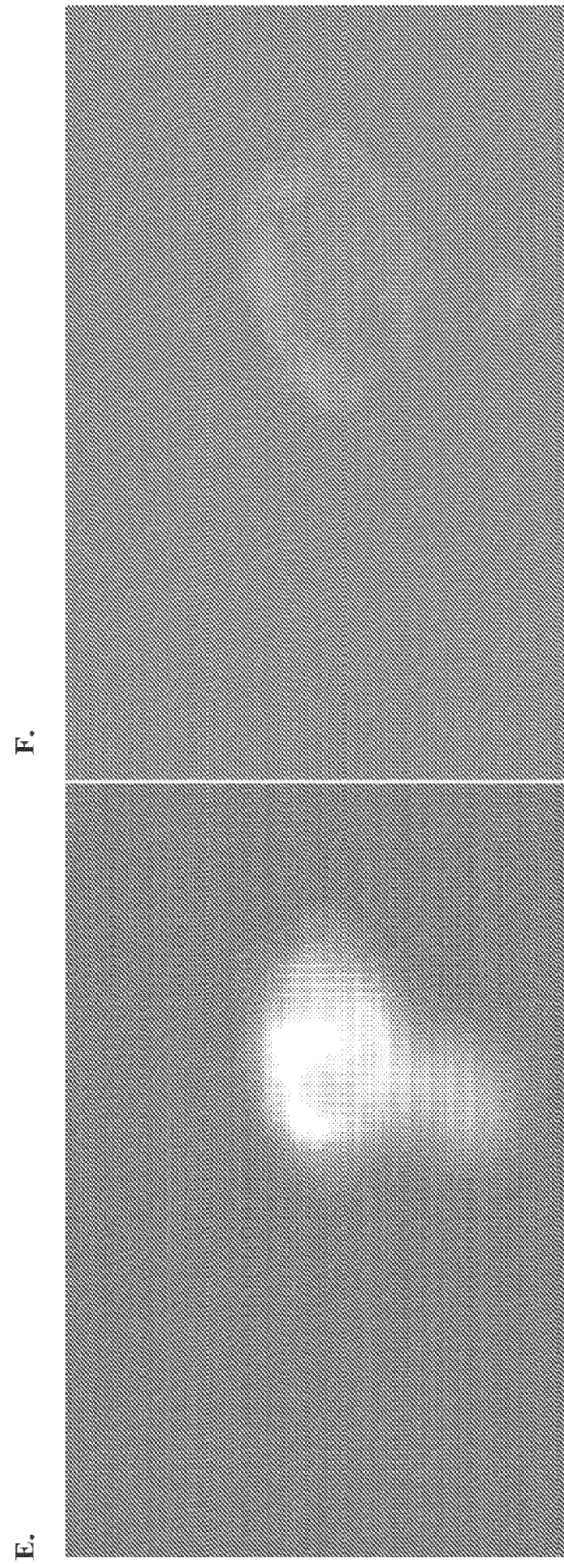


FIG. 29

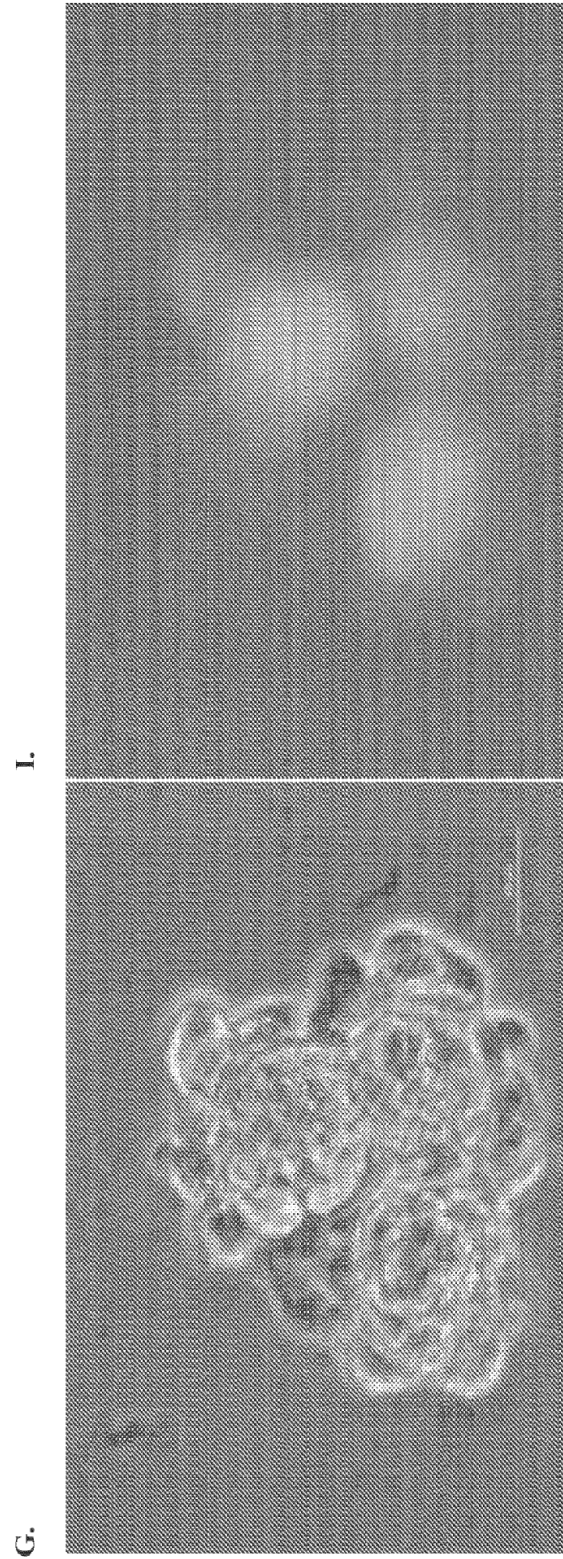


FIG. 30